HAL
open science

Métabolisme énergétique et traitements anticancéreux : caractérisation des effets de la Δ2-troglitazone et du 2-désoxyglucose sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires

Audrey Berthe

To cite this version:

Audrey Berthe. Métabolisme énergétique et traitements anticancéreux : caractérisation des effets de la Δ2-troglitazone et du 2-désoxyglucose sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires. Biologie cellulaire. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0082 . tel-01755224

HAL Id: tel-01755224

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01755224

Submitted on 12 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Audrey BERTHE**

« Métabolisme énergétique et traitements anticancéreux : caractérisation des effets de la Δ2-troglitazone et du 2-désoxyglucose sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires »

Le 10 Juillet 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Mme Corinne ABBADIE**	**Professeur, Institut de Biologie de Lille, Lille**
	M. Jérôme KLUZA	**Docteur, INSERM UMR-S 1172, Lille**
Examinateurs :		
	M. Jean-Yves JOUZEAU	**Professeur, UMR 7365 CNRS-UL, Nancy**
	Mme Annie BORGNE-SANCHEZ	**Docteur, Mitologics SAS, Paris**
	M. Stéphane FLAMENT	**Professeur, CRAN UMR 7039 CNRS-UL, Nancy directeur de thèse**
	Mme Sabine MAZERBOURG	**Docteur, CRAN UMR 7039 CNRS-UL, Nancy co-directeur de thèse**

CRAN (Centre de Recherche en Automatique de Nancy), UMR 7039 CNRS-Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, 54506 Vandoeuvre-Lès-Nancy

REMERCIEMENTS

« L'avenir appartient à ceux qui croient en la beauté de leurs rêves. »
Eleanor Roosevelt

Réaliser une thèse n'est pas facile. Certains moments sont teintés de joie, tandis que d'autres sont plus difficiles. J'ai parfois douté de ne pas réussir à terminer cette thèse. Mais durant ces quatre années, vous m'avez encadrée, accompagnée et soutenue. Et finalement, j'y suis arrivée. Alors un grand merci à chacun d'entre vous !

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Corinne Abbadie, M. Jérôme Kluza et Mme Annie Borgne-Sanchez d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et de juger mon travail. Merci également à M. Jean-Yves Jouzeau qui a suivi l'avancée de mes travaux durant ces quatre années et qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie tout naturellement Stéphane Flament et Sabine Mazerbourg qui m'ont encadrée tout au long de cette thèse et m'ont beaucoup apporté tant sur le plan scientifique qu'humain. Merci pour vos conseils, votre enthousiasme et votre bienveillance à mon égard. Vous n'avez cessé de m'encourager et de me conseiller. Je suis heureuse d'avoir été votre thésarde et je n'oublierai pas ces nombreux moments de complicité et de rire partagés pendant quatre ans.

Je remercie également l'ensemble des personnes qui ont collaboré à la réalisation de cette thèse :

- merci à Michel Boisbrun pour son enthousiasme, sa bonne humeur et sa disponibilité. Merci d'avoir partagé ton expérience et ton savoir-faire. Nos discussions autour d'un thé ont toujours été très enrichissantes.
- à Frédéric Bost d'avoir accepté de suivre mon travail durant cette thèse. Merci également pour votre aide technique et vos conseils très précieux, qui m'ont beaucoup aidée lors de mes premiers pas dans l'étude du métabolisme.
- à François Foulquier et Marine Houdou pour leur aide technique et scientifique. Merci d'avoir consacré du temps pour l'étude des effets du 2-désoxyglucose sur la N-glycosylation des protéines.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire CRAN, et en particulier ceux du département SBS, qui grâce à leurs remarques constructives pendant les séminaires, m'ont permis de prendre du recul sur mon travail et de mieux appréhender les résultats de cette thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe SticMo qui ont été à mes côtés pendant ces quatre ans. Merci pour vos sourires, votre joie de vivre et les nombreux échanges que nous avons eus. Vos conseils et vos encouragements ont toujours été d'un grand réconfort.

Merci à Sandra, Isabelle et Hélène qui m'ont toujours encouragée et soutenue. Merci pour ces moments passés autour d'un café (et parfois d'un gâteau) et nos nombreuses discussions. Je remercie également Stéphanie qui m'a accompagnée pour mes débuts dans l'enseignement et n'a cessé de m'apporter son expérience. Merci d'avoir partagé mes galères de métabolisme et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles. Je remercie aussi Philippe, Nadège, Catherine, Lionel et Amand pour leur convivialité. Merci à Vanessa et Emilie pour leur aide technique et leur bonne humeur. Votre joie de vivre et vos encouragements m'ont beaucoup aidée.

Je pense aussi à Guillaume, Claire, Charlène et Alexis, qui suivent le même chemin que moi. Claire et Charlène, je vous souhaite bon vent pour votre thèse. Que la réussite soit à vos côtés ! Bonne continuation à toi aussi Alexis ! Et merci Guillaume, pour ton aide et ta bienveillance durant mes premiers pas dans l'enseignement. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse ! Je n'oublie pas non plus Claire Barbieux qui est maintenant docteure. Merci pour tes conseils, ton enthousiasme et tes encouragements.

Je remercie Marie pour son aide, son investissement et nos nombreuses discussions. Je n'oublierai pas tous ces moments de complicité que nous avons partagés et notre complémentarité dans les manips. Je te souhaite beaucoup de réussite Marie car tu le mérites amplement !

Je tiens à remercier mes deux « camarades de bureau » Marine et Alexandra, avec qui j'ai partagé tellement de bons moments. Merci Marine pour ta bonne humeur et tes encouragements. Je n'oublierai pas nos virées à Strasbourg. Merci à toi Alex, qui m'a tant encouragée et soutenue pendant ces quatre années. Merci de m'avoir redonné le goût du sport! Si j'avais une baguette magique, je t'emmènerais avec moi dans le prochain labo où j'irai.

Je remercie l'ensemble de ma famille, de ma belle-famille et mes amis qui ont toujours été à mes côtés, m'ont encouragée et n'ont cessé de me soutenir. Merci en particulier à mes parents et mon frère qui ont été mon point de repère pendant toutes ces années. Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer ma gratitude envers vous.

Enfin, ces derniers mots sont pour toi, Raphaël. Tout ce que je pourrais écrire n'est rien à côté de tout le bonheur et la joie que tu m'apportes chaque jour. Que la vie continue à m'offrir cette chance d'être à tes cotés.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **1**

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CANCER DU SEIN 7

1. Structure et développement du sein 7

2. La carcinogenèse mammaire 8

3. Epidémiologie et facteurs de risque 11
   3.1 Epidémiologie du cancer du sein 11
   3.2 Facteurs de risque associés au cancer du sein 12

4. Classification des tumeurs mammaires 14
   4.1 La classification histologique 14
   4.2 La classification anatomopathologique 15
   4.3 La classification moléculaire 17

5. Les stratégies thérapeutiques dans le cancer du sein 18
   5.1 La chirurgie 18
   5.2 La radiothérapie 19
   5.3 La chimiothérapie 20
   5.4 L'hormonothérapie 22
   5.5 Les thérapies ciblées 23
   5.6 Limites des stratégies thérapeutiques du cancer du sein 24

II. METABOLISME ENERGETIQUE ET CANCER 26

1. Le métabolisme énergétique d'une cellule non cancéreuse 26
   1.1 Présentation du métabolisme cellulaire et énergétique 26
   1.2 Les substrats du métabolisme énergétique 27
   1.3 Les transporteurs d'énergie dans le métabolisme énergétique 27
   1.4 La glycolyse 28
      1.4.1 Mécanisme et rendement de la glycolyse 28
      1.4.2 Destin du pyruvate en conditions aérobies et anaérobies 29
      1.4.3 Contribution de la glycolyse aux processus de biosynthèse 30
      1.4.4 Régulation de la glycolyse 30
   1.5 Le métabolisme mitochondrial 31
      1.5.1 La structure de la mitochondrie 31
         1.5.1.1 Les membranes externe et interne de la mitochondrie 31
         1.5.1.2 La matrice 32
      1.5.2 Le cycle de Krebs 33
         1.5.2.1 Mécanisme et rendement du cycle de Krebs 33
         1.5.2.2 Régulation du cycle de Krebs 34
      1.5.3 La phosphorylation oxydative 35

1.5.3.1 Transport des électrons dans la chaîne respiratoire *35*
1.5.3.2 Couples redox et réactions d'oxydoréduction dans la chaîne respiratoire *37*
1.5.3.3 Gradient électrochimique à travers la membrane interne *37*
1.5.3.4 Synthèse de l'ATP par l'ATP synthase *38*
1.5.3.5 Rendement énergétique à l'issue de la phosphorylation oxydative *39*
1.5.3.6 Régulation de la phosphorylation oxydative *40*
1.5.3.6.1 Régulation du taux de synthèse d'ATP 40
1.5.3.6.2 Régulation de l'efficacité du couplage 41
1.5.3.6.3 Modifications post-traductionnelles des protéines des complexes respiratoires 43
1.5.3.6.4 Fusion et fission mitochondriales 43
1.5.3.6.5 La biogenèse des mitochondries 44
1.5.4 Autres processus cellulaires associés à la mitochondrie *45*
1.5.4.1 Production d'espèces réactives de l'oxygène *45*
1.5.4.2 L'apoptose *47*
1.5.4.3 La signalisation calcique *49*

2. Le métabolisme énergétique d'une cellule cancéreuse 50
2.1 Présentation de l'effet Warburg 50
2.2 Les avantages de l'effet Warburg pour les cellules cancéreuses 52
2.3 Le métabolisme mitochondrial dans les cellules cancéreuses 55
2.4 Le métabolisme énergétique comme cible thérapeutique 58

III. LES THIAZOLIDINEDIONES 63

1. Présentation générale 63

2. Propriétés antidiabétiques 64

3. Propriétés anti-cancéreuses 65

4. Des mécanismes anti-cancéreux PPARγ-indépendants (ARTICLE 1) 68

5. Altération du métabolisme énergétique par les TZDs 73
5.1 Induction d'une restriction énergétique par des dérivés de la Δ2-CGZ 73
5.2 Altération du métabolisme mitochondrial par les TZDs 75

OBJECTIFS DE THESE 81

MATERIEL & METHODES

I. MOLECULES UTILISEES 82

II. CULTURE CELLULAIRE ET CONDITIONS DE TRAITEMENT 82

1. Lignées cellulaires 82

2. Conditions de culture 83
3. Ensemencement et conditions de traitement 83
III. NUMERATION CELLULAIRE PAR COLORATION AU CRISTAL VIOLET 83
IV. CARACTERISTATION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE 84
1. Evaluation de la prolifération cellulaire par le test d'incorporation de BrdU 84
2. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux 84
V. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES 84
1. Au niveau transcriptionnel par RT-PCR conventionnelle 84
2. Au niveau traductionnel 84
2.1 Par western blot 84
2.2 Immunocytochimie 85
VI. ETUDE DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES CELLULES 85
1. Dosage de l'ATP 85
2. Dosage du NAD^+ et du NADH 86
3. Etude de l'activité mitochondriale par oxygraphie 86
4. Analyse de l'activité glycolytique par mesure de la production de lactate et de la consommation de glucose 87
VII. DETERMINATION DE L'INDICE DE COMBINAISON (CI) SELON LA METHODE DE CHOU-TALALAY 88
VIII. ANALYSE STATISTIQUE 89

RESULTATS

I. CARACTERISATION DES EFFETS DE LA Δ2-TGZ EN MILIEU DE CULTURE CONTENANT 10% DE SERUM DE VEAU FŒTAL (ARTICLE 2) 90
1. Objectifs 90
2. Résultats 90
3. Conclusions 92
4. Résultats complémentaires 93
4.1 Etude du senseur énergétique AMPK dans des conditions de culture restrictives en sérum 93
4.2 Etude des effets de la Δ2-TGZ sur le nombre de cellules au cours d'une cinétique de traitement 93
II. ETUDE DES EFFETS DE LA Δ2-TGZ SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES MDA-MB-231 94
1. Etude du métabolisme énergétique dans sa globalité 94

2. Etude de la respiration mitochondriale 94

3. Etude de la glycolyse 96

4. La glycolyse : un mécanisme compensateur en réponse à l'atteinte mitochondriale ?.. 97
4.1 Dosage de l'ATP intracellulaire 97
4.2 Etude des senseurs énergétiques AMPK et Sirt1 97
4.3 Etude des effets de la combinaison Δ2-TGZ + 2-DG sur le nombre de cellules 98

5. Conclusion 99

III. CARACTERISATION DU MODE D'ACTION DU 2-DG DANS LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES (ARTICLE 3) 100

1. Contexte 100

2. Résultats 100

3. Conclusion 102

4. Résultats complémentaires 103
4.1 Etude des effets du 2-DG sur le niveau d'ATP intracellulaire en présence ou non de mannose 103
4.2 Etude des effets du 2-DG sur le nombre de cellules lors d'une cinétique de traitement en présence ou non de mannose 103

IV. ETUDE PRELIMINAIRE SUR L'UTILISATION DE LA Δ2-TGZ EN THERAPIE COMBINATOIRE 104

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. LA Δ2-TGZ ALTERE LE METABOLISME ENERGETIQUE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES 106

1. Quelles est la cible mitochondriale de la Δ2-TGZ ? 107

2. Quel est le mécanisme d'action de la Δ2-TGZ dans la mitochondrie ? 109

3. Quel est l'impact de la perturbation du métabolisme énergétique dans les effets anti-cancéreux de la Δ2-TGZ ? 111

II. INTERET THERAPEUTIQUE DE LA Δ2-TGZ 111

1. Une fenêtre thérapeutique suffisamment large pour la Δ2-TGZ ? 112

2. L'action de la Δ2-TGZ peut-elle être potentialisée ? 113

3. La Δ2-TGZ peut-elle potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie ? 117

III. DE NOUVEAUX DERIVES DE LA Δ2-TGZ 119

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABREVIATIONS

$[Ca^{2+}]_c$, $[Ca^{2+}]_i$	Concentration de calcium cytosolique et intracellulaire
15d-PGJ2	15-désoxy-Δ12,14-prostaglandine J2
2-DG	2-désoxyglucose
5-FU	5-fluorouracile
αKGDH	A-cétoglutarate déshydrogénase
Δ2-TGZ	Delta-2-troglitazone
ΔpH	Gradient de pH
ΔV ou ΔΨm	Potentiel de membrane mitochondrial
ABC	ATP-binding cassette
Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine diphosphate
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Protein kinase B
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique
ANT	Adenosine nucleotide translocase
APAF1	Apoptotic protease-activating factor 1
AR	Récepteur aux androgènes (ou androgen receptor)
ARE	Androgen response elements
ATF6	Activating transcription factor 6
ATP	Adénosine triphosphate
ATP5E	ATP synthase subunit epsilon
ATP5O	ATP synthase subunit O
ATR	Atractyloside
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma-2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 homology
BH3	Bcl-2 homology 3
BH3-only Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BiP	Binding immunoglobulin protein
BRCA1, BRCA2	Breast cancer associated 1 et 2
BrdU	Bromodeoxyuridine
Ca^{2+}	Calcium

cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
cdk	Cyclin-dependent kinases
CGZ	Ciglitazone
CHOP	C/EBP homologous protein
CI	Indice de combinaison (ou combination index)
cIAP-1	Cellular inhibitor of apoptosis protein-1
CISD1	CDGSH iron sulfur domain 1
CoA	Coenzyme A
COX	Cytochrome c oxidase
Cytokine-R	Cytokine receptor
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNMT1	ADN méthyltransférase 1
Drp1	Dynamin related protein 1
dTMP	Désoxythymidine monophosphate
DTT	1,4-dithiothreitol
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
dUMP	Désoxyuridine monophosphate
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGR1	Early growth response gene-1
eIF2α	Eukaryotic initiation factor 2α
ERα	Estrogen receptor α
ERβ	Estrogen receptor β
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated protein degradation
ErbB2	Avian erythroblastosis oncogene B 2
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
ERRα	Estrogen-related receptor α
ERMA	agent mimant une restriction énergétique (ou energy restriction mimetic agent)
ESI	Electrospray ionization
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADD	FAS-associated death domain
FasL	Fas ligand
FASN	Fatty acid synthetase
FBS	Fetal bovine serum
FBP	Fructose 1,6-bisphosphate
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FCS	Fetal calf serum
FDG	2-[^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose
FGF	Fibroblasts growth factor
fibroblastes embryonnaires de souris TKO	Rb-family triple knock-out mouse embryonic fibroblasts
FMN	Flavine mononucléotide
FQR	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
GDP	Guanosine diphosphate
GF-R	Growth factor receptor
GLUT	Glucose Transporter
GPDH	Glycérol 3-phosphate déshydrogénase
GPX	Glutathion peroxidases
GRP75	75 kda glucose-regulated protein
GRP78	78 kda glucose-regulated protein
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulphide
HAS	Haute autorité de santé
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIF1	Hypoxia inducible factor 1
HK-II	Hexokinase II
HMEC	Cellules épithéliales non malignes mammaires
HtrA2	High-temperature requirement A2
HUVEC	Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
IC_{50}	Half-maximal inhibitory concentration
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IGF	Insulin-like growth factor
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
IL-6	Interleukine-6
IMM	Inner mitochondrial membrane
IMS,	Intermembrane space
$Ins1,4,5P_3$	Inositol 1,4,5 trisphosphate
$Ins1,4,5P_3R$	Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor
INCa	Institut national du cancer
IRE1α	Inositol requiring enzyme 1α
JNK	C-Jun N-terminal kinase 1
LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2
LCFA	Acides gras à longue chaîne (ou long chain fatty acids)
LDH	Lactate dehydrogenase
LHRH	Luteinizing hormone releasing hormone

MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
MCT1, 4	Monocarboxylate transporter 1 et 4
MCU	Mitochondrial Ca^{2+} uniporter
MDH	Malate déshydrogénase
Mfn1, Mfn2	Mitofusin1 et 2
MMP	Métalloprotéases matricielles
MnSOD	Superoxyde dismutase à manganèse
MOMP	Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
MPC1, MPC2	Mitochondrial pyruvate carrier 1 et 2
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MS	Spectrométrie de masse
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTOT	Mitochondrial target of thiazolidinones
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDUFA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9
NDUFB10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1β subcomplex subunit 10
NDUFS4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4
NDUFV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2
NK	Natural killer
NOX	NADPH oxydase
NPC	Cellules épithéliales pancréatiques normales
NRF-1, NRF-2	NRF-2 nuclear respiratory factor-1 et -2
Oct1	Organic cation transporter 1
OGDH	2-oxoglutarate déshydrogénase ou α-cétoglutarate déshydrogénase
O-GlcNAcylation	O-N-acétylglucosaminylation
OGT	O-glcnac transferase
oligo A	Oligomycine A
OMM	Outer mitochondrial membrane
Opa1	Optic atrophy 1
p160MBP	P160 myb binding protein
PARP	Polyadp-ribose polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Pyruvate carboxylase
PDGF(R)	Platelet-derived growth factor (receptor)
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PDP	Pyruvate déshydrogénase phosphatase
PEP	Phosphoénolpyruvate

PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PERK	Pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase
PET	Positron emission tomography
PFK2	Phosphofructokinase 2
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3
PGC1-α, PGC1-β	Peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1α et β
PGZ	Pioglitazone
pHe	Ph extracellulaire
pHi	Ph intrac
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PKA	Protéine kinase A
PKM2	Pyruvate kinase isoenzyme type M2
PPARα, PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor-α et β
PR	Récepteurs à la progestérone (ou progesterone receptor)
PR-A	Progesterone receptor isoform A
pRb	Retinoblastoma protein
PR-B	Progesterone receptor isoform B
PRC	PGC-1α-related coactivator
PrEC	Cellules épithéliales prostatiques non malignes
Prx	Peroxiredoxines
PSA	Prostate-specific antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RE	Réticulum endoplasmique
RGZ	Rosiglitazone
Rh4	Alveolar rhabdomyosarcoma
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (ou reactive oxygen species)
RPMI	Roswell park memorial institute
s.e.m	Standard error of the mean
SBR	Scarff-bloom-richardson
SCF	Skp1-Cul1-F-box protein
SCO2	Synthesis of cytochrome c oxidase
SDHA, SDHB	Succinate dehydrogenase subunit A et B
SERD	Selective estrogen receptor degradation
SERM	Selective estrogen receptor modulators
Sirt1, SIRT3, SIRT5	Sirtuin 1, 3 et 5
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspase direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pi

SOD	Superoxyde dismutase
Sp1	Specific protein 1
SRP	Surface plasmon resonance
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STS	Staurosporine
SVF	Sérum de veau fœtal
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukemia
tBid	Truncated Bid
TCA	Tricarboxylic acid cycle
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TEP-scan	Tomographie par émission de positons associée à un scanner
Tfam	Mitochondrial transcription factor A
TFB1M, TFB2M	Mitochondrial transcription factor B1 et B2
TGF-β	Transforming growth factor-β
TGZ	Troglitazone
THS	Traitement hormonal substitutif
TIGAR	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator
TIM	Translocase of the inner membrane
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF-α	Tumour necrosis factor α
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNM	Tumor-node-metastasis
TOM	Translocase of the outer mitochondrial membrane
TP53	tumor protein p53
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R1/2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1/2
TRAMP	Transgenic adenocarcinoma of mouse prostate
TRIP-Br	Transcriptional regulator interacting with the PHD-bromodomain
Trx	Thioredoxin
TZD	Thiazolidinedione
UCP	Uncoupling protein
UICC	Union internationale contre le cancer
UPR	Unfolded protein response
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
XBP-1	X-box-Binding Protein1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

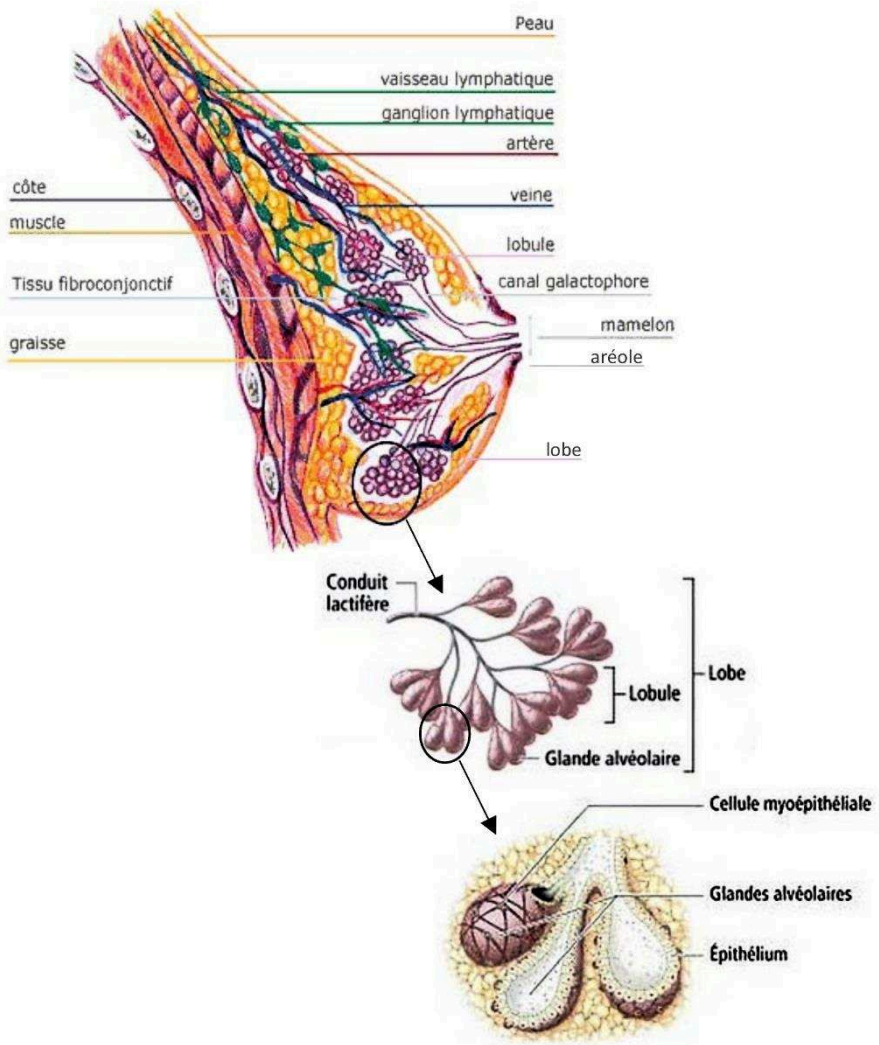

Figure 1 : Anatomie du sein et structure du réseau lobulo-alvéolaire. Sur ce schéma, sont représentées de manière successive l'organisation d'un sein et d'un lobe, suivie de la structure d'une alvéole (adapté de Centre de sénologie des Coteaux , Mader 2010)

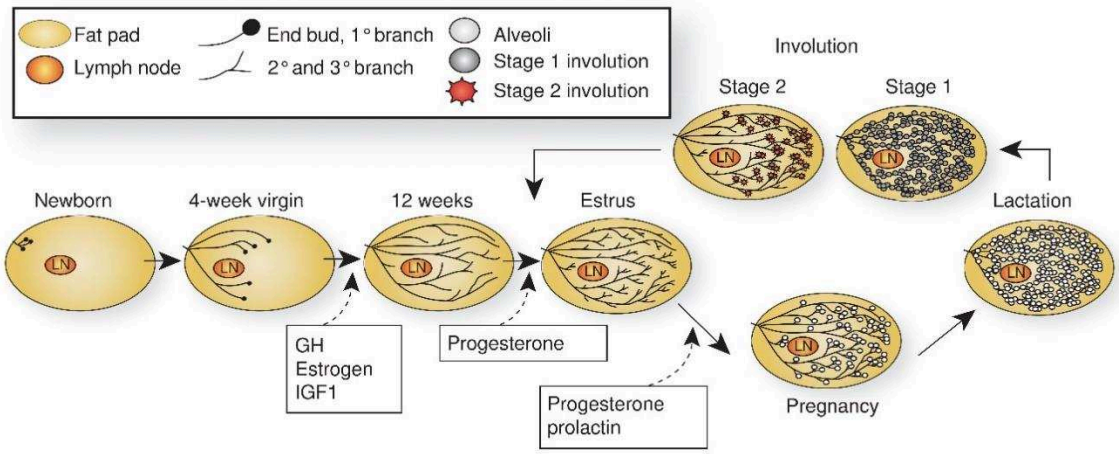

Figure 2 : Développement de la glande mammaire chez la souris, depuis la naissance jusqu'à l'involution. Les hormones et facteurs de croissance, conservés chez les mammifères et jouant un rôle prépondérant dans l'évolution de la glande mammaire sont indiqués. GH, growth hormone; IGF1, insulin-like growth factor-1; LN, lymph node adapté (d'après Macias and Hinck 2012)

I. LE CANCER DU SEIN

1. Structure et développement du sein

Le sein est un organe bilatéral situé sur la paroi thoracique antérieure d'un individu. Il est de forme conique ou hémisphérique et présente à son sommet un relief appelé mamelon (Figure 1). Ce dernier est entouré par un disque cutané pigmenté qui est l'aréole. L'homme et la femme possèdent tous les deux des seins, mais ils ne sont bien développés que chez la femme. Le sein féminin est une glande exocrine dont la fonction principale est de produire du lait après la naissance d'un enfant (Beaudry *et al.* 2006).

La glande mammaire est constituée de deux compartiments : un stroma de tissu conjonctif très vascularisé et innervé contenant des adipocytes et des fibroblastes et un compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau lobulo-alvéolaire en forme de grappe (Figure 1). Un lobe est constitué de plusieurs lobules, tandis qu'un lobule est formé d'alvéoles (ou acini), les unités sécrétrices du lait (Beaudry *et al.* 2006). Le lait est transporté de l'alvéole vers le mamelon grâce à un vaste réseau de canaux présent dans la glande mammaire. Les sécrétions des alvéoles sont tout d'abord drainées par des canaux alvéolaires qui se rejoignent pour former un canal lobulaire qui draine un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se regroupent ensuite pour donner un canal galactophore (ou conduit lactifère) qui draine un lobe et débouche finalement au niveau du mamelon (Arnal-Morvan and Laganier 2015).

Les alvéoles contiennent une rangée de cellules épithéliales sécrétrices (cellules luminales), entourées par des cellules myoépithéliales contractiles (cellules basales), responsables de l'éjection du lait (Figure 1). Les cellules luminales et basales se différencient à partir d'une population de cellules souches mammaires, qui assurent le développement de la glande mammaire (Charafe-Jauffret *et al.* 2007).

Le sein d'une femme se développe tout au long de sa vie, depuis le stade fœtal jusqu'à la ménopause, sous l'influence de nombreuses hormones, comme les hormones sexuelles (œstrogène et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance (Macias and Hinck 2012, Javed and Lteif 2013). Le développement du sein commence à partir de la 4ème semaine de la vie fœtale : le compartiment épithélial est d'origine ectodermique, tandis que le stroma est d'origine mésodermique. L'embryogenèse permet la formation d'une glande mammaire rudimentaire, constituée essentiellement de canaux galactophores à la naissance (Figure 2). Le sein se développe ensuite peu jusqu'à la puberté, sa croissance étant proportionnée à celle de l'organisme (Coujard *et al.* 1980, Javed and Lteif 2013).

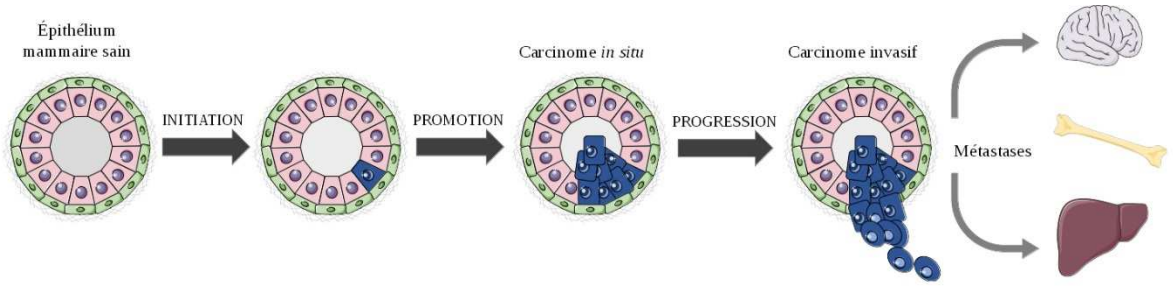

Figure 3 : Représentation des trois étapes principales de la carcinogenèse mammaire : l'initiation, la promotion et la progression. Durant l'initiation, des altérations génétiques et épigénétiques apparaissent dans une cellule (cellule bleue) : c'est la première étape de la carcinogenèse mammaire. Cette cellule se multiplie ensuite durant l'étape de promotion, aboutissant à la formation d'un carcinome *in situ*. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés migratrices et invasives, leur permettant d'envahir les tissus avoisinants, ainsi que des organes distants où des tumeurs secondaires (métastases) seront formées (à partir de Witsch *et al.* 2010, Pan *et al.* 2015).

Durant la puberté, le développement du sein s'accélère. Le tissu graisseux devient en effet plus abondant et les canaux épithéliaux de la glande mammaire prolifèrent, se ramifient et forment à leur extrémité des bourgeons terminaux (Figure 2). Ces derniers sont à l'origine de nouvelles ramifications qui donneront à leur tour des bourgeons alvéolaires. Des lobules apparaissent également 1 à 2 ans après le début des cycles menstruels, chaque cycle favorisant le développement progressif du sein jusqu'à l'âge de 35 ans. La différenciation de la glande mammaire ne sera toutefois pas complète si une femme ne donne pas naissance à un enfant. La glande mammaire atteint en effet son niveau maximal de différenciation durant la maternité et l'allaitement (Russo and Russo 2004, Javed and Lteif 2013). Ces deux évènements induisent des modifications importantes du sein, comme la prolifération des ramifications terminales des canaux et le développement des alvéoles (Figure 2). Ces dernières se différencient en unités sécrétrices de lait, permettant ainsi la différenciation maximale des lobules (Russo and Russo 2004). Le tissu adipeux est quant à lui moins abondant dans le sein, en raison du développement de la glande mammaire (Macias and Hinck 2012).

Le processus de lactation se met en place après l'accouchement. Un liquide jaunâtre, riche en protéines et en immunoglobulines, est alors sécrété : il s'agit du colostrum. La composition de ce premier lait change rapidement dans les jours suivant la naissance, menant alors à la sécrétion d'un lait mature riche en lipides, lactose et autres éléments comme du citrate et du magnésium. L'allaitement de l'enfant se poursuit jusqu'au phénomène de sevrage (Beaudry *et al.* 2006)

La fin de l'allaitement marque l'arrêt de la production de lait dans les alvéoles, ainsi que l'involution de la glande mammaire (Figure 2). Celle-ci se caractérise par l'élimination progressive des cellules sécrétrices épithéliales des alvéoles et la régénération du tissu adipeux, dans lequel la glande mammaire se développera à nouveau lors d'une prochaine gestation (Russo and Russo 2004, Macias and Hinck 2012).

La ménopause correspond à la dernière phase de changement dans le sein. Cette étape est caractérisée par un phénomène de régression des structures de la glande mammaire : il ne subsiste alors que quelques alvéoles et canaux dans le sein âgé (Macias and Hinck 2012).

2. La carcinogenèse mammaire

La carcinogenèse correspond au processus de formation d'un cancer, qui comprend trois étapes principales : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 3) (INCa, Institut national du cancer).

L'initiation correspond à l'apparition d'altérations génétiques et épigénétiques dans certaines cellules de la glande mammaire (Witsch *et al.* 2010). Actuellement, certains travaux suggèrent

que le cancer du sein pourrait se développer à partir des cellules souches mammaires ou des progéniteurs précoces (Charafe-Jauffret *et al.* 2007, Visvader 2009).
Les altérations de l'ADN peuvent être dues due à des facteurs exogènes (carcinogènes chimiques et physiques) ou endogènes (prédispositions génétiques) (Gauzeran 2015). A ce jour, on estime qu'environ 5 à 10% des cancers du sein seraient liés à une prédisposition génétique, ce qui signifie que la plupart des mutations génétiques entraînant le développement d'un cancer du sein sont somatiques, c'est-à-dire qu'elles n'affectent que les cellules tumorales (INCa). Ces modifications génétiques sont nombreuses et de nature variée, puisqu'environ 4000 altérations génétiques, affectant un peu plus de 2500 gènes, ont été identifiées dans le génome des cellules cancéreuses mammaires (Yang *et al.* 2015). Ces altérations génétiques touchent néanmoins un nombre restreint de gènes, qui sont impliqués dans un nombre limité de processus cellulaires (Lee and Muller 2010). La majorité des altérations génétiques peuvent en fait être divisées en deux catégories : 1) les mutations activant les proto-oncogènes (gain de fonction), qui stimulent la croissance, la division et la survie cellulaire, comme *ErbB2* (avian erythroblastosis oncogene B 2) et *PIK3CA* 2) les mutations inactivant les gènes suppresseurs de tumeur (perte de fonction), qui normalement préviennent une prolifération cellulaire incontrôlée, comme *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) et *TP53* (tumor protein p53) (Lee and Muller 2010, Watson *et al.* 2013). D'autres altérations génétiques sont retrouvées dans les cellules germinales, prédisposant ainsi génétiquement un individu à un cancer du sein. Les gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2*, codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, sont parmi les gènes les plus touchés par ces mutations génétiques constitutionnelles : environ 20% des cas familiaux de cancer du sein sont en effet attribués à des mutations dans ces gènes (Aloraifi *et al.* 2015). La présence de ces mutations augmente le risque de développer non seulement un cancer du sein, mais également un cancer de l'ovaire (Evans *et al.* 2008).

Le développement d'un cancer du sein passe ensuite par l'étape de promotion : il s'agit d'une phase de croissance tumorale, au cours de laquelle la cellule initiée se multiplie (Boujard *et al.* 2015). Cette prolifération est stimulée par certaines des mutations génétiques apparues précédemment dans la cellule transformée: c'est le cas par exemple des mutations ciblant *PIK3CA* ou *PTEN*, ayant pour effet l'activation constitutive de la voie de survie PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase)/Akt (Protein kinase B) (Hanahan and Weinberg 2011). En plus des altérations génétiques, un certain nombre de signaux extracellulaires stimulent la prolifération cellulaire. Ces signaux sont d'origine endocrine, via les hormones stéroïdiennes

(œstrogènes et progestérone) ou autocrine/paracrine, par le biais des facteurs de croissance (Witsch *et al.* 2010, Reznikov 2015).

Les effets des œstrogènes et de la progestérone sont médiés principalement par leurs récepteurs nucléaires respectifs ERα (estrogen receptor α) et ERβ (estrogen receptor β), et PR-A (progesterone receptor isoform A) et PR-B (progesterone receptor isoform B) (Reznikov 2015). Le rôle d'ERβ dans la cancérogenèse mammaire n'est toutefois pas sûr : il pourrait en effet avoir un rôle plutôt antiprolifératif et pro-apoptotique dans les cellules cancéreuses mammaires (Leygue and Murphy 2013). En plus de leurs effets récepteur-dépendants, des actions non-génomiques ont aussi été mises en évidence pour les hormones stéroïdiennes, comme par exemple des propriétés génotoxiques pour les dérivés métaboliques des œstrogènes (Yue *et al.* 2013).

Quant aux facteurs de croissance, plusieurs d'entre eux favorisent la prolifération des cellules transformées, comme l'EGF (epidermal growth factor) et l'IGF (insulin-like growth factor). Ces deux facteurs de croissance se fixent tout d'abord sur leurs récepteurs respectifs EGFR (epidermal growth factor receptor) et IGFR (Insulin-like growth factor receptor) et ils activent ensuite la prolifération et la survie cellulaire, via notamment les voies de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) et PI3K/Akt (Witsch *et al.* 2010).

En plus de la prolifération cellulaire, les facteurs de croissance et les hormones favorisent également l'échappement à l'apoptose. La voie PI3K/Akt régule en effet négativement l'apoptose, tandis que les œstrogènes induisent, via le récepteur ERα, l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma-2), telles que Mcl-1 (Witsch *et al.* 2010, Schacter *et al.* 2014).

La dernière étape de la progression tumorale correspond à la dissémination des cellules cancéreuses en dehors de leur tissu d'origine. Les cellules tumorales envahissent tout d'abord les tissus avoisinants, ensuite elles pénètrent dans le système vasculaire sanguin et/ou lymphatique, puis elles colonisent des organes distants, où elles vont former des tumeurs secondaires (métastases) (Witsch *et al.* 2010). Plusieurs processus sont nécessaires au phénomène d'invasion des cellules cancéreuses. Ces dernières doivent en effet non seulement dégrader la membrane basale, mais également acquérir des propriétés migratrices et invasives. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un des phénomènes majeurs conférant des capacités invasives aux cellules : il s'agit d'une transdifférenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses mobiles. La TEM est associée à une perte de la polarité apico-basale, une altération des jonctions intercellulaires, ainsi qu'une réorganisation du

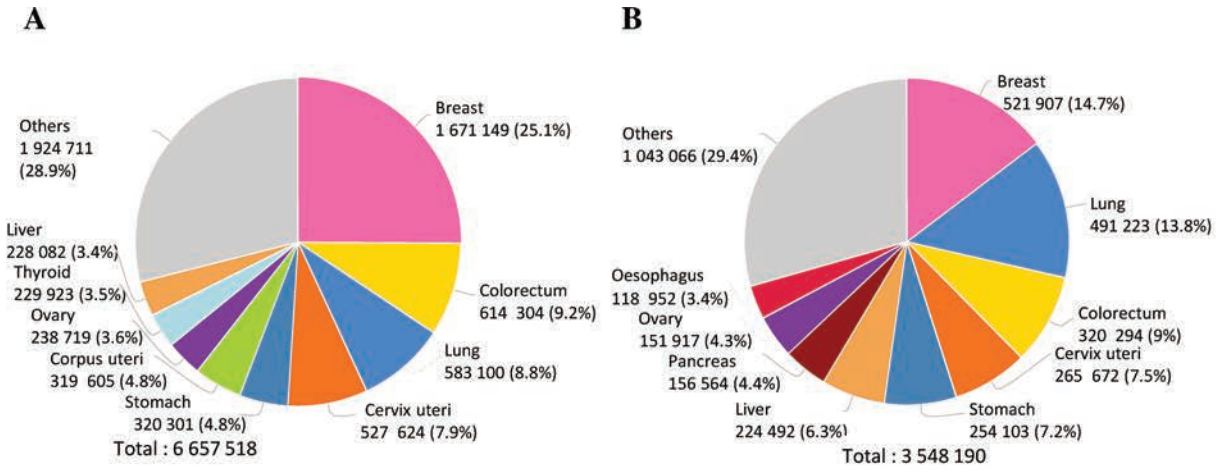

Figure 4 : Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde. Les diagrammes représentent la répartition par types de cancer du nombre de nouveaux cas (A) et de décès par cancer (B) estimés en 2012 chez la femme au niveau mondial. La surface de chaque secteur est proportionnelle au nombre de nouveaux cas ou de décès estimés (adapté de Ferlay et al. 2015)

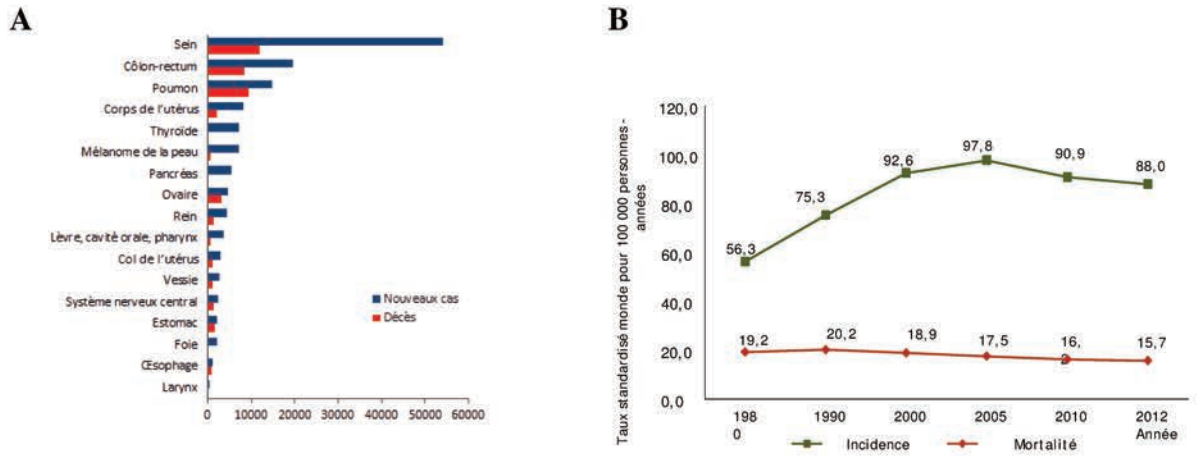

Figure 5 : Données épidémiologiques à propos du cancer du sein en France. A) Classement des cancers par localisation et selon le nombre de nouveaux cas et de décès estimés en 2015. Les données de mortalité des cancers du foie et du pancréas ne sont pas indiquées en raison d'une fiabilité réduite de ces données (à partir de Leone et al. 2015) B) Evolution des taux d'incidence et de mortalité, observés de 1980 à 2012 (d'après INCa 2016a)

cytosquelette. De plus, les cellules transformées sécrètent des métalloprotéases matricielles (MMP) afin de dégrader la matrice extracellulaire (Lamouille *et al.* 2014).

Le phénomène d'invasion des cellules tumorales est sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance, tels que TGF-β (transforming growth factor-β) ou FGF (fibroblast growth factor), ainsi que certains gènes suppresseurs de tumeur ou oncogènes mutés comme *ErbB2*. Des cellules présentes dans le microenvironnement tumoral, comme des fibroblastes ou des macrophages, favorisent également la mobilité des cellules cancéreuses, via notamment la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines (Witsch *et al.* 2010).

Par ailleurs, la progression tumorale est également caractérisée par le processus d'angiogenèse : il s'agit de la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. Ce processus est initié en réponse à une carence en oxygène (hypoxie) et en nutriments de la tumeur ou bien suite à des mutations touchant les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est un des facteurs pro-angiogéniques majeurs (Chung *et al.* 2010).

3. Epidémiologie et facteurs de risque

3.1 Epidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde : il représente 25% des nouveaux cas de cancers chez la femme au niveau mondial (Figure 4A). Avec environ 1,7 millions de nouveaux cas estimés en 2012, il devance de loin le cancer colorectal et le cancer du poumon (Figure 4A). Il cause également le plus grand nombre de décès féminins par cancer, avec environ 522 000 décès estimés dans le monde en 2012 (Figure 4B). Le cancer du sein est cependant la seconde cause de décès par cancer chez la femme derrière le cancer du poumon dans les pays développés (Ferlay *et al.* 2015).

En France métropolitaine, 54 062 nouveaux cas de cancer du sein ont été estimés en 2015, soit 31,2% de l'incidence des cancers féminins. 11 913 décès ont également été projetés, plaçant ainsi le cancer du sein en tête de la mortalité par cancer chez la femme en France (Figure 5A). Ce cancer représente 18,2% des décès par cancer féminin (Leone *et al.* 2015, INCa 2016a). Le cancer du sein est néanmoins un cancer de bon pronostic, avec une survie nette standardisée sur l'âge à 5 et 10 ans de 85% et 76% respectivement (cas diagnostiqués entre 1989 et 2010) (Cowpli-Bony *et al.* 2016).

L'incidence du cancer du sein a fortement augmenté en France jusqu'en 2000, avant de diminuer à partir de 2005, comme indiqué dans la figure 5B (Binder-Foucard *et al.* 2013). Cette baisse de l'incidence concerne principalement les femmes âgées de 50 à 74 ans et pourrait être

due notamment à une baisse de la prescription des traitements hormonaux lors de la ménopause (Daubisse-Marliac *et al.* 2011). Quant au taux de mortalité, il est resté stable jusqu'en 1995, avant de diminuer ensuite de manière régulière (Figure 5B). Cette baisse de la mortalité pourrait s'expliquer par l'amélioration de la prise en charge thérapeutique et un diagnostic plus précoce des cancers du sein grâce au développement du dépistage organisé (Binder-Foucard *et al.* 2013, Leone *et al.* 2015).

3.2 Facteurs de risque associés au cancer du sein

De nombreux facteurs de risques ont été répertoriés à ce jour comme étant susceptibles de favoriser le développement d'un cancer du sein chez un individu. Ces facteurs peuvent être classés selon deux catégories distinctes : 1) les facteurs de risque internes inhérents aux individus 2) les facteurs de risque externes liés à l'environnement et au mode de vie des individus (INCa).

Le sexe de l'individu figure parmi les principaux facteurs de risque internes. La majorité des cancers du sein sont en effet observés chez la femme, tandis que moins d'1% d'entre eux sont détectés chez l'homme (Weiss *et al.* 2005). L'âge de la personne influe également sur le risque de développer un cancer du sein, puisque plus de la moitié des nouveaux cas en France surviennent chez des femmes âgées de 50 à 74 ans (Leone *et al.* 2015). Cette classe d'âge est d'ailleurs la cible du dépistage organisé du cancer du sein dans notre pays, avec un examen clinique des seins et une mammographie proposés tous les deux ans (INCa 2016a). Outre le sexe et l'âge, les antécédents personnels d'un individu sont des facteurs de risques internes prépondérants. Une femme ayant déjà eu un cancer à un sein possède en effet 4 à 5 fois plus de risques de développer un cancer dans l'autre sein, comparé à une femme sans antécédent (Fondation ARC 2016). Une irradiation thoracique, qu'elle soit accidentelle ou médicale, peut également favoriser l'apparition de la maladie, avec un risque dépendant de l'âge de la femme et de la dose cumulée d'irradiation (INCa 2012). Quant à certaines anomalies histologiques du sein, comme une hyperplasie atypique, elles sont aussi associées à un risque de cancer, qui est d'autant plus élevé pour les femmes présentant à la fois une hyperplasie atypique et des antécédents familiaux de cancer du sein (Dupont *et al.* 1993).

Si une parente au premier degré (mère, sœur ou fille) a eu un cancer du sein et si ce cancer a été diagnostiqué avant la ménopause, alors le risque pour une femme d'avoir la maladie est doublé (INCa). Les antécédents familiaux de cancer du sein sont donc des facteurs de risque importants: 20 à 30% des cancers du sein sont en effet détectés chez des femmes présentant de

tels antécédents. Cette disposition familiale peut être due au hasard, à un mode vie commun entre les membres de la famille, et/ou bien il peut s'agir d'un cancer héréditaire dû à une mutation génétique qui se transmet entre générations. On estime alors que 5 à 10% des cancers du sein seraient liés à une prédisposition génétique (INCa). Les mutations dans les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* favorisent considérablement l'apparition de cancers, puisque à l'âge de 70 ans, les femmes porteuses de ces mutations ont un risque respectif de 68 et 74% de développer un cancer du sein et de 60 et 30% d'avoir un cancer de l'ovaire (Evans *et al.* 2008). Tous les cas de cancers du sein familiaux ne sont cependant pas dus à des mutations dans *BRCA1* ou *BRCA2*, de nombreux autres gènes de prédisposition au cancer du sein comme *TP53*, *CHEK2* ou encore *PTEN* ayant été identifiés (Aloraifi *et al.* 2015).

En plus de ses antécédents familiaux, l'histoire hormonale d'une femme peut aussi constituer un facteur de risque. En effet, puisque les œstrogènes favorisent la prolifération des cellules tumorales, alors une exposition prolongée à ces hormones peut être associée à un risque élevé de cancer du sein (Yue *et al.* 2013). Plusieurs variables modulent l'imprégnation hormonale d'une patiente, c'est-à-dire les taux d'œstrogènes et de progestérone auxquels elle a été soumise au cours de sa vie. C'est le cas notamment d'une puberté précoce (premières règles avant 12 ans) ou d'une ménopause tardive (après 55 ans), qui déterminent une exposition longue aux hormones endogènes et accentuent ainsi le risque de cancer du sein (Hsieh *et al.* 1990, INCa 2012). Les contraceptifs oraux ou un traitement hormonal substitutif (THS) sont associés de la même manière à une augmentation de la probabilité de développer cette maladie. Ces risques sont toutefois diminués dès la fin de l'utilisation des hormones exogènes, avec un effet négligeable 10 ans après la fin du traitement pour les contraceptifs oraux et 5 ans pour les THS (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1996). Par ailleurs, le risque de cancer du sein dépend également des évènements de la vie reproductive d'une femme. Un âge précoce lors de la première grossesse, une multiparité et un allaitement prolongé contribuent en fait à une diminution du risque de développer un cancer du sein (MacMahon *et al.* 1970, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer cet effet protecteur, à savoir notamment une glande mammaire plus différenciée et une diminution du nombre de cellules souches dans le sein d'une femme ayant eu un ou des enfants (Britt *et al.* 2007).

D'autres facteurs de risque externes, liés à notre mode de vie, notre comportement et notre environnement, ont par ailleurs été répertoriés comme influant sur l'apparition d'un cancer du sein, notamment après la ménopause. Les principaux facteurs de risque comportementaux sont

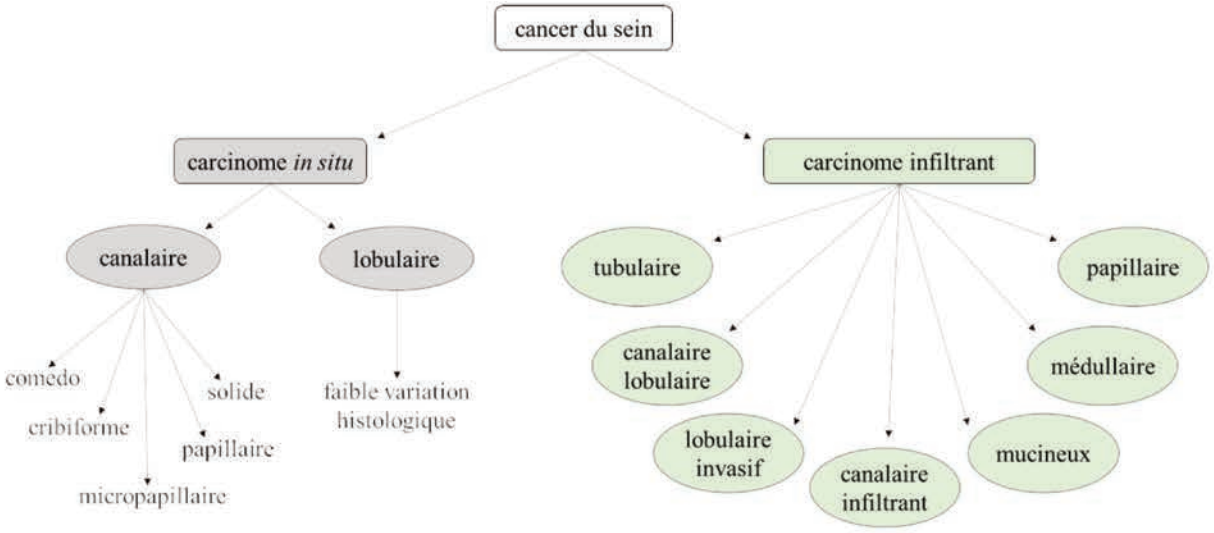

Figure 6 : Classification histologique des tumeurs mammaires. 95% des cancers du sein sont des adénocarcinomes. Ces tumeurs mammaires peuvent être localisées (carcinome in situ ou non invasif) ou bien se propager hors du tissu d'origine (carcinome infiltrant ou invasif). Sur ce schéma, sont indiqués les différents sous-types répertoriés. Les tumeurs mammaires autres que les adénocarcinomes ne sont pas représentées (à partir de INCa , Malhotra et al. 2010)

une alimentation déséquilibrée, la consommation d'alcool, un surpoids à l'âge adulte, ainsi que le tabagisme actif (Luo *et al.* 2011, Dartois *et al.* 2016). Quant aux facteurs de risque environnementaux, certains polluants chimiques présents dans notre environnement pourraient favoriser le développement de tumeurs mammaires en agissant notamment comme des perturbateurs endocriniens (INCa 2012, INCa 2016a).

4. Classification des tumeurs mammaires

Le cancer du sein est une maladie hautement hétérogène, tant du point de vue clinique, que génétique : une classification des cancers du sein est donc nécessaire (Malhotra *et al.* 2010). Pour ce faire, les tumeurs mammaires peuvent être classées selon des critères histologiques, anatomopathologiques, ou selon l'expression de certains marqueurs moléculaires.

4.1 La classification histologique

La plupart des cancers du sein sont des adénocarcinomes (95%), c'est-à-dire qu'ils se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire (INCa). Les tumeurs naissent à partir des cellules des lobules ou des canaux: on parle alors de carcinomes lobulaires ou canalaires. Les carcinomes canalaires sont plus fréquents que les carcinomes lobulaires (Sharma *et al.* 2010).

En plus de la localisation d'origine des cellules, le degré d'invasivité est également pris en compte dans la classification histologique des tumeurs mammaires (Sharma *et al.* 2010). On distingue ainsi deux types principaux de carcinomes : les carcinomes *in situ* (ou carcinomes non invasifs) et les carcinomes infiltrants (ou carcinomes invasifs) (Figure 6).

Les carcinomes *in situ* représentent une forme précoce de cancer mammaire. Les cellules cancéreuses qui les constituent sont en effet présentes uniquement dans les canaux et les lobules, la membrane basale qui les délimite n'ayant pas été franchie (HAS, haute autorité de santé 2015). On peut distinguer le carcinome lobulaire *in situ* et le carcinome canalaire *in situ*, ce dernier étant le plus fréquent (90% des cancers non invasifs) (Sharma *et al.* 2010). Une grande variabilité histologique caractérise le cancer canalaire *in situ* : il peut ainsi être divisé en plusieurs sous-types, indiqués dans la figure 6 (Malhotra *et al.* 2010). Ces cancers sont de bon pronostic, toutefois ils peuvent devenir invasifs en cas de traitements non soutenus (INCa 2009).

Dans le cas des carcinomes infiltrants, les cellules cancéreuses ont franchi la membrane basale qui les délimitait et elles ont infiltré les tissus avoisinants. Ces cellules peuvent également se propager vers les ganglions axillaires ou vers d'autres organes (os, poumon, foie, cerveau)

A

Critère	Note attribuée		
	1	2	3
Architecture cellulaire	La tumeur contient beaucoup de structures bien formées		La tumeur contient peu ou pas du tout de structures bien formées
Forme du noyau	Les noyaux de la tumeur sont petits et uniformes		Les noyaux de la tumeur sont gros et leur taille et leur forme varient
Activité mitotique	Les cellules de la tumeur se divisent lentement : faible nombre de mitoses		Les cellules de la tumeur se divisent rapidement : important nombre de mitoses

B

Grade	Descriptif	Score
I	Tumeurs les moins agressives	3, 4 ou 5
II	Grade intermédiaire entre les grades 1 et 3	6 ou 7
III	Tumeurs les plus agressives	8 ou 9

Tableau 1 : Grade histopronostique de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modifié par Elston et Ellis. Durant la carcinogenèse, la cellule perd progressivement ses caractéristiques d'origine, elle se développe plus rapidement et change d'apparence. Ces événements sont pris en compte dans le grade de SBR basé sur trois critères : l'architecture cellulaire, la forme du noyau et le nombre de cellules en division. Chacun de ces trois critères est évalué et une note allant de 1 à 3 lui est attribuée (A). Le grade du cancer est ensuite obtenu par la somme des notes attribuées à chaque critère. On obtient alors un score global (classé de I à III) qui caractérise le degré d'agressivité de la tumeur (B) (à partir de HAS 2015).

(HAS 2015). Plusieurs sous-types histologiques de carcinomes infiltrants ont été répertoriés : ils sont indiqués dans la figure 6. Le carcinome canalaire infiltrant est de loin le carcinome le plus fréquent, à la fois parmi les carcinomes infiltrants, mais également au niveau de l'ensemble des cancers du sein (80% des cas de cancers du sein) (Malhotra *et al.* 2010, Sharma *et al.* 2010). Certains types de carcinomes infiltrants comme les carcinomes tubulaire, médullaire, mucineux et papillaire ont moins tendance à se propager vers les ganglions lymphatiques : ils présentent donc un pronostic plus favorable que le carcinome canalaire infiltrant (INCa).

Par ailleurs, en plus des adénocarcinomes, d'autres tumeurs mammaires malignes plus rares existent comme la tumeur phyllode, le sarcome ou le lymphome (INCa).

4.2 La classification anatomopathologique

D'autres classifications, dérivant de l'histologie des tumeurs, permettent de déterminer le stade d'évolution d'un cancer, ainsi que son pronostic. L'évaluation de ces paramètres aide à définir la stratégie thérapeutique à adopter (HAS 2015).

Le grade histopronostique de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modifié par Elston et Ellis permet de caractériser le degré d'agressivité d'un cancer. Cette classification repose sur l'évaluation de trois paramètres spécifiques : l'architecture cellulaire, la forme du noyau et le nombre de cellules en division (Tableau 1). A partir de ces trois paramètres, les tumeurs sont classées selon plusieurs grades, allant du grade I pour les tumeurs les moins agressives au grade III pour les tumeurs les plus agressives (HAS 2015).
Quant à la classification TNM (Tumor-Node-Metastasis) de l'Union internationale contre le cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), elle permet de caractériser l'étendue d'un cancer. Cette classification prend en compte la taille et l'infiltration de la tumeur (T), l'envahissement ganglionnaire (N), ainsi que la présence de métastases (M). A partir de ces paramètres, les tumeurs mammaires sont classées selon plusieurs stades, allant de 0 pour les cancers les moins avancés, jusqu'au stade IV pour les cancers les plus avancés (Tableau 2) (HAS 2015).

Toutefois, la classification TNM possède un pouvoir prédictif réduit, de même que la classification histologique qui présente des valeurs prédictives et pronostiques parfois limitées (Park *et al.* 2011, Viale 2012). Ces classifications peuvent donc être insuffisantes pour choisir les traitements thérapeutiques à administrer. C'est pourquoi des critères moléculaires

A

T	**Tumeur primitive**
Tx	La tumeur primitive ne peut pas être évaluée
T0	La tumeur primitive n'est pas palpable
Tis	Carcinome *in situ* : carcinome canalaire *in situ* ou carcinome lobulaire *in situ*
T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension T1mic microinvasion ≤ 0,1 cm T1a > 0,1 et ≤ 0,5 cm T1b > 0,5 mm et ≤ 1 cm T1c >1 et ≤ 2 cm
T2	Tumeur > 2 et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension
T4	Tumeur, de toute taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b) T4a Extension à la paroi thoracique T4b Œdème ou ulcération cutanée du sein, ou nodules de perméation limités au même sein T4c T4a + T4b T4d Cancer inflammatoire
N	**Ganglions régionaux**
Nx	L'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué
N0	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
N2	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
N3	Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires, envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux
M	**Métastases**
Mx	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Absence de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance

B

Stade	Statut de la tumeur	Statut des ganglions	Statut des métastases
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2 ou T3 T0 à T2	N0 N1	M0 M0
IIIA	T0 à T2 T3	N2 N1, N2	M0 M0
IIIB	T4	Tout N	M0
IIIC	Tout T	N3	M0
IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 2 : Classification TNM (Tumor-Node-Metastasis) et stadification des cancers du sein, selon l'Union internationale contre le cancer (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). La classification TNM prend en compte la taille de la tumeur (T), l'envahissement des ganglions (N), ainsi que la présence de métastases (M). Chacun de ces trois critères est évalué et un coefficient lui est affecté (A). A partir des coefficients obtenus pour les trois critères, les tumeurs sont ensuite classées selon plusieurs stades, allant de 0 à IV (B). Les stades I et II sont qualifiés de précoces, tandis que les stades III et IV sont dits localement avancés et métastatiques. CMI : chaîne mammaire interne (à partir de HAS 2015).

Sous-type moléculaire	Fréquence	Statut ER, PR et HER2	Expression des gènes de prolifération	Mutations dans le gène *TP53*	Pronostic
Luminal A	50-60%	ER^+ PR^+ $HER2^-$	-	-	Favorable
Luminal B	10-20%	ER^+ PR^+ $HER^{+/-}$	+	+	Intermédiaire
HER2-enriched	10-15%	ER^- PR^- $HER2^+$	+	++	Défavorable
Normal breast-like	5-10%	$ER^{+/-}$ PR^- $HER2^-$	-	-	Intermédiaire
Basal-like	10-20%	ER^- PR^- $HER2^-$	+	++	Défavorable
Claudin-Low	12-14%	ER^- PR^- $HER2^-$	+	++	Défavorable

Tableau 3 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires. Grâce au perfectionnement des outils de biologie moléculaire, les cancers du sein peuvent être répartis en 6 sous-types moléculaires. Chacun de ces sous-types présente des caractéristiques génomiques et cliniques propres. ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PR, progesterone receptor (à partir de Eroles *et al.* 2012).

supplémentaires sont pris en compte pour une classification améliorée des tumeurs mammaires et un meilleur choix de thérapie.

4.3 La classification moléculaire

Le perfectionnement des techniques d'analyse du génome et du transcriptome ont permis de montrer une hétérogénéité et une complexité des cancers du sein au niveau moléculaire. Ainsi, une nouvelle classification, dite moléculaire, a été établie : elle est basée sur le profil d'expression génique des tumeurs mammaires (Mathieu 2007). En 2000, Pérou et Sorlie furent les premiers à établir une classification moléculaire, reposant sur l'analyse par puce à ADN de l'expression de 8102 gènes chez 42 individus (Perou *et al.* 2000). Cette première analyse a ensuite été complétée et 5 sous-types moléculaires ont alors été déterminés (Sorlie *et al.* 2003). Depuis ces travaux, le classement des tumeurs mammaires a légèrement évolué et compte désormais 6 sous-types moléculaires : luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like, normal breast-like et claudin-low (Eroles *et al.* 2012). Chacun de ces sous-types possède des caractéristiques génomiques et cliniques propres, présentées dans le tableau 3.

Un des principaux critères dans la classification moléculaire des cancers du sein repose sur l'expression de trois récepteurs : les récepteurs des œstrogènes (ER), de la progestérone (PR) et HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Certains sous-types moléculaires expriment ainsi les récepteurs hormonaux et/ou HER2, tandis que d'autres ne les expriment pas : c'est le cas notamment des sous-types claudin-low et basal-like qui se caractérisent souvent par une absence d'expression des récepteurs ER, PR et HER2 (Tableau 3). Dans ce cas, on parle de tumeurs triple-négatives. Toutefois, il n'y a pas de superposition complète entre les tumeurs triple-négatives et les tumeurs du sous-type basal-like ou claudin-low, c'est-à-dire que toutes les tumeurs de type basal-like ou claudin-low ne sont pas triple-négatives, et inversement (Bertucci *et al.* 2008, Eroles *et al.* 2012, Dias *et al.* 2017). Outre les récepteurs ER, PR et HER2, les sous-types moléculaires diffèrent aussi entre eux par d'autres critères génomiques, comme l'expression de gènes de prolifération ou des mutations dans le gène *TP53* (Tableau 3).

L'expression de certains marqueurs a également permis d'établir une corrélation entre les différents sous-groupes et les cellules composant la glande mammaire. Les tumeurs luminal A et B expriment ainsi des marqueurs des cellules luminales comme les cytokératines CK8/18 et CK19, tandis que les tumeurs basal-like expriment des marqueurs des cellules basales comme les cytokératines CK5 et CK17 (Mathieu 2007). Les tumeurs HER2-enriched expriment par contre faiblement les marqueurs des cellules luminales (Eroles *et al.* 2012). Quant aux tumeurs claudin-low, elles semblent exprimer des marqueurs des cellules souches mammaires (Perou

2010). Elles se caractérisent également par une forte expression des gènes impliqués dans la TEM et une absence d'expression des claudines-3,-4,-7, impliquées dans la formation des jonctions intercellulaires (jonctions serrées) (Dias *et al.* 2017). Pour ce qui est du sous-type normal breast-like, ces tumeurs expriment des gènes caractéristiques du tissu adipeux. L'existence réelle de ce sous-type est toutefois discutée, puisque qu'il pourrait en fait être un biais de sélection correspondant à du tissu mammaire non tumoral (Parker *et al.* 2009).

Par ailleurs, chaque sous-type moléculaire est associé à un pronostic différent (Tableau 3). La classification moléculaire peut donc susciter un intérêt potentiel du point de vue clinique, afin de prédire l'évolution d'une tumeur. Elle a donc été facilitée et standardisée par l'utilisation de signatures moléculaires, comme la signature PAM50. Cette dernière permet de déterminer le sous-type moléculaire d'une tumeur grâce à l'analyse par RT-PCR de l'expression de 55 gènes (Parker *et al.* 2009). En plus de l'aide à la classification moléculaire, certaines signatures moléculaires ont une valeur pronostique : c'est le cas de PAM50 qui permet d'estimer la probabilité de récidive d'un cancer du sein (Parker *et al.* 2009). De la même manière, les signatures Oncotype-DX et Mammaprint, reposant respectivement sur le profil d'expression de 21 et 70 gènes, contribuent à évaluer le risque de métastases chez des patientes atteintes d'un cancer du sein sans envahissement ganglionnaire (Van 't Veer *et al.* 2003, Paik *et al.* 2004).

L'amélioration de la classification des tumeurs mammaires a donc favorisé une meilleure prise en charge thérapeutique.

5. Les stratégies thérapeutiques dans le cancer du sein

Différents traitements du cancer du sein sont disponibles. Selon les cas, ils ont pour but de supprimer la tumeur ou les métastases, de ralentir le développement de celles-ci et/ou de réduire le risque de récidive. On distingue la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées. Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou en association, selon la stratégie thérapeutique adoptée. Cette dernière dépend de la patiente (âge, statut ménopausal, antécédents et état de santé et des caractéristiques de la tumeur mammaire (type histologique, stade, grade et statut moléculaire) (INCa 2013).

5.1 La chirurgie

La chirurgie est un traitement local du cancer du sein : elle est utilisée pour traiter notamment les formes précoces de cancer du sein. Il existe deux principaux types d'intervention : la tumorectomie (chirurgie conservatrice) et la mastectomie (chirurgie non conservatrice) (INCa 2013). La tumorectomie consiste à retirer la tumeur, ainsi qu'une partie du tissu sain avoisinant,

tout en conservant la plus grande partie du sein. Cette chirurgie est utilisée pour les tumeurs localisées, non multicentriques et suffisamment petites par rapport à la taille du sein (Morrow *et al.* 2002). Si ces conditions ne sont pas réunies, la mastectomie est privilégiée : elle consiste alors à enlever le sein contenant la tumeur dans son intégralité, aréole et mamelon compris. Selon les cas, il peut également s'avérer nécessaire de retirer un ou plusieurs ganglions lymphatiques axillaires (INCa 2013).

La chirurgie peut être le seul traitement utilisé ou bien elle peut être suivie d'une chimiothérapie, et/ou d'une radiothérapie, et/ou d'une hormonothérapie. Ces traitements adjuvants ont pour but notamment de diminuer le risque de récidive, comme c'est le cas pour la radiothérapie, qui en complétant la tumorectomie, diminue de 70% le risque de récidive locale (EBCTCG 2005, INCa 2013). A l'inverse, la chirurgie peut être précédée d'une chimiothérapie ou d'une hormonothérapie : dans ce cas, on parle de traitements néoadjuvants. Le but ici est de réduire la taille de la tumeur, afin de faciliter l'intervention chirurgicale (INCa 2013).

5.2 La radiothérapie

De même que la chirurgie, la radiothérapie est un traitement local du cancer du sein. Elle repose sur l'utilisation de rayons ionisants capables d'endommager les cellules cancéreuses et de bloquer leur prolifération. Les rayonnements sont dirigés précisément sur la zone à traiter, afin de préserver au mieux les tissus sains et les organes avoisinants. On distingue principalement la curiethérapie et la radiothérapie externe, cette dernière étant la plus fréquemment utilisée dans le cadre du cancer du sein. La curiethérapie consiste à placer un radio-isotope (iridium 192) à l'intérieur du corps, directement au contact de la zone à traiter. La radiothérapie est quant à elle basée sur l'utilisation d'une source externe de rayonnements, dirigés à travers la peau vers la zone à traiter (INCa 2013).

Pour les cancers du sein *in situ* et infiltrants, la radiothérapie est souvent indiquée en complément de la chirurgie, le but étant de détruire les cellules cancéreuses qui pourraient subsister à l'issue de l'intervention chirurgicale. Quatre zones peuvent alors être ciblées : la glande mammaire et le lit tumoral (après une chirurgie conservatrice), la paroi thoracique (après une mastectomie) ou bien les ganglions sus-claviculaires et ceux de la chaîne mammaire interne. La radiothérapie peut aussi être appliquée pour certains cancers métastatiques, afin de traiter des métastases osseuses ou cérébrales (INCa 2013).

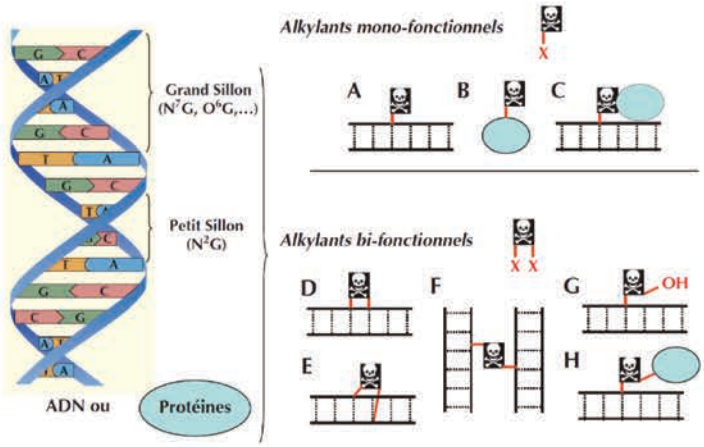

Figure 7 : Représentation schématique des produits d'alkylation générés par les agents alkylants. Ces derniers sont des entités électrophiles capables de réagir avec des groupements nucléophiles de l'ADN ou des protéines et d'y transférer de manière covalente des groupements alkyles. On peut distinguer les agents mono- et bifonctionnels. Avec un seul groupement réactif (noté en rouge), les alkylants monofonctionnels établissent un lien covalent avec la molécule cible pour former un adduit (A-C). Quant aux alkylants bifonctionnels, ils possèdent deux groupements réactifs (notés en rouge) : dans ce cas, ils établissent des pontages intrabrins ou inter-brins dans l'ADN ou entre une molécule d'ADN et une protéine (D-H). Si la cible est l'ADN, l'alkylation se produit majoritairement au niveau du grand sillon de la double hélice, souvent à hauteur des positions N^7, O^6 et N^2 de la guanine (d'après Pourquier 2011).

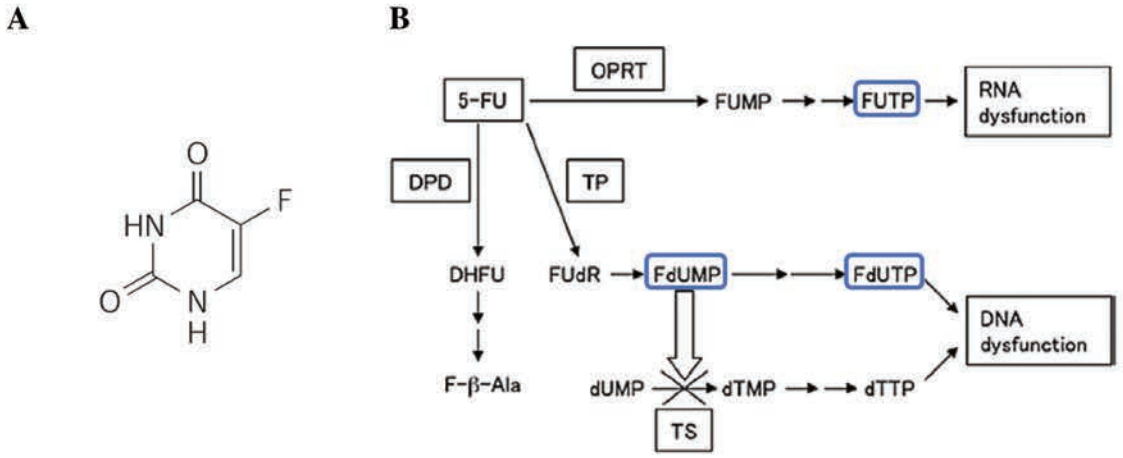

Figure 8 : Structure chimique (A) et métabolisme (B) du 5-fluorouracile (5-FU). (A) Le 5-FU est un analogue de l'uracile contenant en position C-5, un atome de fluor à la place d'un atome d'hydrogène. (B) Après son entrée dans la cellule, le 5-FU est converti en trois métabolites actifs principaux (encadrés en bleu) : le 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP), le 5-fluorodésoxyuridine triphosphate (FdUTP) et le 5-fluorouridine triphosphate (FUTP). Le FdUMP inhibe la thymidylate synthase (TS) : la synthèse de désoxythymidine monophosphate (dTMP) est ainsi inhibée, ce qui bloque la production de désoxythymidine triphosphate (dTTP), nécessaire à la synthèse de l'ADN. Le FdUMP est aussi converti en FdUTP qui est incorporé dans l'ADN. Par ailleurs, le 5-FU est métabolisé par l'orotate phosphoribosyltransférase (OPRT) en 5-fluorouridine monophosphate (FUMP), qui est lui-même transformé en FUTP. Ce dernier est incorporé dans l'ARN, altérant ainsi sa synthèse. Quant à la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), elle représente l'enzyme limitante dans le catabolisme du 5-FU, puisqu'elle métabolise 85% du 5-FU en métabolites inactifs dans le foie. DHFU, 5-fluoro-dihydrouracile; DNA, deoxyribonucleic acid; dUMP, désoxyuridine monophosphate; F-β-Ala, α-fluoro-β-alanine; FUdR, 5-fluorodésoxyuridine; RNA, ribonucleic acid; TP, thymidine phosphorylase (d'après Longley *et al.* 2003, Tamatani *et al.* 2012).

Par ailleurs, ces dernières années, une nouvelle approche de radiothérapie est en phase d'expérimentation. Elle consiste à irradier directement le lit tumoral pendant l'intervention chirurgicale : on parle alors de radiothérapie peropératoire (Williams *et al.* 2014).

5.3 La chimiothérapie

Contrairement à la chirurgie et à la radiothérapie, la chimiothérapie est un traitement systémique, c'est-à-dire qu'elle agit sur les cellules cancéreuses dispersées dans l'ensemble de l'organisme. Ce traitement repose sur l'utilisation de substances chimiques (agents de chimiothérapie) qui agissent principalement sur les mécanismes de la division cellulaire (INCa 2013). Quatre grandes familles d'agents de chimiothérapie sont utilisées pour traiter le cancer du sein :

- Les agents alkylants

Ce sont des molécules qui forment des liaisons covalentes avec des groupements de l'ADN ou des protéines, comme montré dans la figure 7, et qui interfèrent ainsi avec les processus de réplication et de transcription (Pourquier 2011). Le cyclophosphamide est un agent alkylant très utilisé dans le traitement du cancer du sein : il provoque la formation de pontages entre deux groupements de l'ADN (pontages intrabrins ou inter-brins) (Emadi *et al.* 2009).

- Les antimétabolites

Ce sont des analogues structuraux de différents métabolites, qui interfèrent avec la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Ils incluent des antifoliques, des analogues de nucléoside, des antipuriques et des antipyrimidiques (Martinez-Outschoorn *et al.* 2017). Le 5-fluorouracile (5-FU), utilisé dans le traitement du cancer du sein, est un analogue de l'uracile contenant en position C-5 un atome de fluor à la place d'un hydrogène (Figure 8A). Cet antipyrimidique inhibe la thymidylate synthase, qui catalyse la conversion du désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP), lui-même précurseur du désoxythymidine triphosphate (dTTP) nécessaire à la réplication et à la réparation de l'ADN (Figure 8B). Le 5-FU s'incorpore également frauduleusement dans l'ADN et l'ARN, bloquant ainsi la réplication de l'ADN, ainsi que la synthèse et la maturation des ARN (Parker and Cheng 1990).

- Les anthracyclines

Il s'agit d'une famille d'antibiotiques qui se caractérisent par un mode d'action complexe, reposant sur de multiples mécanismes : ce sont notamment des inhibiteurs de la topo-isomérase II, une enzyme modulant la topologie de l'ADN au cours de la réplication et de la transcription (Minotti *et al.* 2004, Vos *et al.* 2011). La doxorubicine est une anthracycline utilisée dans le

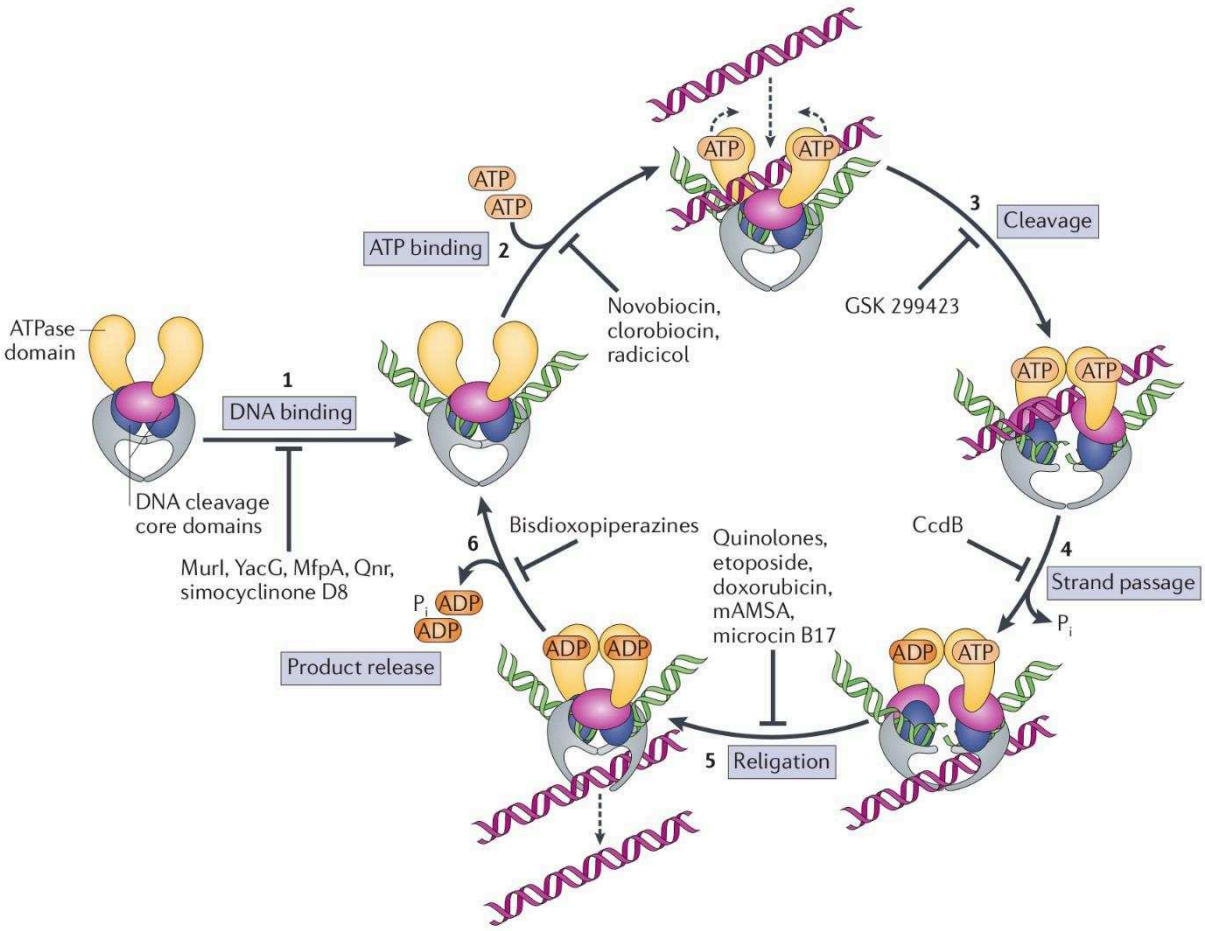

Figure 9 : Représentation des différentes étapes du cycle catalytique de la topo-isomérase II. Cette enzyme contrôle la topologie de l'ADN en formant des coupures double-brin transitoires et en catalysant le passage de segments d'ADN à travers ces coupures. Durant la catalyse, la topo-isomérase s'associe à un premier segment d'ADN (étape 1), puis à un deuxième (étape 2). La fixation de l'ATP stimule ensuite le clivage et l'ouverture du premier segment d'ADN (étape 3), ce qui permet le passage du deuxième segment à travers l'ouverture (étape 4). Après ce passage, les brins du premier segment d'ADN sont religués et le deuxième segment est libéré (étape 5). Dans une dernière étape, le premier segment d'ADN est libéré à son tour et l'enzyme retrouve sa configuration de départ (étape 6). Chacune de ces étapes peut être la cible d'agents, notés sur le schéma, qui bloquent l'action de la topo-isomérase II. Ce sont soit des inhibiteurs qui diminuent l'activité enzymatique de la topo II, soit des poisons, qui stabilisent les complexes de clivage. La doxorubicine appartient à la catégorie des poisons de la topo II : elle forme un complexe ternaire avec l'ADN et la topo II, empêchant ainsi l'étape de religation et entraînant la formation de cassures de l'ADN. ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; DNA, deoxyribonucleic acid; Pi, phosphate inorganique (d'après Vos et al. 2011)

traitement de nombreux cancers, dont celui du sein. Cette molécule inhibe l'action de la topo-isomérase II par la formation d'un complexe ternaire doxorubicine-ADN-topo-isomérase II, dans lequel l'ADN est clivé, induisant ainsi des cassures double brins (Figure 9) (Lansiaux and Pourquier 2011). La doxorubicine est également capable de s'intercaler dans l'ADN et de bloquer la progression des ADN et ARN polymérases, inhibant ainsi les processus de réplication et de transcription de l'ADN. Cette molécule peut aussi former des adduits à l'ADN (Cutts *et al.* 2005). Par ailleurs, la doxorubicine entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species), lorsqu'elle est métabolisée par des enzymes d'oxydoréductions comme la cytochrome P450 réductase. Il en résulte des dommages à l'ADN, ainsi qu'une peroxydation lipidique (Gewirtz 1999, Meredith and Dass 2016). En outre, la doxorubicine entraîne aussi une perturbation de l'homéostasie calcique, ainsi qu'une altération de l'activité respiratoire mitochondriale des cellules tumorales, avec une diminution de la quantité d'ATP (adénosine triphosphate), une baisse de la respiration mitochondriale et une augmentation de la production de ROS (Kuznetsov *et al.* 2011).

- Les agents antimitotiques

Ce sont des molécules qui se fixent sur la tubuline ou sur les microtubules et qui altèrent ainsi la dynamique des microtubules. Un ralentissement ou un blocage de la mitose est alors provoqué (Jordan and Wilson 2004). Le paclitaxel et le docétaxel font partie des agents de chimiothérapie utilisés dans le traitement des tumeurs mammaires. Ces deux agents antimitotiques appartiennent à la famille des taxanes : ils se fixent sur la tubuline et stabilisent les microtubules, empêchant ainsi la progression des cellules dans la mitose, de la métaphase vers l'anaphase (Parker *et al.* 2009).

La chimiothérapie est indiquée dans le traitement des cancers du sein de différents types. Elle peut tout d'abord être proposée en association avec la chirurgie dans le traitement des cancers du sein infiltrants. Dans ce cas, la chimiothérapie est utilisée pour réduire le risque de récidive (chimiothérapie adjuvante) ou bien afin de diminuer la taille d'une tumeur trop volumineuse (chimiothérapie néoadjuvante). Seule ou en association avec une hormonothérapie et/ou une thérapie ciblée, la chimiothérapie peut aussi être prescrite pour les cancers du sein métastatiques, pour lesquels les traitements médicamenteux (chimiothérapie et/ou thérapies ciblées et/ou hormonothérapie) sont le traitement principal. Le but est alors de stabiliser l'évolution du cancer et d'améliorer la qualité de vie (INCa 2013).

Différents agents de chimiothérapie sont le plus souvent associés, selon le plan de traitement défini en fonction de la patiente et des caractéristiques de la tumeur (Sharma *et al.* 2010). Les

Combinaison	Agents de chimiothérapie utilisés
AC	doxorubicine + cyclophosphamide
AC – Taxol	doxorubicine + cyclophosphamide, suivis de paclitaxel
TC	docétaxel + cyclophosphamide
TAC (ou DAC)	docétaxel + doxorubicine + cyclophosphamide
FAC (ou CAF)	cyclophosphamide + doxorubicine + 5-FU
FEC (ou CEF)	cyclophosphamide + épirubicine (anthracycline) + 5-FU
FEC – T	cyclophosphamide + épirubicine + 5-FU, suivis de docétaxel
CMF	cyclophosphamide + méthotrexate (antimétabolite) + 5-FU
Taxol – FAC	paclitaxel, suivi de cyclophosphamide + doxorubicine + 5-FU
	doxorubicine et docétaxel
EC-GCSF	épirubicine + cyclophosphamide
	docétaxel + carboplatine (agent alkylant)
	gemcitabine (antimétabolite) + docétaxel
	gemcitabine + paclitaxel
	capécitabine (antimétabolite) + docétaxel

Tableau 4 : Combinaisons de chimiothérapies les plus souvent administrées dans le traitement du cancer du sein (à partir de Société canadienne du cancer).

combinaisons de chimiothérapie les plus couramment administrées sont présentées dans le tableau 4.

Par ailleurs, les différents sous-types moléculaires du cancer du sein ne répondent pas tous de la même façon à la chimiothérapie. Ainsi, les tumeurs mammaires triple-négatives répondent mieux à la chimiothérapie néoadjuvante que d'autres types tumeurs. La chimiothérapie, seule ou en combinaison avec la chirurgie, représente le traitement principal des cancers triple-négatifs (Liedtke *et al.* 2008, Wahba and El-Hadaad 2015).

5.4 L'hormonothérapie

Environ 80% des tumeurs mammaires sont dites hormonosensibles, c'est-à-dire qu'elles expriment des récepteurs des œstrogènes et de la progestérone qui stimulent leur croissance. L'hormonothérapie cible de façon spécifique ce type de tumeur, en bloquant l'effet des hormones féminines sur la prolifération et la survie des cellules cancéreuses mammaires. Ce traitement systémique repose sur l'utilisation de différents types de molécules: les anti-œstrogènes, les anti-aromatases et les agonistes de la LHRH (luteinizing hormone releasing hormone). Ces molécules ont pour but de bloquer l'action des hormones ou bien d'inhiber leur synthèse.

Les anti-œstrogènes, de type SERM (selective estrogen receptor modulators) ou SERD (selective estrogen receptor degradation), sont des molécules empêchant l'action des œstrogènes. Les SERM, comme le tamoxifène, sont des antagonistes du récepteur ER, tandis que les SERD, tels que le fulvestrant, favorisent sa dégradation (Abdulkareem and Zurmi 2012, INCa 2013). Les anti-aromatases, comme l'exémestane, bloquent quant à eux la production des œstrogènes : ce sont des inhibiteurs de l'enzyme aromatase, qui catalyse la synthèse d'œstrogènes à partir d'androgènes (Abdulkareem and Zurmi 2012). L'aromatase permet de synthétiser des œstrogènes notamment après la ménopause, lorsque les ovaires ont cessé d'en produire : les anti-aromatases sont donc utilisés chez les femmes ménopausées (Vander *et al.* 2009, INCa 2013). Pour ce qui est des agonistes du récepteur de la LHRH, tels que la goséréline, ils sont utilisés chez la femme non ménopausée. Ces molécules bloquent par rétrocontrôle négatif la stimulation des ovaires par l'axe hypothalamo-hypophysaire, diminuant ainsi la production ovarienne d'œstrogènes (Abdulkareem and Zurmi 2012).

L'hormonothérapie est utilisée pour traiter des cancers hormonosensibles de différents stades. Elle peut tout d'abord être appliquée en complément de la chirurgie en cas de cancer infiltrant localisé ou non métastatique. La prescription dure alors généralement au moins 5 ans, le but

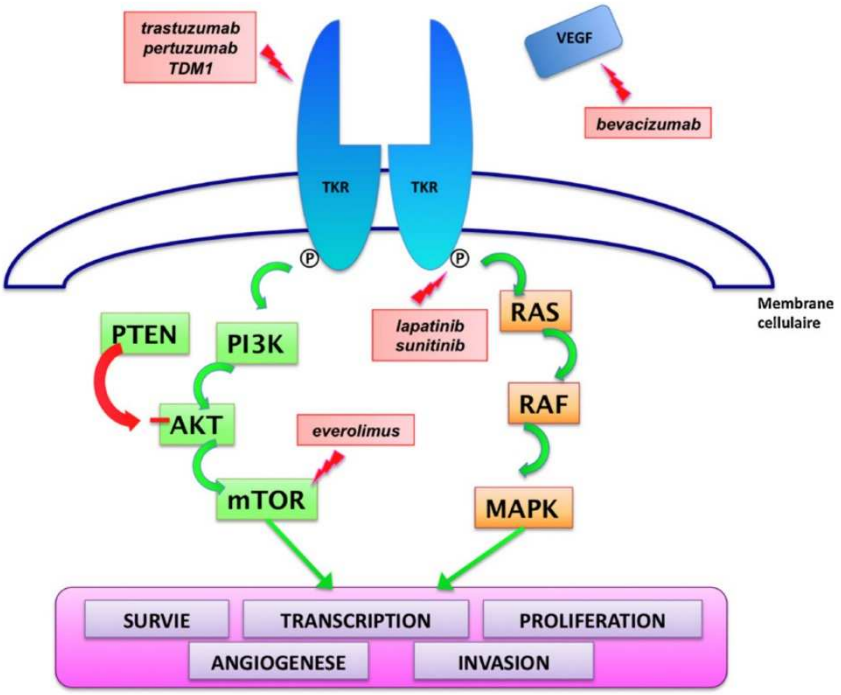

Figure 10 : Mécanismes d'action des molécules de thérapie ciblée utilisées pour traiter le cancer du sein. Sur cette figure, sont représentées de façon schématique les cascades de signalisation associées au récepteur à tyrosine kinase (TKR, tyrosine kinase receptor) HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Les molécules de thérapie ciblée, notées dans les cadres rouges, ont pour cible différents acteurs de ces cascades, bloquant ainsi la transduction du signal. Le bévacizumab cible quant à lui le processus d'angiogenèse, en se liant au VEGF (vascular endothelial growth factor). Akt, protein kinase B; MAPK, mitogen-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphoinositide 3 kinase; PTEN, phosphatase and tensin homolog, TDM1, trastuzumab emtansine (d'après Molnar-Stanciu *et al.* 2012).

étant de diminuer le risque de récidive locale ou à distance. Dans d'autres cas, l'hormonothérapie est proposée avant la chirurgie, afin de réduire la taille d'une tumeur trop volumineuse. Seule ou associée à d'autres traitements, elle peut aussi être prescrite pour traiter ou stabiliser l'évolution d'un cancer présentant des métastases (INCa 2013).

Par ailleurs, un second type d'hormonothérapie, autre que les traitements médicamenteux, existe. Cela consiste à supprimer de façon définitive la production d'œstrogènes au niveau des ovaires, par l'ablation de ces organes au cours d'une chirurgie (ovariectomie) ou par radiothérapie (irradiation des ovaires) (INCa 2013). L'ovariectomie est beaucoup utilisée en traitement préventif pour les femmes porteuses de mutations *BRCA1* ou *BRCA2*, dont le risque de développer un cancer du sein est très élevé. L'ablation des ovaires est alors associée à une diminution de moitié du risque de développer un cancer mammaire (Rebbeck *et al.* 2009).

5.5 Les thérapies ciblées

Grâce à une meilleure caractérisation moléculaire des cancers du sein et une compréhension améliorée des mécanismes de carcinogenèse mammaire, il est devenu possible de mettre en évidence des anomalies moléculaires spécifiques des cellules cancéreuses et de développer la thérapie ciblée. Il s'agit d'un traitement systémique basé sur l'utilisation de molécules qui ciblent spécifiquement une protéine ou un mécanisme impliqués dans le développement tumoral (Inserm).

La thérapie ciblée est indiquée dans le traitement des cancers du sein à différents stades, depuis un stade précoce jusqu'au stade métastatique. Cette thérapie peut être administrée seule ou en association avec la chimiothérapie ou l'hormonothérapie. Elle peut être néoadjuvante, adjuvante ou bien il peut s'agir d'un traitement de première ligne pour les cancers du sein métastatiques (INCa 2016b).

Environ 20% des cancers du sein se caractérisent par une amplification ou une surexpression du gène *HER2*, associées à un risque élevé de récidive ou de décès. Des molécules ont donc été mises au point pour cibler le récepteur à activité tyrosine kinase HER2, impliqué notamment dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaires (Arteaga *et al.* 2011). Le trastuzumab et le lapatinib sont deux molécules ciblant HER2 : elles sont utilisées dans le traitement des cancers du sein surexprimant ce récepteur. Le trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé, se liant au domaine extracellulaire de HER2 (Figure 10). Cette liaison empêche le clivage protéolytique du domaine extracellulaire, prévenant ainsi l'activation de HER2 (Arteaga *et al.* 2011). Le trastuzumab peut être utilisé seul après une radiothérapie, ou

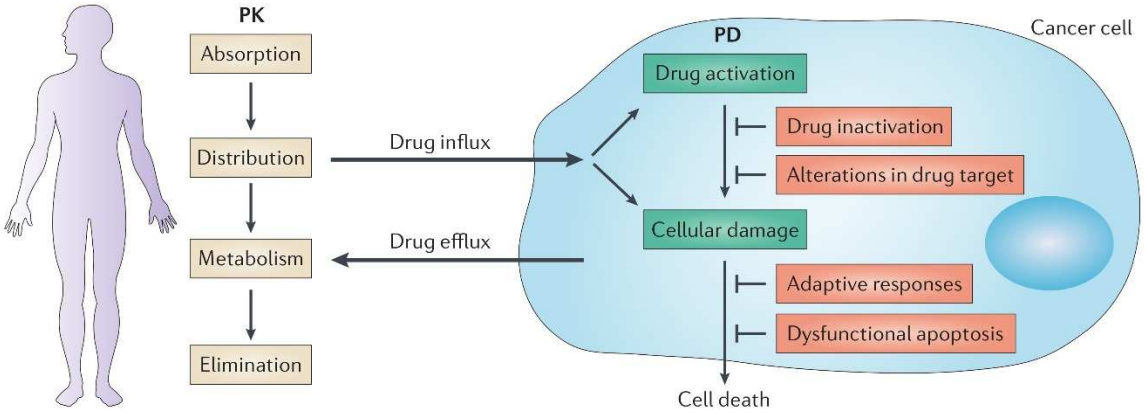

Figure 11 : Principaux mécanismes de résistance des cellules tumorales aux molécules anti-cancéreuses. La quantité de molécule atteignant une tumeur peut tout d'abord être limitée par les paramètres pharmacocinétiques (PK) de la molécule (absorption, distribution, métabolisme et élimination). Ensuite, dans la tumeur, les effets de la molécule sur les cellules cancéreuses (propriétés pharmacodynamiques (PD)) peuvent être réduits par des mécanismes de résistance variés qui sont notamment : un faible influx ou un efflux excessif de la molécule; une inactivation ou une absence d'activation de la molécule; une altération de la cible de la molécule (mutations ou changements du niveau d'expression); une adaptation de la tumeur (activation de voies de signalisation alternatives de survie ou réparation de l'ADN); une inactivation des voies de mort cellulaire (d'après Holohan *et al.* 2013).

en association à une chimiothérapie ou une hormonothérapie, pour le traitement des cancers du sein précoces ou métastatiques (INCa 2016b). Quant au lapatinib, il s'agit d'une petite molécule qui inhibe l'activité tyrosine kinase de HER2 : il bloque ainsi la transduction du signal via les voies de signalisation PI3K/Akt et Ras/Raf/MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Figure 10). Ce médicament est indiqué dans le traitement de cancers du sein métastatiques positifs pour HER2 (INCa 2013).

Outre le trastuzumab et le lapatinib, d'autres molécules de thérapie ciblée indiquées dans la figure 10, sont utilisées dans le traitement du cancer du sein: c'est le cas de l'évérolimus. Il s'agit d'un analogue de la rapamycine qui inhibe mTOR (mammalian target of rapamycin), une protéine kinase favorisant la prolifération et la survie cellulaires (Houghton 2010, Julien and Roux 2010). Cette molécule est administrée, en association avec l'hormonothérapie, pour traiter des cancers du sein métastatiques hormonodépendants (INCa 2013). Le bévacizumab est également utilisé pour traiter des cancers du sein présentant des métastases : c'est un anticorps monoclonal humanisé qui inhibe le processus d'angiogenèse. Il se lie au VEGF circulant et bloque ainsi sa fixation sur le récepteur VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) (Molnar-Stanciu *et al.* 2012). Ce médicament est administré en association avec la chimiothérapie (INCa 2013).

5.6 Limites des stratégies thérapeutiques du cancer du sein

Ces dernières décennies, la prise en charge thérapeutique des cancers du sein s'est améliorée. Cependant, dans certains cas, une résistance aux traitements est observée et des patientes doivent faire face à une récidive ou à l'apparition de métastases (Gu *et al.* 2016). Les traitements actuels du cancer du sein présentent donc certaines limites. Ainsi, environ 25% des patientes atteintes d'un cancer du sein ER^+ ne répondent pas au tamoxifène et la moitié des patientes traitées avec cette molécule développent un phénotype tamoxifène-résistant (EBCTCG 2005). De la même manière, des résistances *de novo* et acquises ont été rapportées pour le trastuzumab. Dans ce cas, le taux de réponse à la molécule utilisée en monothérapie n'est que de 11 à 26%, et la durée de réponse est inférieure à 1 an chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique (Gajria and Chandarlapaty 2011). Les phénomènes de résistance concernent aussi les patientes ayant reçu une chimiothérapie, puisque ces femmes développent fréquemment une résistance aux anthracyclines et/ou aux taxanes (Rivera and Gomez 2010). Des mécanismes variés sont à l'origine de la résistance des cellules tumorales à ces différents traitements : ils sont présentés dans la figure 11.

Outre les phénomènes de résistance, certains traitements du cancer du sein présentent des effets secondaires importants : c'est le cas notamment des agents de chimiothérapie. Les effets indésirables les plus fréquents de ces composés sont dus au fait que la chimiothérapie cible les cellules en prolifération rapide, qu'elles soient cancéreuses ou non. Les cellules de la peau, des cheveux ou de la moelle osseuse sont ainsi la cible des agents de chimiothérapie, ce qui entraîne de nombreux effets secondaires, comme une diminution des globules blancs, la chute des cheveux, ou encore de la fatigue (Ligue contre le cancer). Les molécules de thérapie ciblée provoquent elles aussi des effets secondaires. Le trastuzumab se caractérise de fait par des effets indésirables cardiaques, tandis que le bevacizumab suscite de l'hypertension artérielle (Molnar-Stanciu *et al.* 2012). De même, les molécules d'hormonothérapie peuvent entraîner des effets secondaires : les anti-aromatases provoquent par exemple des douleurs articulaires ou une diminution de la densité minérale osseuse, facteur de risque d'une ostéoporose (INCa 2013).

Enfin, certains sous-types moléculaires du cancer du sein ne disposent pas de stratégie thérapeutique optimale, comme les tumeurs mammaires triple-négatives qui sont très agressives. Ces tumeurs n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni le récepteur HER2 : elles ne peuvent donc bénéficier ni de l'hormonothérapie, ni de la thérapie ciblée. Ainsi, la chirurgie et la chimiothérapie, utilisées seules ou en combinaison, sont les deux seules options thérapeutiques pour ces tumeurs (Wahba and El-Hadaad 2015).

Au vu de ces données, il s'avère donc nécessaire d'optimiser les stratégies thérapeutiques et de développer de nouveaux agents anti-cancéreux moins toxiques. Dans ce contexte, une stratégie thérapeutique prometteuse repose sur l'utilisation d'agents ciblant le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses.

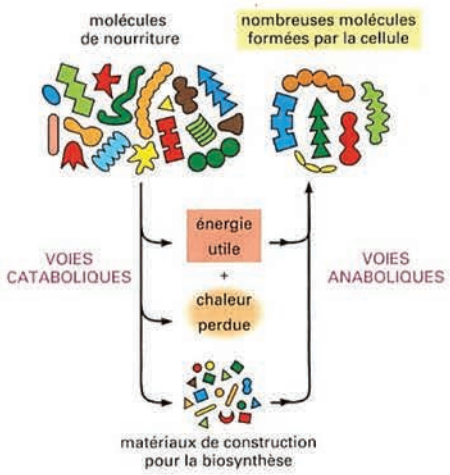

Figure 12 : Le métabolisme cellulaire comprend deux grands processus: le catabolisme et l'anabolisme. Des molécules complexes, issues de structures cellulaires ou de l'alimentation, sont dégradées en molécules plus simples au cours des réactions cataboliques, ce qui permet de produire de l'énergie et des molécules-précurseurs utilisées comme « matériau de construction » dans les processus de biosynthèse. Les voies anaboliques utilisent ces molécules simples et l'énergie produite par les réactions cataboliques pour la synthèse de macromolécules propres à la cellule. Une partie de l'énergie libérée par le catabolisme n'est pas réutilisée par la cellule : elle est alors dissipée sous forme de chaleur (d'après Bruce Alberts 2005).

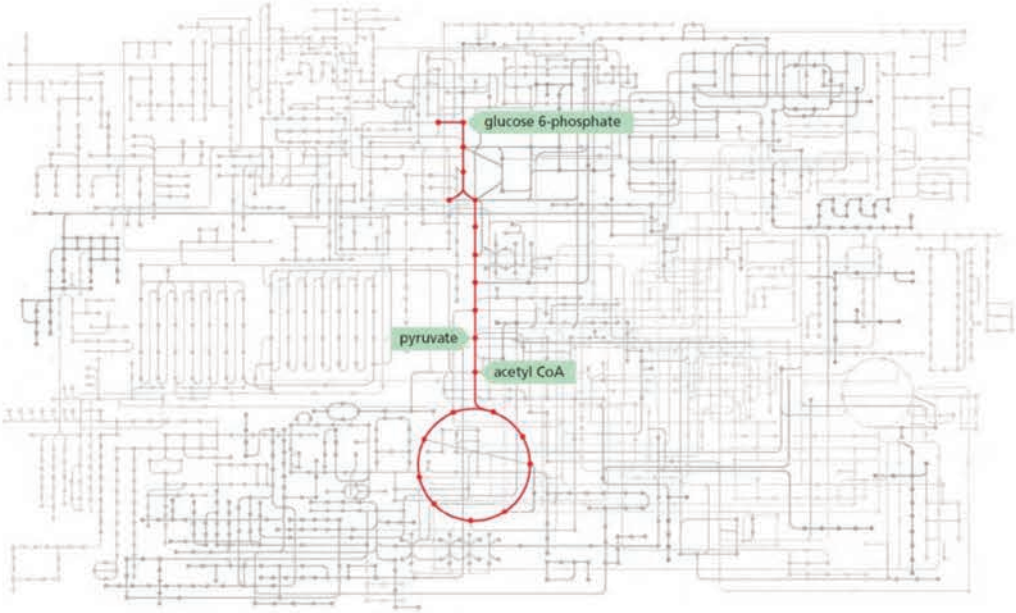

Figure 13 : Le métabolisme cellulaire constitue un vaste réseau. Sur ce schéma, sont représentées de façon non exhaustive environ 2000 réactions métaboliques participant à la synthèse des divers constituants cellulaires, ainsi qu'à la production d'énergie. Les voies colorées en rouge représentent la glycolyse et le cycle de Krebs qui participent au métabolisme énergétique. Chaque point du réseau indique un produit intermédiaire d'une voie métabolique (d'après Alberts *et al.* 2015).

II. METABOLISME ENERGETIQUE ET CANCER

1. Le métabolisme énergétique d'une cellule non cancéreuse

1.1 Présentation du métabolisme cellulaire et énergétique

Le métabolisme est défini comme l'ensemble des réactions biochimiques se produisant au sein d'un organisme, et plus spécifiquement au sein d'une cellule. Il comprend deux grands processus : le catabolisme et l'anabolisme (Larousse 1995). Ces deux processus permettent de synthétiser des molécules complexes constituant la cellule et de produire de l'énergie.

Le catabolisme correspond à l'ensemble des réactions qui dégradent des molécules complexes en des molécules plus simples. Ces molécules complexes sont d'origine cellulaire ou sont apportées à l'organisme par l'alimentation (Bruce Alberts 2005). Le processus catabolique permet de produire de l'énergie utilisable par la cellule pour divers procédés, ainsi que des précurseurs qui pourront être mis à profit comme « matériaux de construction » pour les processus de biosynthèse (Figure 12). Les réactions du catabolisme sont dites exergoniques puisqu'elles permettent la libération d'énergie (Moussard 2006).

L'anabolisme représente l'ensemble des réactions qui permettent la synthèse de molécules complexes à partir de molécules plus simples, issues entre autres du catabolisme. Les réactions anaboliques permettent la synthèse des macromolécules constituant la cellule (Figure 12). Ce processus étant consommateur en énergie, une partie de l'énergie libérée lors du catabolisme peut être mise à profit pour l'anabolisme (Bruce Alberts 2005). Les réactions anaboliques sont dites endergoniques puisqu'elles consomment de l'énergie (Moussard 2006).

Les réactions du métabolisme cellulaire sont organisées en un vaste réseau de voies métaboliques interconnectées (Figure 13). Chacune de ces voies exerce une fonction propre et l'association de plusieurs voies permet le métabolisme d'un constituant particulier de la cellule, tels que les nucléotides. Dans ce réseau, est également intégré l'ensemble des réactions permettant de produire de l'énergie au sein d'une cellule : il s'agit du métabolisme énergétique. La glycolyse et le métabolisme mitochondrial, formé par le cycle de Krebs (aussi appelé cycle de l'acide citrique) et la phosphorylation oxydative, sont les deux voies principales du métabolisme énergétique. Ce dernier permet de produire de l'énergie grâce à l'oxydation de substrats issus des réactions cataboliques (Bruce Alberts 2005).

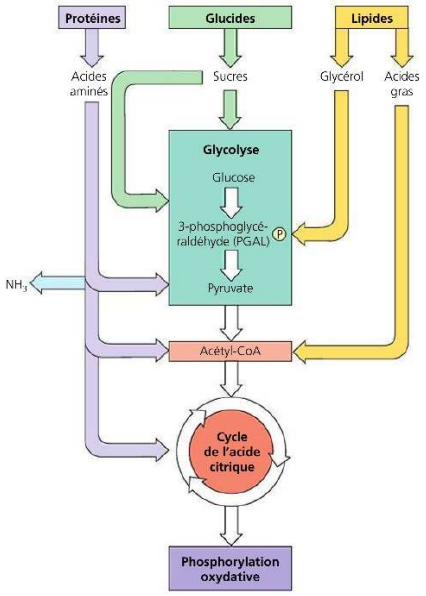

Figure 14 : Les réactions cataboliques fournissent des substrats pour le métabolisme énergétique. Au cours des réactions cataboliques, les protéines, glucides et lipides sont digérés respectivement en acides aminés, sucres, glycérol et acides gras. Ces monomères sont utilisés comme substrats à divers endroits dans glycolyse et/ou le cycle de Krebs, permettant ainsi leur oxydation pour la production d'énergie. Les acides aminés sont intégrés comme intermédiaires dans la glycolyse et dans le cycle de Krebs, ainsi que sous la forme d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), qui est alimente le cycle de Krebs, issu de la glycolyse. Les acides gras participent au métabolisme énergétique en tant que substrats du cycle de Krebs, tandis que le glycérol sert d'intermédiaire pour la glycolyse. Les sucres sont seulement des substrats pour la glycolyse (d'après Reece and Campbell 2012).

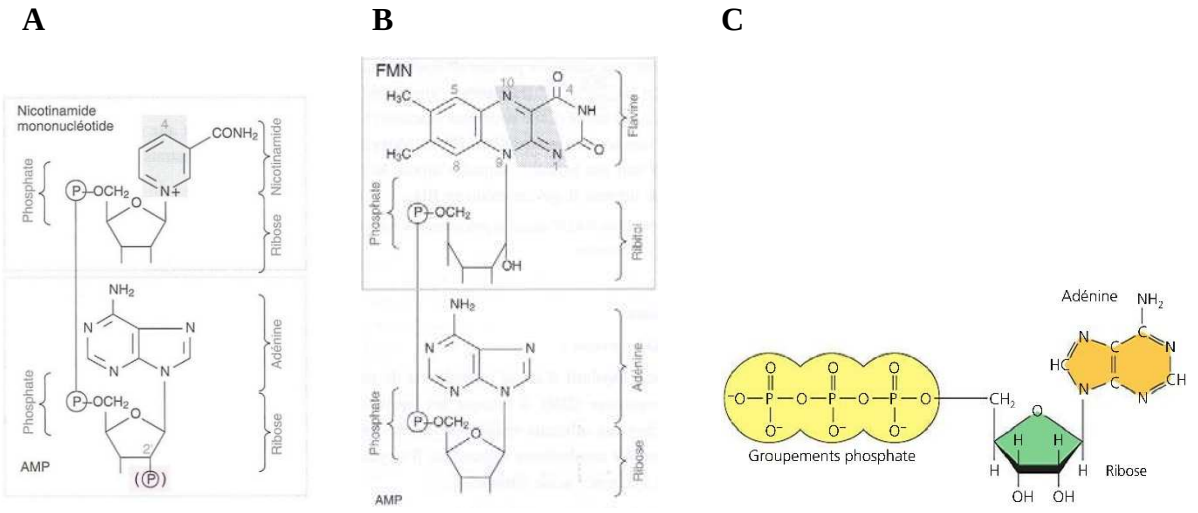

Figure 15 : Structures chimiques du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide), du FAD (flavine adénine dinucléotide) et de l'ATP (adénosine triphosphate). (A) Le coenzyme NAD est composé de l'adénosine monophosphate (AMP) et du nicotinamide mononucléotide. NAD^+ et NADH (ou $NADH,H^+$) correspondent respectivement aux formes oxydées et réduites du NAD. (B) Le coenzyme FAD est composé du nucléotide AMP et du nucléotide flavine mononucléotide (FMN, cadre). FAD et $FADH_2$ correspondent respectivement aux formes oxydées et réduites du FAD. (C) L'ATP est un nucléoside triphosphate composé d'un sucre ribose, d'une base azotée adénine et d'une chaîne de trois groupements phosphate. Les zones grisées sur les schémas représentent la partie active des molécules (d'après Moussard 2006, Reece and Campbell 2012).

1.2 Les substrats du métabolisme énergétique

Lors des réactions cataboliques, les protéines, les lipides et les polysaccharides qui constituent la majorité de notre alimentation sont dégradés par des enzymes au sein de l'intestin ou dans les lysosomes. Les enzymes digestives réduisent ces macromolécules en leurs sous-unités monomériques respectives : les protéines en acides aminés, les graisses en acides gras et glycérol et les polysaccharides en sucres (Bruce Alberts 2005). Ces molécules plus simples entrent ensuite dans le cytosol des cellules et sont utilisés lors de la glycolyse et/ou du cycle de Krebs comme substrats (Figure 14). Ces différents nutriments seront oxydés progressivement au cours des différentes étapes du métabolisme énergétique pour mener à la production d'énergie.

Les substrats du métabolisme énergétique peuvent également provenir du catabolisme de molécules de stockage telles que le glycogène qui est la forme de stockage du glucose dans les cellules animales (Moussard 2006). Le processus d'autophagie permet également de fournir à la cellule des substrats endogènes pour le métabolisme cellulaire. Il s'agit un processus au cours duquel le cytoplasme d'une cellule, ainsi qu'une partie de ses organites, sont dégradés par les enzymes contenues dans les lysosomes. Ce mécanisme permet de recycler les constituants usés ou malformés de la cellule ou bien de fournir une source de nutriments en cas de carence (Rabinowitz and White 2010). Les produits de l'autophagie peuvent ainsi être mis à profit comme substrats pour les procédés de biosynthèse ou pour la production d'énergie au sein de la cellule.

Par ailleurs, il est à noter que selon l'origine du tissu et les conditions physiologiques rencontrées, les substrats utilisés par les cellules ne sont pas les mêmes. Certains tissus sont gluco-dépendants, comme le tissu cérébral, alors que d'autres utilisent les acides gras autant que le glucose. En cas de jeûne, le glucose est réservé aux tissus gluco-dépendants, les autres tissus étant plutôt associés à un régime lipidique (Moussard 2006).

1.3 Les transporteurs d'énergie dans le métabolisme énergétique

Les coenzymes NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) et FAD (flavine adénine dinucléotide), dont les structures sont présentées dans la figure 15, récupèrent l'énergie libérée par l'oxydation des nutriments au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs. La réduction de NAD^+ et FAD mène à la formation de NADH, H^+ et $FADH_2$ selon les réactions suivantes :

$$FAD + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow FADH_2$$

$$NAD^+ + 2\ e^- + 2\ H^+ \rightarrow NADH + H^+ \text{ ou } NADH, H^+$$

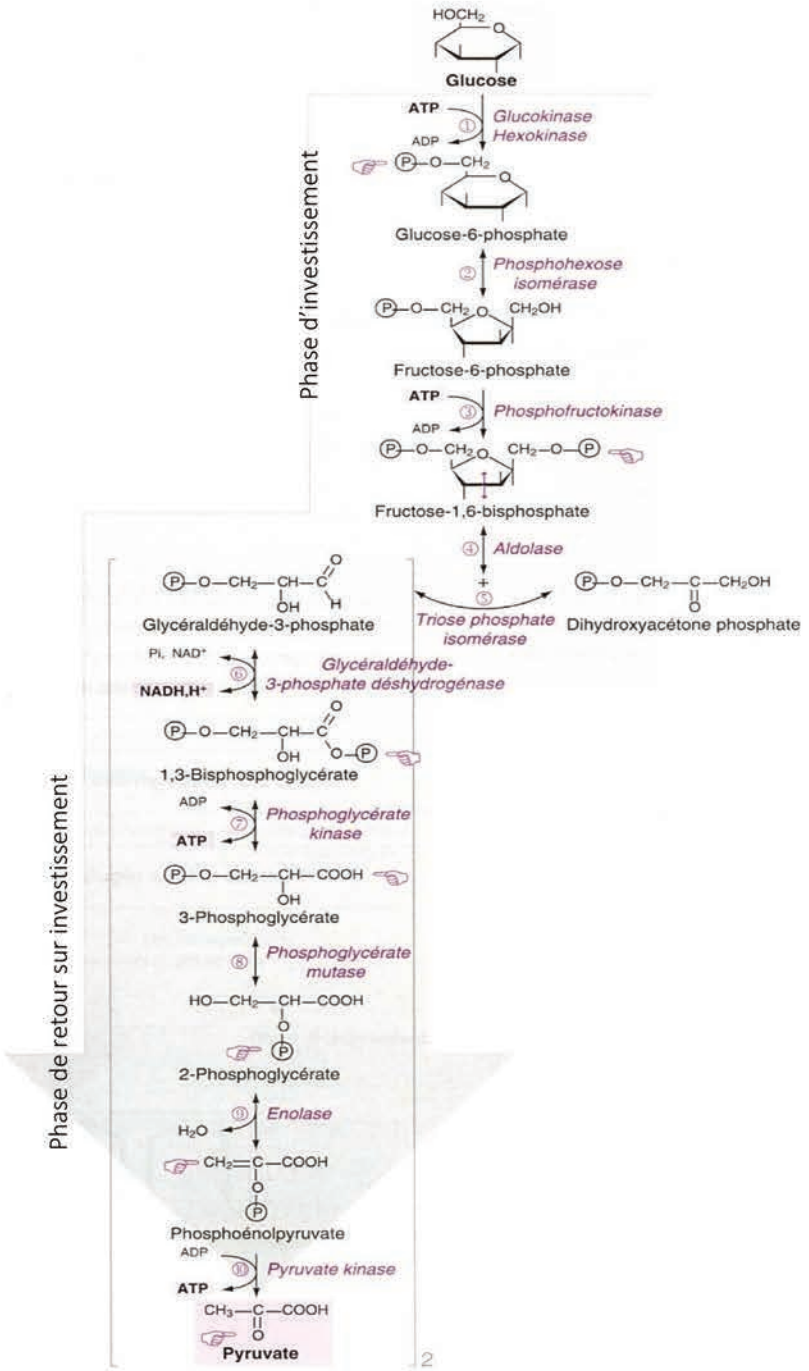

Figure 16 : Les différentes étapes de la glycolyse. Sur ce schéma, sont représentées les 10 réactions chimiques qui composent la glycolyse. La première étape est catalysée par la glucokinase, exprimée dans le foie et le pancréas, ou par l'hexokinase qui est ubiquiste (en particulier musculaire). Au cours de la 4ème réaction sont obtenus deux sucres intermédiaires : le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone phosphate. Ce dernier est converti en glycéraldéhyde-3-phosphate au cours de la 5ème réaction. A partir de ce point, les réactions suivantes sont donc réalisées en double grâce aux deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate. Par ailleurs, la glycolyse peut être divisée en deux phases : une phase d'investissement où il y a consommation d'ATP et une phase de retour sur investissement où de l'ATP est produit. Les modifications chimiques réalisées au cours des différentes étapes sont indiquées par le symbole ☞. ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide ; Pi, phosphate inorganique (d'après Moussard 2006).

Ces coenzymes sont donc les transporteurs respectifs d'ions hydrure (deux électrons et un proton) et d'atomes d'hydrogène. Les liaisons chimiques seront ensuite rompues (réoxydation des coenzymes) afin de permettre la synthèse d'ATP au cours de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie (Bruce Alberts 2005).

L'ATP (adénosine triphosphate), dont la structure est présentée dans la figure 15, est la molécule de stockage d'énergie la plus abondante dans la cellule (Bruce Alberts 2005). Cette molécule est synthétisée selon la réaction de phosphorylation suivante (où Pi et ADP signifient respectivement phosphate inorganique et adénosine diphosphate) :

$$ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O$$

Cette réaction nécessite de l'énergie apportée par l'oxydation des coenzymes NADH et $FADH_2$. L'énergie stockée sous forme d'ATP sera ensuite restituée lors de l'hydrolyse de la molécule pour la réalisation de couplages énergétiques. Le couplage d'énergie consiste à employer l'énergie libérée par une réaction exergonique pour déclencher une réaction endergonique. Dans la plupart des cas, l'ATP est la source d'énergie directe pour ces couplages énergétiques : elle permet ainsi à la cellule de produire du travail. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire à la réalisation des travaux chimiques, mécaniques et de transport de la cellule (Reece and Campbell 2012). L'ATP est obtenu au cours de certaines étapes de la glycolyse, ainsi que du cycle de Krebs, mais 90% de sa production a lieu pendant la phosphorylation oxydative (Moussard 2006).

1.4 La glycolyse

La glycolyse, aussi appelée voie d'Embden-Meyerhof, est la principale voie du métabolisme des glucides dans la cellule, constituant ainsi la première étape du processus d'oxydation du glucose au cours du métabolisme énergétique. Cette voie métabolique est exclusivement cytoplasmique et la présence d'oxygène n'est pas requise pour son fonctionnement (Moussard 2006).

1.4.1 Mécanisme et rendement de la glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique composée de 10 réactions chimiques successives, au cours desquelles une molécule de glucose sera transformée en deux molécules de pyruvate (Figure 16). Chacune des étapes de la glycolyse est catalysée par une enzyme particulière, permettant ainsi la formation d'un sucre intermédiaire différent à chaque étape (Bruce Alberts 2005).

.

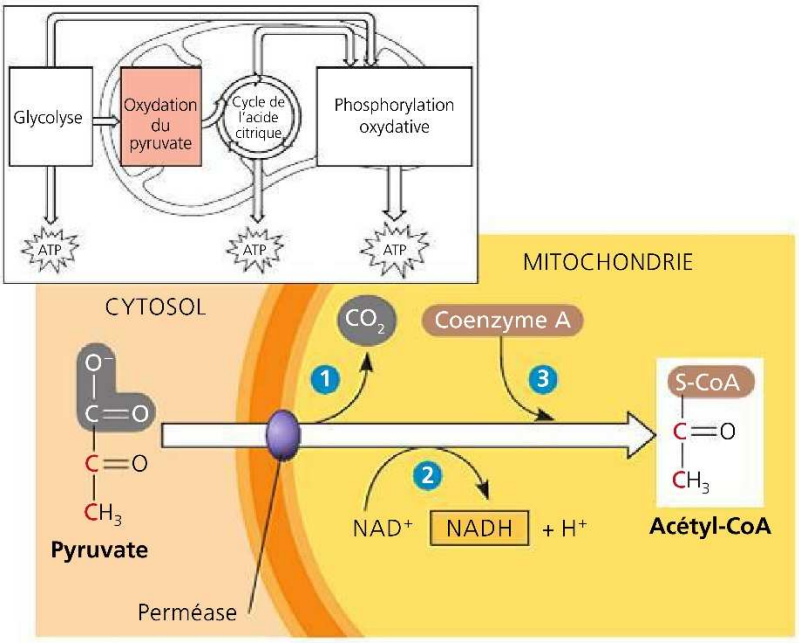

Figure 17 : Devenir du pyruvate en conditions aérobies. A l'issue de la glycolyse, le pyruvate entre dans la mitochondrie par transport actif grâce à une perméase. Il est ensuite oxydé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) par la pyruvate déshydrogénase. Dans une première étape, le groupement carboxyle (COO^-) du pyruvate est éliminé et libéré sous forme de dioxyde de carbone (CO_2). Le fragment restant, composé de deux atomes de carbone, est oxydé et forme ainsi un acétate. Les électrons et protons libérés au cours de l'oxydation sont transférés au coenzyme NAD^+ (étape 2). Dans une dernière étape, l'acétate est attaché au coenzyme A, dérivé d'une vitamine du groupe B, pour former l'acétyl-CoA. Les atomes de carbone du groupement acétyle de l'acétyl-CoA seront ensuite oxydés au cours du cycle de Krebs (noté ici cycle de l'acide citrique) et la molécule de NADH formée sera utilisée pour la synthèse d'ATP lors de la phosphorylation oxydative. Il faut noter que cette réaction est réalisée en double dans la cellule puisque deux molécules de pyruvate sont issues de la glycolyse. ATP, adénosine triphosphate ; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide (d'après Reece and Campbell 2012).

La glycolyse peut être divisée en deux phases, constituées chacune de cinq étapes successives (Moussard 2006). La première phase correspond à une phase d'investissement, au cours de laquelle deux molécules d'ATP sont consommées pour permettre la transformation d'une molécule de glucose en deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate. La seconde phase consiste en une phase de retour sur investissement (Figure 16). Chaque molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate est métabolisée en une molécule de pyruvate, menant à la synthèse de deux molécules d'ATP par molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate, soit une production de quatre molécules d'ATP pour les deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate issues d'une molécule de glucose. Les deux molécules d'ATP investies dans la première phase de la glycolyse sont ainsi récupérées au cours de la seconde phase et le gain net de la glycolyse est donc de deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose (Moussard 2006).

Par ailleurs, la sixième étape de la glycolyse, qui permet la transformation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycérate, est une réaction d'oxydoréduction. Deux électrons et deux protons sont ainsi libérés et pris en charge par le coenzyme NAD^+ (Figure 16). Cette étape permet donc l'obtention de deux molécules de NADH (1 molécule de NADH par molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate), qui seront ensuite utilisées pour la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie (Moussard 2006).

L'ensemble des réactions chimiques de la glycolyse mène au bilan métabolique suivant :

$$\text{Glucose} + 2\ \text{Pi} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{NAD}^+ \rightarrow 2\ \text{Pyruvate} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{H}_2\text{O} + 2\ \text{NADH} + 2\ \text{H}^+$$

L'utilisation du pyruvate à l'issue de la glycolyse dépend ensuite de la présence ou non d'oxygène. En conditions aérobies (présence d'oxygène), le pyruvate entre dans la mitochondrie pour permettre le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, alors qu'en conditions anaérobies (absence d'oxygène), il subit la fermentation lactique dans le cytosol (Moussard 2006). Le maintien de l'activité glycolytique nécessite par ailleurs que le coenzyme NADH soit réoxydé sous la forme NAD^+ après la synthèse de pyruvate, afin d'être à nouveau utilisable pour la glycolyse. En présence d'oxygène, cette réoxydation a lieu lors de la phosphorylation oxydative, tandis qu'en conditions anaérobies, le NADH est réoxydé en NAD^+ grâce à la fermentation lactique (Moussard 2006).

1.4.2 Destin du pyruvate en conditions aérobies et anaérobies

En conditions aérobies, après transport actif dans la mitochondrie, le pyruvate subit une réaction de décarboxylation oxydative où il est transformé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (Figure 17). Cette réaction est catalysée par la pyruvate déshydrogénase, qui est un complexe

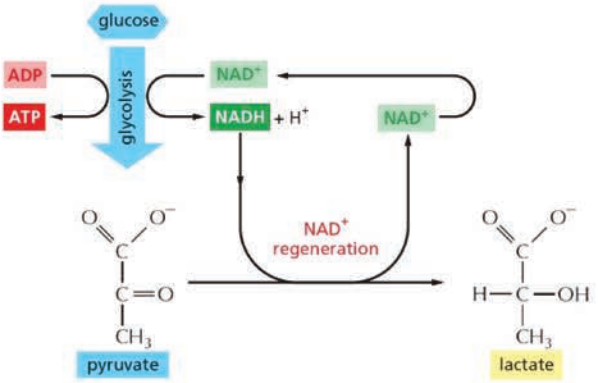

Figure 18 : La fermentation lactique permet la transformation du pyruvate en lactate en conditions anaérobies. Cette réaction chimique a lieu dans le cytoplasme grâce à la pyruvate déshydrogènase. Deux molécules de lactate sont formées à partir des deux molécules de pyruvate issues de la glycolyse. Les électrons et protons récupérés par le coenzyme NADH au cours de la glycolyse sont transférés aux molécules de lactate, permettant ainsi la réoxydation du NADH en NAD^+. ATP, adénosine triphosphate ; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide (d'après Alberts *et al.* 2015).

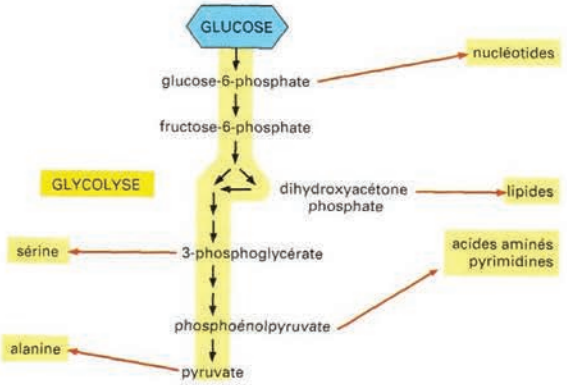

Figure 19 : La glycolyse fournit de nombreux précurseurs pour les processus de biosynthèse. Différents intermédiaires de la glycolyse sont intégrés dans les voies anaboliques cellulaires afin de permettre la synthèse des constituants de la cellule. Le glucose-6-phosphate permet la synthèse des nucléotides tandis que le dihydroxyacétone phosphate participe à la synthèse des lipides. La synthèse des acides aminés requiert la présence de différents intermédiaires de la glycolyse comme le pyruvate (d'après Bruce Alberts 2005).

multienzymatique, formé de trois enzymes et fonctionnant avec 5 coenzymes (Moussard 2006). La production d'acétyl-CoA est associée à la formation d'une molécule de CO_2 et de NADH (Figure 17). Puisque deux molécules de pyruvate sont issues de la glycolyse, cette réaction mène à un bilan final de deux molécules d'acétyl-CoA, de NADH et de CO_2 pour une molécule de glucose (Reece and Campbell 2012). L'acétyl-CoA entre ensuite dans le cycle de Krebs pour la poursuite du processus d'oxydation, tandis que les molécules de NADH seront utilisées dans la mitochondrie au cours de la phosphorylation oxydative pour la synthèse d'ATP (Moussard 2006).

En conditions anaérobies, le pyruvate est transformé en lactate au cours de la fermentation lactique (Figure 18). Cette réaction est catalysée par la lactate déshydrogénase. Elle permet la production d'une molécule de lactate et la réoxydation du NADH en NAD^+ (Moussard 2006). Puisque deux molécules de pyruvate proviennent de la glycolyse, alors cette étape mène à un bilan final de deux molécules de lactate et deux molécules de NAD^+ pour une molécule de glucose. A l'issue de sa production, le lactate est excrété de la cellule, mettant ainsi fin au cycle d'oxydation du glucose en conditions anaérobies sans production supplémentaire d'énergie (Bruce Alberts 2005). Le bilan énergétique de l'oxydation du glucose par la voie anaérobie est donc faible, puisqu'il est seulement de deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose (Moussard 2006). Il est à noter toutefois que le lactate excrété de la cellule peut être réabsorbé pour produire du glucose au cours de la néoglucogenèse (Moussard 2006).

1.4.3 Contribution de la glycolyse aux processus de biosynthèse

En plus d'être source d'énergie, la glycolyse est également impliquée dans les processus de biosynthèse de la cellule (Bruce Alberts 2005). Cette voie métabolique fournit en effet de nombreux précurseurs pour la synthèse des divers constituants de la cellule, tels que les acides aminés, les lipides et les nucléotides (Figure 19). Le glucose-6-phosphate est par exemple utilisé comme substrat dans la voie des pentoses phosphate : il contribue à la synthèse du ribose-5-phosphate, indispensable à la synthèse des nucléotides (Moussard 2006). Dans la cellule, la glycolyse peut ainsi exercer à la fois un rôle bioénergétique et biosynthétique.

1.4.4 Régulation de la glycolyse

En raison de son rôle central comme source d'énergie et de précurseurs pour les processus de biosynthèse, la glycolyse est une voie métabolique fortement régulée afin d'adapter son activité en fonction des besoins de la cellule.

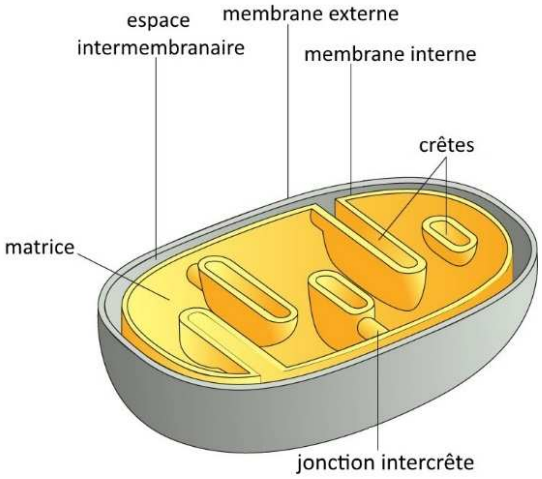

Figure 20 : Structure de la mitochondrie. La membrane externe sépare la mitochondrie du cytoplasme, mais reste perméable à de nombreuses molécules. La membrane interne, imperméable, forme une barrière entre l'espace intermembranaire et la matrice. De plus, elle présente de nombreuses invaginations, formant les crêtes (adapté d'après Alberts *et al.* 2015).

Son activité dépend de la glycémie au niveau de l'organisme et de l'entrée du glucose dans les cellules (Moussard 2006). L'activité de la glycolyse dépend également de la vitesse de certaines réactions chimiques. Trois étapes sont irréversibles au cours de la glycolyse et représentent ainsi des points clefs de régulation (Moussard 2006). Il s'agit de la première étape catalysée par l'hexokinase, de la troisième étape réalisée par la phosphofructokinase-1 (réaction limitante majeure) et de la dernière étape catalysée par la pyruvate kinase. Trois modes de contrôle permettent de réguler ces étapes critiques : une régulation allostérique de l'activité enzymatique, un contrôle par modification covalente des enzymes et une régulation transcriptionnelle des gènes de ces enzymes (Moussard 2006).

1.5 Le métabolisme mitochondrial

La mitochondrie tient une place importante dans la cellule puisqu'elle participe à de nombreux processus cellulaires. Sa fonction principale repose sur la production d'énergie : elle représente le « poumon énergétique » de la cellule (Kuhlbrandt 2015). Elle est également impliquée dans la synthèse de constituants cellulaires, dans la signalisation calcique ou encore dans le processus de mort cellulaire par apoptose (Osellame *et al.* 2012). Elle constitue par ailleurs un site majeur de production des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule (Carriere *et al.* 2006).

1.5.1 La structure de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite limité par deux membranes : les membranes externe et interne. Deux compartiments principaux sont alors définis : l'espace intermembranaire et la matrice (Figure 20).

1.5.1.1 Les membranes externe et interne de la mitochondrie

Les membranes externe et interne de la mitochondrie sont formées par des bicouches lipidiques, dans lesquelles sont enchassées des protéines. La membrane externe de la mitochondrie est composée de 50% de phospholipides et 50 % de protéines (Distler *et al.* 2008). Cette membrane est perméable à de nombreuses molécules, en raison de la présence de porines (ou VDAC (Voltage-dependent anion channel)) (Kuhlbrandt 2015). Ces protéines de transport, formant de grands canaux aqueux, permettent le passage à travers la membrane externe de diverses molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 10 kDa (Bruce Alberts 2005). Les VDAC sont perméables aux ions (Cl^-, K^+ par exemple), à de plus grosses molécules chargées négativement comme le glutamate et l'ATP, ainsi qu'à de grosses molécules chargées positivement comme la dopamine et l'acétylcholine (Shoshan-Barmatz *et al.* 2010). Du fait de

la perméabilité de la membrane externe, l'espace intermembranaire présente une composition chimique proche de celle du cytosol (Bruce Alberts 2005).

La membrane interne de la mitochondrie présente des caractéristiques différentes de celles de la membrane externe. En effet, elle est composée d'un tiers de phospholipides pour deux tiers de protéines (Distler *et al.* 2008). De plus, contrairement à la membrane externe, elle est imperméable aux ions et aux molécules. Des protéines de transport spécifiques sont ainsi requises pour le passage des ions et des divers métabolites au travers de cette membrane; l'ATP-ADP translocase en est un exemple (Kuhlbrandt 2015). La membrane interne mitochondriale forme donc une barrière, résultant en une composition ionique différente entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Cette caractéristique est mise à profit pour le processus de phosphorylation oxydative, puisque la mise en place d'un gradient électrochimique au travers de la membrane interne constitue l'élément moteur pour la production d'ATP dans la mitochondrie (Kuhlbrandt 2015).

Par ailleurs, la membrane interne de la mitochondrie présente de nombreuses invaginations, formant ainsi des crêtes qui se prolongent dans la matrice mitochondriale (Figure 20). Ces replis sont des zones spécialisées de la membrane interne : elles contiennent l'ensemble de la machinerie mitochondriale permettant la production d'énergie (chaîne respiratoire) (Kuhlbrandt 2015). Grâce à la visualisation tridimensionnelle des mitochondries *in situ*, une nouvelle structure des crêtes a été proposée ces dernières années. Au lieu de former de larges ouvertures reliées à l'espace intermembranaire, les crêtes mitochondriales constitueraient plutôt un troisième compartiment mitochondrial, séparé de l'espace intermembranaire et du reste de la membrane interne par des jonctions intercrêtes (Figure 20). Les crêtes possèderaient ainsi leur propre lumen (Perkins and Frey 2000, Kuhlbrandt 2015).

1.5.1.2 La matrice

La matrice représente un compartiment spécialisé de la mitochondrie, au sein duquel sont réalisés plusieurs processus cellulaires (réplication de l'ADN mitochondrial, transcription et synthèse de protéines par exemple) ainsi que de nombreuses réactions enzymatiques (Kuhlbrandt 2015). Les réactions d'oxydation du pyruvate et des acides gras, ainsi que le cycle de Krebs ont lieu dans ce compartiment (Bruce Alberts 2005).

Selon la théorie endosymbiotique, les mitochondries dérivent d'une ancienne α-protéobactérie, incorporée dans une cellule eucaryote il y a environ 1 ou 2 milliards d'années. Les mitochondries possèdent donc leur propre ADN contenu dans la matrice (Osellame *et al.* 2012).

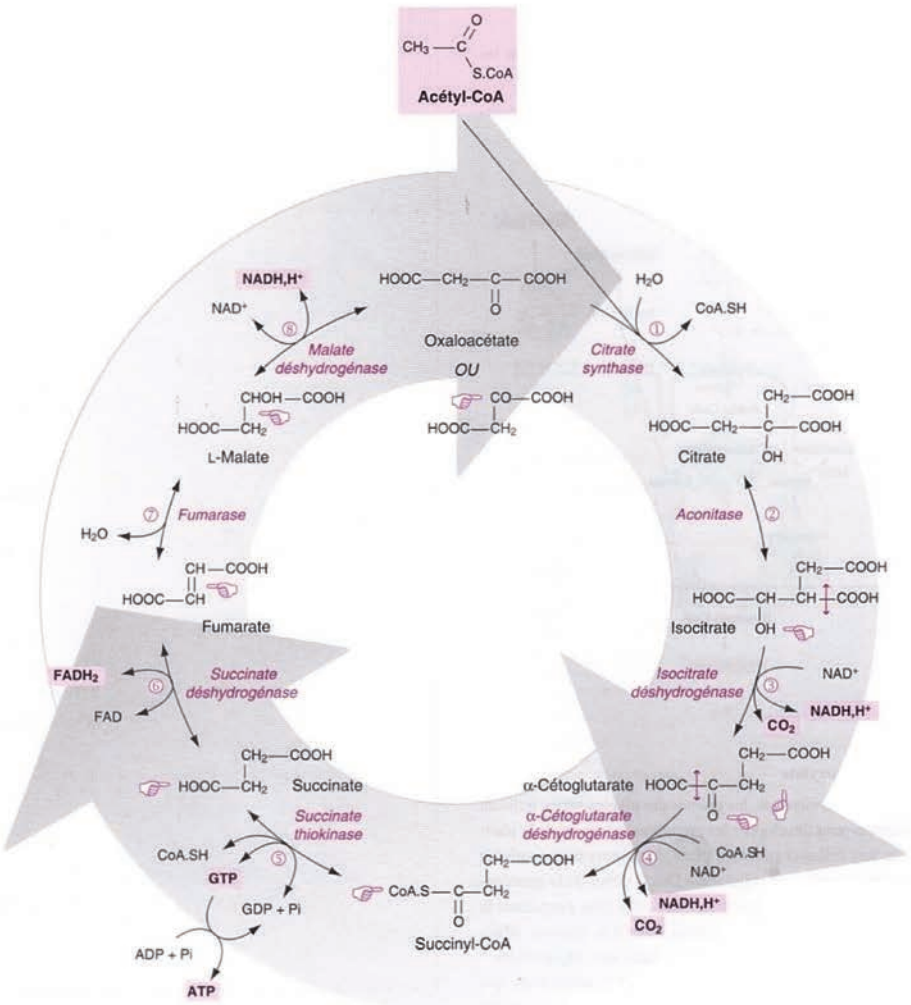

Figure 21 : Les différentes étapes du cycle de Krebs. Le groupement acétyle de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) est tout d'abord transféré à l'oxaloacétate pour former une molécule de citrate. Cette molécule est ensuite oxydée progressivement au cours des différentes étapes du cycle, aboutissant finalement à la régénération de l'oxaloacétate et à la production de 2 molécules de CO_2, 3 molécules de NADH, H^+, une molécule de $FADH_2$ et une molécule de GTP. Les molécules de CO_2 formées seront rapidement exportées de la mitochondrie comme déchets, tandis que les coenzymes réduits NADH et $FADH_2$ seront utilisés pour la synthèse d'ATP. La molécule de GTP sera convertie en ATP. Les modifications chimiques réalisées au cours des différentes étapes sont indiquées par le symbole ☞. ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; CoA, coenzyme A; FAD, flavine adénine dinucléotide; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; Pi, phosphate inorganique (d'après Moussard 2006).

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est composé d'environ 16 600 paires de bases et il contient peu de bases non codantes (Anderson *et al.* 1981). De nombreuses copies de ce génome circulaire sont présentes dans la matrice mitochondriale sous forme de nucléoïdes (Alberts *et al.* 2015). Toutefois, l'ADNmt ne code que 13 protéines mitochondriales (faisant partie de la chaîne respiratoire), soit environ 1% des protéines mitochondriales. Les autres protéines de la mitochondrie sont codées par le génome nucléaire (Schmidt *et al.* 2010, Kuhlbrandt 2015).

1.5.2 Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, aussi nommé cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques, constitue la seconde étape dans le processus d'oxydation au cours du métabolisme énergétique après la glycolyse. Il appartient au métabolisme mitochondrial et repose sur l'oxydation progressive de substrats, permettant ainsi la libération d'énergie transférée aux coenzymes NAD^+ et FAD. Cette énergie sera ensuite restituée lors de la phosphorylation oxydative pour la synthèse d'ATP (Reece and Campbell 2012). Le cycle de Krebs constitue donc une étape préalable à la réalisation de la phosphorylation oxydative.

1.5.2.1 Mécanisme et rendement du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est une voie métabolique composée de huit réactions chimiques successives, chacune étant catalysée par une enzyme spécifique (Figure 21). Cette chaîne de réactions forme un cycle puisque le réactif de la première étape (oxaloacétate) est régénéré à la fin du processus (Reece and Campbell 2012).

Au cours de la première étape du cycle de Krebs, le groupement acétyle de l'acétyl-CoA est transféré à une molécule d'oxaloacétate pour former une molécule de citrate (Figure 21). Cette molécule est ensuite oxydée progressivement durant les sept étapes restantes du cycle, aboutissant à la formation de deux molécules de dioxyde de carbone et à la régénération de l'oxaloacétate (Reece and Campbell 2012).

Quatre des huit réactions du cycle de Krebs sont des réactions d'oxydation, au cours desquelles des électrons et des protons sont libérés et récupérés par les coenzymes NAD^+ et FAD (Moussard 2006). L'ensemble de ces réactions permet d'obtenir trois molécules de NADH et une molécule de $FADH_2$ à partir d'une molécule d'acétyl-CoA (Figure 21). Ces coenzymes réduits seront ensuite réoxydés lors de la phosphorylation oxydative pour permettre la synthèse d'ATP. Aucune réaction chimique annexe au cycle de Krebs n'existe pour réoxyder le NADH en NAD^+ et le $FADH_2$ en FAD en dehors de la phosphorylation oxydative. Le cycle de l'acide

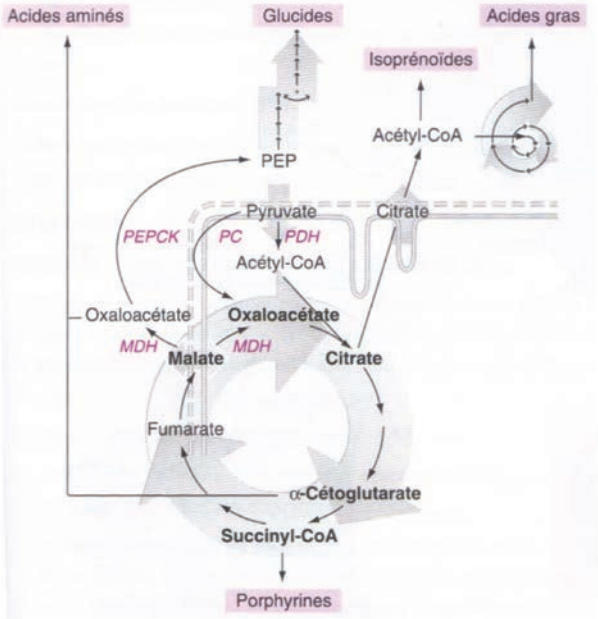

Figure 22 : Le cycle de Krebs fournit des précurseurs pour les processus de biosynthèse. Plusieurs intermédiaires du cycle de Krebs sont intégrés dans les réactions anaboliques de la cellule. L'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) est transporté de la mitochondrie vers le cytosol grâce à la navette du citrate. Il est ensuite utilisé pour la synthèse des acides gras et des isoprénoïdes tels que le cholestérol. Le catabolisme des molécules non glucidiques permet d'obtenir des intermédiaires du cycle de Krebs ou du pyruvate, métabolisé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase (PC). Ces métabolites intermédiaires du cycle sont ensuite transformés successivement en malate, oxaloacétate (par la malate déshydrogénase (MDH)) et phosphoénolpyruvate (par la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK)). Le phosphoénolpyruvate (PEP) est utilisé finalement comme substrat dans le processus de néoglucogenèse. Des intermédiaires du cycle de Krebs participent par ailleurs à la synthèse des acides aminés ainsi qu'à la formation de porphyrines telles que l'hème. PDH, pyruvate déshydrogénase (d'après Moussard 2006).

citrique ne peut donc avoir lieu qu'en conditions aérobies, même si la présence d'oxygène n'est pas précisément requise pour son fonctionnement (Moussard 2006).

Par ailleurs, une molécule de GTP est synthétisée au cours de la 5ème réaction du cycle (Figure 21). L'ensemble des étapes du cycle de Krebs permet donc d'obtenir le bilan métabolique suivant :

$$\text{Acétyl-CoA} + 3\ NAD^+ + FAD + GDP + P_i + 2\ H_2O \rightarrow \text{Coenzyme A} + 2\ CO_2 + 3\ NADH + 3\ H^+ + FADH_2 + GTP$$

La molécule de GTP produite sera convertie ultérieurement en ATP par la nucléoside diphosphate kinase (Moussard 2006).

En plus de sa fonction comme fournisseur de coenzymes NADH et $FADH_2$ pour la synthèse d'ATP, le cycle de Krebs forme un point de départ pour les synthèses protéiques, lipidiques, mais aussi glucidiques (Figure 22) (Moussard 2006).

1.5.2.2 Régulation du cycle de Krebs

Comme le cycle de Krebs constitue une étape préalable à la synthèse d'ATP pendant la phosphorylation oxydative, alors sa vitesse varie en fonction des besoins énergétiques de la cellule (Moussard 2006).

Trois réactions chimiques du cycle de Krebs sont irréversibles et constituent ainsi des points clefs de régulation. Il s'agit de la première étape catalysée par la citrate synthase, de la troisième étape réalisée par l'isocitrate déshydrogénase et de la quatrième étape catalysée par l'α-cétoglutarate déshydrogénase (Moussard 2006). L'activité de ces enzymes est régulée de façon allostérique par les produits des réactions, ainsi que par l'ATP. La disponibilité des substrats influe également sur les activités enzymatiques (Moussard 2006).

La vitesse du cycle de Krebs dépend aussi de l'activité de la pyruvate déshydrogénase, qui catalyse l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA. Cette réaction chimique commande le flux d'entrée de l'acétyl-CoA d'origine glucidique dans le cycle (Moussard 2006). L'action de la pyruvate déshydrogénase est donc importante pour le bon fonctionnement du cycle. Son activité est régulée de façon allostérique par les produits de la réaction (acétyl-CoA et NADH), ainsi que par modification covalente de l'enzyme (phosphorylation). La production d'acétyl-CoA dépend aussi de la disponibilité des substrats (Moussard 2006).

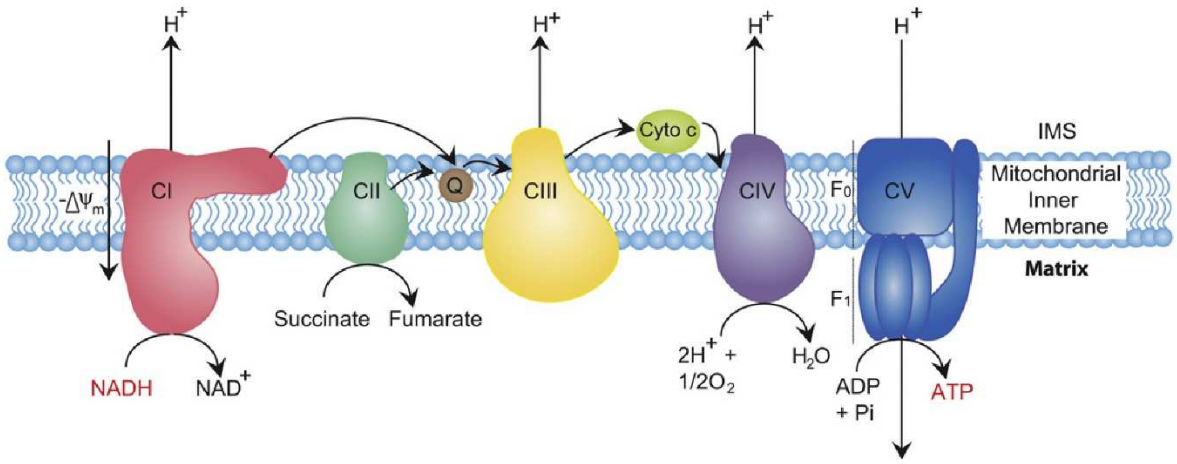

Figure 23 : La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de cinq complexes fixes et de deux transporteurs mobiles d'électrons. Les complexes (C) de la chaîne respiratoire sont enchâssés dans la membrane interne mitochondriale, tandis que les transporteurs d'électrons coenzyme Q (Q) et cytochrome c (Cyto c) sont mobiles dans la membrane. Les électrons et les protons donnés par les coenzymes NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) et $FADH_2$ (flavine adénine dinucléotide, non montré sur ce schéma) se déplacent le long de la chaîne respiratoire d'un complexe à un autre via les transporteurs mobiles d'électrons (flèches rouges). L'énergie libérée par les réactions d'oxydoréductions successives permet le pompage de protons par les complexes I, III et IV. Un potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) est alors créé entre l'espace intermembranaire et la matrice : il contribue à la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) à partir d'ADP (adénosine diphosphate) et de phosphate inorganique (Pi) au niveau du complexe V, qui est l'ATP synthase. Cette enzyme comporte deux domaines : les domaines F_0 et F_1 (adapté d'après Osellame *et al.* 2012).

1.5.3 La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative, aussi appelée respiration mitochondriale, constitue l'étape ultime du processus d'oxydation au cours du métabolisme énergétique. Appartenant au métabolisme mitochondrial, elle est catalysée par la chaîne respiratoire au niveau des crêtes de la membrane interne de la mitochondrie. Elle représente la voie majeure de synthèse de l'ATP dans les cellules, puisqu'elle contribue à la formation de plus de 90% de l'ATP cellulaire (Moussard 2006).

Les coenzymes réduits NADH et $FADH_2$, issus notamment du cycle de Krebs, sont les substrats de la phosphorylation oxydative (Moussard 2006). Ils fournissent des électrons et des protons à la chaîne respiratoire permettant le déclenchement d'une succession de réactions d'oxydoréduction : les électrons et protons sont transportés le long de la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final qui est l'oxygène. Les réactions d'oxydoréduction libèrent de l'énergie permettant de générer un gradient électrochimique au travers de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient supporte la synthèse d'ATP par phosphorylation d'ADP au cours de la dernière étape de la phosphorylation oxydative (Moussard 2006).

1.5.3.1 Transport des électrons dans la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire, également nommée chaîne de transport des électrons, est composée de cinq complexes multiprotéiques fixes (de I à V) et de deux transporteurs mobiles d'électrons (coenzyme Q et cytochrome c) (Figure 23). Les électrons et les protons donnés par les coenzymes NADH et $FADH_2$ se déplacent le long de la chaîne respiratoire dans la membrane interne mitochondriale en passant du complexe I au complexe IV, via le coenzyme Q et le cytochrome c intercalés entre les complexes (Figure 23).

La première étape dans la chaîne respiratoire consiste en la réoxydation des coenzymes NADH et $FADH_2$ en NAD^+ et FAD qui seront à nouveau disponibles pour les diverses voies du métabolisme énergétique telles que le cycle de Krebs (Moussard 2006). Cette réoxydation a lieu dans le complexe I pour le NADH et le complexe II pour le $FADH_2$.

Le coenzyme NADH est issu de la glycolyse, de l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA, du cycle de Krebs, ainsi que de la β-oxydation des acides gras (Moussard 2006). Il sert de substrat pour le complexe I, également nommé NADH déshydrogénase (Figure 23). Cette enzyme contient un domaine hydrophobe enchassé dans la membrane interne mitochondriale et un bras hydrophile dépassant dans la matrice et contenant le site de fixation du NADH (Osellame *et al.* 2012). Dans un premier temps, le NADH transfère deux électrons et un proton aux groupements

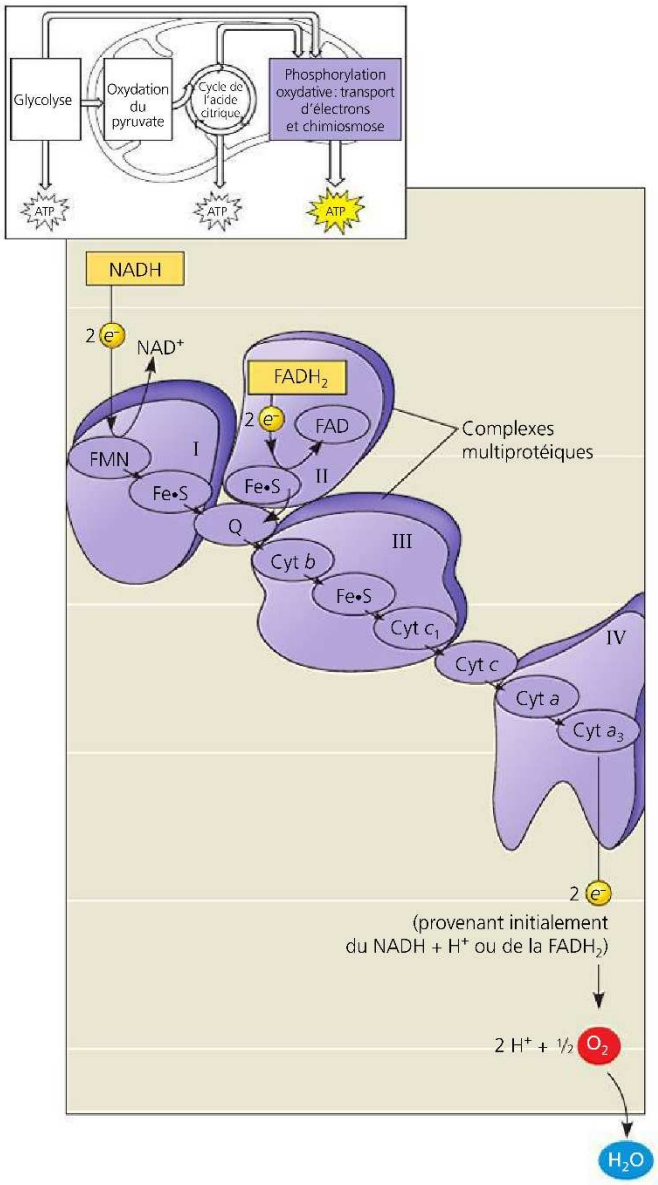

Figure 24 : Les groupements prosthétiques dans les complexes de la chaîne respiratoire permettent le transport des électrons et des protons à l'intérieur des complexes, avant leur transfert aux transporteurs mobiles d'électrons. Sur ce schéma, les groupements prosthétiques dans les complexes I à IV sont indiqués par des pointillés rouges, tandis que les pointillés bleus représentent les transporteurs mobiles d'électrons. Les protons ne sont pas indiqués sur ce schéma, seuls les électrons (e^-) sont représentés. Les ions cuivre à l'intérieur du complexe IV ne sont pas non plus montrés. ATP, adénosine triphosphate; Cyt, cytochrome; FAD, flavine adénine dinucléotide; Fe•S, protéine à centre Fer-Soufre; FMN, flavine mononucléotide; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; Q, coenzyme Q (adapté d'après Reece and Campbell 2012).

prosthétiques (coenzyme fixés de façon covalente à une apoenzyme) du complexe I qui permettent le transfert des équivalents réducteurs à travers le complexe. Ces groupements prosthétiques sont un coenzyme FMN (flavine mononucléotide) et des protéines à centre Fer-Soufre (Figure 24). Les équivalents réducteurs sont ensuite transférés au coenzyme Q (ou ubiquinone) (Moussard 2006).

Le coenzyme $FADH_2$ est produit au cours du cycle de Krebs par la succinate déshydrogénase. Cette enzyme, appartenant au cycle de Krebs, fait également partie de la chaîne respiratoire, puisqu'elle représente le complexe II. Localisé dans la membrane interne mitochondriale, le complexe II contient un groupement prosthétique FAD et des protéines à centre Fer-Soufre, auxquels le $FADH_2$ donne deux atomes d'hydrogène, chaque atome contenant un électron et un proton (Figure 24). Ces atomes sont ensuite transmis au coenzyme Q (Osellame *et al.* 2012).

Le coenzyme Q récupère ainsi les électrons et les protons provenant des complexes I et II (Figure 23). De plus, il peut également recevoir des atomes du coenzyme $FADH_2$ issu de la β-oxydation des acides gras ou de la navette du glycérol-3-phosphate. Cette navette permet le transfert des équivalents réducteurs du NADH contenu dans le cytosol vers le coenzyme FAD présent dans la mitochondrie. Tous les équivalents réducteurs transmis à la chaîne respiratoire transitent donc par le coenzyme Q (Moussard 2006).

Le coenzyme Q diffuse ensuite librement à travers la membrane interne afin de donner ses équivalents réducteurs au complexe III, également appelé cytochrome c réductase (Figure 23). Cette enzyme oxyde le coenzyme Q, menant à la libération de deux protons H^+ dans l'espace intermembranaire. En parallèle, deux électrons provenant de l'oxydation du coenzyme Q sont transmis aux groupements prosthétiques du complexe III qui sont deux cytochromes b, une protéine à centre Fer-Soufre et un cytochrome c_1 (Figure 24). Les deux électrons sont finalement transférés sur deux molécules de cytochrome c (un électron par molécule) (Moussard 2006, Osellame *et al.* 2012).

Le complexe IV, ou cytochrome c oxydase, représente la dernière étape du transport des électrons dans la chaîne respiratoire (Figure 23). Les molécules de cytochrome c transmettent les deux électrons à deux ions cuivre, puis aux cytochromes a et a_3 à l'intérieur du complexe IV (Figure 24). Dans une dernière réaction d'oxydoréduction, les deux électrons sont finalement transmis à un atome d'oxygène (contenu dans une molécule d'O_2) pour former une molécule d'eau (H_2O) (Moussard 2006).

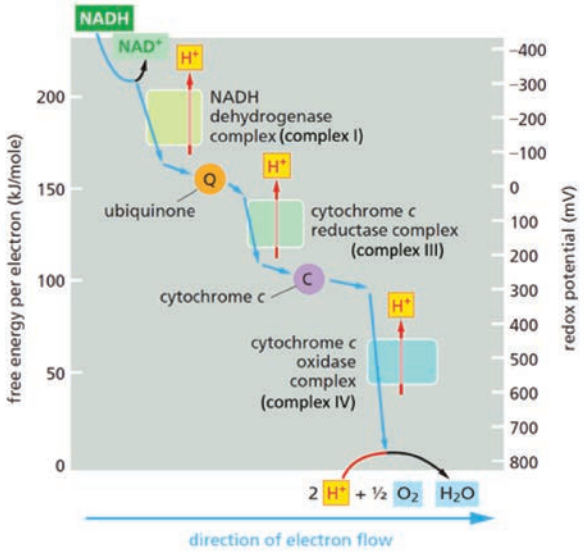

Figure 25 : Disposition des composants de la chaîne respiratoire selon un gradient de potentiel redox croissant. Les électrons et les protons se déplacent le long de la chaîne respiratoire (flèches bleues) depuis des transporteurs ayant le moins d'affinité pour eux (potentiel redox faible) vers ceux ayant le plus d'affinité (potentiel redox élevé). Le coenzyme réduit NADH (nicotinamide adénine dinucléotide), avec le potentiel redox le plus faible, est le donneur initial d'électrons dans la chaîne respiratoire, tandis que l'oxygène, ayant le potentiel redox le plus élevé, est l'accepteur final des électrons. La différence de potentiel redox entre les composants successifs de la chaîne respiratoire permet la libération d'énergie au cours des réactions d'oxydoréductions. Cette énergie est utilisée pour le pompage de protons H^+ (flèches rouges) au niveau des complexes I, III et IV. Les réactions catalysées au niveau du complexe II, non représenté sur ce schéma, ne libèrent pas suffisamment d'énergie pour permettre un pompage de protons (adapté d'après Alberts *et al.* 2015).

Par ailleurs, des études récentes ont permis de montrer que les complexes de la chaîne respiratoire sont assemblés dans les crêtes de la membrane interne mitochondriale sous la forme de supercomplexes. Ces derniers sont composés d'un exemplaire du complexe I, un dimère du complexe III et un monomère du complexe IV. Le rôle fonctionnel de ces supercomplexes n'a pas encore été clairement établi. Toutefois, une hypothèse suggère que cette organisation aide les transporteurs mobiles d'électrons (coenzyme Q et cytochrome c) à transférer les équivalents réducteurs avec une meilleure efficacité (Alberts *et al.* 2015, Kuhlbrandt 2015).

1.5.3.2 Couples redox et réactions d'oxydoréduction dans la chaîne respiratoire

Le transfert des électrons et des protons d'un composant de la chaîne respiratoire à un autre est réalisé grâce à une réaction d'oxydoréduction (Bruce Alberts 2005). Dans une réaction de ce type, deux couples d'oxydoréduction (ou couples redox) sont mis en jeu : les électrons (équivalents réducteurs) sont transférés d'un couple redox à un autre. Le couple redox d'une molécule est composé d'un réducteur (forme réduite de la molécule) et d'un oxydant (forme oxydée de la molécule) : NADH et NAD^+ constituent par exemple le couple redox du coenzyme NAD (Moussard 2006). Dans la chaîne respiratoire, les réactions d'oxydoréduction permettent le transfert des électrons (et des protons) entre les coenzymes (NAD et FAD), les groupements prosthétiques au sein des complexes et les transporteurs mobiles d'électrons (coenzyme Q et cytochrome c).

Le couple redox de chaque molécule est caractérisé par un potentiel d'oxydoréduction ou potentiel redox, définissant son affinité pour les électrons et les protons. La différence de potentiel redox entre deux couples d'une réaction d'oxydoréduction permet de déterminer si la réaction d'oxydoréduction entre les deux couples est favorable sur le plan énergétique : plus la différence de potentiel est élevée, plus la réaction est exergonique (Moussard 2006). Les composants de la chaîne respiratoire sont ainsi disposés selon un gradient de potentiel redox croissant le long de la chaîne respiratoire, afin de générer des réactions d'oxydoréductions exergoniques au niveau des complexes : de l'énergie est alors libérée (Figure 25).

1.5.3.3 Gradient électrochimique à travers la membrane interne

L'énergie libérée par les réactions d'oxydoréduction se produisant au niveau des complexes de la chaîne respiratoire est utilisée pour pomper des protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire contre leur gradient de concentration : ce pompage de protons a lieu au niveau des complexes I, III et IV (Osellame *et al.* 2012). Les réactions d'oxydoréduction se produisant au niveau du complexe II ne libèrent pas suffisamment d'énergie pour qu'il puisse pomper des protons (Moussard 2006).

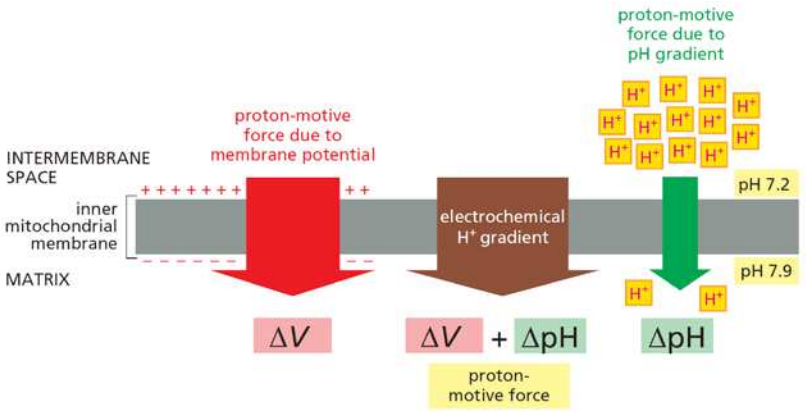

Figure 26 : Le gradient de pH et le potentiel de membrane créés grâce au transport de protons H^+ à travers la membrane interne mitochondriale contribuent à la formation d'un gradient électrochimique. L'énergie libérée par les réactions d'oxydoréductions dans la chaîne respiratoire a permis le pompage de protons H^+ depuis la matrice vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique, mesuré en millivolts. Ce gradient est composé d'un potentiel de membrane (ΔV) ayant une grande force et d'un gradient de pH (ΔpH) ayant une force plus faible. Les forces du potentiel de membrane et du gradient de pH se combinent pour générer la force proton-motrice, qui pousse les protons H^+ à revenir dans la matrice (d'après Alberts *et al.* 2015).

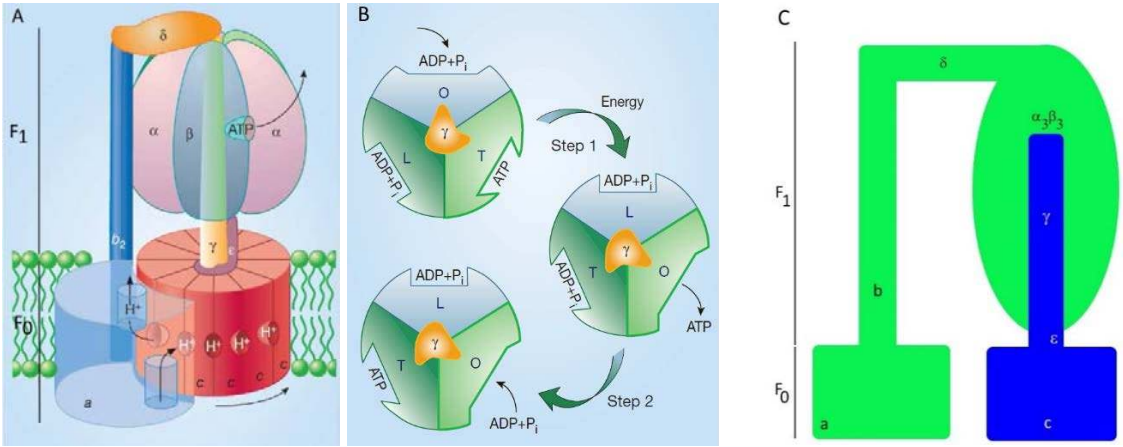

Figure 27 : L'ATP synthase, composée de deux domaines principaux, peut être assimilée à une turbine. (A et B) L'ATP synthase contient les domaines F_0 et F_1. Le domaine F_0, enchassé dans la membrane interne mitochondriale, est un canal à protons. Le domaine F_1, situé dans la matrice, contient les sites catalytiques de l'ATP synthase. Le schéma (B) représente une coupe horizontale de l'ATP synthase au niveau de sa tête. Chaque zone bleue ou verte du schéma correspond à une paire de sous-unités α et β. Les protons H^+ issus de l'espace intermembranaire entrent dans la sous-unité a par un premier canal et ils se fixent sur les sous-unités c de l'anneau du rotor. Le rotor effectue alors une rotation et les protons sont libérés dans la matrice via un deuxième canal de la sous-unité a. Le mouvement du rotor a permis une rotation de 120°de la sous-unité γ dans la tête de l'ATP synthase. Cette rotation induit des changements de conformation dans les sites catalytiques de l'ATP synthase, présents aux interfaces des sous-unités α et β. Les sites catalytiques expérimentent alors trois conformations différentes permettant successivement la fixation des substrats ADP (adénosine diphosphate) et Pi (phosphate inorganique) (conformation L), la production d'ATP (conformation T) et le relargage de la molécule d'ATP (conformation O) (adapté d'après Cross 2004). (C) L'ATP synthase peut être vue comme une turbine composée d'un rotor, représenté en bleu et d'un stator, représenté en vert.

Le transport des protons H^+ à travers la membrane interne mitochondriale contre leur gradient de concentration a deux conséquences majeures :

- un gradient de pH (ΔpH) est généré entre l'espace intermembranaire (pH 7, et la matrice (pH ~ 8)
- un potentiel de membrane est créé entre l'espace intermembranaire de charge positive et la matrice de charge négative

Le gradient de pH (ΔpH) et le potentiel de membrane mitochondrial (ΔV ou $\Delta\Psi_m$) alors établis permettent la formation d'un gradient électrochimique au travers de la membrane interne mitochondriale (Alberts *et al.* 2015). Ce gradient exerce une force proton-motrice qui pousse les protons H^+ à revenir dans la matrice (Figure 26). Il constitue ainsi un des éléments majeurs de la théorie chimio-osmotique de Peter Mitchell publiée en 1961 (Mitchell 1961). Selon cette théorie, l'oxydation de substrats (NADH et $FADH_2$) est couplée à la phosphorylation de l'ADP en ATP par un gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale. Dans un premier temps, l'énergie chimique obtenue grâce aux réactions d'oxydoréduction est convertie en énergie osmotique sous la forme d'un gradient de protons au travers de la membrane interne. Dans un second temps, cette énergie osmotique (gradient de protons) est convertie en énergie chimique au cours de la phosphorylation de l'ADP en ATP (Moussard 2006).

1.5.3.4 Synthèse de l'ATP par l'ATP synthase

La synthèse d'ATP est catalysée dans les crêtes mitochondriales par l'ATP synthase, qui est le complexe V de la chaîne respiratoire (Figure 23). Cette enzyme, également nommée F_0F_1 ATPase, est composée de deux domaines : les domaines F_0 et F_1 (Figure 27). Le domaine F_0 est ancré dans la membrane interne : il constitue un canal à protons. Ce domaine est composé des sous-unités a et b, ainsi que d'un anneau formé par des sous-unités c. Le domaine F1, qui est la tête de l'ATP synthase, dépasse du côté de la matrice : il contient les sites catalytiques de l'enzyme. Il est constitué des sous-unités γ, δ et ε, ainsi que de trois sous-unités α et β dans la tête de l'enzyme (Elston *et al.* 1998, Cross 2004). Les sites catalytiques de l'ATP synthase sont localisés à l'interface des sous-unités α et β. L'ATP synthase permet la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Toutefois, la réaction peut être catalysée dans le sens inverse en cas de besoin, afin de générer un gradient électrochimique par hydrolyse de l'ATP. La décision de l'ATP synthase de synthétiser ou d'hydrolyser de l'ATP dépend de l'intensité du gradient électrochimique (Bruce Alberts 2005, Alberts *et al.* 2015).

Le fonctionnement de l'ATP synthase peut être assimilé à celui d'une turbine, composée d'un stator fixe et d'un rotor mobile (Figure 27). Le rotor est formé par les sous-unités c, γ et ε de

l'ATP synthase, tandis que le stator contient les sous-unités a, b, δ, α et β. La sous-unité γ relie le rotor au stator (Elston *et al.* 1998). La force proton-motrice, générée par le gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne, pousse les protons à quitter l'espace intermembranaire pour repartir dans la matrice. Pour ce faire, les protons passent au travers du domaine F_0 de l'ATP synthase, ce qui permet d'actionner l'enzyme : le flux de protons génère de l'énergie utilisée pour faire tourner le rotor de l'ATP synthase (Elston *et al.* 1998). La rotation du rotor implique le mouvement de la sous-unité γ qui relie le rotor au stator. Suite à la rotation de γ, des changements de conformation sont induits dans le stator de l'ATP synthase : ces modifications ont lieu dans les sous-unités catalytiques de l'ATP synthase (Figure 27). Elles permettent la fixation de l'ADP et du phosphate inorganique dans les sites catalytiques, menant finalement à la production d'ATP (Cross 2004).

L'ATP synthétisé est ensuite exporté de la matrice vers l'espace intermembranaire par la protéine de transport ATP-ADP translocase qui, grâce au gradient électrochimique à travers la membrane interne, échange cette molécule avec une molécule d'ADP provenant du cytosol. L'ATP diffuse ensuite à travers la membrane externe pour aller dans le cytosol où il sera utilisé pour réaliser divers travaux cellulaires (Bruce Alberts 2005, Alberts *et al.* 2015).

Par ailleurs, il a été mis en évidence que dans les crêtes mitochondriales, l'ATP synthase est assemblée sous la forme de dimères. Cet assemblage permet la formation et la stabilisation des crêtes (Alberts *et al.* 2015, Kuhlbrandt 2015). De plus, plusieurs dimères d'ATP synthase sont alignés sur le sommet des crêtes, les autres complexes de la chaîne respiratoire étant disposés de chaque côté de ces dimères. Cette organisation de la chaîne respiratoire, conservée dans de nombreuses espèces, permet de maintenir les protons pompés par les complexes respiratoires à proximité de l'ATP synthase et ainsi d'optimiser le rendement de la respiration mitochondriale (Davies *et al.* 2011).

1.5.3.5 Rendement énergétique à l'issue de la phosphorylation oxydative

A l'issue de la phosphorylation oxydative, un certain nombre de molécules d'ATP ont été synthétisées. Le passage de trois protons dans le domaine F_0 de l'ATP synthase est nécessaire pour la synthèse d'une molécule d'ATP et un proton supplémentaire est requis pour transporter l'ATP hors de la mitochondrie : 4 protons sont donc utilisés pour l'obtention d'une molécule d'ATP (Moussard 2006). Puisque le NADH permet à la chaîne respiratoire de pomper 12 protons à travers la membrane interne lors de son oxydation, alors 3 molécules d'ATP sont synthétisées pour une molécule de NADH. Quant au $FADH_2$, le pompage de 8 protons autorise la synthèse de 2 molécules d'ATP pour une molécule de $FADH_2$.

Au cours du métabolisme oxydatif d'une molécule de glucose, 2 molécules de NADH sont obtenues grâce à la glycolyse, 2 unités de NADH proviennent de l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA et 2 molécules de $FADH_2$ et 6 molécules de NADH sont produites pendant le cycle de Krebs. L'oxydation complète d'une molécule de glucose au cours du métabolisme énergétique permet donc d'obtenir 10 molécules de NADH et 2 molécules de $FADH_2$ (Moussard 2006). Ces coenzymes réduits sont ensuite réoxydés au cours de la phosphorylation oxydative, générant ainsi 34 molécules d'ATP. Quatre unités d'ATP supplémentaires sont produites pendant la glycolyse et le cycle de Krebs (2 unités par voie métabolique), menant ainsi à un total de 38 molécules d'ATP synthétisées pour une molécule de glucose. Ce rendement énergétique est beaucoup plus élevé que celui obtenu en conditions anaérobies (2 molécules d'ATP pour une molécule de glucose) (Moussard 2006).

Par ailleurs, d'autres substrats sont oxydés au cours du métabolisme énergétique tels que les lipides. Ces substrats n'étant pas oxydés par les mêmes voies métaboliques que les glucides, le rendement en ATP varie donc d'un substrat à l'autre. Pour l'oxydation d'une molécule d'acide caproïque (lipide) ayant subi la β-oxydation des acides gras par exemple, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, le rendement énergétique est de 45 molécules d'ATP (Moussard 2006).

Le nombre de molécules d'ATP obtenues au cours de la phosphorylation oxydative peut être toutefois plus faible. En effet, les protons sont capables de traverser la membrane interne pour rejoindre la matrice sans passer par l'ATP synthase, court-circuitant ainsi la production d'ATP. Certains électrons transportés le long de la chaîne respiratoire peuvent également « s'échapper » avant d'atteindre le complexe IV (Osellame *et al.* 2012).

1.5.3.6 Régulation de la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative doit être minutieusement régulée en fonction des besoins énergétiques de la cellule. Au niveau mitochondrial, elle est contrôlée par le taux de synthèse d'ATP et l'efficacité du couplage entre l'oxydation des substrats et la phosphorylation d'ADP (Kadenbach 2003). Au niveau cellulaire, les processus de fission, fusion et de biogenèse mitochondriales participent à la régulation de la phosphorylation oxydative (Scarpulla 2008, Westermann 2012).

1.5.3.6.1 Régulation du taux de synthèse d'ATP

Le taux de synthèse d'ATP est régulé en fonction de l'utilisation d'ATP dans la cellule. La régulation est médiée par un mécanisme de rétrocontrôle, nommé le « contrôle respiratoire ».

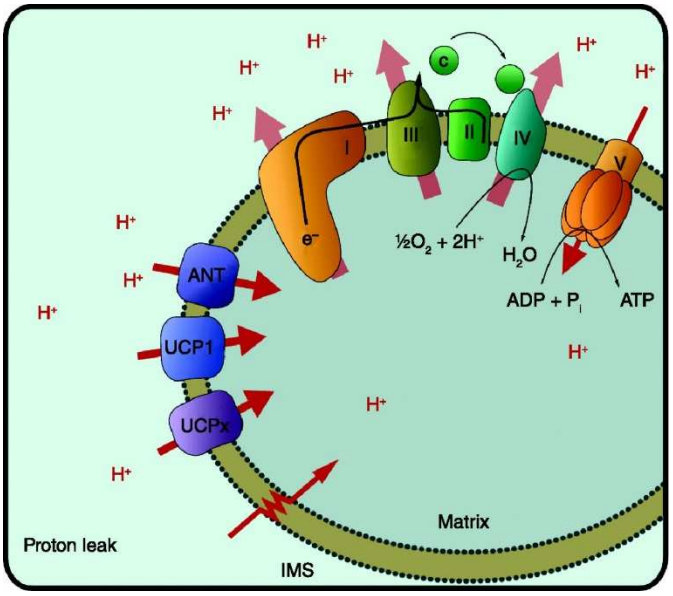

Figure 28 : La fuite de protons est le résultat de deux phénomènes : une fuite de protons basale et une fuite de protons inductible. Au cours de la phosphorylation oxydative, les protons sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire (IMS, intermembrane space) par les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire, formant ainsi un gradient électrochimique. Les protons retournent ensuite dans la matrice en passant par l'ATP synthase pour permettre la production d'ATP (adénosine triphosphate). Des protons peuvent toutefois traverser la membrane interne sans passer par l'ATP synthase : il se produit alors une fuite de protons. Cette dernière est soit basale, soit inductible. La composition lipidique de la membrane interne et la présence des protéines transmembranaires ANT (adenosine nucleotide translocase) et UCP1 (uncoupling protein-1) semblent à l'origine de la fuite basale. Quant à la fuite de protons inductible, elle résulte de l'activité des protéines découplantes UCP et des protéines de transport tels que l'ANT. Il en résulte alors une dissipation du gradient électrochimique sous forme de chaleur. ADP, adénosine diphosphate; c, cytochrome c; e^-, électron; Pi, phosphate inorganique (d'après Jastroch *et al.* 2010).

Ce mécanisme repose sur une stimulation de la respiration mitochondriale en présence d'ADP, suivie de son inhibition après la conversion de l'ADP en ATP. L'entrée d'ADP dans la mitochondrie stimule en fait l'ATP synthase qui consomme ainsi des protons et provoque une diminution du gradient électrochimique. Cette baisse du gradient stimule en retour la respiration au travers de l'activation des pompes à protons dans la chaîne respiratoire. En cas d'élévation du ratio ATP/ADP dans la mitochondrie, la cytochrome c oxydase (complexe IV) est par contre inhibée de façon allostérique par l'ATP (Kadenbach 2003).

1.5.3.6.2 Régulation de l'efficacité du couplage

L'efficacité du couplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP varie selon les demandes en ATP de la cellule. Ce paramètre est défini par le ratio P/O, qui correspond à la quantité de phosphate inorganique incorporée dans l'ATP par molécule d'oxygène consommée. Le ratio varie soit par modification du gradient électrochimique (découplage extrinsèque), soit par modification de l'efficacité du pompage des protons au niveau des complexes respiratoires (découplage intrinsèque). Le découplage définit tout processus qui diminue le ratio P/O (Kadenbach 2003).

- Le découplage extrinsèque

Le découplage extrinsèque correspond à une augmentation de la perméabilité de la membrane interne aux cations et aux protons. Il se produit ainsi une fuite de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale sans passage par l'ATP synthase : il en résulte alors une diminution du gradient électrochimique sans synthèse d'ATP (Kadenbach 2003) (Damon and Collin 2006). Ce processus est le résultat de deux phénomènes : une fuite de protons basale qui n'est pas régulée et une fuite de protons inductible qui est catalysée par des protéines de la membrane interne (Figure 28).

Les protéines découplantes UCP (uncoupling protein) sont les principaux médiateurs de la fuite de protons inductible (Figure 28). Elles appartiennent à la famille des transporteurs mitochondriaux d'anions. Ces protéines transmembranaires transportent les protons directement de l'espace intermembranaire vers la matrice et cinq protéines UCP ont été identifiées à ce jour (Ramsden *et al.* 2012). UCP1 est majoritairement exprimée dans le tissu adipeux. Cette protéine joue un rôle essentiel dans la thermogenèse (Busiello *et al.* 2015). Pour les protéines UCP2 et UCP3, leur rôle physiologique n'est pas clairement défini. UCP2 est exprimée de façon ubiquitaire, alors qu'UCP3 est présente dans le muscle squelettique, le tissu adipeux brun et le cœur. Ces deux protéines découplantes semblent exercer un rôle protecteur contre la production de ROS. UCP3 semble également être impliqué dans la régulation de

l'oxydation des acides gras (Busiello *et al.* 2015). Quant aux protéines UCP4 et UCP 5, elles sont majoritairement exprimées dans le système nerveux central. Ces deux protéines semblent avoir un rôle antioxydant (Ramsden *et al.* 2012).

D'autres protéines sont également impliquées dans la fuite de protons inductible, comme la protéine de transport ATP-ADP translocase (ou ANT, adenosine nucleotide translocase) et des protéines de transport pour anions et cations (transport du calcium par exemple). Ces protéines sont activées par les acides gras notamment et inhibées par les nucléotides phosphates (Kadenbach 2003, Damon and Collin 2006).

Une fuite de protons peut également être induite de manière artificielle grâce à des agents chimiques. Le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) et le FCCP (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) sont les agents découplants les plus communément utilisés. Ce sont des acides organiques faibles portant une charge négative délocalisée qui permet le transport de protons à travers la membrane interne. Il en résulte alors une dissipation du gradient électrochimique. Des ionophores, qui permettent le transport d'ions à travers la membrane, peuvent également être utilisés. A23187 catalyse par exemple l'échange d'ions magnésium (Mg^{2+}) ou calcium (Ca^{2+}) contre des protons H^+ au travers de la membrane interne (Kadenbach 2003).

- <u>Le découplage intrinsèque</u>

Le découplage intrinsèque repose sur un phénomène de « patinage » au niveau des complexes de la chaîne respiratoire, c'est-à-dire que l'efficacité de pompage des protons au niveau des complexes respiratoires diminue. Le nombre de protons pompés pour chaque paire d'électrons transportée par la chaîne respiratoire est donc plus faible. Il en résulte alors une baisse de la stœchiométrie H^+/e^-, ainsi que du ratio P/O. Ce phénomène de patinage a lieu au niveau des complexes IV et V de la chaîne respiratoire (Kadenbach 2003, Brand 2005). Dans le complexe IV, la diminution de l'efficacité de pompage résulterait d'un blocage des canaux à protons (Brand 2005). En réduisant le nombre de protons pompés, ce patinage permettrait de prévenir la production de ROS lorsque $\Delta\Psi_m$ est élevé (Kadenbach 2003). En ce qui concerne le complexe V, le mécanisme de rotation du domaine F1 de l'ATP synthase ne semble pas toujours strictement couplé au flux de protons, surtout lorsque les concentrations en nucléotides sont faibles. La production d'ATP ne serait donc pas à son maximum. Il est à noter toutefois que certains auteurs contestent l'existence d'un phénomène de découplage intrinsèque dans des conditions physiologiques (Brand 2005).

Complex	Subunits & residues	Modification	Enzyme	Influence
Complex I	NDUFA9	Deacetylation	SIRT3	Increased activity
	NDUFS4	cAMP-dependent S/T phosphorylation	n.d.	Increased activity
	NDUFB10 & NDUFV2	Y phosphorylation	Src-kinases	Decreased activity
	-	S-nitrosylation	RNS	Decreased activity
	-	O-GlcNAcylation	OGT	Decreased activity
Complex II	SDHA	Deacetylation	SIRT3	Increased activity
	SDHB	Desuccinylation	SIRT5	Decreased activity
Complex III	-	Deacetylation	SIRT3	Increased activity
	-	O-GlcNAcylation	OGT	Decreased activity
	Subunits I & II	S/T phosphorylation	Src-kinases	Decreased activity
Complex IV	-	S-nitrosylation	RNS	Decreased activity
	-	O-GlcNAcylation	OGT	Decreased activity
	COXI & COXIV-2	Phosphorylation	PKA	Increased activity
	COXI; Y304	cAMP-dependent Y Phosphorylation	n.d.	Decreased activity
	COXII	Y phosphorylation	c-Src	Increased activity
	COXII	Y phosphorylation	EGFR	Decreased activity
	COXII	Y phosphorylation	ErbB2	Decreased respiration
Complex V	-	S-nitrosylation	RNS	Decreased activity
	ATP5E & ATP5O	Deacetylation	SIRT3	Increased activity
	α-, β-, γ-, & e-subunits	Y phosphorylation	Src-kinases	Decreased activity

Tableau 5 : Modifications post-traductionnelles des protéines des complexes respiratoires. Ce tableau répertorie de façon non-exhaustive un certain nombre de modifications post-traductionnelles. Le type de modification, l'enzyme catalysant la réaction et l'effet de la modification sur l'activité du complexe sont indiqués. ATP5E, ATP synthase subunit epsilon; ATP5O, ATP synthase subunit O; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; COX, cytochrome c oxidase; EGFR, epidermal growth factor receptor; ErbB2, avian erythroblastosis oncogene B 2; n.d., not determined; NDUFA9, NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9; NDUFB10, NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1β subcomplex subunit 10; NDUFS4, NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4; NDUFV2, NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2; O-GlcNAcylation, O-N-acetylglucosaminylation; OGT, O-GlcNAc transferase; PKA, protein kinase A; RNS, reactive nitrogen species; SDHA, B succinate dehydrogenase subunit A, B; SIRT, sirtuin S/T, serine/threonine; Y, tyrosine (adapté d'après Hofer and Wenz 2014, Stram and Payne 2016).

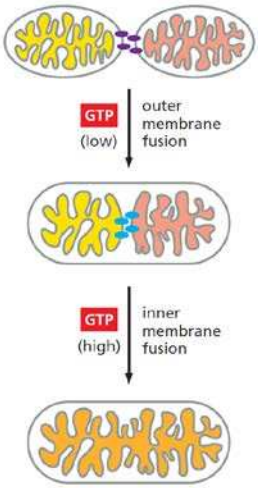

Figure 29 : La fusion mitochondriale. Les fusions des membranes externes et internes de la mitochondrie sont des évènements séquentiels coordonnés par des protéines différentes. Les GTPases Mfn1 et Mfn 2 (mitofusin1 et 2, violet) forment des hétéro- ou homodimères ancrés dans les deux membranes à fusionner, permettant ainsi la fusion des membranes externes. L'oligomérisation d'Opa1 (optic atrophy 1, bleu) est ensuite requise pour la fusion des membranes internes. Ces deux étapes de la fusion mitochondriale requièrent l'hydrolyse de GTP (guanosine triphosphate) et sont dépendantes d'un gradient électrochimique à travers la membrane interne (adapté d'après Osellame *et al.* 2012, Alberts *et al.* 2015).

1.5.3.6.3 Modifications post-traductionnelles des protéines des complexes respiratoires

Les protéines des complexes de la chaîne respiratoire sont modifiées par phosphorylation, déacétylation ou désuccinylation. Les réactions de phosphorylation sont catalysées majoritairement par les tyrosines kinases Src et les kinases dépendantes de l'AMPc (AMP cyclique) telles que PKA (protéine kinase A). Les récepteurs à activité tyrosine kinase EGFR et ErbB2 sont également impliqués. En ce qui concerne les réactions de déacétylation et de désuccinylation, elles sont médiées respectivement par les enzymes dépendantes du NAD^+ SIRT3 (sirtuin 3) et SIRT5 (sirtuin 5). Des modifications post-traductionnelles des protéines par S-nitrosylation ou O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) ont également été recensées. L'ensemble de ces modifications, répertoriées dans le tableau 5, sont à l'origine d'une stimulation ou d'une inhibition de l'activité des complexes respiratoires selon les modifications (Hofer and Wenz 2014, Stram and Payne 2016).

1.5.3.6.4 Fusion et fission mitochondriales

Les mitochondries adaptent leur morphologie selon les conditions physiologiques. Cette dynamique mitochondriale contribue à la coordination de nombreux processus mitochondriaux tels que la mort cellulaire, mais elle permet également l'adaptation des cellules aux besoins énergétiques (Westermann 2012). Les phénomènes de fusion et fission mitochondriales sont les acteurs de cette dynamique et la taille des mitochondries dans une cellule dépend d'une balance entre les deux processus (Westermann 2012, Van der Bliek *et al.* 2013). Les mitochondries peuvent être présentes sous la forme de multiples organites ou alors former un large réseau tubulaire composé de nombreuses ramifications.

La fusion mitochondriale est un processus cellulaire au cours duquel les membranes externes et internes de deux mitochondries fusionnent à l'issue de deux étapes successives (Osellame *et al.* 2012). Ce processus est réalisé par l'intermédiaire des GTPases de la famille des dynamines Mfn1 et Mfn2 (mitofusin1 et 2) pour la fusion des membranes externes et Opa1 (optic atrophy 1) pour la fusion des membranes internes (Figure 29). Il permet d'optimiser l'activité de la chaîne respiratoire en cas de besoin énergétique (Westermann 2012). Au cours de la fusion mitochondriale, les contenus de deux mitochondries sont mélangés : tous les métabolites, toutes les enzymes et toutes les protéines sont ainsi rassemblés dans une seule structure, permettant un mécanisme de coopération mitochondriale. Un phénomène de complémentation protéique se produit également en cas d'ADNmt manquant ou défectueux. Il en résulte alors une activité mitochondriale optimisée et une activité respiratoire augmentée (Westermann 2012). Gomes *et*

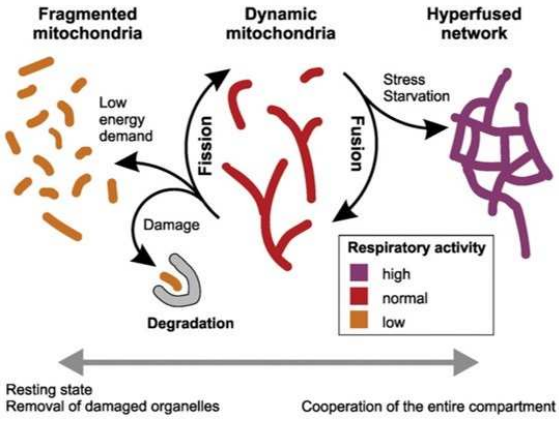

Figure 30 : L'organisation des mitochondries varie selon les besoins énergétiques de la cellule. L'organisation sous forme de mitochondries individuelles constitue l'organisation morphologique préférée lorsque l'activité mitochondriale (activité respiratoire) est faible. Cette organisation permet d'éliminer les mitochondries endommagées ou usées grâce à la mitophagie. Quand le statut bioénergétique d'une cellule devient critique (en cas de privation de nutriments par exemple), les mitochondries forment un réseau très ramifié afin d'optimiser l'activité respiratoire mitochondriale et la production d'énergie. Dans des conditions intermédiaires où l'activité mitochondriale est normale, les mitochondries subissent des cycles fréquents de fusion-fission afin de garantir une répartition identique des métabolites et des macromolécules dans les différents organites (d'après Westermann 2012).

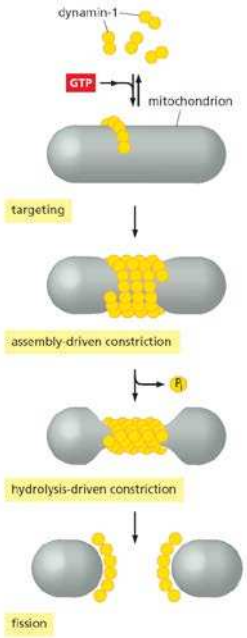

Figure 31 : La fission mitochondriale est réalisée par l'intermédiaire de Drp1. La GTPase Drp1 (dynamin related protein 1 ou dynamin-1) existe sous la forme de dimères dans le cytosol. L'hydrolyse de GTP (guanosine triphosphate) permet l'assemblage des dimères de dynamin-1 en structures oligomériques. Les oligomères interagissent ensuite avec des protéines adaptatrices présentes sur la membrane mitochondriale externe afin de former une spirale autour de la mitochondrie. Cette spirale provoque une première constriction. Une seconde hydrolyse de GTP induit finalement un changement conformationnel de la spirale, permettant la fission des mitochondries. Pi, phosphate inorganique (d'après Alberts *et al.* 2015).

al. ont montré que les mitochondries allongées présentent un plus grand nombre de crêtes et de dimères d'ATP synthase, associés à une efficacité accrue de la synthèse d'ATP (Gomes *et al.* 2011). L'optimisation de l'activité de la chaîne respiratoire après fusion mitochondriale explique sans doute pourquoi les mitochondries sont organisées sous la forme d'un réseau en cas de stress énergétique (Figure 30).

La fission mitochondriale correspond quant à elle à la division d'une mitochondrie en deux. Ce processus est réalisé par l'intermédiaire d'une GTPase de la famille des dynamines : Drp1 (dynamin related protein 1) (Figure 31). La fission contribue à la répartition des mitochondries pendant la division cellulaire et elle est impliquée dans le relargage de différentes protéines de l'espace intermembranaire durant la mort cellulaire par apoptose (Westermann 2012). L'obtention de mitochondries de faible taille suite à la fission permet également l'élimination des mitochondries usées ou endommagées dans les autophagosomes, grâce à un processus spécial d'autophagie : la mitophagie (Osellame *et al.* 2012). En éliminant les mitochondries défectueuses, la mitophagie contribue au maintien d'une activité optimale de la chaîne respiratoire (Westermann 2012). L'organisation des mitochondries sous la forme d'unités individuelles n'est pas privilégiée en cas de besoins énergétiques, mais elle constitue plutôt une organisation par défaut permettant l'élimination des mitochondries défectueuses (Figure 30).

1.5.3.6.5 La biogenèse des mitochondries

La biogenèse des mitochondries correspond à la croissance et à la division de mitochondries pré-existantes. Elle permet une augmentation en taille et en nombre des mitochondries. Elle est induite en réponse à différentes conditions de stress telles qu'un exercice physique ou une restriction calorique (Jornayvaz and Shulman 2010). Le co-activateur transcriptionnel PGC1-α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1α) occupe une place centrale dans la régulation de ce processus (Scarpulla 2008).

La biogenèse des mitochondries requiert l'expression coordonnée des génomes nucléaire et mitochondrial, la synthèse de protéines et de lipides et l'assemblage correct de protéines pour former les structures de la mitochondrie telles que la chaîne respiratoire (Hood *et al.* 2006). Les protéines codées par l'ADNmt sont synthétisées dans la matrice grâce à un système de traduction complet propre à la mitochondrie, comprenant notamment des ribosomes et des ARN de transfert (Kuhlbrandt 2015). Les protéines codées par l'ADN nucléaire sont synthétisées dans le cytosol sous forme de protéines-précurseurs, puis importées dans la mitochondrie grâce à un signal d'adressage reconnu par des récepteurs à la surface des mitochondries. Ces protéines-précurseurs sont transportées à travers les membranes externe et interne de la

A **B**

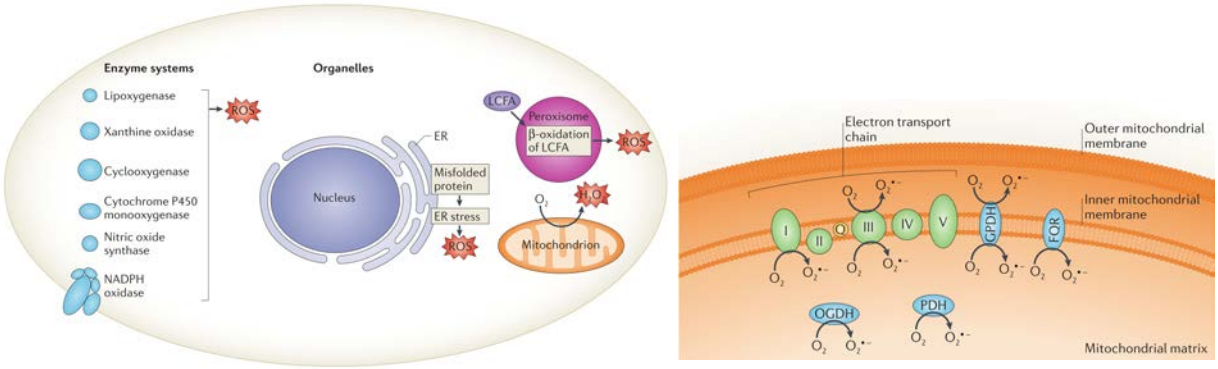

Figure 32 : Les différentes sources de ROS dans la cellule (A) Les ROS (espèces réactives de l'oxygène) sont produits dans différents organites cellulaires tels que la mitochondrie qui en est une source majeure, le réticulum endoplasmique (ER) et les peroxysomes. Un stress du réticulum endoplasmique et la β-oxydation des acides gras à longue chaîne (LCFA) dans les peroxysomes participent à la synthèse de ROS cellulaires. Du fait de leur activité, d'autres enzymes, incluant des oxydases et des oxygénases, sont aussi à l'origine d'une production de ROS. (B) Plusieurs sites de production de ROS ont été identifiés dans la mitochondrie. Les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont des sites majeurs de production de l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. D'autres enzymes métaboliques mitochondriales sont également impliquées comme la pyruvate déshydrogénase (PDH). FQR, electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase; GPDH, glycérol 3−phosphate déshydrogénase; NADP, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; OGDH, 2-oxoglutarate déshydrogénase ou α-cétoglutarate déshydrogénase; Q, coenzyme Q (d'après Holmstrom and Finkel 2014).

mitochondrie grâce aux translocases TOM (translocase of the outer mitochondrial membrane) et TIM (translocase of the inner membrane) respectivement (Schmidt *et al.* 2010). Elles sont ensuite repliées grâce à des protéines chaperonnes, permettant ainsi d'obtenir des protéines fonctionnelles (Jornayvaz and Shulman 2010).

1.5.4 Autres processus cellulaires associés à la mitochondrie

1.5.4.1 Production d'espèces réactives de l'oxygène

La mitochondrie est une source majeure de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule (Figure 32). Les ROS sont une famille de composés chimiques constituée de radicaux libres tels que l'ion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et le radical hydroxyle $^{\bullet}OH$, et d'espèces non-radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le peroxynitrite $ONOO^-$. Les radicaux libres sont obtenus par rupture d'une liaison covalente entre deux atomes ou par transfert d'un électron entre deux espèces chimiques. Ces composés se caractérisent par la présence d'un électron célibataire sur leur couche externe, les rendant généralement instables et donc réactifs (Moussard 2006, Liou and Storz 2010).

La synthèse de ROS dans la mitochondrie résulte de l'activité de la chaîne respiratoire et d'autres voies métaboliques mitochondriales (Figure 32). Pendant la phosphorylation oxydative, certains électrons transportés dans la chaîne respiratoire peuvent « s'échapper » au niveau des complexes I et III : au lieu de traverser la chaîne respiratoire, ces électrons réagissent avec des molécules d'oxygène présentes dans la mitochondrie, résultant en la formation d'ions $O_2^{\bullet -}$ qui sont obtenus par réduction mono-électronique de l'oxygène (Moussard 2006, Brand 2010). Les complexes II et IV semblent participer à la production de ROS seulement dans des conditions pathologiques (Chen and Zweier 2014). Le cycle de Krebs est aussi une source d'ions $O_2^{\bullet -}$ via l'activité de l'α-cétoglutarate déshydrogénase. D'autres compartiments de la cellule tels que les peroxysomes sont également impliqués, de même que certaines enzymes cytosoliques (Figure 32). La NADPH oxydase (NOX) qui est présente dans la membrane cytoplasmique et qui a pour coenzymes NADPH ou NADH, est une source importante de ROS dans la cellule (Migdal and Serres 2011, Holmstrom and Finkel 2014).

Les ROS contribuent à l'oxydation de molécules chimiques au cours de réactions d'oxydoréduction. Les cibles principales de ces composés sont des constituants cellulaires tels que les protéines, les lipides et l'ADN. La concentration cellulaire des ROS détermine s'ils ont des effets bénéfiques ou délétères dans la cellule. Une production modérée de ROS est à l'origine d'effets positifs pour la cellule. Dans ce cas, les ROS agissent comme des molécules

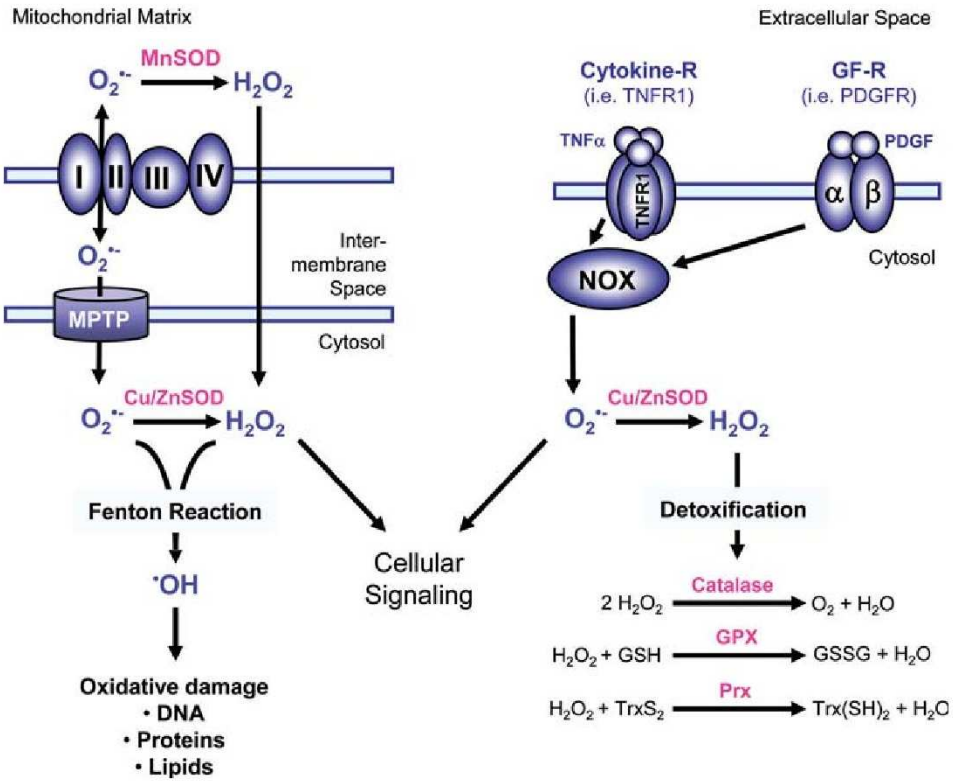

Figure 33 : Les ROS peuvent avoir différents effets dans la cellule : des effets bénéfiques (signalisation cellulaire) ou délétères (stress oxydant). La NADPH oxydase (NOX) activée par différents stimuli et la chaîne respiratoire sont deux sources d'ions superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Les superoxyde dismutases (SOD) produisent quant à elles du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à partir d'$O_2^{\bullet-}$. H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$ ont ensuite des effets positifs sur l'homéostasie cellulaire, en tant que seconds messagers. Néanmoins, ils ont aussi des effets négatifs au travers de la réaction de Fenton qui permet la synthèse du radical hydroxyle $^{\bullet}OH$. Ce composé très réactif provoque des dommages oxydatifs dans les protéines, les lipides et l'ADN, créant ainsi un stress oxydant. Un système antioxydant permet néanmoins de neutraliser les ROS. Pour cela, H_2O_2 est transformé en eau via la catalase, les glutathion peroxidases (GPX) et les peroxiredoxines (Prx). Cytokine-R, cytokine receptor ; GF-R, growth factor receptor; GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulphide; Mn SOD : superoxyde dismutase à manganèse; MPTP, mitochondrial permeability transition pore; PDGF(R), platelet-derived growth factor (receptor); TNFα, tumour necrosis factor α; TNFR1, tumor necrosis factor receptor 1; Trx, thioredoxin (d'après Liou and Storz 2010).

de signalisation cellulaire, $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 étant les médiateurs principaux de ce phénomène (Figure 33). La production de ROS est induite de façon transitoire en réponse à différents stress tels qu'une hypoxie ou un changement métabolique. L'induction des ROS permet l'oxydation de résidus cystéines dans des protéines clefs comme des kinases, des phosphatases ou des facteurs de transcription. Un changement d'activité de ces protéines est à l'origine de la modulation de différents processus cellulaires tels que l'autophagie, l'immunité ou encore la différenciation cellulaire par exemple (Carriere *et al.* 2006, Sena and Chandel 2012, Holmstrom and Finkel 2014). Une concentration cellulaire élevée de ROS est en revanche synonyme d'effets négatifs pour la cellule. Dans ce cas, l'oxydation des constituants cellulaires n'est pas spécifique et elle est irréversible. Les protéines, les lipides et l'ADN sont oxydés indifféremment par $^{\bullet}OH$ et $ONOO^-$, résultant ainsi en un stress oxydant (Figure 33). Les ROS, considérés comme toxiques dans ce contexte, sont alors impliqués dans un certain nombre de pathologies telles que le diabète, le cancer ou le vieillissement (Carriere *et al.* 2006, Migdal and Serres 2011).

La quantité de ROS présente dans une cellule dépend d'un équilibre entre la production et l'élimination de ces composés. L'état redox de la chaîne respiratoire et le gradient électrochimique sont deux éléments régulateurs de la production d'$O_2^{\bullet-}$ dans la mitochondrie. Un état réduit des transporteurs d'électrons dans la chaîne respiratoire favorise l'interaction des électrons transportés avec l'oxygène, menant ainsi à une augmentation de la production d'$O_2^{\bullet-}$. Une élévation du gradient électrochimique est également associée à une augmentation de la production de ROS. Le découplage entre l'activité respiratoire et la synthèse d'ATP grâce aux protéines UCP induit cependant une diminution du gradient, résultant en une baisse de la production d'$O_2^{\bullet-}$ (Carriere *et al.* 2006, Sena and Chandel 2012). Quant à la neutralisation des ROS, elle dépend d'un système antioxydant composé d'enzymes antioxydantes et d'antioxydants. Les enzymes anti-oxydantes, utilisant le NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) comme coenzymes, permettent la neutralisation de l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ sous forme d'eau (Figure 33). Ainsi, $O_2^{\bullet-}$ est transformé en oxygène et H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD), puis H_2O_2 est métabolisé en eau par la catalase, les glutathion peroxydases ou les peroxiredoxines (Moussard 2006, Liou and Storz 2010). Les antioxydants, tels que le glutathion ou les vitamines A, C et E permettent quant à eux de piéger les radicaux libres. Le glutathion chélate également des ions Cu^+, ce qui bloque la transformation d'H_2O_2 en $^{\bullet}OH$ par la réaction de Fenton. D'autres systèmes tels que le système thioredoxine contribuent finalement à la réparation des dommages oxydatifs (Moussard 2006, Liou and Storz 2010).

1.5.4.2 L'apoptose

La mitochondrie joue un rôle majeur dans la mort cellulaire par apoptose, puisque des protéines pro-apoptotiques sont présentes dans l'espace intermembranaire mitochondrial. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée ayant normalement lieu durant le développement ou le vieillissement d'un organisme. Ce type de mort contribue au maintien de l'homéostasie grâce à l'élimination des cellules endommagées ou inutiles, présentes dans certains tissus. L'apoptose est un mécanisme de défense également retrouvé dans les réactions immunitaires. Une dérégulation de l'apoptose conduit à certaines pathologies, comme le cancer (défaut d'apoptose) ou des maladies neurodégénératives (excès d'apoptose) (Green and Llambi 2015, Kiraz *et al.* 2016).

L'apoptose se caractérise par des changements morphologiques propres comme le rétrécissement du volume cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire ainsi que le bourgeonnement de la membrane plasmique (Kerr *et al.* 1972). Des protéines spécifiques sont à l'origine de l'induction de ces changements morphologiques : il s'agit des caspases. Ce sont des protéases à cystéine clivant des liaisons peptidiques au niveau d'acides aspartiques. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont classées en deux catégories : les caspases initiatrices incluant les caspases-2, -8, -9 et -10, et les caspases effectrices comprenant les caspases-3, -6 et -7. Ces caspases sont synthétisées au départ sous une forme inactive (pro-caspase ou zymogène), puis elles sont activées séquentiellement au cours de l'apoptose. Les caspases initiatrices sont tout d'abord activées par deux voies de signalisation majeures, les voies intrinsèque et extrinsèque, puis ces caspases activent les caspases effectrices par clivage (McIlwain *et al.* 2013). Les nombreux clivages protéiques réalisés par les caspases effectrices conduisent à une fragmentation des cellules et à la formation de corps apoptotiques qui seront finalement éliminés par phagocytose (Green and Llambi 2015, Kiraz *et al.* 2016).

La voie intrinsèque, ou voie apoptotique mitochondriale, est induite en réponse à des stress cellulaires comme des dommages de l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique ou une privation en facteurs de croissance. L'activation de cette voie apoptotique repose sur la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, qui entraîne la libération des facteurs pro-apoptotiques contenus dans l'espace intermembranaire (Green and Llambi 2015). Le processus de perméabilisation est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma-2), caractérisées par la présence d'un ou plusieurs domaines BH (Bcl-2 homology). Il existe trois catégories de protéines Bcl-2 :

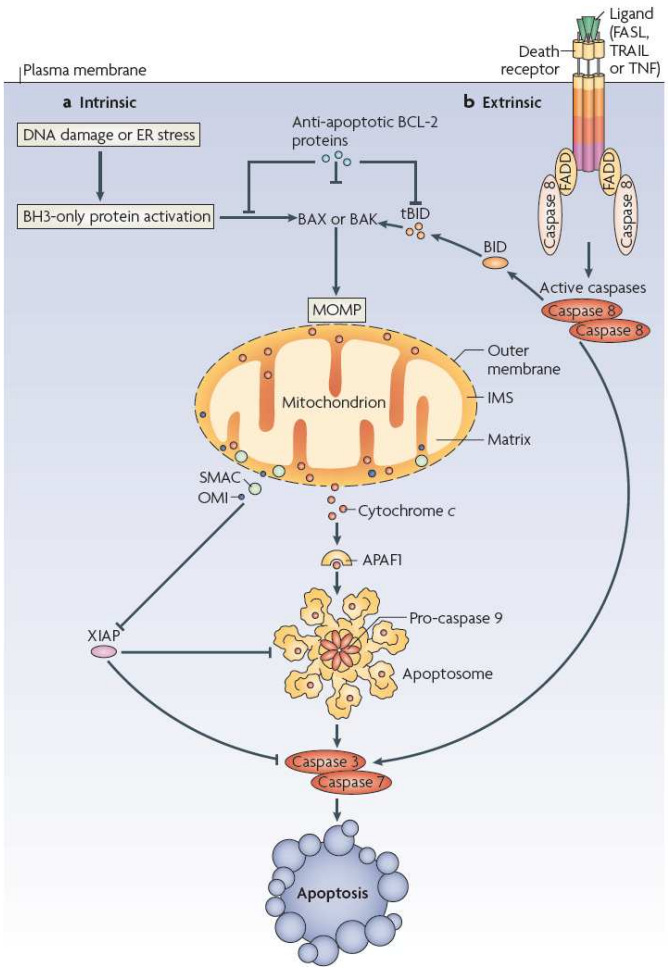

Figure 34 : L'apoptose est induite grâce à deux voies de signalisation majeures : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. (a) L'activation de la voie intrinsèque repose sur la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP). Ce processus est contrôlé par les protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma-2). En réponse à des stress cellulaires comme des dommages de l'ADN, l'activation des protéines pro-apoptotiques BH3 (Bcl-2 homology 3)-only conduit à l'induction des protéines effectrices pro-apoptotiques Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) qui sont responsables de la MOMP. Les protéines anti-apoptotiques préviennent la MOMP par l'inhibition des protéines pro-apoptotiques. A la suite de la MOMP, les protéines apoptogènes contenues dans l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS) sont libérées dans le cytosol. Le cytochrome c interagit alors avec APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) afin de former l'apoptosome qui contribue à l'activation de la caspase-9. Cette caspase initiatrice clive ensuite les caspases effectrices -3 et -7 afin d'initier l'apoptose. La MOMP contribue également à la libération de Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) et Omi qui bloquent l'inhibiteur de caspases XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein). (b) La voie extrinsèque est déclenchée par la fixation d'un ligand spécifique sur un récepteur de mort. Cette interaction ligand-récepteur conduit au recrutement d'une protéine adaptatrice telle que FADD (FAS-associated death domain) afin de former le complexe DISC (death-inducing signaling complex) qui permet la dimérisation et l'activation de la caspase-8. Cette caspase initiatrice active ensuite les caspases effectrices ou bien elle peut aussi induire la voie intrinsèque grâce au clivage de la protéine BH3-only Bid (BH3-interacting domain death agonist). L'activation de la voie intrinsèque par tBid (truncated Bid) contribue à la libération de Smac et Omi. L'activation des caspases effectrices conduit finalement à la mise en place des changements morphologiques propres à l'apoptose comme le bourgeonnement de la membrane plasmique. FasL, Fas ligand ; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand (d'après Tait and Green 2010).

- les protéines effectrices pro-apoptotiques qui contiennent quatre domaines BH (BH1 à BH4), telles que Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer)
- les protéines anti-apoptotiques avec quatre domaines BH (BH1 à BH4) telles que Bcl-2, Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) et Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1)
- les protéines pro-apoptotiques avec un seul domaine BH3, appelées protéines BH3-only, comme Bid (BH3-interacting domain death agonist), Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) et Bad (Bcl-2-associated death promoter)

Les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak sont à l'origine de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. L'action de ces deux protéines est facilitée par les protéines pro-apoptotiques BH3-only, tandis qu'elle est réprimée par les protéines anti-apoptotiques (Figure 34). L'induction des protéines BH3-only par différents stress cellulaires conduit à une variation de l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques, permettant ainsi d'activer les protéines Bax et Bak (Sendoel and Hengartner 2014, Green and Llambi 2015). Ces deux protéines déclenchent la perméabilisation de la membrane grâce à la formation d'oligomères qui s'insèrent dans la membrane externe et la déstabilisent. Les étapes suivant l'insertion de Bak et Bax dans la membrane et conduisant à la perméabilisation de la membrane ne sont pas caractérisées de façon précise à ce jour (Green and Llambi 2015).

Plusieurs protéines apoptogènes contenues dans l'espace intermembranaire mitochondrial sont libérées suite à la perméabilisation, telles que le cytochrome c ou des antagonistes des IAPs (inhibitors of apoptosis proteins). Le cytochrome c présent dans le cytosol interagit avec la protéine APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) afin de former un complexe nommé apoptosome (Figure 34). Ce complexe permet l'activation de la caspase-9 qui induit ensuite les caspases effectrices afin d'initier l'apoptose (Tait and Green 2010). Quant aux antagonistes des IAPs, tels que Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) et Omi (ou HtrA2 (high-temperature requirement A2), ils ont pour fonction d'inactiver les IAPs qui sont des inhibiteurs de caspase (Figure 34). Smac/DIABLO et Omi bloquent notamment XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) qui est un inhibiteur des caspases-9, -3 et -7 (Green and Llambi 2015, Kiraz *et al.* 2016).

En ce qui concerne la voie extrinsèque, elle intervient notamment dans le fonctionnement du système immunitaire en contribuant à l'élimination des cellules infectées ou potentiellement tumorales (Kiraz *et al.* 2016). L'activation de cette voie repose sur la fixation d'un ligand

spécifique sur un récepteur de mort présent à la surface des cellules (Figure 34). Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF et incluent entre autres TNFR1 (TNF receptor-1), Fas et TRAIL-R1/2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1/2) qui ont pour ligands respectifs TNF, FasL et TRAIL. La fixation du ligand sur son récepteur conduit au recrutement d'une protéine adaptatrice, telle que FADD (FAS-associated death domain), suivi de la formation d'un complexe appelé DISC (death-inducing signaling complex). Ce complexe permet l'activation des caspases-8 ou -10 (McIlwain *et al.* 2013, Green and Llambi 2015). Dans certaines cellules (cellules de type I), la caspase-8 clive ensuite directement les caspases effectrices -3 et -7 (Figure 34). Dans d'autres cellules par contre (cellules de type II), les caspases effectrices ne peuvent pas être activées directement par la caspase-8 car elles sont bloquées par XIAP. Dans ces cellules, une libération de Smac et Omi est donc nécessaire pour inactiver XIAP avant l'activation des caspases effectrices (Green and Llambi 2015). Pour cela, la caspase-8 active la voie extrinsèque, via le clivage de la protéine BH3-only Bid, afin de provoquer la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale nécessaire à la libération de Smac et Omi (Figure 34).

1.5.4.3 La signalisation calcique

La mitochondrie communique de façon permanente avec le cytosol afin d'assurer un équilibre entre la production d'énergie et les demandes énergétiques de la cellule. Le calcium est un médiateur de cette communication entre la matrice mitochondriale et le cytosol. La signalisation calcique est impliquée dans l'activation de multiples processus cellulaires tels que la contraction musculaire ou la sécrétion de substances. Un certain nombre de ces processus ont pour caractéristique d'être consommateurs en énergie (Osellame *et al.* 2012). Une des fonctions de la voie calcique est donc de stimuler la production d'énergie par la mitochondrie.

Dans la cellule, les ions calcium Ca^{2+} sont majoritairement stockés dans le réticulum endoplasmique (ou le réticulum sarcoplasmique pour les muscles). Différentes molécules de signalisation, comme des hormones ou des facteurs de croissance, induisent une libération de calcium dans le cytosol des cellules : il en résulte alors une augmentation de la concentration cytosolique du calcium ($[Ca^{2+}]_c$) (Alberts *et al.* 2015). Cette hausse de la $[Ca^{2+}]_c$ et le potentiel de membrane au travers de la membrane interne mitochondriale favorisent alors l'entrée des ions Ca^{2+} dans la mitochondrie selon leur gradient électrochimique. Les porines VDAC facilitent l'entrée de calcium dans l'espace intermembranaire mitochondrial, tandis que le canal MCU (mitochondrial Ca^{2+} uniporter) permet le passage des ions à travers la membrane interne de la mitochondrie. Les ions Ca^{2+} sont des activateurs de plusieurs enzymes du cycle de Krebs

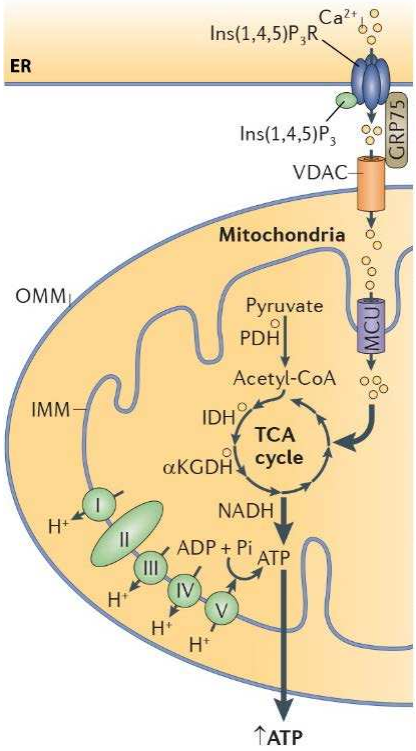

Figure 35 : La signalisation calcique contribue à l'augmentation de la synthèse d'ATP dans les mitochondries. Le canal calcique Ins(1,4,5)P_3R (inositol 1,4,5 trisphosphate receptor), présent dans le réticulum endoplasmique (ER), permet la libération de calcium depuis l'ER vers le cytosol, en réponse au second messager Ins(1,4,5)P_3 (inositol 1,4,5 trisphosphate). Quant à la porine VDAC (voltage-dependent anion channel) et au canal MCU (mitochondrial Ca^{2+} uniporter), ils facilitent l'entrée du calcium dans la mitochondrie. Les ions Ca^{2+} sont des activateurs des enzymes pyruvate-, isocitrate- et α-cétoglutarate déshydrogénases (PDH, IDH et αKGDH, respectivement), qui sont des enzymes clefs pour le cycle de Krebs (ou tricarboxylic acid (TCA) cycle). Le nombre de coenzymes NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) réduits augmente suite à la stimulation du cycle de Krebs, ce qui permet d'accélérer la phosphorylation oxydative et donc la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate). Le transfert des ions Ca^{2+} entre l'ER et la mitochondrie est facilité grâce à des points de contact entre ces deux organites. Le canal Ins(1,4,5)P_3R de l'ER et la porine VDAC de la mitochondrie sont maintenus à proximité l'un de l'autre par les protéines chaperonnes GRP75 (75 kDa glucose-regulated protein). Acetyl-CoA, acetyl-coenzyme A; ADP, adenosine diphosphate; IMM, inner mitochondrial membrane; OMM, outer mitochondrial membrane; Pi, inorganic phosphate (adapté d'après Rizzuto *et al.* 2012).

et de l'ATP synthase, ainsi que du transporteur mitochondrial aspartate-glutamate (Osellame *et al.* 2012, Rizzuto *et al.* 2012). L'entrée de Ca^{2+} dans la matrice permet donc de stimuler l'activité mitochondriale, menant ainsi à une augmentation de la synthèse d'ATP dans les mitochondries (Figure 35). Une hausse de la $[Ca^{2+}]_c$ est également associée à l'induction de la biogenèse des mitochondries dans les cellules musculaires (Ojuka *et al.* 2002). En plus d'activer les fonctions mitochondriales, l'entrée de calcium dans la mitochondrie contribue également à réguler la signalisation calcique. Le transfert des ions Ca^{2+} du cytosol à la mitochondrie induit en effet une diminution de la $[Ca^{2+}]_c$, ce qui entraîne une modulation des signaux calciques transmis dans la cellule. La mitochondrie exerce donc une fonction de tampon qui permet de réguler la $[Ca^{2+}]_c$ (Rizzuto *et al.* 2012).

2. Le métabolisme énergétique d'une cellule cancéreuse

La prolifération accrue des cellules cancéreuses nécessite une synthèse massive de macromolécules et d'énergie. Pour ce faire, ces cellules s'adaptent en reprogrammant leur métabolisme (Vander Heiden *et al.* 2009, Romero-Garcia *et al.* 2011). Dans ce contexte, une stratégie thérapeutique prometteuse repose sur l'utilisation d'agents ciblant le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses (Martinez-Outschoorn *et al.* 2017).

2.1 Présentation de l'effet Warburg

Dans les années 1920, Otto Warburg et ses collaborateurs ont observé que les tissus cancéreux métabolisaient environ 10 fois plus de glucose sous forme de lactate que les tissus normaux en conditions aérobies (Warburg 1926). Ces scientifiques furent ainsi les premiers à constater que le métabolisme des cellules cancéreuses est souvent différent de celui des cellules normales. La plupart des cellules cancéreuses présentent en effet une activité glycolytique accrue et une forte production de lactate, même en présence d'oxygène : un shift de la respiration mitochondriale vers la glycolyse a donc lieu dans ces cellules. Ce phénomène métabolique est décrit comme l'effet Warburg (Koppenol *et al.* 2011). Les cellules tumorales se caractérisent également par une consommation élevée de glucose, inhérente à la stimulation de la glycolyse (Cairns *et al.* 2011). Cette propriété métabolique a été mise à profit au niveau clinique avec la tomographie par émission de positons associée à un scanner (TEP-scan), qui utilise un analogue du glucose marqué radioactivement, le FDG (2-[^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose), pour visualiser la forte accumulation de glucose dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains. Cette technique permet ainsi de diagnostiquer et de suivre l'évolution de nombreux cancers comme les mélanomes ou les cancers du poumon (Gambhir 2002).

La stimulation de la glycolyse dans les cellules cancéreuses repose en partie sur l'activation de la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la glycolyse et le transport de glucose (Moreno-Sanchez *et al.* 2007). La surexpression de plusieurs gènes codant des enzymes glycolytiques comme la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou la pyruvate kinase a ainsi été identifiée dans pas moins de 20 types de cancer différents (cerveau, prostate ou estomac par exemple). L'expression du gène de la lactate déshydrogénase A, qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate, est aussi augmentée dans plus de 10 cancers d'origines variées (utérus, foie ou prostate par exemple) (Altenberg and Greulich 2004). Il en est de même pour les transporteurs de glucose, comme GLUT-1, qui sont surexprimés dans beaucoup de cancers comme ceux du sein et du poumon (Medina and Owen 2002). En plus de ces surexpressions, une hausse de l'activité de plusieurs enzymes dont la lactate déshydrogénase et l'hexokinase a été rapportée dans les tissus cancéreux mammaires (Balinsky *et al.* 1984). L'activité des GLUT est également augmentée de 10 à 12 fois dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules non tumorales (Moreno-Sanchez *et al.* 2007).

D'autre part, certaines isoformes d'enzymes glycolytiques sont préférentiellement exprimées dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales afin de supporter une forte activité glycolytique (Moreno-Sanchez *et al.* 2007). C'est le cas notamment pour l'hexokinase II (HK-II) qui est l'isoforme prédominante de l'hexokinase dans les cellules cancéreuses alors qu'en conditions normales, elle est seulement exprimée en faible quantité dans les cellules du muscle et du tissu adipeux (Pedersen *et al.* 2002). Cette isoenzyme est capable de se lier à la membrane externe de la mitochondrie grâce à une interaction avec les porines : elle bénéficie ainsi d'un accès privilégié à l'ATP synthétisé dans la mitochondrie, ce qui permet d'augmenter le taux de glycolyse. Dans les cellules cancéreuses HeLa, HK-II empêche également la fixation de Bax sur la mitochondrie, ce qui prévient la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et le relargage du cytochrome c, bloquant ainsi l'apoptose (Pastorino *et al.* 2002, Pedersen *et al.* 2002). HK-II offre donc aux cellules tumorales un avantage métabolique mais aussi une protection contre l'apoptose, ce qui explique sans doute que sa surexpression dans de nombreux cancers soit associée à un pronostic défavorable au niveau clinique (Porporato *et al.* 2011). Les cellules cancéreuses expriment également des isoformes de GLUTs qui habituellement ne sont pas présentes dans le tissu dont elles dérivent. Une surexpression des GLUTs ou une consommation élevée de glucose dans les cellules tumorales, mesurée par TEP-scan, est associée à un mauvais pronostic au niveau clinique (Medina and Owen 2002, Mochiki *et al.* 2004).

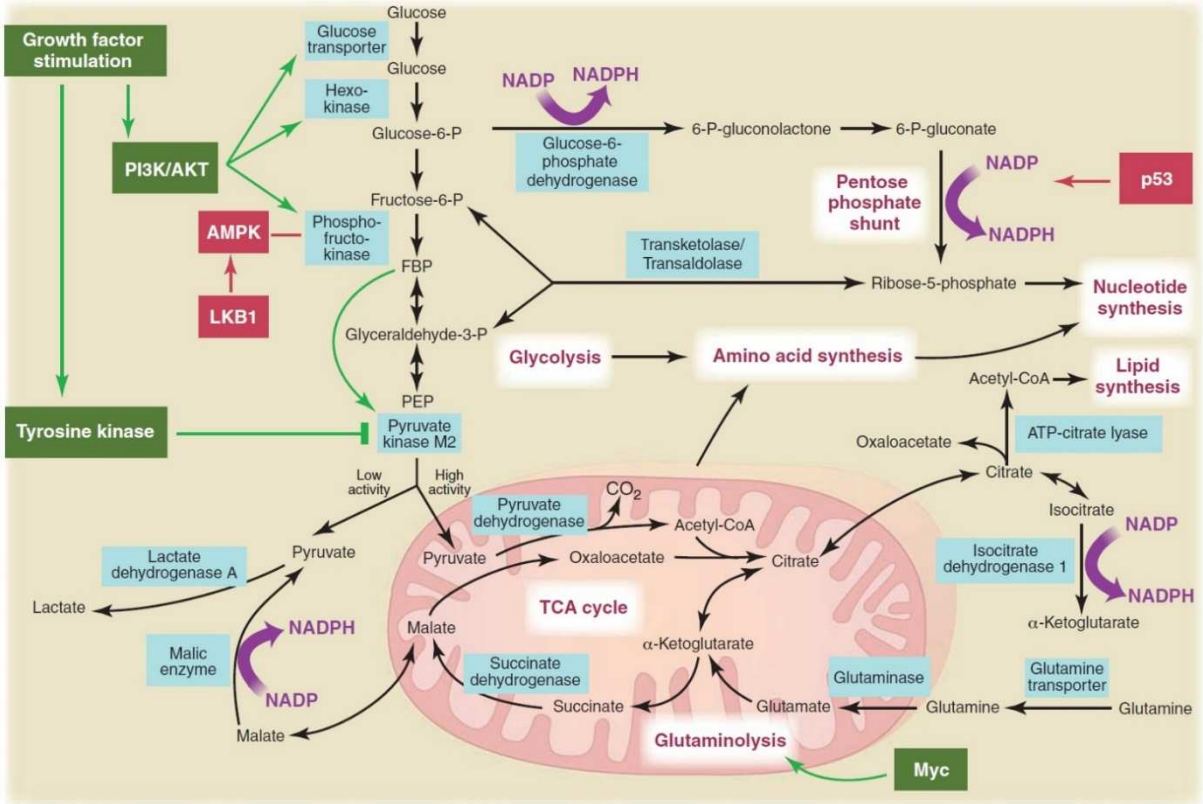

Figure 36 : La glycolyse et le métabolisme mitochondrial fournissent des précurseurs pour les processus de biosynthèse et contribuent au maintien de l'homéostasie redox dans les cellules cancéreuses. Différents intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA cycle)) sont utilisés comme substrats dans les voies anaboliques cellulaires afin de produire les nombreuses macromolécules dont les cellules cancéreuses ont besoin pour proliférer. En parallèle, plusieurs réactions chimiques permettent la production de coenzyme NADPH, ce dernier étant nécessaire pour la synthèse des acides gras et le fonctionnement du système antioxydant. Plusieurs oncogènes (verts) et gènes suppresseurs de tumeur (rouge) régulant habituellement le métabolisme cellulaire sont par ailleurs indiqués. Acetyl-CoA, acetyl-coenzyme A; AMPK, AMP-dependant protein kinase; FBP, fructose 1,6-bisphosphate; LKB1, liver kinase B1; NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate); PEP, phosphoénolpyruvate; PI3K/Akt, phosphatidylinositol 3 kinase/ protein kinase B (d'après Vander Heiden *et al.* 2009).

2.2 Les avantages de l'effet Warburg pour les cellules cancéreuses

Avec seulement 2 molécules d'ATP synthétisées pour une molécule de glucose, la glycolyse est beaucoup moins rentable sur le plan énergétique que la phosphorylation oxydative qui permet d'obtenir 38 molécules d'ATP (Moussard 2006). Quels sont alors les avantages d'une activité glycolytique accrue pour les cellules cancéreuses? Plusieurs hypothèses ont été émises pour répondre à cette question. Warburg a tout d'abord suggéré que la glycolyse aérobie était due à un dysfonctionnement des mitochondries dans les cellules cancéreuses (Warburg 1956). Cette hypothèse a été contestée par la suite car la plupart des cellules cancéreuses sont capables d'effectuer la respiration mitochondriale. De plus, elles consomment généralement de l'oxygène à des taux similaires à ceux des tissus non transformés (Weinhouse 1956, Frezza and Gottlieb 2009). Une explication alternative est basée sur le concept que la glycolyse est plus rapide que la phosphorylation oxydative pour synthétiser de l'ATP (Pfeiffer *et al.* 2001). L'utilisation de la glycolyse peut également être un mécanisme d'adaptation des cellules cancéreuses aux conditions hypoxiques rencontrées lors du développement précoce des tumeurs (Gatenby and Gillies 2004). En outre, de par sa capacité à être une source de précurseurs pour les processus de biosynthèse, la glycolyse offre un avantage biosynthétique aux cellules cancéreuses. En effet, puisque les intermédiaires de cette voie métabolique peuvent être utilisés comme substrats dans les voies de synthèse des constituants cellulaires (acides aminés, lipides et nucléotides), la forte activité glycolytique permet donc d'alimenter en substrats les voies anaboliques cellulaires et de produire ainsi les nombreuses macromolécules dont les cellules cancéreuses ont besoin pour proliférer (Figure 36) (Vander Heiden *et al.* 2009). De plus, l'orientation des intermédiaires de la glycolyse dans les voies anaboliques ne sert pas seulement à la synthèse des constituants cellulaires, mais elle contribue également au maintien de l'homéostasie redox dans les cellules cancéreuses grâce à la production de coenzyme NADPH qui, outre sa participation à la synthèse des acides gras, est nécessaire au fonctionnement du système antioxydant (Vander Heiden *et al.* 2009, Cairns *et al.* 2011). Ainsi, le glucose-6-phosphate, synthétisé lors de la première étape de la glycolyse, alimente la voie des pentoses phosphate afin de produire du ribose-5-phosphate, ainsi que du NADPH (Figure 36).

Par ailleurs, dans les cellules cancéreuses, l'isoforme de la pyruvate kinase PKM2 (pyruvate kinase isoenzyme type M2), qui catalyse la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate, contribue à la régulation du flux de métabolites à travers la glycolyse. En effet, selon le niveau d'activité de cette isoenzyme, les intermédiaires de la glycolyse sont utilisés soit pour la synthèse de macromolécules, soit pour la production d'énergie. Une faible activité de PKM2

entraîne en fait un ralentissement de la synthèse de pyruvate et provoque l'accumulation des intermédiaires de la glycolyse, favorisant ainsi leur redirection dans les voies de biosynthèse. Une forte activité de PKM2 contribue par contre à la synthèse de pyruvate et d'ATP, menant alors à la production d'énergie (Mazurek 2011, Israelsen and Vander Heiden 2015).

D'autre part, dans les cellules cancéreuses, l'effet Warburg ne se limite pas une activité glycolytique accrue, mais il inclut également une production élevée de lactate. De même que la glycolyse, la synthèse de lactate dans les cellules cancéreuses est peu rentable sur le plan énergétique car le lactate produit par les cellules tumorales est exporté à l'issue de sa synthèse, sans apport supplémentaire d'énergie pour la cellule (Bruce Alberts 2005). Quel est donc l'intérêt pour les cellules cancéreuses de produire autant de lactate? Plusieurs arguments peuvent alors être avancés. La synthèse de lactate dans les cellules tumorales contribue tout d'abord au maintien de la glycolyse, puisque la transformation du pyruvate en lactate permet la régénération rapide du coenzyme NAD, indispensable au bon fonctionnement de la glycolyse (Locasale and Cantley 2010). Ensuite, la libération de lactate dans le milieu extracellulaire entraîne une diminution du pH extracellulaire (pHe) et provoque ainsi une acidification du microenvironnement tumoral, qui est propice à l'activation de différents processus tumoraux (Payen *et al.* 2016, Romero-Garcia *et al.* 2016). Un environnement acide est en premier lieu toxique pour les cellules normales qui ne possèdent pas de mécanisme d'adaptation à un tel environnement (Gatenby and Gillies 2004). Ainsi, ces cellules meurent par apoptose à la périphérie tumorale et offrent donc de l'espace disponible pour la tumeur (Gatenby *et al.* 2006). Les cellules cancéreuses sont au contraire capables de survivre dans des conditions d'acidose, grâce à l'activation de systèmes de régulation du pH intracellulaire (pHi), comme des pompes ioniques ou des transporteurs membranaires, qui permettent le maintien du pHi (Chiche *et al.* 2010).

Si les cellules tumorales survivent en conditions acides, elles sont également capables de se propager dans cet environnement. Des études ont en effet démontré qu'une diminution du pH favorise le détachement, la migration et l'invasion des cellules tumorales, encourageant alors la progression métastatique (Payen *et al.* 2016). Les cellules cancéreuses se détachent des cellules voisines grâce à une déstabilisation des jonctions adhérentes induite par une baisse du pHe, tandis que leur migration dépend en partie d'une régulation par le pHe de l'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire (Stock *et al.* 2005, Chen *et al.* 2008). L'acidification du microenvironnement tumoral induit également une dégradation de la matrice extracellulaire, via la sécrétion et/ou l'activation d'enzymes protéolytiques comme les

cathepsines et les MMP (matrix metalloproteinases) (Payen *et al.* 2016). Ces processus favorables à l'envahissement tumoral ne sont toutefois pas seulement induits par une variation du pHe, mais ils résultent aussi d'une action directe du lactate. Ce dernier joue en effet un rôle dans le processus métastatique, puisqu'il stimule la migration et l'invasion des cellules tumorales (Goetze *et al.* 2011, Payen *et al.* 2016). Le lactate contribue également à l'induction du processus d'angiogenèse, via une activation des acteurs angiogéniques VEGF (vascular endothelial growth factor) et IL-8 (Burns and Wilson 2003, Vegran *et al.* 2011). Outre son action dans la propagation tumorale, le lactate est impliqué dans le phénomène d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. Ce métabolite altère la fonction de nombreuses cellules immunitaires comme les lymphocytes T ou les cellules NK (Natural Killer) et il bloque la différentiation des monocytes en cellules dendritiques. Il semble également se comporter comme un facteur pro-inflammatoire (Romero-Garcia *et al.* 2016).
Au vu des nombreux avantages conférés par le lactate aux cellules cancéreuses, il ne semble donc pas surprenant que la détection d'un niveau élevé de ce métabolite dans des biopsies de tumeurs soit associée à un mauvais pronostic de survie des patients, ainsi qu'à un risque élevé de métastases (Walenta *et al.* 2004, Blatt *et al.* 2016). Il apparaît également que la forte production de lactate dans une tumeur favoriserait une résistance des cellules tumorales à la radiothérapie. Cette radiorésistance pourrait être due aux propriétés antioxydantes du lactate. Ce métabolite peut en effet se comporter comme un piégeur de radicaux libres (Groussard *et al.* 2000, Blatt *et al.* 2016).

Compte-tenu de l'ensemble des données présentées dans ce chapitre, la glycolyse aérobie et la forte production de lactate dans les cellules cancéreuses semblent donc favoriser considérablement la croissance et l'envahissement tumoral. Ainsi, l'effet Warburg apparaît comme un contributeur clef du phénotype malin des tumeurs. Cependant, la glycolyse aérobie n'est pas suffisante à elle seule pour permettre la réplication des cellules cancéreuses. En effet, le catabolisme du glucose à travers la glycolyse ne permet pas de fournir l'ensemble des précurseurs, tels que des atomes de carbone ou d'azote, dont les cellules ont besoin pour la synthèse des macromolécules (Dang *et al.* 2011). En plus de la glycolyse, le métabolisme des cellules cancéreuses repose donc sur l'activation d'une seconde voie métabolique: le métabolisme mitochondrial. En effet, les voies métaboliques de la mitochondrie contribuent de façon significative aux processus de biosynthèse dans les cellules cancéreuses. De plus, la mitochondrie semble également participer de façon majeure à la production d'énergie dans les cellules (Zu and Guppy 2004, DeBerardinis *et al.* 2008). Le remodelage du métabolisme

énergétique dans les cellules cancéreuses s'étend donc au-delà de l'effet « Warburg » et de la stimulation de la glycolyse.

2.3 Le métabolisme mitochondrial dans les cellules cancéreuses

Dans les années 1950, Warburg a suggéré que les mitochondries n'étaient pas fonctionnelles dans les cellules cancéreuses, justifiant ainsi une forte activité glycolytique des cellules (Warburg 1956). Cependant, les cellules cancéreuses consomment généralement de l'oxygène à des taux similaires à ceux des tissus non transformés (Weinhouse 1956). De même, les enzymes du cycle de Krebs, comme les isocitrate et malate déshydrogénases, sont présentes en quantités équivalentes et possèdent une activité comparable entre des tissus cancéreux et normaux (Wenner *et al.* 1952). La plupart des cellules cancéreuses se caractérisent donc par des mitochondries fonctionnelles. De plus, il semble que la majorité de l'ATP synthétisé dans les cellules tumorales provient de la phosphorylation oxydative. En effet, Zu et Guppy ont compilé des données issues de 31 études qui ont analysé la production d'ATP mitochondriale (en mesurant la consommation d'oxygène) et glycolytique (en mesurant la production de lactate) et ont ainsi constaté que dans les cellules tumorales, seulement 17% de la production d'ATP est due à la glycolyse (Zu and Guppy 2004). Fan *et al.* ont également obtenu le même résultat dans les cellules murines immortalisées de rein iBMK (Fan *et al.* 2013). La mitochondrie semble donc jouer un rôle essentiel dans la production d'énergie des cellules cancéreuses.

Cet organite est également impliqué dans les processus de biosynthèse dans les cellules tumorales. En effet, le cycle de Krebs fournit de nombreux précurseurs pour la synthèse de macromolécules, comme les lipides ou les acides aminés (Figure 36) (DeBerardinis *et al.* 2008). Ainsi, les cellules cancéreuses se caractérisent par un efflux des intermédiaires du cycle de Krebs vers les processus de biosynthèse. Par exemple, le citrate contribue à la synthèse des lipides, tandis que l'oxaloacétate permet la synthèse de nucléotides et d'acides aminés. En plus de la synthèse des macromolécules, les intermédiaires du cycle de Krebs participent également au maintien de l'homéostasie redox dans les cellules cancéreuses, en permettant la production de coenzyme NADPH. Par exemple, le malate est exporté de la mitochondrie vers le cytosol, où il sera converti en pyruvate par l'enzyme malique, permettant ainsi la synthèse de NADPH (Figure 36) (Moussard 2006, Cantor and Sabatini 2012).

Toutefois, si de nombreux intermédiaires du cycle de Krebs sont utilisés dans les processus de biosynthèse, alors leur quantité peut devenir insuffisante pour permettre une activité optimale du cycle (Moussard 2006). Plusieurs voies métaboliques, dites anaplérotiques et n'appartenant

pas au cycle de Krebs, permettent donc la production d'intermédiaires du cycle supplémentaires. Dans ce contexte, la glutamine semble constituer une voie anaplérotique majeure dans les cellules cancéreuses (DeBerardinis *et al.* 2007). En effet, la transformation de cet acide aminé en glutamate, puis en α-cétoglutarate, permet de réapprovisionner le cycle de Krebs (Figure 36). Les intermédiaires du cycle, dérivés de la glutamine, sont ensuite déviés vers les processus de biosynthèse, tandis les coenzymes NAD et FAD sont réduits en NADH et $FADH_2$ respectivement, afin de permettre la production d'ATP au cours de la phosphorylation oxydative (Fan *et al.* 2013). Outre le métabolisme de la glutamine, d'autres voies métaboliques peuvent également contribuer au réapprovisionnement du cycle de Krebs, comme la β-oxydation des acides gras ou bien l'autophagie qui fournissent notamment de l'acétyl-CoA (Ralph *et al.* 2010, White 2012). Les acides aminés, autres que la glutamine, constituent aussi une source de carbone importante dans les cellules cancéreuses (Hosios *et al.* 2016). Par ailleurs, la glutamine, comme les autres acides aminés, constitue une source d'azote dans les cellules cancéreuses et contribue ainsi à la synthèse de différentes macromolécules comme les nucléotides ou les acides aminés (DeBerardinis and Cheng 2010, Hosios *et al.* 2016).

Outre son implication dans les processus de biosynthèse, la mitochondrie exerce également une fonction de signalisation dans les cellules tumorales. En effet, les différents métabolites générés par les voies métaboliques mitochondriales peuvent se comporter comme des molécules de signalisation. Ainsi, le citrate est exporté de la mitochondrie et clivé dans le cytosol par l'ATP citrate lyase afin de former de l'oxaloaétate et de l'acétyl-CoA (Figure 36). Ce dernier est ensuite utilisé comme substrat pour l'acétylation d'histones et de protéines cytosoliques ou mitochondriales. De même, l'α-cétoglutarate contribue à des réactions de déméthylation de la chromatine (Vyas *et al.* 2016). En outre, les ROS produits au sein de la mitochondrie permettent l'oxydation de résidus cystéines dans des protéines clefs comme des facteurs de transcription, des kinases ou des phosphatases comme PTEN et contribuent ainsi au développement tumoral, en stimulant notamment la survie et la prolifération cellulaire (Schieber and Chandel 2014). En raison d'un métabolisme cellulaire exacerbé, des quantités élevées de ROS sont produites dans les cellules cancéreuses. Ces dernières contrecarrent cependant cette accumulation de métabolites, en stimulant notamment la production de NADPH qui contribue à l'activité optimale des enzymes antioxydantes (Cairns *et al.* 2011, Weinberg and Chandel 2015).

Compte-tenu de ses différentes fonctions, le métabolisme mitochondrial semble donc jouer un rôle important dans les cellules cancéreuses. En accord avec cette hypothèse, un nombre croissant d'études suggère que l'activité mitochondriale contribue à la survie et à la croissance

des cellules tumorales. En effet, un shift du métabolisme de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse, induit par une diminution d'expression de la protéine p32 (rôle dans le maintien de la phosphorylation oxydative), entraîne une réduction de la prolifération des cellules cancéreuses MDA-MB-435 et MDA-MB-231 *in vitro* et *in vivo* (Fogal *et al.* 2010). De même, des cellules cancéreuses déficientes en complexes respiratoires, suite à une déplétion de leur ADNmt (cellules ρ0), présentent une capacité réduite à pousser sans ancrage et à former de nouvelles tumeurs (Hayashi *et al.* 1992, Cavalli *et al.* 1997, Tan *et al.* 2015). Le métabolisme mitochondrial semble donc contribuer au processus de carcinogenèse. Il semble d'ailleurs jouer un rôle important dans l'étape de progression tumorale. En effet, des données de la littérature suggèrent que les cellules cancéreuses invasives se caractérisent par une forte activité mitochondriale, cette dernière augmentant progressivement lorsque les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés métastatiques (LeBleu *et al.* 2014, Porporato *et al.* 2014). L'induction du métabolisme mitochondrial repose notamment sur l'activation du co-activateur transcriptionnel PGC1-α, impliqué dans la régulation de la biogenèse et de la fonction des mitochondries (LeBleu *et al.* 2014). Cette stimulation mitochondriale entraîne alors une hausse de la synthèse d'ATP, ainsi qu'une augmentation de la production de ROS. Ces derniers activent les protéines tyrosine kinases Src et Pyk2, qui à leur tour favorisent l'invasion tumorale (Porporato *et al.* 2014).

L'ensemble des données présentées dans ce chapitre suggère donc que le métabolisme mitochondrial favorise la croissance et l'envahissement tumoral. Contrairement à ce qui avait été suggéré initialement par Warburg, les modifications du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses ne se limitent donc pas seulement à une stimulation de la glycolyse, le métabolisme mitochondrial est également impliqué. Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses est donc plus complexe qu'initialement décrit. De plus, il semble que toutes les tumeurs ne présentent pas le même phénotype métabolique. De même, une tumeur est composée de plusieurs sous-populations de cellules qui se caractérisent par un profil métabolique distinct. Certaines cellules cancéreuses dépendent en effet de la glycolyse (cellules glycolytiques), tandis que d'autres utilisent plutôt la respiration mitochondriale (cellules « mitochondriales ») (Sonveaux *et al.* 2008, Danhier *et al.* 2017). Une telle hétérogénéité inter- et intratumorale semble résulter d'une combinaison de facteurs internes (profil génétique de la tumeur et tissu d'origine) et externes (microenvironnement tumoral) qui sont à l'origine d'une reprogrammation du métabolisme des cellules cancéreuses (Cairns *et al.* 2011, Yuneva *et al.* 2012). Un certain nombre d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur régulent en effet le

ONCOGENE OR ENERGY PROTEIN ACTIVATION *Mutated allele or altered expression level*	Glycolysis	Krebs-Cycle	PDH	OXPHOS
K-RAS		Increased conversion of glucose carbons into glutamate/glutamine aspartate and uridine		Generation of (ROS) by complex III
H-RASV12				Increase in oxygen consumption
H-RASV12/E1A	Late increase in glycolysis and lactate production			Early increase in oxygen consumption and superoxide production
C-MYC	Decreased contribution of glycolysis to phospholipids synthesis	Stimulation of mitochondrial glutaminolysis		Stimulation of mitochondrial glutaminolysis
Hif 1α Overexpressed in cancer	Activation of glycolytic genes	Inhibition of PDH and subsequent limitation of the Krebs cycle		Repression of OXPHOS proteins. Expression of COX4-2 (low rate)
STAT3 (activated in some tumors such as those bearing H-RasV12)	Increased LDH activity			Activation of complex II and complex V.
Oct1 Overexpressed in cancer	Glucose metabolism is reduced			Mitochondrial activity and amino acid oxidation are increased
P53/SCO2 Mutated p53 decreases SCO2 expression				Inhibition of complex IV
P53/Tigar Mutated p53 decreases TIGAR expression	Activation of glycolysis (Tigar normally inhibits glycolysis)			
PDK1 Overexpressed in some tumors		Inhibition of PDH and subsequent Krebs cycle		Subsequent reduction of respiration
PI3/AKT Hyperactivated in tumors	Activates the expression of glycolytic enzymes			

Tableau 6 : Impact de diverses altérations génétiques sur le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses. Un certain nombre d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur régulent habituellement le métabolisme énergétique des cellules. Ainsi, l'apparition de mutations dans ces gènes entraîne une reprogrammation du métabolisme énergétique dans les cellules cancéreuses. Certaines protéines, surexprimées dans les cellules tumorales, induisent également des modifications du métabolisme énergétique. COX, cytochrome c oxidase; Hif1α, hypoxia inducible factor 1; LDH, lactate dehydrogenase; Oct1, organic cation transporter 1; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK1, pyruvate dehydrogenase kinase 1; PI3K/Akt, phosphatidylinositol 3 kinase/ protein kinase B; ROS, reactive oxygen species; SCO2, synthesis of cytochrome c oxidase; STAT3, signal transducer and activator of transcription; TIGAR, TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (d'après Jose *et al.* 2011).

métabolisme énergétique des cellules. Ainsi, le profil métabolique d'une tumeur ou de ses cellules varie selon les altérations apparues dans ces gènes (Tableau 6). De même, le microenvironnement tumoral influe sur le métabolisme énergétique cellulaire (Cairns *et al.* 2011). En effet, les cellules cancéreuses utilisent différentes voies métaboliques selon la disponibilité des substrats comme le glucose ou l'oxygène (Smolkova *et al.* 2011). Par exemple, des conditions restrictives en oxygène sont associées à une diminution de la respiration mitochondriale, menant ainsi à une stimulation de la glycolyse (Eales *et al.* 2016). En réponse à différents facteurs, les cellules adaptent donc leur métabolisme afin de favoriser leur survie et leur prolifération (Cairns *et al.* 2011).

Par ailleurs, un nombre croissant de données suggère également qu'il existe une coopération métabolique entre les cellules glycolytiques et « mitochondriales » d'une tumeur (phénomène de symbiose métabolique) (Figure 37A). Cette même collaboration semble aussi avoir lieu entre les cellules cancéreuses et les cellules du stroma (phénomène connu sous le nom de « reverse Warburg effect ») (Figure 37B) (Sonveaux *et al.* 2008, Pavlides *et al.* 2009). En effet, selon ces modèles, les cellules cancéreuses contenues dans les zones hypoxiques de la tumeur et les cellules stromales utilisent principalement du glucose afin de réaliser la glycolyse, ce qui entraîne une production de différents métabolites riches en énergie comme du lactate ou du pyruvate. Ces derniers sont à leur tour utilisés comme substrats par les cellules cancéreuses présentes dans les zones oxygénées de la tumeur qui réalisent alors la phosphorylation oxydative. De cette manière, le glucose est réservé pour les cellules hypoxiques, favorisant ainsi leur survie malgré leur éloignement des vaisseaux sanguins (Sonveaux *et al.* 2008, Pavlides *et al.* 2009). Des adaptations métaboliques sont donc observées non seulement au niveau cellulaire, mais également à une échelle plus large dans la tumeur.

2.4 Le métabolisme énergétique comme cible thérapeutique

La glycolyse aérobie et le métabolisme mitochondrial semblent tous les deux favoriser considérablement la croissance et l'envahissement tumoral. Ainsi, le métabolisme énergétique apparaît comme un contributeur clef du phénotype malin des tumeurs, ce qui en fait une ciblede choix du point de vue thérapeutique. Dans ce contexte, de nombreux agents anticancéreux ont donc été développés afin de cibler le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses (Martinez-Outschoorn *et al.* 2017). Une partie de ces composés, présentés dans le tableau 7, ont pour cible différents acteurs de la glycolyse, comme des isoformes de transporteurs de glucose (GLUT1 par exemple) ou des enzymes glycolytiques (PKM2 par exemple), qui sont exprimées dans les cellules cancéreuses et jouent un rôle clef dans l'activité

A B

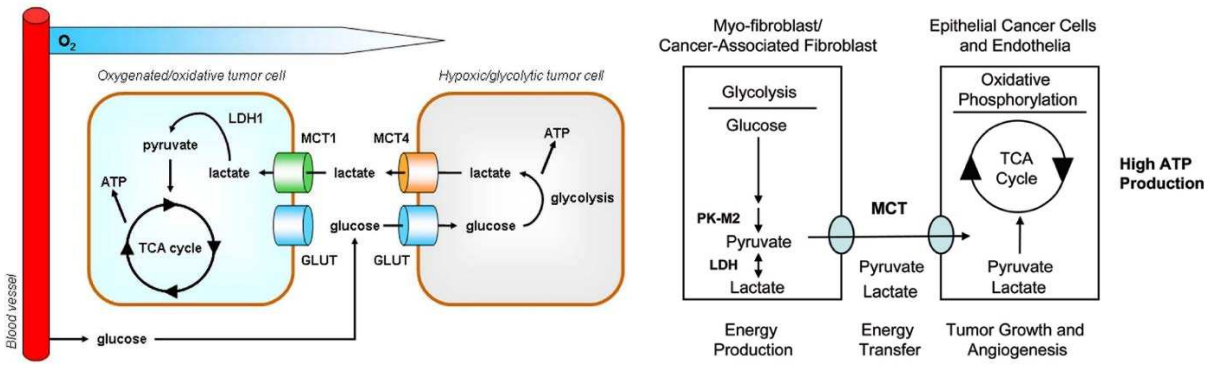

Figure 37 : Modèles des phénomènes de symbiose métabolique (A) et de « reverse Warburg effect » (B). Selon ces deux modèles, les cellules cancéreuses éloignées des vaisseaux sanguins (cellules hypoxiques) et les cellules du stroma utilisent du glucose afin de réaliser la glycolyse. Des métabolites riches en énergie comme du pyruvate ou du lactate sont alors produits et excrétés dans le milieu extracellulaire. Les cellules proches des vaisseaux sanguins (cellules « oxygénées ») récupèrent ces métabolites et les utilisent pour le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale. L'ATP est ainsi produit grâce à la glycolyse dans les cellules cancéreuses hypoxiques et les cellules stromales, tandis le métabolisme mitochondrial représente la principale source d'énergie dans les cellules cancéreuses oxygénées. GLUT, glucose transporter; MCT1, 4, monocarboxylate transporter 1 et 4; LDH, lactate dehydrogenase; PK-M2, pyruvate kinase M2; TCA cycle, tricarboxylicacid cycle (d'après Pavlides *et al.* 2009, Porporato *et al.* 2011).

Target pathway and protein	Agent	Development stage	Observations
Glycolysis			
GLUT1	WZB117, silibinin, and RNAi	Preclinical studies	Anticancer activity *in vitro* and *in vivo*
Hexokinases	2-deoxyglucose, lonidamine, 3-bromopyruvic acid, and methyl jasmonate	Preclinical and clinical studies	• Anticancer activity *in vitro* and *in vivo* • Clinical development of 2-deoxyglucose, lonidamide, 3-bromopyruvic acid has been discontinued • Lonidamine, the most advanced agent, has been tested in phase II clinical trials
Phospho-fructokinase 2 (isoform PFKFB3)	PFK158	Preclinical studies	Anticancer activity *in vivo*
Pyruvate kinase isoform M2 (PKM2)	TLN-232 and RNAi	Preclinical and phase II clinical studies	Anticancer activity *in vitro* and *in vivo*, and in phase II clinical trials
Lactate dehydrogenase A (LDHA)	GNE-140, FX11, galloflavin, and RNAi	Preclinical studies	Anticancer activity *in vitro* and *in vivo*
Lactate secretion			
MCT4	AZ93 and RNAi	Preclinical studies	Reduced tumour-cell growth *in vitro* and *in vivo*
Lactate uptake			
MCT1	AZD3965, CHC, and RNAi	AZD3965 is in clinical development	• Being tested in patients with advanced-stage solid tumours • No information on clinical activity is currently available
Hydrogen ion excretion (acid–base balance)			
Carbonic anhydrase 9	Indisulam	Clinical trials	Some trials were closed owning to a lack of clinical activity; in others, information on clinical activity is currently not available

Tableau 7 : Exemples d'agents ciblant la glycolyse et d'autres mécanismes associés. Ce tableau présente de façon non exhaustive plusieurs inhibiteurs ciblant différents acteurs de la glycolyse. Une stratégie thérapeutique prometteuse repose également sur l'inhibition des transporteurs de lactate MCT1 et 4 (monocarboxylate transporter 1 et 4), qui sont notamment impliqués dans le phénomène de symbiose métabolique. Par ailleurs, des molécules inhibant les systèmes de régulation du pH intracellulaire ont aussi été développées. GLUT1, glucose transporter 1; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3; RNAi, RNA interference (adapté de Martinez-Outschoorn *et al.* 2017).

Target pathway and protein	Agent	Development stage	Observations
TCA cycle			
Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1)	Dichloroacetate (DCA) and RNAi	Approved for the treatment of lactic acidosis	• Causes mitochondrial defects in cancer cells • Dichloracetate is being studied in phase I clinical trials • A phase II trial in previously treated metastatic breast and non-small-cell lung cancer was terminated early owing to toxicity
Pyruvate carboxylase	RNAi	Preclinical studies	Important for TCA anaplerosis; anticancer activity *in vitro* and *in vivo*
α-ketoglutarate dehydrogenase	CPI-613	Preclinical and clinical studies	Anticancer activity in acute myeloid leukaemia
Isocitrate dehydrogenases	AG-120, AG-221, AG-881, and RNAi	Preclinical and clinical studies	Anticancer effects via decreased production of 2-hydroxyglutarate
Oxidative phosphorylation			
Mitochondrial membrane potential	MKT-077	Clinical studies	MKT-077 is a mitochondrial poison
Mitochondrial complex I	Metformin, phenformin	Metformin is approved for the treatment of type 2 diabetes	• Anticancer activity *in vitro*, *in vivo*, and in phase II clinical trials, although results have been mixed • Phase III clinical trials are ongoing
Mitochondrial complex III	Arsenic trioxide	Preclinical and clinical studies	Approved by the FDA for acute promyelocytic leukaemia
Glutamine metabolism			
Glutaminase (GLS1)	CB-839, BPTES, and RNAi	Preclinical and clinical studies	Inhibition of TCA anaplerosis; anticancer activity *in vitro* and *in vivo*
Fatty acid β-oxidation			
Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)	Etomoxir, perhexiline, and RNAi	Perhexiline is approved for use as an antiangina therapy	• Anticancer effects *in vitro* and *in vivo* • No clinical activity data available from oncology clinical trials
Oxidative stress			
Reactive oxygen species production/glutathione	Vitamin C, *N*-acetylcysteine (NAC), quercetin, and dimethylfumarate	Preclinical and clinical studies	Phase I clinical trials are ongoing

Tableau 8 : Exemples d'agents ciblant le métabolisme mitochondrial et d'autres voies métaboliques associées. Ce tableau présente de façon non exhaustive plusieurs inhibiteurs ciblant des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques (TCA cycle), ainsi que des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Des agents ont également été développés afin de cibler la pyruvate carboxylase, qui transforme le pyruvate en oxaloacétate et la PDK1, qui inhibe la pyruvate déshydrogènase. D'autres molécules inhibent les voies anaplérotiques du cycle de Krebs (métabolisme de la glutamine et β-oxydation des acides gras) ou bien modulent la production de ROS dans les cellules cancéreuses. FDA, U.S. food and drug administration; RNAi, RNA interference (adapté de Martinez-Outschoorn *et al.* 2017).

glycolytique de ces cellules. Des inhibiteurs de la lactate déshydrogénase A sont également étudiés afin de bloquer la production de lactate dans les cellules tumorales. De plus, comme la survie des cellules cancéreuses en condition d'acidose dépend de systèmes de régulation du pHi, des molécules inhibant ces systèmes existent aussi (Porporato *et al.* 2011, Martinez-Outschoorn *et al.* 2017). A ce jour, plusieurs molécules sont étudiées au niveau préclinique, tandis que d'autres font ou ont fait l'objet d'évaluations au niveau clinique après avoir montré des effets anticancéreux encourageants *in vitro* et *in vivo* (Martinez-Outschoorn *et al.* 2017).

A titre d'exemple, le 2-désoxyglucose (2-DG) a été testé dans des études cliniques de phases I/II (Porporato *et al.* 2011). Ce composé est un analogue du glucose se caractérisant par la présence en C-2 d'un atome d'hydrogène à la place d'un groupement hydroxyle (Kuntz *et al.* 2014). Le 2-DG est un inhibiteur de la glycolyse qui empêche à la fois l'entrée du glucose dans les cellules par compétition et qui bloque les deux premières étapes de la glycolyse, via une inhibition de l'hexokinase et de la phosphoglucoisomérase (Nakada and Wick 1956, Wick *et al.* 1957, Chen and Gueron 1992). Il en résulte alors une diminution du niveau d'ATP tumoral (Karczmar *et al.* 1992). Cette action du 2-DG sur le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses lui a valu d'être considéré comme un agent mimant une restriction énergétique (ERMA) (Omar *et al.* 2014). Les effets anticancéreux du 2-DG ne sont toutefois pas seulement dus à une inhibition de la glycolyse. En effet, ce composé se comporte également comme un analogue du mannose et perturbe ainsi le processus de N-glycosylation des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE), menant à l'induction d'un stress du RE (Kurtoglu *et al.* 2007, Xi *et al.* 2014). A ce jour, il n'est pas déterminé de façon exacte si l'action anticancéreuse du composé est toujours liée à l'inhibition de la glycolyse, à l'interférence de la N-glycosylation des protéines ou bien plutôt à la combinaison des deux mécanismes.

Par ailleurs, d'autres composés ont également été développés afin de cibler le métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses. Ces agents appartiennent à la famille des mitocans, dont le mécanisme d'action repose sur l'altération de la production d'énergie dans les mitochondries. Il en résulte alors une augmentation de la production de ROS, suivie de l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (Ralph *et al.* 2006). Différents composés, présentés dans le tableau 8, ont été développés afin d'inhiber les acteurs du métabolisme mitochondrial, comme les complexes de la chaîne respiratoire ou bien des enzymes du cycle de Krebs. Des inhibiteurs ciblent également les voies anaplérotiques, comme le métabolisme de la glutamine ou la β-oxydation des acides gras. En outre, des agents modulant la production de ROS dans les cellules cancéreuses sont étudiés. A ce jour, plusieurs molécules sont analysées au niveau préclinique,

Targeted metabolism	*Targeted metabolic enzymes*	*Metabolic inhibitors*	*Cancer therapeutics/ other inhibitors*	*Cancer types* (in vitro *and/or* in vivo)
Glycolysis	GLUT1	Phloretin	Daunorubicin	Colon cancer (*in vitro*), leukemia (*in vitro*)
		WZB117	Cisplatin/paclitaxel	Lung cancer (*in vitro*), breast cancer (*in vitro*)
	GLUT4	Ritonavir	Doxorubicin	Multiple myeloma (*in vitro*)
	HK	2-DG	ABT-737/ABT-263	Leukemia (*in vitro*), cervical cancer (*in vitro*), hepatocarcinoma (*in vitro*), breast cancer (*in vitro*), small lung cancer (*in vitro*), lymphoma (*in vitro*), prostate cancer (*in vitro* and *in vivo*)
			Trastuzumab	Breast cancer (*in vitro* and *in vivo*)
			Prednisolone	Leukemia (*in vitro*)
		3-BrPA	Daunorubicin	Leukemia (*in vitro*)
			Doxorubicin	Multiple myeloma (*in vitro* and *in vivo*)
			Oxaliplatin/5-FU	Colon cancer (*in vitro*)
			Prednisolone	Leukemia (*in vitro*)
		LND	ABT-737	Leukemia (*in vitro*), lymphoma (*in vitro*)
			Prednisolone	Leukemia (*in vitro*)
	PKM2	shRNA	Cisplatin	Lung cancer (*in vivo*)
			Docetaxel	Lung cancer (*in vitro* and *in vivo*)
	LDHA	FX11	FK866	Lymphoma (*in vivo*)
		Oxamate	Paclitaxel	Breast cancer (*in vitro*)
			Trastuzumab	Breast cancer (*in vitro* and *in vivo*)

Tableau 9 : Exemples de combinaisons d'agents ciblant la glycolyse avec différentes molécules anticancéreuses testées *in vitro* et *in vivo* dans divers types de cancer. 2-DG, 2-déoxyglucose; 3-BrPA, 3-bromopyruvate; 5-FU, 5-fluorouracil; GLUT, glucose transporter; HK, hexokinase; LDHA, lactate dehydrogenase A; LND, lonidamine; PKM2, pyruvate kinase M2; shRNA, short hairpin RNA (adapté de Zhao *et al.* 2013).

tandis que d'autres font ou ont fait l'objet d'études cliniques (Martinez-Outschoorn *et al.* 2017). Un agent est également approuvé en clinique pour le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire : il s'agit du trioxyde d'arsenic. Ce composé présente un mode d'action complexe, reposant entre autres sur l'induction d'un stress oxydant, associé notamment à une diminution du niveau intracellulaire de GSH (glutathione) (Cheng *et al.* 2010). Outre le trioxyde d'arsenic, d'autres composés sont très prometteurs : c'est le cas notamment de la metformine. Il s'agit d'un antidiabétique utilisé comme traitement de première intention dans la prise en charge du diabète de type 2. Le mécanisme d'action de la metformine repose sur l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire. Actuellement, plusieurs dizaines d'études cliniques sont en cours afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette molécule en cancérologie (Foretz and Viollet 2014).

Par ailleurs, des données de la littérature suggèrent que la forte activité glycolytique des cellules cancéreuses pourrait être associée à une résistance des cellules à différentes thérapies comme des agents de chimiothérapie ou des molécules de thérapie ciblée. En effet, la reprogrammation du métabolisme énergétique dans les cellules tumorales semble induire plusieurs mécanismes à l'origine de cette résistance. Tout d'abord, la forte activité glycolytique des cellules cancéreuses entraîne une augmentation de la production d'ATP et de NADPH. Des niveaux élevés d'ATP provoquent alors l'activation des transporteurs ABC (ATP-binding cassette), qui permettent l'efflux des agents anticancéreux en dehors des cellules. Le NADPH contribue quant à lui au fonctionnement optimal des systèmes antioxydants, limitant ainsi l'action des agents anticancéreux dont le mode d'action repose sur l'induction d'un stress oxydant. Ensuite, la libération de lactate induite par la forte activité glycolytique des cellules cancéreuses provoque une acidification du milieu extracellulaire, qui à son tour entraîne une baisse de l'absorption passive des agents anticancéreux (Zhao *et al.* 2013). La stimulation de la glycolyse dans les cellules cancéreuses semble donc contrecarrer l'action d'agents anticancéreux. De même, le métabolisme mitochondrial semble contribuer à la résistance des cellules cancéreuses à certaines molécules de chimiothérapie. De plus, la stimulation de la phosphorylation oxydative est associée à la résistance *de novo* et acquise des cellules cancéreuses aux inhibiteurs de kinases oncogèniques (Marchetti *et al.* 2015). Dans ce contexte, cibler le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses pourrait constituer une stratégie prometteuse pour augmenter l'action de divers agents anticancéreux. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont donc été initiées afin de tester cette hypothèse. De même, des études cliniques sont en cours de réalisation. Dans le tableau 9, sont répertoriés des exemples de combinaisons d'agents ciblant la glycolyse et de

diverses molécules anticancéreuses testées *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles anticancéreux.

L'ensemble de ces données suggère que cibler le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses présente un potentiel thérapeutique prometteur. A ce jour, un seul composé ciblant le métabolisme énergétique (trioxyde d'arsenic) est toutefois autorisé sur le marché. Les thiazolidinediones pourraient être des candidats intéressants.

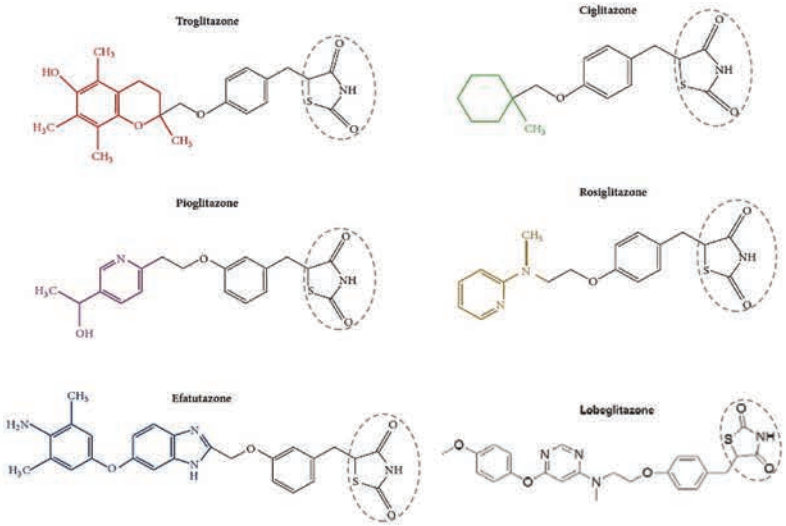

Figure 38 : Structure chimique de plusieurs thiazolidinediones (TZDs). Les TZDs se caractérisent par la présence d'un cycle thiazolidine-2,4-dione (ou cycle glitazone, cercles en pointillé). Il s'agit d'un cycle à 5 liaisons comportant un atome de soufre (S) et un atome d'azote (N), substitué par deux cétones. En plus du cycle glitazone, la troglitazone contient aussi un groupement chromane provenant de l'α-tocophérol (rouge) (adapté de Henry 1997, Chadha *et al.* 2015).

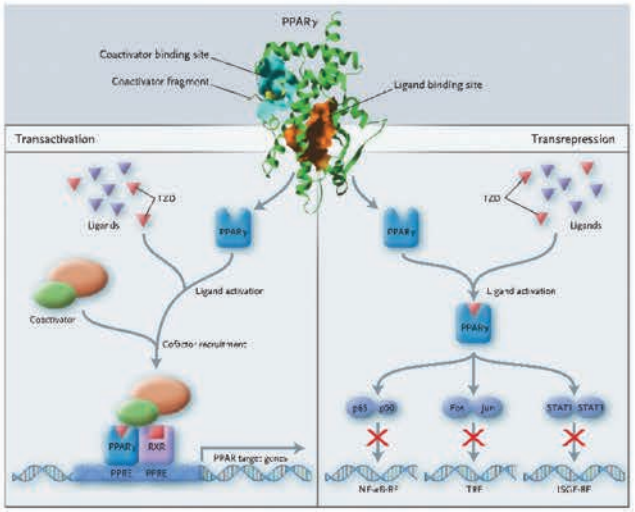

Figure 39 : Régulation transcriptionnelle de gènes cibles par les récepteurs PPARs (peroxisome proliferator activated receptor). Les récepteurs PPARs sont des facteurs de transcription activés par un ligand, comme les thiazolidinediones (TZD) pour le récepteur PPARγ. La transcription des gènes est régulée selon deux mécanismes : la transactivation ou la transrépression. Dans le cas de la transactivation, les récepteurs PPARs forment un complexe hétérodimérique avec le récepteur à l'acide rétinoïque RXR (retinoid X receptor). Ce complexe se fixe sur l'élément de réponse PPRE (peroxisome proliferator response element), tout en recrutant des coactivateurs transcriptionnels, afin d'activer la transcription de gènes cibles. Dans le cas de la transrépression, les récepteurs PPARs ne se fixent par sur l'ADN, mais ils bloquent l'action d'autres facteurs de transcription, comme NF-κB (nuclear factor-kappa B) ou AP-1 (activator protein-1). ISGF-RE, interferon-stimulated gene factor responsive element; NF-κB-RE, NF-kappaB response element; STAT, signal transducers and activators of transcription; TRE, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) responsive element (d'après Yki-Jarvinen 2004).

III. LES THIAZOLIDINEDIONES

1. Présentation générale

Les thiazolidinediones (TZDs), aussi nommées glitazones, sont une famille de composés synthétiques caractérisés par la présence d'un cycle thiazolidine-2,4-dione (ou cycle glitazone) (Figure 38). Les composés de cette famille les plus connus sont la ciglitazone (CGZ), la troglitazone (TGZ), la pioglitazone (PGZ) et la rosiglitazone (RGZ). Ces molécules sont des agents antidiabétiques, utilisés initialement dans le traitement du diabète de type II (Day 1999).

La CGZ fut la première TZD synthétisée. Elle diminue la résistance à l'insuline chez des animaux obèses et/ou diabétiques (Fujita *et al.* 1983). Une seconde molécule, la TGZ, a ensuite été développée. Elle est composée d'un cycle glitazone et d'un groupement chromane provenant de l'α-tocophérol (Figure 38) : cette molécule possède ainsi à la fois des propriétés insulino-sensibilisante et anti-oxydante (inhibition de la peroxydation lipidique) (Henry 1997). En 1997, la TGZ fut la première TZD approuvée pour l'utilisation en clinique, suivie de la RGZ et de la PGZ en 1999 et de la lobéglitazone en 2013. Les TZDs présentent cependant des effets indésirables qui ont contrarié leur utilisation clinique. La TGZ et la RGZ ont ainsi été retirées du marché, ces deux molécules présentant respectivement des toxicités hépatique et cardiaque (Chadha *et al.* 2015).

Les TZDs sont des agonistes du récepteur nucléaire PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor-γ), ayant pour ligands naturels les acides gras polyinsaturés, dont principalement des dérivés arachidoniques tels que la 15-désoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2) (Forman *et al.* 1995). Comprenant trois isoformes (α, β/δ et γ), les récepteurs PPARs sont des facteurs de transcription activés par un ligand (Figure 39). Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie énergétique, en régulant le métabolisme des lipides et du glucose. Au travers de ces modulations métaboliques, ils régulent les processus de prolifération, différenciation et survie cellulaires. Ils interviennent également dans le contrôle de l'inflammation et de la réponse immunitaire (Shimizu and Moriwaki 2008). Les différents isotypes de PPAR présentent une expression tissulaire spécifique, PPARγ étant fortement exprimé dans le tissu adipeux. Il existe deux isoformes de PPARγ (γ_1 et γ_2), qui diffèrent de 30 acides aminés à l'extrémité N-terminale : beaucoup de tissus expriment faiblement PPARγ_1, tandis que PPARγ_2 est exprimé de façon sélective et en grande quantité dans le tissu adipeux (Rosen and Spiegelman 2001).

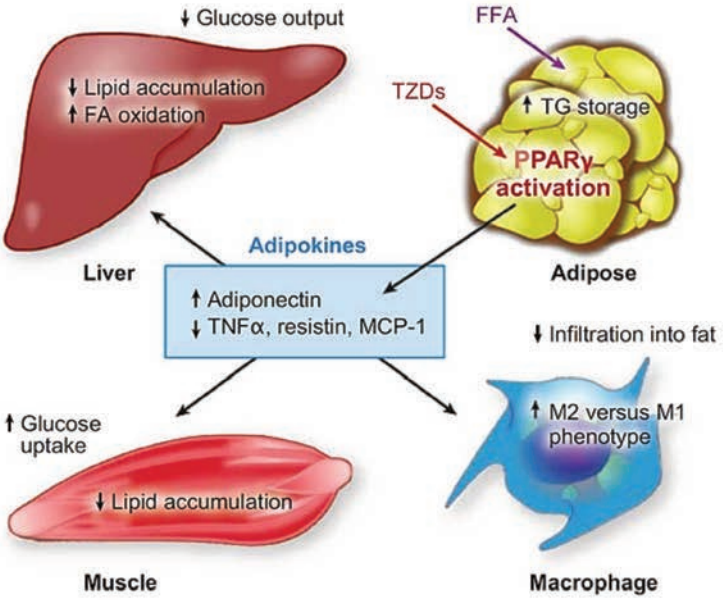

Figure 40 : Mécanismes moléculaires à l'origine des effets insulino-sensibilisants des thiazolidinediones (TZDs). L'activation de PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor γ) par les TZDs dans le tissu adipeux permet d'induire plusieurs évènements favorables à l'amélioration de la sensibilité des tissus à l'insuline. Cela facilite tout d'abord le stockage des lipides dans le tissu adipeux, au lieu d'autres tissus comme le muscle et le foie, dans lesquels l'accumulation de lipides favorise l'insulinorésistance. En parallèle, PPARγ régule la production par les adipocytes d'adipokines, comme le TNF-α (tumour necrosis factor α), la résistine, la protéine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) et l'adiponectine qui modulent la sensibilité des tissus à l'insuline. La diminution de la concentration d'acides gras libres circulants, la baisse du taux de lipides dans les tissus et les changements d'expression des adipokines résultant de l'induction de PPARγ ont des effets bénéfiques sur le métabolisme du glucose. L'activation de PPARγ oriente aussi les macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire M2 et réduit l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux, un phénomène qui favorise la synthèse de molécules inflammatoires contribuant à l'insulinorésistance. FA, fatty acid; FFA, free fatty acid; TG, triglyceride (d'après Tontonoz and Spiegelman 2008).

2. Propriétés antidiabétiques

Le diabète sucré est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie résultant d'anomalies dans la sécrétion de l'insuline, dans l'action de l'insuline ou de la combinaison des deux phénomènes. Deux types de diabète sont décrits : le diabète de type I, dû à un défaut de sécrétion de l'insuline et le diabète de type II, qui résulte à la fois d'une résistance des cellules à l'insuline et d'une sécrétion insuffisante d'insuline pour compenser l'insulinorésistance (Mellitus 2003).

Les TZDs sont utilisées dans le traitement du diabète de type II : elles sont capables de diminuer la résistance à l'insuline du tissu adipeux, des muscles squelettiques et du foie (Yki-Jarvinen 2004). Plusieurs mécanismes, décrits dans la figure 40, sont à l'origine de ces effets insulino-sensibilisants : ils impliquent une fixation des TZDs sur le récepteur PPARγ. En cas de diabète de type II, il se produit une augmentation du taux plasmatique d'acides gras libres et une accumulation inappropriée de lipides dans les tissus autres que le tissu adipeux, comme le foie et les muscles squelettiques : cette accumulation d'acides gras favorise la résistance à l'insuline (Tontonoz and Spiegelman 2008, Samuel *et al.* 2010). PPARγ est un activateur clef du processus de différenciation des adipocytes : les TZDs entraînent donc le développement du tissu adipeux et favorisent le stockage des lipides dans les adipocytes, au lieu des cellules hépatiques et musculaires. Cela permet d'améliorer la sensibilité des tissus à l'insuline et de diminuer la concentration d'acides gras libres circulants (Tontonoz and Spiegelman 2008, Cariou *et al.* 2012). Par ailleurs, les acides gras libres empêchent l'entrée du glucose dans les muscles. Leur diminution en réponse aux TZDs améliore donc l'utilisation du glucose par les muscles, ce qui confère un effet hypoglycémiant aux TZDs (Arner 2003, Duran-Sandoval *et al.* 2003). L'activation de PPARγ induit également une augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT4 (Wu *et al.* 1998).

Outre leurs effets sur le métabolisme des lipides et du glucose, les TZDs induisent aussi une modification de l'expression des molécules sécrétées par les adipocytes, les adipokines (Figure 40). Les TZDs provoquent une baisse de la production et de la sécrétion des adipokines associées au phénomène d'insulinorésistance, comme le TNF-α (tumour necrosis factor α) et la résistine, tandis que l'expression de l'adiponectine, qui améliore la sensibilité à l'insuline, est augmentée (Arner 2003). Les propriétés insulino-sensibilisantes des TZDs sont également associées à des effets anti-inflammatoires. En cas d'obésité, l'accumulation de macrophages de type M1 dans le tissu adipeux favorise la production de cytokines inflammatoires comme le TNF-α ou l'IL-6 (interleukine-6), diminuant ainsi la sensibilité des tissus à l'insuline. Les

Evènements cellulaires	Acteurs moléculaires mis en jeu
Apoptose	Protéines pro-apoptotiques ↑ Bax, Bad PTEN, p53 Protéines anti-apoptotiques ↓ Bcl-2, Bcl-xL Survivine
Inhibition de la prolifération	Arrêt du cycle cellulaire ↑ p21, p27 Déphosphorylation de pRb Promotion du cycle cellulaire ↓ Cyclines D1, D2, D3 et E Cdks 2, 4 et 6 PCNA

Tableau 10 : Mécanismes moléculaires impliqués dans les effets apoptotiques et antiprolifératifs des TZDs dans les cellules cancéreuses. L'apoptose est déclenchée par stimulation de l'expression des protéines apoptotiques et répression de l'expression des protéines anti-apoptotiques. Quant à la prolifération, elle est altérée par un arrêt du cycle cellulaire. Les TZDs entraînent une diminution de l'expression des protéines qui favorisent la progression du cycle, comme les cyclines et les cdks (cyclin-dependent kinase), tandis que l'expression de p21 et p27, qui inhibent respectivement cdk2/4 et cdk2, est augmentée. La phosphorylation de pRb (retinoblastoma protein) est également atténuée. Bax, Bcl-2-associated X protein; Bad, Bcl-2-associated death promoter; Bcl-2, B cell lymphoma-2; Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra large; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PTEN, phosphatase and tensin homolog (adapté de Yin *et al.* 2001, Blanquicett *et al.* 2008).

ligands de PPARγ inhibent la synthèse de ces deux cytokines par les monocytes. De plus, PPARγ favorise la polarisation des monocytes humains en macrophages de type M2, qui ont des propriétés anti-inflammatoires (Jiang *et al.* 1998, Tontonoz and Spiegelman 2008, Cariou *et al.* 2012).

3. Propriétés anti-cancéreuses

Depuis la fin des années 1990, il est aussi apparu que les TZDs possédent des potentialités anti-cancéreuses qui font appel à divers modes d'action selon les molécules et les types cellulaires (Grillier-Vuissoz *et al.* 2012). Les TZDs inhibent la prolifération cellulaire, mais ils induisent aussi la différenciation ou l'apoptose de divers types de cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Blanquicett *et al.* 2008). L'inhibition de la prolifération est associée à un blocage du cycle cellulaire en phase G_0/G_1, suite à une diminution de l'expression de protéines régulatrices du cycle (cyclines et cyclin-dependent kinases (cdk)) (Tableau 10). Une surexpression des inhibiteurs de cdk p21 et p27 et la déphosphorylation de la protéine pRb (retinoblastoma protein) sont également observées (Yin *et al.* 2001, Yang *et al.* 2005). L'apoptose est quant à elle déclenchée par une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax et une baisse de l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Tableau 10). Au lieu de l'apoptose, les TZDs peuvent également induire le processus d'autophagie (Zhou *et al.* 2009).

D'autres travaux soulignent l'intérêt des TZDs dans les thérapies anti-cancéreuses. Ainsi, des analyses rétrospectives suggèrent que l'utilisation clinique des TZDs chez des patients atteints d'un diabète de type II est associée à une diminution modeste mais significative du risque de cancers colorectal, pulmonaire, et mammaire (Colmers *et al.* 2012). De nombreux essais cliniques ont aussi été réalisés (Tableau 11). Certains ont rapporté des effets bénéfiques des TZDs, tandis que d'autres n'ont montré aucun effet anticancéreux significatif des composés. Néanmoins, il a été démontré que les TZDs, utilisées en thérapie combinatoire, sont capables d'augmenter les effets de différentes molécules anticancéreuses dans des modèles *in vitro* (Tableau 12) et *in vivo* (Tableau 13). Une diminution de la résistance des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux et une toxicité réduite des traitements ont également été constatées (Skelhorne-Gross and Nicol 2012). Plusieurs essais cliniques, mettant en jeu majoritairement la pioglitazone, ont été réalisés afin de compléter ces études sur les thérapies combinatoires (Tableau 14). Les TZDs pourraient donc avoir un intérêt pour la thérapie anti-cancéreuse en monothérapie ou en thérapie combinatoire avec des agents de chimiothérapie.

	TZD	Number of patients	Tumor type	Stage	Effects	Reference
Phase II	TGZ	3	Liposarcoma	Disseminated	• Terminal adipocytic differentiation of tumour cells • Reduced cell proliferation	Demetri 1999
Phase II	RGZ	9	Liposarcoma	Disseminated	• No sign of differentiation of tumour cells • No significant decrease of cell proliferation	Debrock 2003
Phase II	TGZ	41	Prostate	Adjuvant	• Prolonged stabilization of prostate-specific antigen (PSA) levels • 1 patient with a dramatic decrease in serum PSA to nearly undetectable levels	Mueller 2000
Phase II	TGZ	22	Breast	Disseminated	• No objective tumour response	Burstein 2003
Phase II	TGZ	25	Colon	Disseminated	• No objective tumour response	Kulke 2002
	RGZ	38	Breast	Neoadjuvant	• No significant effects on cell proliferation	Yee 2007
	RGZ	5	Thyroid	Recurrent	• Absence of radioiodine uptake • Increased serum thyroglobulin levels	Philips 2004
Phase II	RGZ	10 and 20	Thyroid	Disseminated	• Increased radioiodine uptake • Reduced serum thyroglobulin levels • No clinically significant response on long-term follow-up	Kebebew 2006 Kebebew 2009
	RGZ	23	Thyroid	Recurrent	• Increased iodine uptake	Tepmongkol 2008
Phase III	RGZ	106	Prostate	Adjuvant	• No increase of PSA doubling time or prolongation of the time to disease progression compared with placebo	Smith 2004
	RGZ	9	Thyroid	Progressive	• Improved LDpA (lesion absorbed dose per administered activity) in 5 patients, unchanged LDpA in 3 patients and deteriorated LDpA in 1 patient • Increase of serum thyroglobulin levels • 3 patients with regression in lesion size • Stabilization of disease in 4 patients	Rosenbaum-Krumme 2012
	PGZ	5	Thyroid	Progressive	• Unchanged LDpA in 3 patients and deteriorated LDpA in 2 patients • Increase of serum thyroglobulin levels • Stabilization of disease in 2 patients • 1 patient with partial metabolic response, 1 patient with stable metabolic disease and 3 patients with progressive metabolic disease	Rosenbaum-Krumme 2012
Phase I	EFA	13	Various	Disseminated	• Partial response in 1 patient with thymic carcinoma • Stabilization of disease in 3 patients (1 with pancreatic islet carcinoma,1 with malignant pleural mesothelioma and 1 with non-small cell lung cancer)	Murakami 2014
Phase I	EFA	31	Various	Disseminated	• Partial response in 1 patient with myxoid liposarcoma. • Stabilization of disease in 10 patients	Pishvaian 2012
Phase II	EFA	84	Colon	Disseminated	• Stabilization of disease in 60.7% of patients • Complete or partial response in 39.3% of patients • Significant improvement of progression-free survival	Boucher 2014

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des études cliniques effectuées avec des TZDs (thiazolidinediones) utilisées en monothérapie chez des patients atteints de différents types de cancer. EFA, efatutazone; PGZ, pioglitazone; RGZ, rosiglitazone; TGZ, troglitazone.

TZD	Additional compound(s)	Cancer type	Effect
CGZ	Gamma-radiation	Lung carcinoma	DNA damage, apoptosis
	RXR-α ligands (SR11237, 6-OH-11-O-hydroxyphenanthrene, 9-cis retinoic acid)	Breast carcinoma, lung carcinoma, glioblastoma, melanoma, myeloma	Growth inhibition; apoptosis, ↓ cell viability
	TNF-α-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	Ovarian cancer, lung cancer, bladder cancer	↓ proliferation; ↓ cell number; apoptosis
	Lovastatin	Pancreatic carcinoma, breast carcinoma, colon cancer	↓ cell viability; ↓ proliferation
	Phenylbutyrate	Lung carcinoma	Growth inhibition
	Niflumic acid	Lung cancer	↓cell viability, apoptosis
TGZ	9-cis retinoic acid	Gastric carcinoma	Apoptosis
	Cisplatin	Lung cancer, mesothelioma	Growth inhibition
	Paclitaxel	Lung carcinoma, glioblastoma	Growth inhibition, apoptosis
	RXR-α ligands (bexarotene, all-trans retinoic acid)	Breast cancer, leukemia cancer	Growth inhibition, differentiation
	Cell signaling molecules (TRAIL, heregulin)	Ovarian cancer, breast cancer, glioblastoma, lung cancer, neuroblastoma	↓ cell number; ↓ cell viability; apoptosis
	Lovastatin	Glioblastoma, lung cancer	Cell cycle inhibitor expression
	Doxorubicin	Breast cancer	↓cell density
	Aspirin	Lung cancer	↓ proliferation
	Tamoxifen	Breast cancer	Growth inhibition
	X-rays	Cervix cancer	↓cell viability
	Herceptin	Breast cancer	Growth inhibition
	Etoposide	Glioblastoma	↓ cell viability, apoptosis
RGZ	Platinium-based compounds (cisplatin, carboplatin)	Ovarian cancer, lung cancer, colon cancer	Growth inhibition, apoptosis
	5-Fluorouracil	Hepatoma, colon cancer	↓ cell viability, apoptosis
	RXR-α ligands (bexarotene, 9-cis retinoic acid)	Breast cancer, colon cancer	↑ differentiation, growth inhibition; ↓ cell viability
	Cell signalling molecules (TNF-α, anti-Fas IgM, Seliciclib, TRAIL)	Breast cancer, bladder cancer, renal cancer, glioblastoma, prostate cancer	Growth inhibition, apoptosis
	Vincristine	Oral epidermoid carcinoma	Growth inhibition, apoptosis
	Gemcitabine	Pancreas cancer	↓ cell viability, growth inhibition
	Gefitinib	Lung cancer	Growth inhibition
	Herceptin	Breast cancer	Growth inhibition
	Bortezomib	Melanoma	Growth inhibition
PGZ	Paclitaxel	Lung cancer	Growth inhibition
	RXR-α ligands (LG268, 6-OH-11-O-hydroxyfenantrene)	Liposarcoma, glioblastoma	↑ differentiation, apoptosis
	Statins (Simvastin, lovastatin)	Glioblastoma, meningioma	↓ cell viability
	Gemcitabine	Pancreas cancer	↓ cell viability
	2-Deoxyglucose	Prostate cancer	↓ tumor spheroid formation
	Tyrosine kinase inhibitors (dasatinib, nilotinib and ponatinib)	Chronic myeloid leukemia	↓ proliferation, apoptosis
EFA	Paclitaxel	Anaplastic thyroid carcinoma	Growth inhibition, apoptosis
	Cetuximab	Esophageal squamous cell carcinoma	↓ proliferation

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des différentes combinaisons TZDs (thiazolidinediones) + agents anticancéreux testées *in vitro* sur des cellules cancéreuses de diverses origines. Les flèches ↑ et ↓ correspondent respectivement à une augmentation et une diminution du paramètre étudié. CGZ, ciglitazone; EFA, efatutazone; IgM, immunoglobulin M; PGZ, pioglitazone; RGZ, rosiglitazone; RXR-α, retinoid X receptor alpha; TGZ, troglitazone ; TNF-α, tumor necrosis factor-α (adapté de Grillier-Vuissoz *et al.* 2012, Skelhorne-Gross and Nicol 2012, Kuntz *et al.* 2014, Sawayama *et al.* 2014, Frohlich and Wahl 2015, Glodkowska-Mrowka *et al.* 2016, Wang *et al.* 2016).

TZD	Additional compound(s)	Model	Effects	Reference
RGZ	Carboplatin	A549 NSCLC (non-small cell lung cancer) xenografted tumours	↓ tumor growth	Girnun 2007
RGZ	Cisplatin	Dimethylbenz [a]anthracene (DMBA)-induced breast tumours	↓ tumour volume ↑ differentiation of mammary tumours ↓ side effect of cisplatin (nephrotoxicity)	Tikoo 2009
TGZ	Cisplatin	EHMES-10 malignant pleural mesothelioma xenografted tumours	↓ tumour weight ↑ survival time	Hamaguchi 2010
TGZ or PGZ	Cisplatin	A549 NSCLC xenografted tumours	↓ tumor growth	Reddy 2008
CGZ	Cisplatin	OVCAR-3 and DISS ovarian carcinoma xenografted tumours	↓ tumour volume ↑ survival time	Yokoyama 2011
RGZ	Carboplatin	KRAS- and EGFR driven lung tumours (models of platinum and tyrosine kinase inhibitor-resistant and lung cancers)	↓ tumor number and size	Girnun 2008
PGZ	Lovastatin and atorvastatin	F98 glioblastoma stereotactically implanted tumours	↓ tumour volume An impact on survival improvement could not be demonstrated	Tapia-Pérez 2016
EFA	Paclitaxel	DRO90-1 and ARO81 anaplastic thyroid carcinoma xenografted tumours	↓ tumour growth	Copland 2006
EFA	Cetuximab	TE-4 esophageal squamous cell carcinoma xenografted tumours	↓ tumour volume	Sawayama 2013
PGZ	Budesonide	Benzo(a)pyrene-induced lung tumours	↓ tumour load	Fu 2011
RGZ	TRAIL	MDA-MB-435 breast carcinoma xenografted tumours	↓ tumour volume	Lu 2005

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des différentes combinaisons TZDs (thiazolidinediones) + agents anticancéreux testées *in vivo* sur des tumeurs de diverses origines. Les flèches ↑ et ↓ correspondent respectivement à une augmentation et une diminution du paramètre étudié. CGZ, ciglitazone; EGFR, epidermal growth factor receptor; EFA, efatutazone; KRAS, kirsten-rat sarcoma viral oncogene homolog; PGZ, pioglitazone; RGZ, rosiglitazone; TGZ, troglitazone; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.

	TZD	Compounds	Number of patients	Tumor type	Effects	Reference
Phase II	PGZ	Rofecoxib and capecitabine or temozolomide	14	High-grade glioma	• Stabilization of disease in 4 patients	Hau 2007
Phase II	PGZ	Rofecoxib and trofosfamide	19	Advanced melanoma	• Complete remission in 1 patient with melanoma and 3 patients with sarcoma • Partial remission in 1 patient with melanoma and 1 patient with sarcoma • Stabilization of disease in 2 patients with melanoma and 3 patients with sarcoma	Reichle 2004
			21	Advanced soft tissue sarcoma		
Phase II	PGZ	Rofecoxib and trofosfamide	5	Angiosarcoma	• Complete remission in 2 patients with angiosarcoma • Partial remission in 1 patient with angiosarcoma • Stabilization of disease in 2 patients with angiosarcoma and 1 patient with hemangioendothelioma	Vogt 2003
			1	Hemangioendothelioma		
	PGZ	Imanitib	3	Chronic myeloid leukaemia	• Complete molecular response in all patients	Prost 2015
Phase II	PGZ	Imatinib	24	Chronic myeloid leukaemia	• Rate of major molecular response of 56%, as compared with 23% in a control group that received imatinib alone	Rousselot 2016
Phase II	PGZ	Etoricoxib, interferon-α and capecitabine	45	Metastatic renal cell carcinoma	• Complete remission in 4 patients • Partial remission in 12 patients • Stabilization of disease in 18 patients	Walter 2012
Phase I	RGZ	Exemestane, Metformin	14	Hormone receptor–positive metastatic breast cancer	• Stabilization of disease in 4 patients	Esteva 2013
Phase I	EFA	FOLFIRI (5-fluorouracil, levo-leucovorin, and irinotecan)	15	Metastatic colorectal cancer	• Stabilization of disease in 8 patients	Komatsu 2014
Phase I	EFA	Paclitaxel	15	Anaplastic thyroid cancer	• Partial response in 1 patient • Stabilization of disease in 7 patients	Smallridge 2013
Phase II	EFA	Carboplatin and paclitaxel	108	Metastaic non-small cell lung cancer	• Efatutazone was associated with a lower progression-free survival rate vs placebo and a shorter progression-free survival • No difference in overall survival	Shaw 2012

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des études cliniques effectuées avec des TZDs (thiazolidinediones) administrées en combinaison avec un ou plusieurs agents anticancéreux chez des patients atteints de différents types de cancer. EFA, efatutazone; PGZ, pioglitazone; RGZ, rosiglitazone.

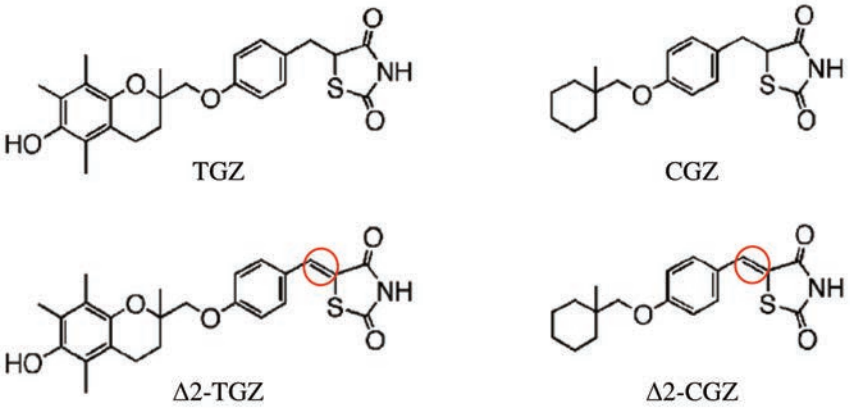

Figure 41 : Structures chimiques de la troglitazone (TGZ), de la ciglitazone (CGZ) et de leurs dérivés respectifs, Δ2-TGZ et Δ2-CGZ. Les composés Δ2-TGZ et Δ2-CGZ ont été obtenus par introduction d'une double liaison (cercles rouge) adjacente au cycle glitazone, conférant aux molécules une rigidité provoquant la perte d'activation de PPARγ (adapté de Shiau *et al.* 2005).

4. Des mécanismes anti-cancéreux PPARγ-indépendants (ARTICLE 1)

Un nombre croissant de données suggère que les effets anti-cancéreux des TZDs résultent en partie de mécanismes PPARγ-indépendants. Cela a été mis en avant par l'observation d'effets des TZDs dans des cellules n'exprimant pas PPARγ et par une absence de corrélation entre l'efficacité des molécules à activer PPARγ et l'intensité des effets observés. L'indépendance vis-à-vis de PPARγ a été démontrée grâce à l'utilisation d'antagonistes de PPARγ, d'ARNs interférants ciblant PPARγ et d'isoformes dominantes négatives de PPARγ (Wei *et al.* 2010, Grillier-Vuissoz *et al.* 2012). Des dérivés de la TGZ et de la CGZ (Δ2-TGZ et Δ2-CGZ respectivement) ont également été utilisés : ces dérivés, dont la structure chimique est présentée en figure 41, ne peuvent pas activer PPARγ, mais ils ont conservé une activité anti-cancéreuse (Huang *et al.* 2005, Shiau *et al.* 2005, Yang *et al.* 2006).

Durant ma thèse, mon travail s'est focalisé sur l'étude du mécanisme d'action de la Δ2-TGZ : les propos détaillés dans la suite de cet exposé porteront donc le plus souvent sur la TGZ et son dérivé Δ2-TGZ.

Action antiproliférative et pro-apoptotique

Certains effets anticancéreux PPARγ-indépendants de la Δ2-TGZ sont associés à une activité antiproliférative. En effet, la Δ2-TGZ bloque la prolifération de divers types de cellules cancéreuses (sein, prostate et poumon) (Chen *et al.* 2004, Fan *et al.* 2004, Shiau *et al.* 2005, Yang *et al.* 2006, Colin *et al.* 2010, Chbicheb *et al.* 2011, Lin *et al.* 2012). Ce dérivé semble plus efficace que sa molécule parente (TGZ), puisque dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, la dose nécessaire pour inhiber de 50% la prolifération des cellules (IC_{50}) après 24 heures de traitement est de 22 µM pour la TGZ contre 14 µM pour la Δ2-TGZ (Shiau *et al.* 2005). De la même manière, dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, les IC_{50} sont de 35,4 et 29,7 µM pour la TGZ et la Δ2-TGZ, respectivement (Colin *et al.* 2010). Cette inhibition de la prolifération pourrait être associée à un blocage du cycle cellulaire puisqu'un dérivé de la Δ2-TGZ, STG28, induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G_0/G_1 dans les cellules LNCaP.

Le composé STG28 induit également l'apoptose, lorsqu'il est utilisé à une concentration plus élevée : l'initiation de l'apoptose peut donc aussi contribuer aux effets antiprolifératifs de la Δ2-TGZ et de ses dérivés (Yang *et al.* 2007, Wei *et al.* 2008). Il a en effet été observé que la Δ2-TGZ induit l'apoptose des cellules cancéreuses de prostate PC-3 et LNCaP, ainsi que des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Shiau *et al.* 2005, Colin-Cassin *et al.* 2015). Dans les cellules de prostate, la Δ2-TGZ induit, avec une meilleure efficacité que la

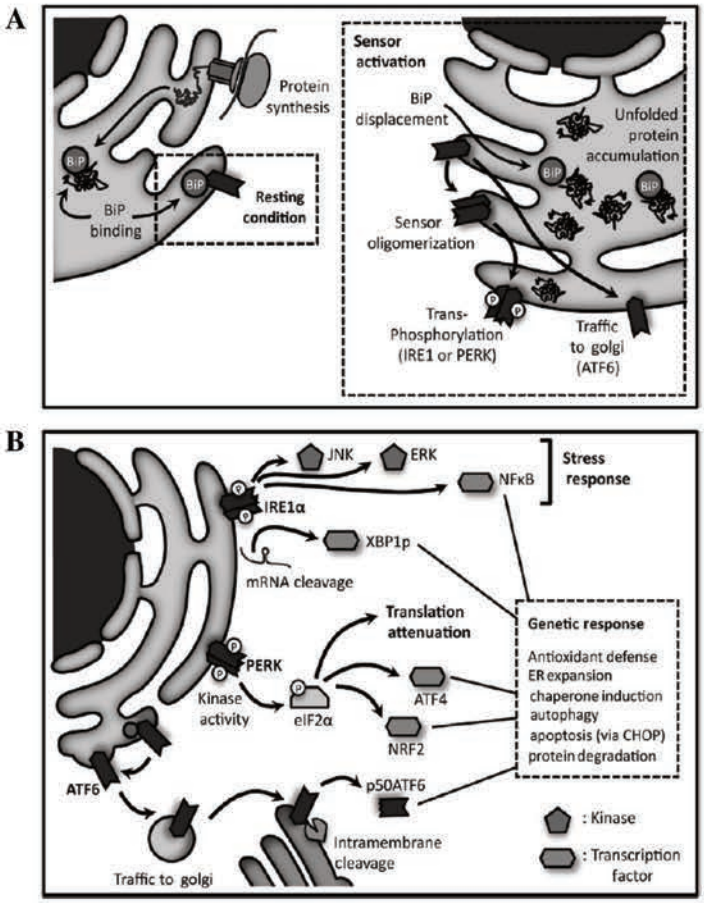

Figure 42 : Initiation de la réponse UPR (unfolded protein response) suite à un stress du réticulum endoplasmique (RE). A) En conditions normales (resting condition), les récepteurs transmembranaires « senseurs » IRE1α, ATF6 et PERK sont associés à la protéine chaperonne BiP. A la suite d'un stress du RE (sensor activation), BiP se dissocie de chaque senseur et se fixe sur les protéines mal conformées qui se sont agrégées dans la lumière du RE. IRE1α et PERK, alors libres, s'homo-oligomérisent et sont activés par transphosphorylation. Quant à ATF6, il est transporté vers l'appareil de Golgi. B) 3 voies de signalisation sont alors induites suite à l'activation d'IRE1α, ATF6 et PERK, ce qui permet la mise en place de la réponse UPR. IRE1α induit le clivage de l'ARNm *XBP-1*, résultant en la synthèse d'un facteur de transcription très actif. Il active aussi les voies de signalisation impliquant les kinases ERK et JNK et le facteur de transcription NF-κB. PERK phosphoryle eIF2α, atténuant ainsi la traduction protéique et menant à la synthèse du facteur de transcription ATF4. ATF6 est quant à lui tronqué dans l'appareil de Golgi et ainsi transformé en un facteur de transcription actif de 50 kDa (p50ATF6). La mise en place de l'UPR permet d'induire plusieurs processus comme la synthèse de protéines chaperonnes ou la dégradation des protéines mal conformées. Néanmoins, si la réponse adaptative UPR ne suffit pas à rétablir l'homéostasie du RE, alors l'apoptose est déclenchée via 3 axes principaux : la voie JNK activée par IRE1α, le facteur de transcription pro-apoptotique CHOP, et la libération de Ca^{2+} menant à l'activation de la caspase 12 chez la souris. ATF4,6, activating transcription factors 4 and 6; BiP, immunoglobulin heavy chain binding protein; CHOP, CEBP homologous protein ; eIF2α, eukaryotic initiation factor 2α; ERK, extracellular signal-regulated kinase; IRE1α, inositol requiring enzyme 1α; JNK, c-Jun N-terminal kinase 1; mRNA, messenger ribonucleic acid; NF-κB, Nuclear Factor-Kappa B; NRF2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; p50ATF6, forme tronquée d'ATF6 de 50 kDa; PERK, pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase; XBP1(p), X-box-binding protein 1 (protein) (d'après Bravo *et al.* 2013).

TGZ, une fragmentation de l'ADN et la libération du cytochrome c. Cette induction de l'apoptose est associée non pas à une variation d'expression des protéines de la famille Bcl-2, mais à un blocage de l'association des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL avec la protéine pro-apoptotique Bak, ce qui conduit à l'activation de la caspase 9 (Shiau *et al.* 2005). Dans les cellules cancéreuses mammaires, la Δ2-TGZ induit une déstabilisation de la membrane mitochondriale et une modification du potentiel membranaire mitochondrial, suivies de l'activation de la caspase 7 et du clivage de PARP (Colin-Cassin *et al.* 2015).

Un certain nombre de travaux ont tenté d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des effets antiprolifératifs ou pro-apoptotiques de la Δ2-TGZ.

Stress du réticulum endoplasmique

L'induction de l'apoptose pourrait être due à un stress prolongé du réticulum endoplasmique (RE) (Bravo *et al.* 2013). Le RE est un organite responsable de la synthèse, du repliement et du transport des protéines, ainsi que de la synthèse et de la distribution des phospholipides et des stéroïdes. Il joue aussi un rôle dans le stockage et le relargage du Ca^{2+}. Lorsqu'une des fonctions du RE est perturbée, cela résulte en un stress du RE et en l'agrégation de protéines mal conformées dans la lumière du RE (Bravo *et al.* 2013). Différents facteurs peuvent provoquer un stress du RE, comme une altération de l'homéostasie calcique, un stress oxydant ou bien un stress énergétique (Szegezdi *et al.* 2006, Bravo *et al.* 2013).
Afin de rétablir l'homéostasie du RE, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) est initiée suite à un stress du RE. Elle est médiée par 3 effecteurs transmembranaires du RE : IRE1α (inositol requiring enzyme 1α), PERK (pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase) et ATF6 (activating transcription factor 6) (Figure 42). La réponse UPR a pour but : 1) d'éviter un afflux de nouvelles protéines dans le RE en atténuant la traduction protéique 2) d'augmenter les capacités du RE en stimulant la biogenèse du RE et l'expression des protéines chaperonnes du RE 3) de réduire l'accumulation de protéines mal conformées en induisant leur dégradation par le système ERAD (endoplasmic reticulum-associated protein degradation) (Bravo *et al.* 2013). Toutefois, si le RE ne parvient pas à restaurer ses fonctions, la réponse protectrice UPR peut évoluer vers une signalisation proapoptotique. 3 voies principales sont alors à l'origine de l'apoptose induite par un stress du RE : l'activation transcriptionnelle du facteur de transcription proapoptotique CHOP (C/EBP homologous protein, aussi connu comme GADD153), l'activation de la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase 1) par IRE1α et la libération de Ca^{2+}, menant à l'activation de la caspase 12 chez la souris (Szegezdi *et al.* 2006, Bravo *et al.* 2013).

Colin-Cassin *et al.* ont démontré récemment que la Δ2-TGZ est capable d'induire un stress du RE dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. Ce dérivé de la TGZ active en effet plusieurs acteurs de la réponse UPR, comme PERK, eIF2α, XBP-1, BiP, ainsi que CHOP (Colin-Cassin *et al.* 2015). La phosphorylation de PERK et eIF2α est également observée dans les cellules épithéliales de foie de rat GN4 en réponse à la Δ2-TGZ. Toutefois, cette activation est nettement moins forte qu'avec la TGZ (Gardner *et al.* 2005). STG28, dérivé de la Δ2-TGZ, induit aussi un stress du RE dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, mais dans ce cas, avec une efficacité meilleure qu'avec la TGZ (Wei *et al.* 2010). Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, le stress du RE est suivi par une induction de l'apoptose. Néanmoins, l'apoptose ne semble pas être une conséquence du stress du RE, puisqu'une atténuation de l'expression de CHOP par ARN interférence ou une inhibition de la kinase JNK avec l'inhibiteur de JNK SP600125 n'empêchent pas l'activation de l'apoptose par la Δ2-TGZ (Colin-Cassin *et al.* 2015).

Activités protéolytiques protéasome-dépendantes

Outre le stress du RE, la Δ2-TGZ déclenche d'autres évènements cellulaires comme la protéolyse de plusieurs protéines jouant un rôle clef dans la régulation des processus de prolifération et d'apoptose. La Δ2-TGZ entraîne ainsi la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 et du récepteur ERα dans les cellules cancéreuses mammaires (Huang *et al.* 2005, Lecomte *et al.* 2008, Colin *et al.* 2010). Le récepteur des androgènes (AR) est également dégradé en réponse à la Δ2-TGZ dans les cellules cancéreuses de prostate hormono-dépendantes LNCaP. Cette protéolyse d'AR entraîne la diminution de la synthèse du marqueur PSA (prostate-specific antigen), dont l'expression est régulée par AR (Yang *et al.* 2007). Utilisée à une faible concentration (10 µM), la Δ2-TGZ peut aussi bloquer le recrutement du récepteur AR sur les éléments de réponse AREs (androgen response elements) présents au niveau du promoteur du gène codant le marqueur PSA (Yang *et al.* 2006).

Wei et ses collaborateurs ont également constaté la protéolyse de la β-caténine dans les cellules LNCaP, suite à un traitement avec la Δ2-TGZ. Dans ces cellules, le dérivé de la TGZ induit une augmentation de l'expression de β-TrCP, une protéine F-box de l'E3 ubiquitine ligase SCF (Skp1-Cul1-F-box protein)-β-TrCP : cette induction de la β-TrCP provoque la dégradation de la β-caténine (Wei *et al.* 2007). STG28 (dérivé de la Δ2-TGZ) et OSU-CG12 (dérivé de la Δ2-CGZ) induisent également l'expression de β-TrCP dans les cellules LNCaP et entraînent respectivement la protéolyse de la cycline D1 et du facteur de transcription Sp1 (specific protein 1) (Wei *et al.* 2008, Wei *et al.* 2009). Ce dernier régule l'expression des récepteurs ERα et AR :

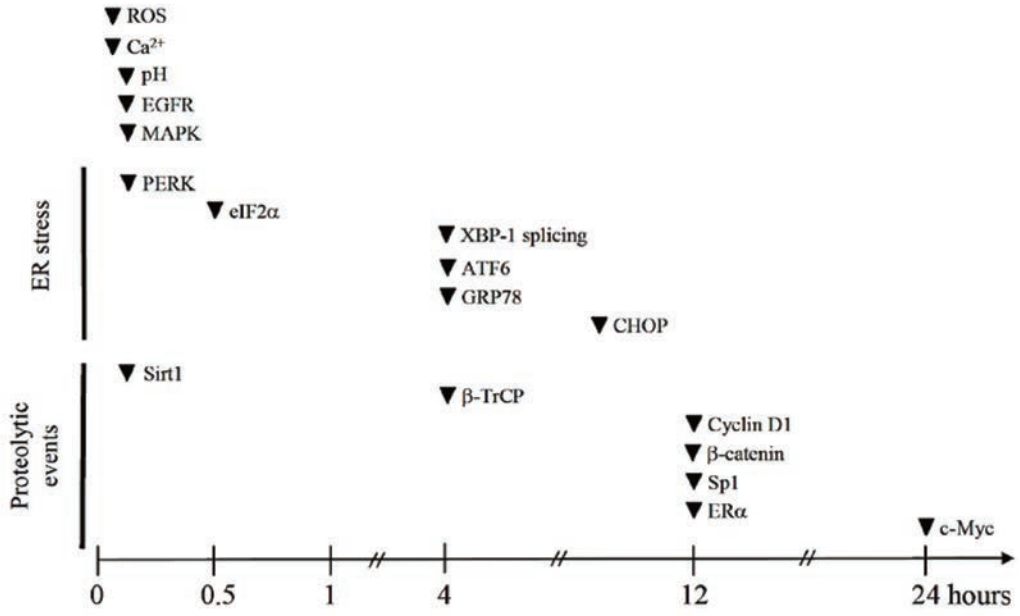

Figure 43 : Chronologie des principaux évènements PPARγ-indépendants associés aux effets anticancéreux de la TGZ et d'autres TZDs. Certains évènements cellulaires sont induits de façon très précoce en réponse aux composés, tandis que d'autres sont plus tardifs. Les données actuelles ne permettent pas de dire si ces différents évènements sont interconnectés. De plus, il reste à déterminer si un évènement très précoce unique est à l'origine de ces diverses actions des TZDs. ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, CEBP homologous protein; EGFR, epidermal growth factor receptor; eIF2α, eukaryotic initiation factor 2α; ER, endoplasmic reticulum; ERα, estrogen receptor alpha; GRP78, 78 kDa glucose-regulated protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PERK, pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase; ROS, reactive oxygen species; Sirt1, sirtuin 1; Sp1, specific protein 1; XBP-1, X-box-binding protein-1 (d'après Grillier-Vuissoz *et al.* 2012).

l'induction de la protéolyse de Sp1 par l'OSU-CG12 provoque donc une diminution d'expression de ces deux récepteurs (Wei *et al.* 2009). Par ailleurs, en plus de la β-TrCP, la TGZ et la Δ2-TGZ induisent également une diminution d'expression de Skp2 et Fbw7, deux protéines F-box. Cela provoque une augmentation d'expression des protéines cibles de ces deux protéines, telles que p27 et cycline E (Wei *et al.* 2007). Ainsi, la Δ2-TGZ induit une augmentation de l'expression de p27, en plus d'une diminution d'expression de la cycline D1, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle cette molécule pourrait induire un blocage du cycle cellulaire (Huang *et al.* 2005, Wei *et al.* 2007, Colin *et al.* 2010).

Augmentation transitoire du taux de calcium intracellulaire et activation des MAPKs

La Δ2-TGZ est également capable d'induire des évènements très précoces. En effet, après quelques minutes de traitement, elle déclenche une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans plusieurs types de cellules comme les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 ou les fibroblastes NIH/3T3 (Chen *et al.* 2004, Fan *et al.* 2004, Chbicheb *et al.* 2011). Cette augmentation est due à une déplétion des réserves calciques intracellulaires, plutôt qu'à un influx de Ca^{2+} extracellulaire. Dans les cellules NIH/3T3, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est associée à la phosphorylation d'eIF2α, induisant une inhibition de l'initiation de la traduction et un blocage de la prolifération cellulaire (Palakurthi *et al.* 2001, Chen *et al.* 2004). Dans les cellules MCF-7, la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ est à l'origine de la phosphorylation des ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) (Chbicheb *et al.* 2011).

En plus d'induire des changements ioniques, la Δ2-TGZ est donc capable d'activer les voies de signalisation MAPK. La phosphorylation de p38 est également observée dans les cellules épithéliales de foie de rat GN4 en réponse à la Δ2-TGZ (Gardner *et al.* 2005). Cependant, l'activation des ERKs est moins rapide et la stimulation de p38 est moins forte avec la Δ2-TGZ qu'avec la TGZ (Gardner *et al.* 2005, Chbicheb *et al.* 2011). En outre, contrairement aux cellules MCF-7, la Δ2-TGZ n'active pas les ERKs dans les cellules GN4 (Gardner *et al.* 2005). L'activation des MAPK par la Δ2-TGZ semble donc être variable selon le type cellulaire. Dans les cellules cancéreuses mammaires, l'activation des ERK1/2 induit l'expression du facteur de transcription EGR1 (early growth response gene-1) qui participe aux effets antiprolifératifs de la Δ2-TGZ dans les cellules MCF-7 (Chbicheb *et al.* 2011).

Certains évènements cellulaires apparaissent donc très tôt en réponse à la TGZ (et d'autres TZDs), tandis que d'autres sont plus tardifs (Figure 43). Cependant le fait qu'il existe un lien commun à l'ensemble de ces évènements n'est pas certain.

Reprofiling of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment?

Sabine Mazerbourg, Sandra Kuntz, Isabelle Grillier-Vuissoz, Audrey Berthe, Marine Geoffroy, Stéphane Flament, Andrea Bordessa and Michel Boisbrun. *Current Topics in Medicinal Chemistry. 2016;16(19):2115-24*

L'ensemble des évènements cellulaires PPARγ-indépendants induits par la TGZ et son dérivé Δ2-TGZ, que j'ai mentionnés dans les pages précédentes de mon manuscrit, ont été décrits dans cette revue à laquelle j'ai contribué pendant ma thèse. Elle s'inscrit dans le thème général du « drug repositioning » qui consiste à utiliser des composés mis sur le marché pour d'autres indications thérapeutiques que celles initialement prévues. Nous avons ainsi considéré que la TGZ évoluait d'un antidiabétique à un anti-cancéreux.

Dans cette revue, outre le fait de décrire et d'expliquer les mécanismes cellulaires impliqués dans l'action PPARγ-indépendante de la TGZ et de la Δ2-TGZ, nous décrivons les différents processus à l'origine de la toxicité hépatique de la TGZ et les modifications de structure chimique qui ont été réalisées afin de développer des nouveaux dérivés plus actifs sur les cellules cancéreuses mammaires, et moins hépatotoxiques. L'insaturation, la désoxygénation ou bien encore l'adjonction de groupements hydrophobes apparaissent ainsi comme les modifications les plus intéressantes.

L'utilisation clinique de la TGZ ayant été remise en cause par sa toxicité hépatique, de tels nouveaux dérivés pourraient être plus pertinents.

FINAL

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016, *16*, 000-000

Reprofiling of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment?

Sabine Mazerbourg[a,b], Sandra Kuntz[a,b], Isabelle Grillier-Vuissoz[a,b], Audrey Berthe[a,b], Marine Geoffroy[a,b], Stéphane Flament[a,b,*], Andrea Bordessa[c,d] and Michel Boisbrun[c,d]

[a]Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France; [b]CNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France; [c]Université de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France; [d]CNRS, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

Stéphane Flament

Abstract: The existence of unresponsive tumors and the appearance of resistant tumors during the course of treatments both justify that we increase urgently the panel of pharmacological molecules able to fight cancer. An interesting strategy is drug reprofiling (also known as drug repositioning, drug repurposing or drug retasking) that consists of identifying and developing new uses for existing drugs. This review illustrates drug reprofiling with troglitazone (TGZ), a synthetic PPARγ agonist initially used for the treatment of type II diabetes. The fact that TGZ also displays anticancer effects is known since the end of the nineties but its development as an anticancer agent was slowed down due to hepatotoxic side effects. Part of the knowledge available for TGZ, mainly the molecular basis for PPARγ activation, its metabolization pathways and the side effects on hepatocytes, were taken into account to elaborate new molecules. Key findings were that unsaturated TGZ derivatives, when compared to TGZ, do not activate PPARγ, exhibit a higher efficiency on cancer cells and a lower toxicity towards hepatocytes. However, a weakness is that the mechanisms involved in the anticancer effects are still not completely understood and that the efficiency of such derivatives has not yet been completely studied *in vivo*. Data about this point should become available very soon from animal models and this will be a prerequisite to initiate clinical trials with these potential new anticancer drugs developed from a drug repurposing strategy.

Keywords: Drug reprofiling, troglitazone, thiazolidinedione, cancer, diabetes, hepatotoxicity.

1. INTRODUCTION

The traditional approach to drug discovery involves *de novo* identification and validation of new molecules, which is a time-consuming and very expensive process. Despite huge investment, the number of new drugs identified by this approach has not increased significantly during past decades. An interesting alternative is drug reprofiling (also known as drug repositioning, drug repurposing or drug retasking) that consists of identifying and developing new uses for existing drugs [1]. More and more companies are scanning the existing pharmacopoeia for reprofiling candidates. This can be achieved by two approaches: *in silico* drug reprofiling which utilizes public databases and bioinformatics tools to systematically identify interaction networks between drugs and protein targets whereas activity-based drug reprofiling refers to the use of existing drugs for screening. Several governments worldwide are investing in drug repositioning and related activities [2]. Drug reprofiling has gained particular attention from the scientific community engaged in anticancer research due to the combination of great demand for new anticancer drugs and the availability of a wide variety of cell- and target-based screening assays [3]. With the successful clinical introduction of a number of non-cancer drugs for cancer treatment, drug repositioning now becomes a powerful alternative strategy to discover and develop novel anticancer drug candidates from the existing drug space. In this review, we expose the case of troglitazone (TGZ) (Fig. **1**), a drug that was used for the treatment of type II diabetes and whose reprofiling could be very interesting for cancer treatment. Indeed, among members of the same family that reached the market for diabetes treatment, TGZ was often described as the most potent one, justifying that a specific attention was paid to this compound [4]. The exact mechanism involved in its anticancer action has remained elusive.

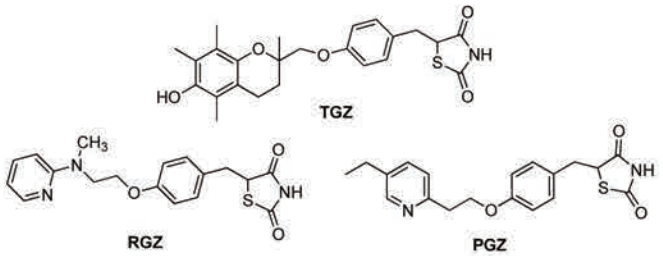

Fig. (1). Chemical structures of TGZ, RGZ, and PGZ.

Original derivatives have been synthesized and exhibit a higher efficiency and a lower toxicity. Ongoing studies are

*Address correspondence to this author at: CRAN, UMR 7039, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France; Tel: 011 33(0) 3 83 68 42 52; Fax: 011 33(0) 3 83 68 40 01; E-mail: stephane.flament@univ-lorraine.fr

1568-0266/16 $58.00+.00 © 2016 Bentham Science Publishers

being focused on identifying the molecular target of these derivatives in cancer cells. This will increase our knowledge of their mode of action, facilitating their development as new anticancer drugs.

2. TGZ AND HEPATOTOXICITY

Thiazolidine-2,4-diones (TZD) are synthetic agonists of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPARγ), a ligand-activated transcription factor belonging to the steroid hormone receptor superfamily. TZD became famous after the discovery of ciglitazone (CGZ) by scientists at the Takeda Pharmaceuticals Company [5, 6]. This compound reduced insulin resistance by potentiating the action of insulin in diabetic or obese animals. Several other TZDs were developed thereafter. TGZ was derived from CGZ by replacing the methylcyclohexylmethyl ether moiety with a vitamin E residue. Pioglitazone (PGZ) and rosiglitazone (RGZ) were developed by modifications based on the metabolites of CGZ. TGZ (Rezulin®, Pfizer) was launched in 1997 as a new oral antidiabetic drug. The recommended dosage was 400 to 800 mg once daily and TGZ was used as monotherapy as well as in combination with metformin, sulfonylureas or insulin. In 2000, TGZ was withdrawn from the market because it was associated with the development of acute liver failure [7, 8]. TGZ was the only TZD to be withdrawn from the market worldwide. RGZ (Avandia®, GSK), another TZD-based antidiabetic drug, was suspended from the European market in 2010 because its use was associated with increased risks of heart attacks, whereas PGZ (Actos®, Takeda) was withdrawn from the French and German markets in 2011 in regards to high risks of bladder cancer (Fig. **1**).

Thus, there was a great interest in designing novel PPARγ ligands that retain insulin-sensitizing properties while minimizing adverse side effects. This led to a second generation of TZD for which attention was put mainly on the tail part of the compounds. Efatutazone (CS-7017; RS5444), developed by the Daiichi Sankyo Company, is a novel third-generation TZD that activates very potently PPARγ-mediated transcription [9].

As reported by Chojkier [7], the liver injury associated with TGZ was idiosyncratic, unpredictable, neither time- nor dose-dependent and cannot be reproduced in animals. A great amount of literature was devoted to the study of TGZ-associated Drug Induced Liver Injury (DILI) in order to better understand the mechanisms involved, but this topic still remains controversial. Smith [10] and later Yokoi [11] have reviewed these aspects. The toxicity of TGZ seems to be PPARγ-independent since molecules with higher PPARγ agonist potency such as RGZ and PGZ exhibited less hepatotoxic effects [12]. Numerous mechanisms were reported to explain TGZ toxicity.

Many articles report on a mitochondria-related toxicity [13-19]. Oxidative stress, reduction of mitochondrial membrane potential, alteration in mitochondrial respiratory function, and mitochondrial DNA damage were evoked. Lee *et al*. [20] used a proteomic approach to detect off-target effects of TGZ, out of which was identified an impaired mitochondrial glutathione import protein. All these phenomena should be attributed not only to TGZ but also to its metabolites and there is mounting evidence that the latter are responsible for at least a significant part of the observed DILI. In this way, many studies have focused on TGZ metabolism. Fig. (**2**) summaries the pathways leading to the various metabolites which were identified. Conjugation as a sulfate is catalyzed by phenol sulfotransferase ST1A3 [28] and this accounts for 70% of the metabolites detected in human plasma [29]. Glucuronic acid conjugation is mediated by UDP-glucuronyltransferase (UGT), leading to a minor metabolite [30]. While these phase II metabolites are generally considered as detoxifying species, it was suggested that TGZ sulfate (TGZS) might have some toxicological potential. Funk *et al*. [31, 32] showed that TGZS interacts with the canalicular Bile salt export pump (Bsep), leading to bile salts accumulation in the liver, inducing cholestasis. It was more recently shown that TGZS has also a direct toxic effect on human liver cells [33].

Many articles also report on the toxicity of Reactive Metabolites (RM) formed after oxidation resulting from phase I metabolism reactions. As depicted in Fig. (**2**), TGZ may be oxidized in the liver by CYP2C8 and CYP3A4 at the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane or at the TZD heterocycles. In the latter case, the heterocycle is converted into a sulfoxide which leads to a reactive isocyanate. One molecule of glutathione may then react directly on the isocyanate carbonyl group or establish a disulfide linkage via a loss of water. Both reactions are catalyzed by the action of glutathione *S*-transferase (GST) [34]. These reactions induce a depletion of glutathione, which may account for the observed toxicity. But RGZ and PGZ also contain a TZD ring, and no such hepatotoxicity was reported. Yet, the recommended doses for these two drugs were much lower than for TGZ, but it is assumed that the difference should arise from the absence of the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman group in RGZ and PGZ. Thus, the phenol group in TGZ enables the formation of the toxic sulfate derivative, but as depicted in Fig. (**2**), it can also be oxidized, giving a radical species leading subsequently to a quinone or a quinone-methide metabolite. The former revealed to be not as toxic as TGZ itself, but the highly reactive quinone-methide is assumed to be very toxic and may react with glutathione [35]. All these metabolites were identified in hepatocytes incubated with TGZ and their production could be reproduced by means of electrochemical oxidation [36-42]. Quantum calculations could afford the mechanistic pathways involved at the atomic level [43].

One may then wonder how could occur a so huge variability in hepatotoxicity among the patients, leading to the observed idiosyncratic DILI. TGZ has been shown to induce CYP3A in human and rat hepatocytes, which stimulates the formation of quinone-type metabolites [44, 45]. Thus, the large interindividual variability of CYP3A4 activities in human liver may be related to the variable risk of DILI. Furthermore, Watanabe *et al*. [46] reported from a group of Japanese patients treated with TGZ a huge correlation between the occurrence of an abnormal increase of the hepatic enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and the double null genotype of GSTM1 and GSTT1 isoforms. This was later confirmed *in vitro* [47]. Meanwhile, Okada *et al*. [34] showed that the various GST isoforms contributed differently to the GSH

Table 1. Overview of TGZ and TG-88 action on xenografted tumor development in mice.

p.o. administration (mg/kg /day)	Beginning of treatment after tumor cells injection	Mice	Cancer cell line		Effects on tumor development		
TGZ (200)	Same day	Balb/c nude	Huh7 (liver)		89 % reduction tumor growth	↓ proliferation ↑ apoptosis	[21]
	12 days (tumor 2-4mm)				88 % reduction tumor growth		
	15 days (tumor 8-10 mm)				42 % reduction tumor growth		
TGZ (500)	Next day	BNX triple immu-nodeficient nude	PC3 (prostate)		20% reduction tumor weight	nd	[22]
TG-88 (100 and 200)	2 days	Male NCr athymic nude	PC3 (prostate)		Tumor growth inhibition: 50 % when 100 mg/kg/day 61 % when 200 mg/kg/day	nd	[12]
TGZ (1000)	Next day	Female BNX triple immunodeficient nude	MCF-7 (breast)		No tumor development	↑ apoptosis	[23]
TGZ (350)	4 days	DBA/2J	KLN (lung)		63 % reduction tumor volume	nd	[24]
TGZ (200)	Same day	Balb/c nude	HCT116 (colon)	XIAP+/+	63 % reduction tumor volume 54 % reduction tumor weight	↓ proliferation ↑ apoptosis	[25]
				XIAP-/-	87.5 % reduction tumor volume 79 % reduction tumor weight	↓ proliferation ↑ apoptosis	
TGZ (200)	10 days (tumor 70 mm^3)	Swiss nude	CX-1 (colon)		50 % reduction tumor volume	nd	[26]
TGZ (500)	Next day	Balb/c nude	BHP 18-21 (thyroid)		98 % reduction tumor volume No metastasis in the liver	nd	[27]

TG-88: Δ2-TGZ derivative ; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein; nd: not determined

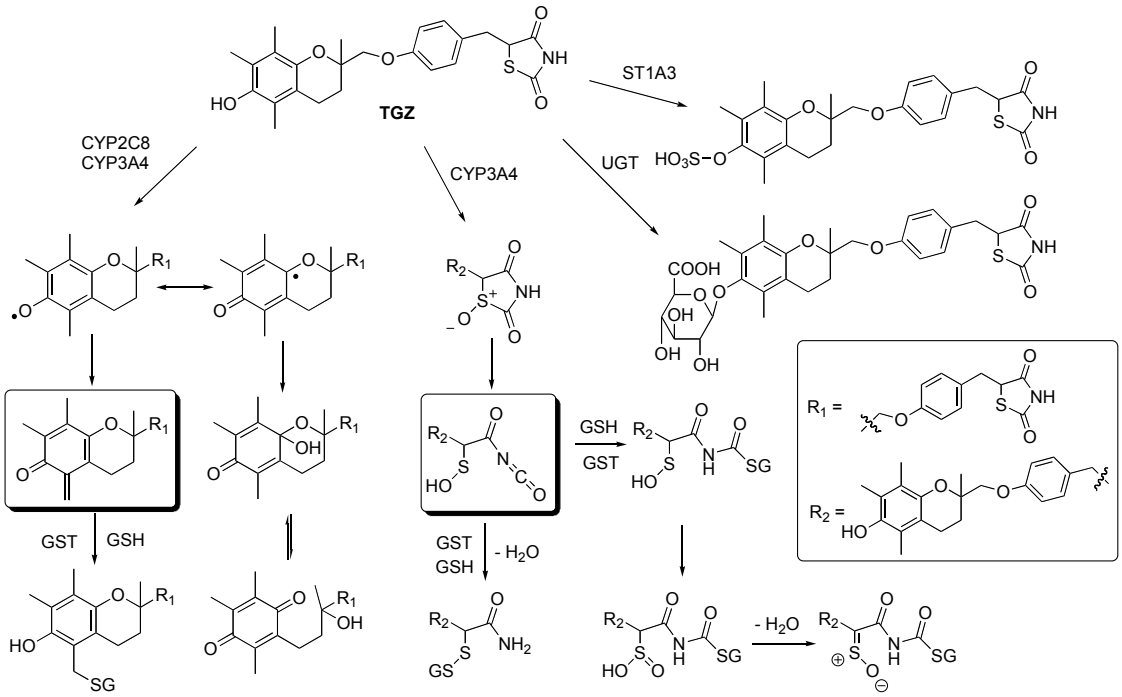

Fig. (2). Metabolization pathways of TGZ.

conjugation of individual reactive metabolites of TGZ. In particular, GSTM1 is the most important GST isoform in the production of the above reported disulfide GSH adduct when the chromane had been previously metabolized into the quinone form. Thus, interindividual differences in detoxification ability may contribute to the susceptibility to TGZ hepatotoxicity.

Thus, in order to use TGZ as a template for the design of new anti-cancer drugs, one should alter its toxicological profile by modifying its metabolization ability.

3. TGZ AND CANCER

TZD also display anticancer properties [48-50]. Regarding TGZ, its anticancer effects were initially revealed from *in vitro* studies performed on breast cancer cells [23, 51]. The anticancer effects of TGZ have also been demonstrated on various cell types in animal models (Table **1**). The TGZ clinical evaluation on refractory cancer patients started in 1999. Interestingly, on liposarcoma, TGZ induced terminal adipocyte differentiation of the tumor and on advanced prostate cancer, a phase II trial showed that the TGZ treatment stabilized the prostate-specific antigen (PSA) level [52, 53]. In addition, one patient had a dramatic decrease in PSA serum concentration, near undetectable level [53]. On advanced breast and colon cancer, no objective response was observed [54, 55].

Several lines of evidence suggest that the antitumor effects of TGZ are PPARγ-independent. First, TGZ anticancerous activity is not correlated to PPARγ expression level. Indeed, LNCaP PPARγ-deficient prostate cancer cells were more sensitive to the antitumor effect of TGZ than the PPARγ-rich PC-3 cells [12]. In the MDA-MB-231 breast cancer cell line, TGZ reduced expression of the human TElomerase Reverse Transcriptase (hTERT) and telomerase activity even in the absence of PPARγ. The expression of hTERT was not correlated with the expression level of PPARγ in clinical breast cancer patients [56]. Moreover, the antitumor effect was not correlated to PPARγ transactivation. Indeed, although being a lower PPARγ agonist than RGZ, TGZ was more potent in reducing cancer cell viability in different cancer cell lines [4, 12]. Second, several *in vitro* experiments have shown that the effects of TGZ were still observed in the presence of PPARγ antagonists or in cells where PPARγ expression was abrogated by RNA interference. The proteasomal degradation of several proliferation regulatory proteins such as estrogen receptor α, cyclin D1, c-Myc and β-catenin was one of the first TGZ-induced mechanisms, demonstrated as being PPARγ-independent. For instance, in C4-2 human prostate cancer cells, the proteasome-mediated degradation of the transcription factor c-Myc induced by TGZ still occurred in the presence of the PPARγ antagonist GW9662 and in cells where PPARγ level was knocked down by siRNA technology [57]. Likewise, the PPARγ antagonist GW9662 did not prevent cyclin D1 and estrogen receptor α degradation induced by TGZ in MCF-7 breast cancer cells [4, 58]. These data were comforted by the absence of correlation between PPARγ expression level and TGZ-induced cyclin D1 degradation in breast cancer cell lines [58]. Moreover, estrogen receptor α proteolysis still occurred in MCF-7 cells submitted to PPARγ silencing [4]. The TGZ-induced suppression of β-catenin, a regulator of the Wnt signaling pathway, was also unaffected by GW9662 in PC-3 prostate cancer cells [59]. Besides, different cancer cell lines were equally susceptible to TGZ-mediated repression of β-catenin irrespective of their PPARγ expression level [59].

Several studies also evaluated the effect of combined therapies with TGZ and other agents both *in vitro* and *in vivo*. Herceptin, an antibody against the EGF-receptor HER2, sensitized breast cancer cells to the differentiating effect of TGZ [60]. When combined with platinum-based compounds TGZ increased the survival of mesothelioma-xenografted mice [61]. In combination with Paclitaxel, TGZ inhibited the growth of lung carcinoma cell lines (A549, H522) [62]. A similar effect was observed on the breast cancer cell line MCF-7 in case of co-treatment with the anti-estrogen tamoxifen [63]. TGZ also increased radiation sensitivity of cervix cancer cell lines (HeLa, Me180, and SiHa) [64].

4. Δ2-TGZ, A PPARγ-INDEPENDENT TGZ DERIVATIVE

Δ2-TGZ (Fig. **3**) has a double bound adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring and lacks PPARγ agonist activity [58, 65]. This unsaturated derivative of TGZ was used to confirm the PPARγ-independent anticancer effects. Δ2-TGZ still suppressed proliferation of various cancer cell lines [12, 58, 65]. Compared to TGZ, Δ2-TGZ inhibited prostate cancer cell proliferation more efficiently in both PPARγ-expressing PC-3 cells and PPARγ-deficient LNCaP cells [12]. Estrogen receptor α, a major regulator of cell proliferation in hormone-dependent breast cancer cells, was subjected to a proteasome-dependent degradation in response to Δ2-TGZ in both MCF-7 and ZR-75 cell lines [4, 58, 66]. Δ2-TGZ also induced cyclin D1 proteasomal degradation in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cells [65]. Furthermore, Δ2-TGZ was more potent than TGZ since the complete ablation of cyclin D1 was observed for 30 μM of Δ2-TGZ compared with 40 μM of TGZ [58]. In LNCaP cells, TGZ and Δ2-TGZ also triggered the degradation of the transcription factor Sp1 leading to the suppression of the expression of the androgen receptor, a major regulator of prostate cell growth [59]. Moreover, in several prostate cancer cells, β-catenin was also degraded after phosphorylation by glycogen synthase kinase 3-β on a site of ubiquitination (Ser33/Ser37/Thr41) [59]. The proteasomal degradation of β-catenin, but also cyclin D1 and Sp1 was the consequence of their ubiquitination by the Skp-cullin-F box (SCF) E3 ubiquitin ligase, β-TrCP. Like TGZ, Δ2-TGZ was shown to upregulate β-TrCP through mRNA stabilization in prostate cancer cells [59]. Interestingly, no change in β-catenin levels was observed in normal prostate epithelial cells [59]. Interestingly, when incubated at 100 μM with human non-malignant hepatocytes in primary culture, Δ2-TGZ was less toxic than TGZ for hepatocytes (63 % versus 52% of viable cells) [67].

5. MORE ACTIVE AND LESS HEPATOTOXIC Δ2-TGZ DERIVATIVES

Since anticancer effects of TGZ appeared to be mainly PPARγ-independent and since Δ2-TGZ exhibited less toxic-

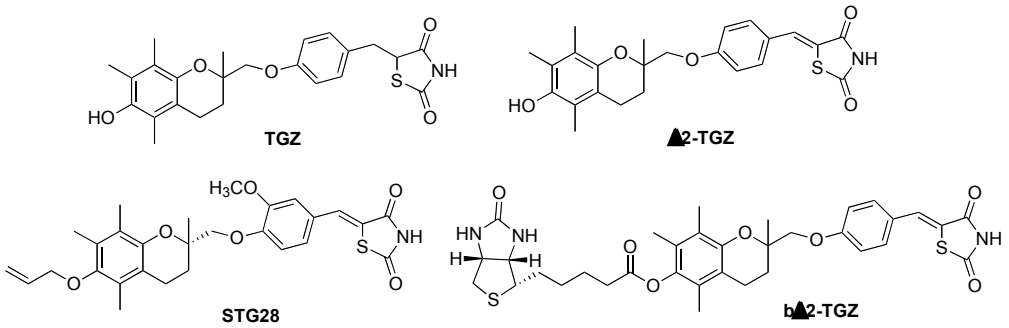

Fig. (3). TGZ and three unsaturated derivatives: Δ2-TGZ, biotinylated Δ2-TGZ and STG28.

ity towards hepatocytes than TGZ, it was then challenging to develop Δ2-TGZ derivatives exhibiting high anticancer properties but devoid of hepatotoxicity, taking advantage of our knowledge about the mechanisms involved in TGZ toxicity.

Huang *et al*. used Δ2-TGZ as a template to increase its potency as an anticancer agent [68]. Special efforts were made in order to slightly change its structure with the aim of increasing its cyclin D1 degradation ability in MCF-7 breast cancer cells. They functionalized the chromane heterocycle at the 6-hydroxy position with various substituents, yielding a series of ethers. The most potent compound bore an allyl group. Additional methoxy moiety on the central phenyl group and a (*S*) stereochemistry of the chiral center of the chromane heterocycle gave STG28 which exhibited the best potency (Fig. **3**). These authors did not study the hepatotoxicity of these compounds.

Colin *et al*. [65] also functionalized the chromane at the same position, but via an ester linkage. Biotinylation of the molecule (Fig. **3**) highly increased both its antiproliferative activity and its cyclin D1 ablative ability both in hormone-dependent MCF-7 and in hormone-independent MDA-MB-231 cell lines. However, the biotin group was not responsible for this phenomenon, since competition experiments with free biotin did not alter the potency of the molecule. Furthermore, related compounds devoid of the biotin group exhibited the same potency.

In an extension of this work, Salamone *et al*. [67] compared the antiproliferative activity of TGZ and Δ2-TGZ derivatives on both aforementioned breast cancer cell lines. This enabled them to check the influence of both the insaturation adjacent to the TZD ring and of the nature of the substituents linked to the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chromane heterocycle. The presence of the double bond (Δ2-TGZ series) slightly but significantly increased the anticancer potency of all the compounds. TGZ and Δ2-TGZ derivatives were also incubated with human non-malignant hepatocytes in primary culture. At 100 μM, all the Δ2-TGZ derivatives (unsaturated compounds) were associated with higher cell viability than the TGZ derivatives (saturated compounds). The rationale for this phenomenon is under investigation. Besides, this study overall showed that non-polar substituents at the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chromane position greatly enhanced the antiproliferative activity of the compounds, whereas polar moieties totally abolished the activity. For example, the compound bearing the unpolar tertiobutyloxycarbonyl moiety (Boc-Δ2-TGZ, Fig. **4**) exhibited a lower IC50 than Δ2-TGZ (3.3 ± 0.1 μM, versus 16.6 ± 1.0 μM MDA-MB-231). Polar groups were tolerated if they were distant from the chromane heterocycle thanks to a non-polar linker. Interestingly, the decrease of polarity caused by the simple replacement of the 6-hydroxyl group by a hydrogen atom also increased the anticancer potency of the molecule compared to Δ2-TGZ (IC50 = 10.8 ± 0.7 μM, MDA-MB231 cells Fig. **4**). Due to the absence of the oxygen atom in para-position to the remaining intracyclic oxygen, this derivative was expected to be non-metabolizable into a quinone-type derivative. As a result, this compound was associated with the lowest hepatocyte toxicity of the series (84% of viable cells at 100 μM). Thus, this desoxy-Δ2-TGZ compound was much attractive.

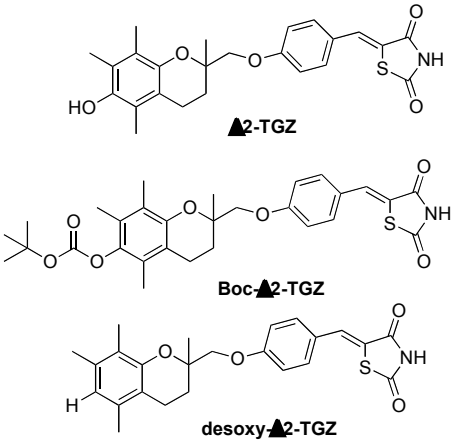

Fig. (4). Δ2-TGZ derivatives [67].

The same team further explored the possibility to simultaneously remove the chromane 6-hydroxyl group and link this heterocycle to a non-polar linker through a stable C-C bond [69]. Meanwhile, *N*-alkylation of the TZD ring was also conducted. This yielded two very active molecules (IC50 up to 1.5 ± 0.1 μM against MDA-MB-231, compared to 15.7 ± 0.1 μM for TGZ) which displayed very low toxicity towards non-malignant human hepatocytes (viability ≥ 80% at 200 μM versus 30% for TGZ). Since these compounds (Fig. **5**) also exhibited a low acute toxicity on a rodent model (maximum tolerated dose up to 65.5 mg/kg), they were selected for further *in vivo* evaluation and a patent was deposited [70]. *In vivo* studies are ongoing to check their antitumor activity and their stability, hoping for an increased stability compared to TGZ.

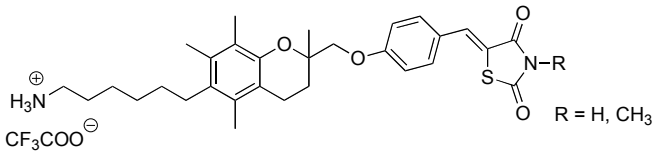

Fig. (5). Molecules prepared by Bordessa *et al.* with attractive activity/toxicity profile [69].

Surprisingly, the simple *N*-methylation of Δ2-TGZ (Fig. **6**) gave a compound with no activity on MCF-7 while keeping a fair activity on MDA-MB-231 cell line. This was the only compound of the series showing such selectivity. Additionally, this compound exhibited no toxicity on human non-malignant hepatocyte in primary culture, showing unexpectedly a slight increase of cell number: viability = 127% at 200 μM. One could rationalize this fact as follows. As depicted in Fig. (**2**), the metabolization of the TZD involves the formation of a reactive isocyanate, which needs the abstraction of a labile proton on the TZD nitrogen. The *N*-methylation of the TZD ring prevents the formation of the isocyanate, and thus prevents the metabolization of the TZD. These considerations should be confirmed by *in vivo* studies in order to determine the metabolites of such N-alkylated TZD derivatives.

Saha *et al*. [33] previously used another strategy to decrease the metabolization of the TZD heterocycle. In order to get a PPARγ agonist similar to TGZ but with a lower hepatotoxicity, they replaced the sulfur atom of TZD by a methylene moiety, giving trosuccinimide (TSN, Fig. **6**). Since the initial stage of the TZD metabolization lies in the sulfur atom oxidation, TSN was expected to be less metabolized. TGZ and TSN were incubated with human liver microsomes enriched with glutathione and with THLE-2 human hepatocytes. As a result, only TGZ afforded detectable GSH conjugates. Yet, the PPARγ binding affinity was lower for TSN than for TGZ, but TSN was less toxic in THLE-2 hepatocytes. Similar results were obtained by the same team with RGZ and PGZ derivatives [71]. Such TSN-like derivatives exhibited less hepatotoxicity but were not studied for their anticancer potency. It might be interesting to apply such a structural modification on the previously reported molecules in order to get antiproliferative compounds with even less hepatotoxic property.

Besides, Yang *et al*. [72] showed that a permutational rearrangement of Δ2-CGZ, an unsaturated derivative of CGZ, yielded molecules exhibiting promising androgen receptor-ablative and antiproliferative activities on LNCaP prostate cancer cell line with activities at the low-micromolar range, and a patent was deposited [73]. Among them, OSU-CG12 was particularly interesting (Fig. **7**). Further optimization of this molecule gave compounds for which the abilities to suppress the viability of LNCaP cells paralleled their respective inhibitory activities on glucose uptake [74]. They were shown to be inhibitors of glucose transporter GLUT1 and low-micromolar antiproliferative activity was associated with no toxicity towards prostate and mammary epithelial cells at 10 μM. Bordessa *et al*. [69] took into account this structural approach and synthesized a Δ2-TGZ derivative where the chromane heterocycle was directly linked to the nitrogen atom of the TZD (Fig. **7**). One of the resulting compounds was very active and showed no toxicity towards human non-malignant hepatocyte in primary culture, even at 200 μM. Further modifications of the Δ2-CGZ template enabled the synthesis of structurally less similar compounds like OSU-53 (Fig. **8**) with interesting adenosine monophosphate-activated protein kinase activator property [75, 76]. Meyer *et al*. [77] also prepared new molecules with interesting activity/toxicity profile. Some exhibited a biphenyle core linked to the Δ2-TGZ template, but most of them showed a low chemical similarity with the TGZ structure (Fig. **8**). Overall, the TZD heterocycle and particularly the benzilidenethiazolidine-2,4-dione template gave access to numerous compounds with anti-cancer properties which were recently reviewed [48].

CONCLUSION

This review clearly illustrates some aspects of drug reprofiling. Indeed, we show that TGZ could be reprofiled to evolve from a drug that was used for the treatment of type II diabetes, towards an anticancer agent. This is very interesting since the existence of unresponsive tumors and the appearance of resistant tumors during the course of treatments both justify that we increase urgently the panel of pharmacological molecules able to fight cancer. Part of the knowledge available for TGZ, mainly the molecular basis for PPARγ activation, its metabolization pathways and the side effects on hepatocytes, were taken into account to elaborate new candidates. We should focus on unsaturated derivatives since, when compared to TGZ, they do not activate PPARγ, they exhibit a higher efficiency on cancer cells and a lower toxicity towards hepatocytes.

Several studies have been performed with Δ2-TGZ and STG28 to understand their mechanism of action. Like TGZ, these compounds induced apoptosis in different cancer cell lines [12, 78]. The authors searched for the reason leading to

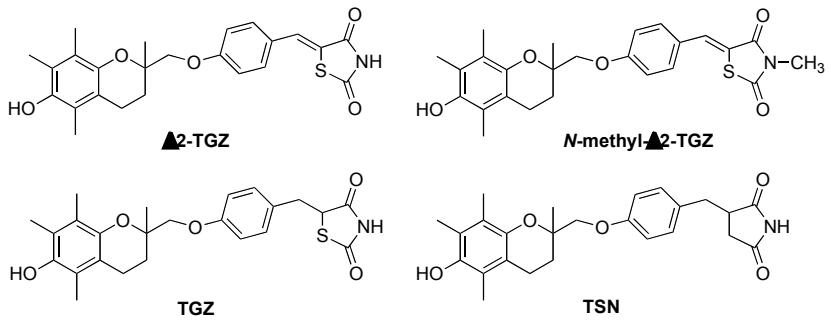

Fig. (6). *N*-methyl-Δ2-TGZ derivative and TGZ derivative trosuccinimide (TSN).

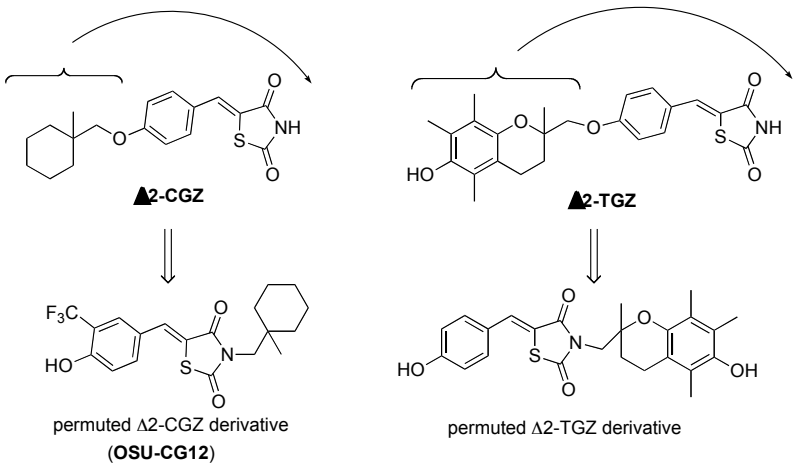

Fig. (7). Permutation strategy from Δ2-CGZ and Δ2-TGZ [69, 72]

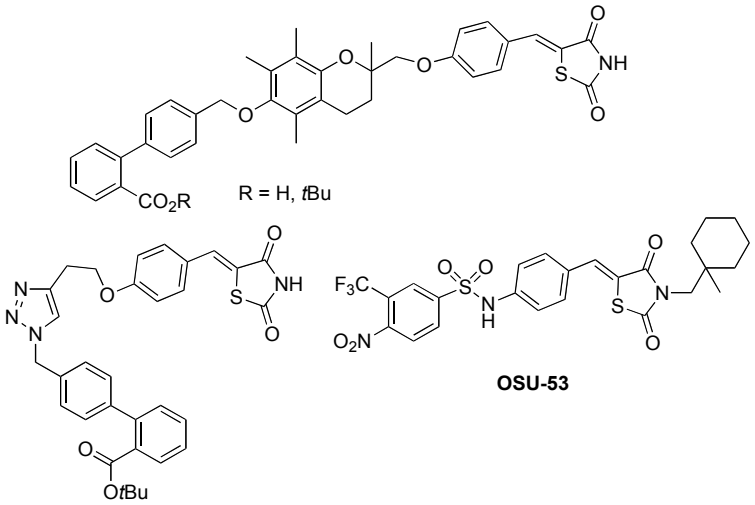

Fig. (8). Other molecules with anti-cancer properties [75, 77].

this apoptotic mechanism. It was reported that TGZ and its unsaturated derivatives induced endoplasmic reticulum (ER) stress which could lead, when being prolonged, to apoptotic cell death [79]. In various cancer cell lines, in tumors collected from animal models, and from patients with liposarcoma, exposure to TGZ led to the phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α) on Ser^{51}, a negative regulator of protein translation involved in ER stress response [24]. This was probably the result of an effect of TGZ on calcium homeostasis. Indeed, TGZ induced a release of calcium from intracellular stores only in cell lines whose proliferation was affected by this compound [24]. In breast cancer cells, intracellular calcium release and ER stress were also described in response to TGZ and Δ2-TGZ treatment [78, 80]. Nevertheless, up to now, the authors could not demonstrate a direct link between TGZ-derivatives induced ER stress and apoptosis [78]. At the mitochondrial level, TGZ and Δ2-TGZ induced changes associated with apoptosis, such as alteration of the mitochondrial membrane potential in breast cancer cell lines and release of cytochrome c in prostate cancer cells [12, 78]. In case of mitochondria dysfunction, energetic metabolism could be dysregulated and this could be a potential reason for subsequent apoptosis [81]. A recent study reports that in human T47D breast and HCT116 colon cancer cells, TGZ stimulated cancer cell ^{18}F-FDG uptake through a shift of metabolism toward glycolytic flux, likely as an adaptive response to impaired mitochondrial oxidative respiration [82]. In various cancer cell lines, TGZ also sensitized cells to TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-induced apoptosis [83-85]. Our knowledge is very poor about the mechanism of action of the recently synthesized Δ2-TGZ derivatives that are more active and less hepatotoxic. Ongoing studies are being focused on identifying their molecular target(s) in cancer cells.

Since TGZ is not in active use in a patient population for anticancer indication, and since unsaturated derivatives are envisioned for this therapeutic usage, a development cycle and clinical trials will be required. Since this will come from a drug reprofiling strategy, it will be less time and money consuming than the complete development of a new anticancer drug.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of the results cited in this review was performed at Université de Lorraine in CRAN and SRSMC labs. They were supported by grants of the Université de Lorraine, the Conseil Régional de Lorraine, and La Ligue contre le Cancer. Audrey Berthe and Marine Geoffroy were recipient of a PhD grant of the "Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche".

REFERENCES

[1] Ashburn, T. T.; Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004,** *3*, 673-83.

[2] Langedijk, J.; Mantel-Teeuwisse, A. K.; Slijkerman, D. S.; Schutjens, M. H. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov. Today*, **2015**, doi: 10.1016/j.drudis.2015.05.001.

[3] Shim, J. S.; Liu, J. O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *Int. J. Biol. Sci.*, **2014,** *10*(7), 654-63.

[4] Lecomte, J.; Flament, S.; Salamone, S.; Boisbrun, M.; Mazerbourg, S.; Chapleur, Y.; Grillier-Vuissoz, I. Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2008,** *112*, 437-51.

[5] Fujita, T.; Sugiyama, Y.; Taketom, S.; Shoda, T.; Kawamatsu, Y.; Iwatsuka, H.; Suzuoki, Z. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 3[-4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3870, U63287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes*, **1983,** *32*(9), 804-810.

[6] Day, C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med.*, **1999,** *16*(3), 179-192.

[7] Chojkier, M. Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology*, **2005,** *41*, 237-46.

[8] Gale, E. A. Troglitazone: the lesson that nobody learned? *Diabetologia*, **2006,** *49*, 1-6.

[9] Chen, L.; Bush, C. R.; Necela, B. M.; Su, W.; Yanagisawa, M.; Anastasiadis, P. Z.; Fields, A. P.; Thompson, E. A. RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2006,** *251*(1-2), 17-32.

[10] Smith, M. T. Mechanisms of Troglitazone Hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003,** *16*, 679-687.

[11] Yokoi, T. Troglitazone. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2010,** *196*, 419-35.

[12] Shiau, C. W.; Yang, C. C.; Kulp, S. K.; Chen, K. F.; Chen, C. S.; Huang, J. W. Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res.*, **2005,** *65*, 1561-9.

[13] Tirmenstein, M. A.; Hu, C. X.; Gales, T. L.; Maleeff, B. E.; Narayanan, P. K.; Kurali, E.; Hart, T. K.; Thomas, H. C.; Schwartz, L. W. Effects of troglitazone on HepG2 viability and mitochondrial function. *Toxicol. Sci.*, **2002,** *69*, 131-8.

[14] Narayanan, P. K.; Hart, T.; Elcock, F.; Zhang, C.; Hahn, L.; McFarland, D.; Schwartz, L.; Morgan, D. G.; Bugelski, P. Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment. *Cytometry Part A*, **2003,** *52*(1), 28-35.

[15] Bova, M. P.; Tam, D.; McMahon, G.; Mattson, M. N. Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells. *Toxicol. Lett.*, **2005,** *155*(1), 41-50.

[16] Lim, P. L.; Liu, J.; Go, M. L.; Boelsterli, U. A. The mitochondrial superoxide/thioredoxin-2/Ask1 signaling pathway is critically involved in troglitazone-induced cell injury to human hepatocytes. *Toxicol. Sci.*, **2008,** *101*, 341-9.

[17] Rachek, L. I.; Yuzefovych, L. V.; Ledoux, S. P.; Julie, N. L.; Wilson, G. L. Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2009,** *240*(3), 348-54.

[18] Okuda, T.; Norioka, M.; Shitara, Y.; Horie, T. Multiple mechanisms underlying troglitazone-induced mitochondrial permeability transition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010,** *248*, 242-248.

[19] Hu, D.; Wu, C.-q.; Li, Z.-j.; Liu, Y.; Fan, X.; Wang, Q.-j.; Ding, R.-g. Characterizing the mechanism of thiazolidinedione-induced hepatotoxicity: An *in vitro* model in mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2015,** *284*, 134-141.

[20] Lee, Y. H.; Goh, W. W.; Ng, C. K.; Raida, M.; Wong, L.; Lin, Q.; Boelsterli, U. A.; Chung, M. C. Integrative toxicoproteomics implicates impaired mitochondrial glutathione import as an off-target effect of troglitazone. *J Proteome Res*, **2013,** *12*(6), 2933-45.

[21] Yu, J.; Qiao, L.; Zimmermann, L.; Ebert, M. P.; Zhang, H.; Lin, W.; Röcken, C.; Malfertheiner, P.; Farrell, G. C. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*, **2006,** *43*, 134-43.

[22] Kubota, T.; Koshizuka, K.; Williamson, E. A.; Asou, H.; Said, J. W.; Holden, S.; Miyoshi, I.; Koeffler, H. P. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **1998,** *58*, 3344-52.

[23] Elstner, E.; Muller, C.; Koshizuka, K.; Williamson, E. A.; Park, D.; Asou, H.; Shintaku, P.; Said, J. W.; Heber, D.; Koeffler, H. P. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998,** *95*, 8806-11.

[24] Aktas, B. H.; Qiao, Y.; Ozdelen, E.; sra; Schubert, R.; Sevinc, S.; Harbinski, F.; Grubissich, L.; Singer, S.; Halperin, J. A. Small-molecule targeting of translation initiation for cancer therapy. *Oncotarget*, **2013,** *4*, 1606.

[25] Qiao, L.; Dai, Y.; Gu, Q.; Chan, K. W.; Zou, B.; Ma, J.; Wang, J.; Lan, H. Y.; Wong, B. C. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis synergistically enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition in colon cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2008,** *7*, 2203-11.

[26] Sarraf, P.; Mueller, E.; Jones, D.; King, F. J.; DeAngelo, D. J.; Partridge, J. B.; Holden, S. A.; Chen, L. B.; Singer, S.; Fletcher, C.; Spiegelman, B. M. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.*, **1998,** *4*, 1046-52.

[27] Ohta, K.; Endo, T.; Haraguchi, K.; Hershman, J. M.; Onaya, T. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2001,** *86*, 2170-7.

[28] Honma, W.; Shimada, M.; Sasano, H.; Ozawa, S.; Miyata, M.; Nagata, K.; Ikeda, T.; Yamazoe, Y. Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab. Disposition*, **2002,** *30*, 944–949.

[29] Loi, C.-M.; Young, M.; Randinitis, E.; Vassos, A.; Koup, J. R. Clinical Pharmacokinetics of Troglitazone. *Clin. Pharmacokinet.*, **1999,** *37*, 91-104.

[30] Yoshigae, Y.; Konno, K.; Takasaki, W.; Ikeda, T. Characterization of UDP-glucuronosyltransferases (UGTS) involved in the metabolism of troglitazone in rats and humans. *J. Toxicol. Sci.*, **2000,** *25*(5), 433-41.

[31] Funk, C.; Pantze, M.; Jehle, L.; Ponelle, C.; Scheuermann, G.; Lazendic, M.; Gasser, R. Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology*, **2001,** *167*, 83-98.

[32] Funk, C.; Ponelle, C.; Scheuermann, G.; Pantze, M. Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: *in vivo* and *in vitro* interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol. Pharmacol.*, **2001,** *59*(3), 627-35.

[33] Saha, S.; New, L. S.; n; Ho, H. K.; Chui, W. K.; Chan, E. C. Y. Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.*, **2010,** *192*, 141-149.

[34] Okada, R.; Maeda, K.; Nishiyama, T.; Aoyama, S.; Tozuka, Z.; Hiratsuka, A.; Ikeda, T.; Kusuhara, H.; Sugiyama, Y. Involvement of different human glutathione transferase isoforms in the glutathione conjugation of reactive metabolites of troglitazone. *Drug Metab. Dispos.*, **2011,** *39*(12), 2290-7.

[35] Yamamoto, Y.; Nakajima, M.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. *Life Sci.*, **2001,** *70*, 471–482.

[36] Kassahun, K.; Pearson, P. G.; Tang, W.; McIntosh, I.; Leung, K.; Elmore, C.; Dean, D.; Wang, R.; Doss, G.; Baillie, T. A. Studies on the Metabolism of Troglitazone to Reactive Intermediates *in Vitro* and *in Vivo*. Evidence for Novel Biotransformation Pathways Involving Quinone Methide Formation and Thiazolidinedione Ring Scission *Chem. Res. Toxicol.*, **2001,** *14*, 62-70.

[37] He, K.; Talaat, R. E.; Pool, W. F.; Reily, M. D.; Reed, J. E.; Bridges, A. J.; Woolf, T. F. Metabolic activation of troglitazone: identification of a reactive metabolite and mechanisms involved. *Drug Metab. Disposition*, **2004,** *32*, 639–646.

[38] Prabhu, S.; Fackett, A.; Lloyd, S.; McClellan, H. A.; Terrell, C. M.; Silber, P. M.; Li, A. P. Identification of glutathione conjugates of troglitazone in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, **2002,** *142*(1-2), 83-97.

[39] Alvarez-Sanchez, R.; Montavon, F.; Hartung, T.; Pahler, A. Thiazolidinedione bioactivation: a comparison of the bioactivation potentials of troglitazone, rosiglitazone, and pioglitazone using stable isotope-labeled analogues and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, **2006,** *19*(8), 1106-16.

[40] Tahara, K.; Yano, Y.; Kanagawa, K.; Abe, Y.; Yamada, J.; Iijima, S.; Mochizuki, M.; Nishikawa, T. Successful preparation of metabolite of troglitazone by in-flow electrochemical reaction on coulometric electrode. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **2007,** *55*(8), 1207-12.

[41] Étienne, S.; Matt, M.; Oster; Thierry; Samadi, M.; Beley, M. Preparation and characterisation of a quinone-functionalised polythiophene film on a modified electrode. Application to the potentiometric determination of glutathione and cysteine concentrations. *Tetrahedron*, **2008,** *64*, 9619-9624.

[42] Tahara, K.; Nishikawa, T.; Hattori, Y.; Iijima, S.; Kouno, Y.; Abe, Y. Production of a reactive metabolite of troglitazone by electrochemical oxidation performed in nonaqueous medium. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2009,** *50*, 1030-1036.

[43] Dixit, V. A.; Bharatam, P. V. Toxic metabolite formation from Troglitazone (TGZ): new insights from a DFT study. *Chem. Res. Toxicol.*, **2011,** *24*(7), 1113-22.

[44] Ramachandran, V.; Kostrubsky, V. E.; Komoroski, B. J.; Zhang, S.; Dorko, K.; Esplen, J. E.; Strom, S. C.; Venkataramanan, R. Troglitazone Increases Cytochrome P-450 3A Protein and Activity in Primary Cultures of Human Hepatocytes. *Drug Metab. Disposition*, **1999,** *27*, 1194-1199.

[45] Sahi, J.; Hamilton, G.; Sinz, M.; Barros, S.; Huang, S. M.; Lesko, L. J.; LeCluyse, E. L. Effect of troglitazone on cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Xenobiotica*, **2000,** *30*(3), 273-84.

[46] Watanabe, I.; Tomita, A.; Shimizu, M.; Sugawara, M.; Yasumo, H.; Koishi, R.; Takahashi, T.; Miyoshi, K.; Nakamura, K.; Izumi, T.; Matsushita, Y.; Furukawa, H.; Haruyama, H.; Koga, T. A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2003,** *73*(5), 435-55.

[47] Usui, T.; Hashizume, T.; Katsumata, T.; Yokoi, T.; Komuro, S. *In Vitro* Investigation of the Glutathione Transferase M1 and T1 Null Genotypes as Risk Factors for Troglitazone-Induced Liver Injury. *Drug Metab. Disposition*, **2011,** *39*, 1303-1310.

[48] Asati, V.; Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014,** *87*, 814-33.

[49] Joshi, H.; Pal, T.; Ramaa, C. S. A new dawn for the use of thiazolidinediones in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, **2014,** *23*(4), 501-10.

[50] Frohlich, E.; Wahl, R. Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. *Biomed Res Int*, **2015,** *2015*, 845340.

[51] Mueller, E.; Sarraf, P.; Tontonoz, P.; Evans, R. M.; Martin, K. J.; Zhang, M.; Fletcher, C.; Singer, S.; Spiegelman, B. M. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol. Cell*, **1998,** *1*(3), 465-70.

[52] Demetri, G. D.; Fletcher, C. D.; Mueller, E.; Sarraf, P.; Naujoks, R.; Campbell, N.; Spiegelman, B. M.; Singer, S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999,** *96*(7), 3951-6.

[53] Mueller, E.; Smith, M.; Sarraf, P.; Kroll, T.; Aiyer, A.; Kaufman, D. S.; Oh, W.; Demetri, G.; Figg, W. D.; Zhou, X. P.; Eng, C.; Spiegelman, B. M.; Kantoff, P. W. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000,** *97*, 10990-5.

[54] Burstein, H. J.; Demetri, G. D.; Mueller, E.; Sarraf, P.; Spiegelman, B. M.; Winer, E. P. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2003,** *79*, 391-7.

[55] Kulke, M. H.; Demetri, G. D.; Sharpless, N. E.; Ryan, D. P.; Shivdasani, R.; Clark, J. S.; Spiegelman, B. M.; Kim, H.; Mayer, R. J.; Fuchs, C. S. A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J.*, **2002,** *8*(5), 395-9.

[56] Rashid-Kolvear, F.; Taboski, M. A.; Nguyen, J.; Wang, D. Y.; Harrington, L. A.; Done, S. J. Troglitazone suppresses telomerase activity independently of PPARgamma in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, **2010,** *10*, 390.

[57] Akinyeke, T. O.; Stewart, L. V. Troglitazone suppresses c-Myc levels in human prostate cancer cells via a PPARgamma-independent mechanism. *Cancer Biol. Ther.*, **2011,** *11*(12), 1046-58.

[58] Huang, J. W.; Shiau, C. W.; Yang, Y. T.; Kulp, S. K.; Chen, K. F.; Brueggemeier, R. W.; Shapiro, C. L.; Chen, C. S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.*, **2005,** *67*, 1342-8.

[59] Wei, S.; Lin, L. F.; Yang, C. C.; Wang, Y. C.; Chang, G. D.; Chen, H.; Chen, C. S. Thiazolidinediones modulate the expression of beta-catenin and other cell-cycle regulatory proteins by targeting the F-box proteins of Skp1-Cul1-F-box protein E3 ubiquitin ligase independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Pharmacol.*, **2007,** *72*, 725-33.

[60] Yang, Z.; Bagheri-Yarmand, R.; Balasenthil, S.; Hortobagyi, G.; Sahin, A. A.; Barnes, C. J.; Kumar, R. HER2 regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and sensitivity of breast cancer cells to PPARgamma ligand therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2003,** *9*(8), 3198-203.

[61] Hamaguchi, N.; Hamada, H.; Miyoshi, S.; Irifune, K.; Ito, R.; Miyazaki, T.; Higaki, J. *In vitro* and *in vivo* therapeutic efficacy of the PPAR-gamma agonist troglitazone in combination with cisplatin against malignant pleural mesothelioma cell growth. *Cancer Sci*, **2010,** *101*(9), 1955-64.

[62] Reddy, R. C.; Srirangam, A.; Reddy, K.; Chen, J.; Gangireddy, S.; Kalemkerian, G. P.; Standiford, T. J.; Keshamouni, V. G. Chemotherapeutic drugs induce PPAR-gamma expression and show sequence-specific synergy with PPAR-gamma ligands in inhibition of non-small cell lung cancer. *Neoplasia*, **2008,** *10*(6), 597-603.

[63] Yu, H. N.; Noh, E. M.; Lee, Y. R.; Roh, S. G.; Song, E. K.; Han, M. K.; Lee, Y. C.; Shim, I. K.; Lee, S. J.; Jung, S. H.; Kim, J. S.; Youn, H. J. Troglitazone enhances tamoxifen-induced growth inhibitory activity of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008,** *377*(1), 242-7.

[64] An, Z.; Liu, X.; Song, H.; Choi, C.; Kim, W. D.; Yu, J. R.; Park, W. Y. Effect of troglitazone on radiation sensitivity in cervix cancer cells. *Radiat Oncol J*, **2012,** *30*(2), 78-87.

[65] Colin, C.; Salamone, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Boisbrun, M.; Kuntz, S.; Lecomte, J.; Chapleur, Y.; Flament, S. New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2010,** *124*, 101-10.

[66] Qin, C.; Burghardt, R.; Smith, R.; Wormke, M.; Stewart, J.; Safe, S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, **2003,** *63*(5), 958-64.

[67] Salamone, S.; Colin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Flament, S.; Martin, H.; Richert, L.; Chapleur, Y.; ves; Boisbrun, M. Synthesis of new troglitazone derivatives: Antiproliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012,** *51*, 206-215.

[68] Huang, J.-W.; Shiau, C.-W.; Yang, J.; Wang, D.-S.; Chiu, H.-C.; Chen, C.-Y.; Chen, C.-S. Development of Small-Molecule Cyclin D1-Ablative Agents. *J. Med. Chem.*, **2006,** *49*, 4684-4689.

[69] Bordessa, A.; Colin-Cassin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Husson, G.; Vo, M.; Flament, S.; Martin, H.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: Towards more active and less toxic compounds. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014,** *83*, 129-140.

[70] Boisbrun, M.; Chapleur, Y.; Bordessa, A.; Flament, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S. Thiazolidinediones derivatives, preparation thereof and use thereof in cancer treatment. Patent WO2013110796 (A1), August 1, 2013.

[71] Saha, S.; Chan, D. S. Z.; Lee, C. Y.; Wong, W.; New, L. S.; Chui, W. K.; Yap, C. W.; Chan, E. C. Y.; Ho, H. K. Pyrrolidinediones reduce the toxicity of thiazolidinediones and modify their anti-diabetic and anti-cancer properties. *Eur. J. Pharmacol.*, **2012,** *697*, 13-23.

[72] Yang, J.; Wei, S.; Wang, D. S.; Wang, Y. C.; Kulp, S. K.; Chen, C. S. Pharmacological exploitation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ciglitazone to develop a novel class of androgen receptor-ablative agents. *J. Med. Chem.*, **2008,** *51*(7), 2100-7.

[73] Chen, C. S.; Wang, D.; Wang, J. Androgen receptot-ablative a-gents. Patent WO 2009105621 A1, August 27, 2009.

[74] Wang, D.; Chu, P.-C.; Yang, C.-N.; Yan, R.; Chuang, Y.-C.; Kulp, S. K.; Chen, C.-S. Development of a Novel Class of Glucose Transporter Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2012,** *55*, 3827-3836.

[75] Guh, J. H.; Chang, W. L.; Yang, J.; Lee, S. L.; Wei, S.; Wang, D.; Kulp, S. K.; Chen, C. S. Development of novel adenosine monophosphate-activated protein kinase activators. *J. Med. Chem.*, **2010,** *53*(6), 2552-61.

[76] Lee, K. H.; Hsu, E. C.; Guh, J. H.; Yang, H. C.; Wang, D.; Kulp, S. K.; Shapiro, C. L.; Chen, C. S. Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator. *J. Biol. Chem.*, **2011,** *286*(45), 39247-58.

[77] Meyer, M.; Kuntz, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Martin, H.; Richert, L.; Flament, S.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. Synthesis and Anti-Proliferative Activity of New Biphenyle-Benzylidenethiazolidine-2,4-Dione Bis-Adducts Containing Various Heterocyclic Cores. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2014,** *11*(3), 256-264.

[78] Colin-Cassin, C.; Yao, X.; Cerella, C.; Chbicheb, S.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Boisbrun, M.; Chapleur, Y.; Diederich, M.; Flament, S.; Grillier-Vuissoz, I. PPARγ-inactive Δ2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells: PPARγ-independent effects in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.*, **2015,** *54*, 393-404.

[79] Chevet, E.; Hetz, C.; Samali, A. Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis. *Cancer Discov*, **2015,** *5*(6), 586-597.

[80] Chbicheb, S.; Yao, X.; Rodeau, J.-L.; Salamone, S.; Boisbrun, M.; Thiel, G.; Spohn, D.; Grillier-Vuissoz, I.; Chapleur, Y.; Flament, S.; Mazerbourg, S. EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPARγ-independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, **2011,** *81*, 1087-1097.

[81] Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Boisbrun, M.; Cerella, C.; Diederich, M.; Grillier-Vuissoz, I.; Flament, S. Energy restriction mimetic agents to target cancer cells: comparison between 2-deoxyglucose and thiazolidinediones. *Biochem. Pharmacol.*, **2015,** *92*(1), 102-11.

[82] Moon, S. H.; Lee, S. J.; Jung, K. H.; Quach, C. H.; Park, J. W.; Lee, J. H.; Cho, Y. S.; Lee, K. H. Troglitazone Stimulates Cancer Cell 18F-FDG uptake by Suppressing Mitochondrial Respiration and Augments Sensitivity to Glucose Restriction. *J. Nucl. Med.*, **2015**.

[83] Plissonnier, M. L.; Fauconnet, S.; Bittard, H.; Lascombe, I. Insights on distinct pathways of thiazolidinediones (PPARgamma ligand)-promoted apoptosis in TRAIL-sensitive or -resistant malignant urothelial cells. *Int. J. Cancer*, **2010,** *127*(8), 1769-84.

[84] Zou, W.; Liu, X.; Yue, P.; Khuri, F. R.; Sun, S. Y. PPARgamma ligands enhance TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and c-FLIP downregulation in human lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, **2007,** *6*, 99-106.

[85] Lu, M.; Kwan, T.; Yu, C.; Chen, F.; Freedman, B.; Schafer, J. M.; Lee, E. J.; Jameson, J. L.; Jordan, V. C.; Cryns, V. L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists promote TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.*, **2005,** *280*(8), 6742-51.

Received: March 20, 2014 **Revised: April 16, 2014** **Accepted: April 20, 2014**

5. Altération du métabolisme énergétique par les TZDs

5.1 Induction d'une restriction énergétique par des dérivés de la Δ2-CGZ

Plusieurs études ont permis de démontrer que des dérivés de la CGZ se comportent comme des « energy restriction mimetic agents » ERMAs. En effet, ces composés induisent des changements métaboliques et des réponses cellulaires caractéristiques d'une restriction énergétique. Ces mêmes évènements sont observés avec d'autres ERMAs tels que le 2-DG et le resveratrol, ainsi qu'en réponse à une privation des cellules en glucose.

Dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, l'OSU-CG12, un dérivé de la Δ2-CGZ, induit des altérations du métabolisme énergétique, de façon similaire au 2-DG et au resveratrol. Il entraîne en effet une diminution du taux de glycolyse et une réduction de l'entrée du glucose dans les cellules, ainsi qu'une baisse de la production de NADH et de lactate (Wei *et al.* 2010, Lin *et al.* 2012, Wang and Green 2012). Par ailleurs, les effets antiprolifératifs de l'OSU-CG12 sont reversés par l'ajout d'un excès de glucose dans le milieu de culture des cellules et ce composé n'altère pas la viabilité des cellules épithéliales prostatiques non malignes (PrEC) (Wei *et al.* 2010). Au niveau moléculaire, l'OSU-CG12 induit aussi l'expression de Sirt1 (sirtuin 1), l'activation de l'AMP-dependant protein kinase (AMPK) et un stress du RE, qui sont des réponses cellulaires caractéristiques d'une restriction énergétique, menant à l'induction des processus d'autophagie et d'apoptose (Wei *et al.* 2010). La désacétylase dépendante du NAD Sirt1 est un senseur métabolique, contribuant au maintien de l'homéostasie énergétique des cellules (Haigis and Sinclair 2010). L'expression de Sirt1 est augmentée de façon transitoire en réponse à l'OSU-CG12. Sirt1 provoque une diminution d'expression de la protéine F-box Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2), impliquée dans la dégradation de la protéine β-TrCP : l'activation de Sirt1 est donc à l'origine de l'augmentation du taux de β-TrCP induite par l'OSU-CG12 dans les cellules LNCaP (Wei *et al.* 2010, Wei *et al.* 2012). L'expression transitoire de Sirt1 et l'augmentation du taux de β-TrCP sont aussi observées suite à un traitement avec du 2-DG ou en réponse à une privation des cellules LNCaP en glucose, suggérant que l'augmentation de la β-TrCP est une réponse cellulaire caractéristique d'une restriction énergétique (Wei *et al.* 2010). β-TrCP conduit notamment à la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 et du facteur de transcription Sp1 qui régulant l'expression des récepteurs ERα et AR (Wei *et al.* 2009). Sp1 régule aussi l'expression d'histones déacétylases et d'histones déméthylases : sa diminution d'expression entraîne ainsi l'activation épigénétique du gène suppresseur de tumeur *KLF6*. Ce dernier joue un rôle clef dans l'apoptose induite par l'OSU-CG12 dans les cellules LNCaP, puisqu'il facilite

l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Noxa (Chen *et al.* 2011). Par ailleurs, l'OSU-CG12 active également le senseur énergétique AMPK dans les cellules LNCaP. Cette activation est associée à la répression de la voie de signalisation mTOR, comme l'indique la diminution de la phosphorylation de mTOR et de sa cible p70S6K. En outre, l'induction d'AMPK entraîne l'initiation du processus d'autophagie, contribuant aux effets antiprolifératifs de l'OSU-CG12. De plus, l'OSU-CG12 induit la déphosphorylation d'Akt, impliqué dans la stimulation de la glycolyse (Wei *et al.* 2010). Enfin, l'expression des enzymes de la glycolyse, hexokinase 2 et phosphofructokinase-1, ainsi que celle de FASN (fatty acid synthetase) sont aussi réduites en réponse à l'OSU-CG12

Un autre dérivé de la Δ2-CGZ, l'OSU-53 inhibe la migration des cellules cancéreuses mammaires triple-négatives MDA-MB-468, ainsi que la prolifération *in vitro* et *in vivo* des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 qui entrent ensuite en apoptose. Le processus d'autophagie est également initié, mais dans ce cas, il s'agit d'un mécanisme de protection des cellules contre les effets antiprolifératifs de l'OSU-53. De fait, le blocage de l'autophagie avec l'inhibiteur CQ permet de potentialiser les effets antitumoraux de l'OSU-53 sur des tumeurs MDA-MB-231 xénogreffées chez des souris nude. L'OSU-53 n'altère pas cependant la viabilité des cellules épithéliales mammaires non cancéreuses MCF-10A (Lee and Longo 2011).

Au niveau métabolique, l'OSU-53 régule l'homéostasie énergétique des cellules MDA-MB-231, en inhibant la synthèse des acides gras et en stimulant l'expression de régulateurs clefs de la biogenèse des mitochondries, tels que PGC1α, NRF1 et Tfam. Au niveau molécuaire, OSU-53 active AMPK dans les macrophages humains THP-1, dans les cellules d'adénocarcinomes de colon C-26, ainsi que dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives MDA-MB-231 (Guh *et al.* 2010, Lee and Longo 2011). Cette activation d'AMPK est associée à la répression des voies de survie Akt et mTOR (Lee and Longo 2011). Par ailleurs, l'induction d'AMPK conduit à une réduction de la production d'IL-6 dans les cellules MDA-MB-231 et THP-1 (Guh *et al.* 2010, Lee and Longo 2011).

D'autres ERMAs, dérivés de la Δ2-CGZ, ont été développés à partir de l'OSU-CG12 afin de cibler l'activité glycolytique des cellules cancéreuses : il s'agit du CG-30 et du CG-5. Ces deux composés, plus efficaces que l'OSU-CG12, bloquent l'entrée du glucose dans divers types de cellules cancéreuses (prostate, côlon et pancréas), en inhibant le transporteur de glucose GLUT-1 (Lin *et al.* 2012, Wang and Green 2012, Arafa el *et al.* 2014, Lai *et al.* 2014). Il est à noter que le dérivé CG-5 contribue à diminuer la résistance des cellules cancéreuses pancréatiques à l'antimétabolite gemcitabine *in vitro* et *in vivo.* Le CG-5 réduit l'expression de la sous-unité

RRM2 de la ribonucléotide réductase, qui joue un rôle clef dans la réparation de l'ADN et contribue ainsi à la résistance des cellules à la gemcitabine. Les effets du CG-5 sur l'expression de la sous-unité RRM2 sont reversés par l'ajout d'un excès de glucose dans le milieu de culture des cellules Panc-1 et les cellules épithéliales pancréatiques normales (NPC) sont résistantes au CG-5 (Lai *et al.* 2014).

La molécule parente CGZ est également capable d'interférer avec le métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses. Shin *et al.* ont en effet démontré que la CGZ induit la mort des cellules cancéreuses ovariennes, en bloquant l'entrée du glucose dans les cellules. Une baisse de l'expression de GLUT-1 est observée : elle pourrait être due à une inhibition de l'expression de la β-caténine et de Sp1, dont un des gènes cibles est le gène codant GLUT-1. Par ailleurs, la CGZ induit aussi la phosphorylation du senseur énergétique AMPK (Shin *et al.* 2014).

5.2 Altération du métabolisme mitochondrial par les TZDs

Durant la caractérisation des effets des dérivés de la Δ2-CGZ sur le métabolisme énergétique, l'activité mitochondriale des cellules n'a pas été étudiée. Or, des effets rapides et directs des TZDs sur le métabolisme mitochondrial ont été démontrés. Plusieurs données suggèrent en effet que ces composés pourraient altérer le fonctionnement de la mitochondrie (Feinstein *et al.* 2005).

Un rôle dans l'action antidiabétique ?

De nombreuses études ont été réalisées afin de mieux caractériser les effets des TZDs sur le métabolisme du glucose dans le muscle squelettique. Brunmair, Fürnsinn et leurs collaborateurs ont constaté que plusieurs TZDs, telles que la TGZ et la PGZ, induisent des effets rapides dans les cellules musculaires squelettiques de rat. Ces composés inhibent l'oxydation du glucose dans la mitochondrie, dès 60 minutes de traitement. Cette inhibition du métabolisme oxydatif mitochondrial est associée à une stimulation de la glycolyse anaérobie, via une augmentation de l'entrée du glucose et de la production de lactate dans les cellules. Ainsi, les TZDs semblent modifier le métabolisme du glucose au niveau du muscle squelettique, avec une stimulation des voies métaboliques anaérobies, au détriment des voies aérobies (Furnsinn *et al.* 1997, Furnsinn *et al.* 2000, Brunmair *et al.* 2001). Cette augmentation de la glycolyse aérobie a aussi été observée dans d'autres types cellulaires, comme les astrocytes de rat ou les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) (Dello Russo *et al.* 2003, Artwohl *et al.* 2005). Ces effets des TZDs semblent être indépendants d'une activation de PPARγ, puisqu'ils sont induits trop rapidement pour impliquer une régulation génique (Brunmair *et al.* 2001). De plus, la RGZ présente une faible efficacité, par rapport à la TGZ et la PGZ, alors qu'elle est un

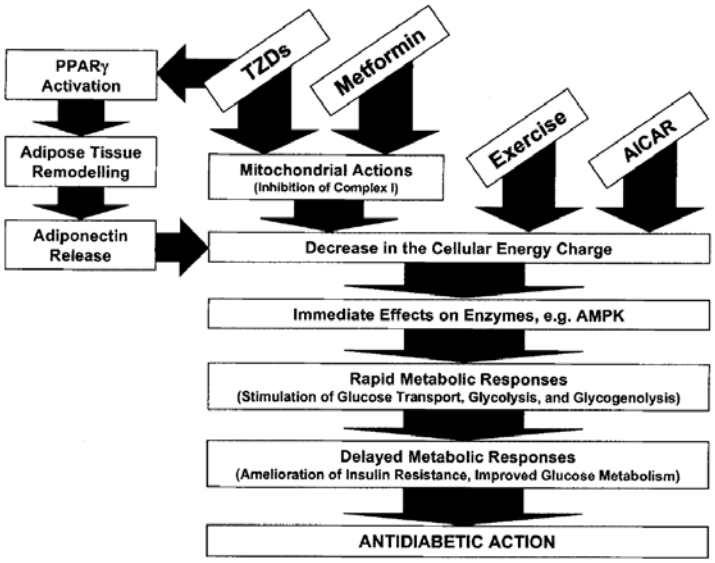

Figure 44 : L'inhibition de la fonction mitochondriale pourrait contribuer aux effets antidiabétiques des TZDs et de la metformine. Brunmair *et al.* ont suggéré que la metformine et les TZDs (thiazolidinediones), de même que l'exercice, pourraient diminuer le niveau d'énergie cellulaire, suite à une consommation élevée d'ATP (exercice), une induction de l'adiponectine (TZDs) ou en réponse à une altération de la respiration mitochondriale (metformine et TZDs). Des effets similaires peuvent être induits par l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside), qui mime une augmentation du niveau d'AMP. Les changements du niveau cellulaire d'énergie sont connus pour affecter différentes enzymes comme AMPK (AMP-activated protein kinase), qui pourraient alors contribuer à l'induction de réponses métaboliques favorisant les effets antidiabétiques des molécules. PPARγ, peroxisome proliferator activated receptor-γ (d'après Brunmair *et al.* 2004).

meilleur agoniste de PPARγ (Brunmair *et al.* 2001, Dello Russo *et al.* 2003, Artwohl *et al.* 2005). Ainsi, ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme PPARγ-indépendant, à l'origine des effets rapides des TZDs sur le métabolisme du glucose dans plusieurs types de cellules.

Une altération de la respiration mitochondriale pourrait être à l'origine de l'action des TZDs sur le métabolisme du glucose. Brunmair *et al.* ont en effet démontré que les ligands de PPARγ induisent une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et provoquent un découplage de la phosphorylation oxydative dans les tissus musculaires et hépatiques murins, ainsi que dans des mitochondries isolées de foie de rat (Brunmair *et al.* 2004). La respiration mitochondriale est alors réduite, de même que l'oxydation du glucose. De plus, la glycolyse anaérobie est stimulée, avec une augmentation du transport de glucose et de la production de lactate, parallèlement à une diminution de la synthèse de glycogène. Ces mêmes effets ont aussi été observés avec la molécule antidiabétique metformine, dont le mode d'action repose notamment sur le blocage du complexe I : Brunmair *et al.* ont alors suggéré que l'inhibition de la respiration mitochondriale, via le blocage du complexe I, pourrait contribuer aux effets antidiabétiques des TZDs, de même que la metformine (Brunmair *et al.* 2004, Pernicova and Korbonits 2014). Cette hypothèse repose sur le fait que l'altération de la respiration mitochondriale pourrait entraîner une déplétion en ATP dans les cellules et activer ainsi le senseur énergétique AMPK, via l'augmentation du ratio AMP/ATP. AMPK pourrait alors contribuer à la mise en place de changements métaboliques, favorisant les effets antidiabétiques des TZDs et de la metformine (Figure 44). Cette hypothèse est en accord avec plusieurs études ayant rapporté l'activation d'AMPK par les TZDs dans les tissus musculaire, hépatique et adipeux (Fryer *et al.* 2002, LeBrasseur *et al.* 2006). Konrad *et al.* ont également démontré que dans les cellules musculaires, la TGZ induit une réduction du potentiel membranaire mitochondrial et entraîne l'activation de l'AMPK, qui stimule à son tour l'entrée du glucose dans les cellules (Konrad *et al.* 2005). Les ligands de PPARγ peuvent activer l'AMPK selon deux mécanismes : 1) par une augmentation du ratio AMP/ATP suite à une déplétion en ATP 2) via l'adiponectine qui induit la phosphorylation d'AMPK et dont la sécrétion par le tissu adipeux est stimulée par PPARγ (Fryer *et al.* 2002, LeBrasseur *et al.* 2006, Yoon *et al.* 2006, Krishan *et al.* 2015).

Les cibles mitochondriales des TZD

Par ailleurs, outre le complexe I cité ci-dessus, d'autres cibles mitochondriales des TZDs ont été décrites. Sanz *et al.* ont en effet démontré que la PGZ et la RGZ réduisent non seulement

l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, mais également celle du complexe III dans des mitochondries isolées de foie de rat. Ce blocage est associé à une diminution de la consommation d'oxygène et une réduction de la production d'H_2O_2 dans des hépatocytes entiers, ainsi que dans des mitochondries isolées de foie de rat (Sanz *et al.* 2011). Une baisse de la consommation d'oxygène a également été constatée dans des mitochondries isolées de cerveau de rat en réponse à la TGZ et à la PGZ (Dello Russo *et al.* 2003). Cependant, dans des astrocytes de rat, la CGZ et la RGZ induisent la formation de ROS, ainsi qu'une diminution du niveau de glutathion dans les cellules, contribuant à l'induction de l'apoptose par la CGZ (Perez-Ortiz *et al.* 2004). La cible mitochondriale des composés n'a toutefois pas été déterminée dans ces études. Soller *et al.* ont quant à eux mis en évidence une inhibition des complexes I et II par la CGZ et la TGZ, alors que la RGZ ne bloque que le complexe I dans des particules submitochondriales préparées à partir de mitochondries isolées de cœur bovin. Les trois composés induisent tous néanmoins une production de ROS dans les lymphocytes T humains Jurkat. La CGZ entraîne en plus une déplétion d'ATP, suivie d'une induction de la nécrose. Quant à la TGZ, elle ne modifie pas le niveau d'ATP et induit pour sa part l'apoptose. Pour ce qui est de la RGZ, elle ne diminue pas la viabilité des cellules T Jurkat (Soller *et al.* 2007). Une réduction de l'activité des complexes I, II+III, IV et V a par ailleurs été observée en réponse à la CGZ et à la TGZ dans des mitochondries isolées de cœur bovin (Nadanaciva *et al.* 2007).

Colca *et al.* ont également cherché à mieux comprendre le mode d'action des TZDs, en recherchant le site de fixation des composés dans la mitochondrie. Ils ont alors montré que la PGZ pouvait se lier spécifiquement à la protéine mitoNEET, aussi nommée CISD1 (CDGSH iron sulfur domain 1) (Colca *et al.* 2004). Il s'agit d'une protéine à centre Fer-Soufre ancrée dans la membrane externe mitochondriale. Néanmoins des travaux complémentaires ont remis en cause cette donnée. En effet, dans des membranes mitochondriales de foie issu de souris ayant subi une invalidation pour le gène codant mitoNEET, les TZDs sont capables de se fixer sur les membranes mitochondriales malgré l'absence de mitoNEET. Une autre cible mitochondriale des TZDs a été mise en évidence : il s'agit du complexe mTOT (mitochondrial target of thiazolidinones), situé dans la membrane mitochondriale interne (Colca *et al.* 2013). Les protéines MPC1 et MPC2 (mitochondrial pyruvate carrier 1 et 2) sont les constituants principaux de ce complexe, dont la fonction principale est de transporter le pyruvate à travers la membrane interne mitochondriale (Vanderperre *et al.* 2015). Colca *et al.* ont alors rapporté une interaction de plusieurs dérivés de la PGZ (MSDC-0160, MSDC-1101 et MSDC-0602) avec la protéine MPC2 (Colca *et al.* 2013). Divakaruni *et al.* ont ensuite montré que les TZDs

bloquent le transport du pyruvate dans la mitochondrie, en inhibant l'activité du transporteur mTOT (ou MPC pour mitochondrial pyruvate carrier). Dans les cellules musculaires, ce blocage entraîne une diminution de la respiration mitochondriale, parallèlement à la phosphorylation d'AMPK et à la stimulation de l'entrée du glucose. Ces effets des TZDs sur l'activité mitochondriale, également observés dans des neurones corticaux, peuvent toutefois être contrecarrés par l'apport de méthylpyruvate, qui traverse librement la membrane interne mitochondriale sans utiliser le MPC (Divakaruni *et al.* 2013).

Par ailleurs, une étude clinique de phase II a permis de montrer que le composé MSCD-0160 induit une diminution du niveau du glucose sanguin, avec la même amplitude que la PGZ, chez des patients atteints d'un diabète de type II. Il entraîne cependant moins d'effets secondaires que la PGZ, avec une diminution de la rétention de fluide diminuée de moitié par rapport à la molécule parente. Le composé MSCD-016, capable de moduler l'activité de mTOT, semble ainsi présenter des effets antidiabétiques encourageants, tout en ayant des effets secondaires limités : le ciblage de mTOT pourrait ainsi constituer une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement du diabète (Colca *et al.* 2013).

Atteinte mitochondriale et action anticancéreuse

Plusieurs études suggèrent que les effets anticancéreux des TZDs pourraient être associés à une altération de l'activité mitochondriale. En effet, dans les cellules cancéreuses de sein (T47D) et de côlon (HCT-116), la TGZ induit une diminution sévère de la consommation d'oxygène, indiquant une inhibition de la respiration mitochondriale. Cette inhibition est accompagnée d'une baisse du potentiel membranaire mitochondrial, d'une augmentation de la production de ROS, ainsi que d'une diminution du nombre de cellules (Moon *et al.* 2016). Elle induit dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et LCC9 une hausse de la production de ROS, de même qu'une augmentation de la transcription du gène codant le co-activateur transcriptionnel PGC1-α, impliqué dans la biogenèse des mitochondries (Skildum *et al.* 2011). La PGZ stimule pour sa part la production de ROS dans les cellules cancéreuses de poumon NCI-H2347 et NCI-H1993 et inhibe ensuite la prolifération des cellules *in vitro* et *in vivo*. Le stress oxydant est dû à l'activation transcriptionnelle par PPARγ du gène codant la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4), qui en inhibant la pyruvate déshydrogénase, induit l'oxydation des acides gras. Ce processus entraîne alors une diminution de la glutaminolyse, suivie d'une baisse du niveau de glutamate et donc de GSH, préalablement à une hausse du niveau de ROS (Srivastava *et al.* 2014). La PGZ réduit également la consommation d'oxygène et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques PC3 et LNCaP cultivées sous forme de

sphéroïdes. La respiration des cellules non cancéreuses n'est toutefois pas affectée (Gottfried *et al.* 2011). Quant à la CGZ, la RGZ et la PGZ, elles diminuent la survie des cellules C6 de gliome de rat, en augmentant la production de ROS, probablement via une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire. Une dépolarisation des mitochondries et une diminution du pH mitochondrial sont aussi observées, tandis que la production de ROS entraîne une diminution du niveau de GSH (Perez-Ortiz *et al.* 2004, Perez-Ortiz *et al.* 2007).

Une altération du métabolisme de la glutamine a également été observée en réponse à la TGZ dans les cellules cancéreuses pulmonaires (H460) et cervicales (HeLa 229), ainsi que dans les fibroblastes embryonnaires de souris TKO (Rb-family triple knock-out mouse embryonic fibroblasts). La TGZ bloque ainsi l'entrée de la glutamine dans les cellules et empêche l'utilisation des dérivés carbonés de la glutamine dans le cycle de Krebs. Il se produit alors une diminution du niveau d'ATP et une augmentation de la production de ROS, suivies d'une réduction du nombre de cellules. Ces effets de la TGZ ne sont pas dus à l'activation de PPARγ, mais ils sont associés à la dégradation protéasome-dépendante de l'oncoprotéine c-Myc, impliquée dans la régulation de la glutaminolyse (Reynolds and Clem 2015). Friday *et al.* ont également étudié les effets de la TGZ sur le métabolisme de la glutamine, mais ils ont quant à eux observé une stimulation de la glutaminolyse (augmentation de la consommation de glutamine) dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Friday *et al.* 2011).

Outre le métabolisme de la glutamine, les TZDs modifient également le métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses, sans doute en réponse à l'altération de la fonction mitochondriale. Les composés semblent en effet induire un shift de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse anaérobie. La TGZ induit ainsi une augmentation de la production de lactate dans les cellules T47D et stimule l'entrée de glucose dans les cellules cancéreuses de sein (T47D, MDA-MB-468, MDA-MB-231 et MCF-7) et de côlon (HCT116) (Moon *et al.* 2016). Ces mêmes évènements sont observés dans les cellules cancéreuses de poumon NCI-H2347 avec la PGZ, ainsi que dans les cellules leucémiques HL-60, en réponse à une inhibition du complexe I par la CGZ (Scatena *et al.* 2004, Srivastava *et al.* 2014). De même, la TGZ induit une augmentation de la glycolyse, suite à une diminution du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules mammaires cancéreuses (MCF-7 et MDA-MB-231) ou non (MCF10-A) (Friday *et al.* 2011). La PGZ, la CGZ et la TGZ stimulent quant à elles la production de lactate et entraînent une acidification du milieu extracellulaire dans les cellules cancéreuses prostatiques PC3 (Gottfried *et al.* 2011). En plus de la glycolyse anaérobie, la TGZ et la CGZ induisent également le

processus de β-oxydation des acides gras, dans les lignées cancéreuses leucémique (HL-60) et pulmonaire (Line 1) respectivement (Scatena *et al.* 2004, Andela *et al.* 2005).
Pour ce qui est de la RGZ et de la PGZ, elles stimulent l'entrée du glucose dans les cellules de carcinome de la bouche (KB), de poumon (A549) et de sein (MDA-MB-231), via notamment une augmentation de l'expression du transporteur GLUT-1 (Kim *et al.* 2009, Cheong *et al.* 2015). L'entrée de glucose est également stimulée dans les cellules cancéreuses mammaires T47D, mais dans ce cas, la stimulation ne dépend pas d'une augmentation de l'expression de GLUT-1 (Moon *et al.* 2016). Elle ne dépend pas non plus du récepteur PPARγ, puisque la RGZ est moins efficace que la TGZ pour induire l'entrée de glucose dans les cellules T47D et l'inhibition de PPARγ par l'antagoniste GW9662 ne modifie pas les effets de la TGZ. L'inhibition d'AMPK et des voies de signalisation MAPK annulent en revanche les effets de la TGZ sur l'entrée du glucose, suggérant l'implication de ces protéines dans la stimulation de la glycolyse par la TGZ (Moon *et al.* 2016).

Si l'activation de la glycolyse est un mécanisme de compensation induit en réponse à l'altération de la fonction mitochondriale par les TZDs, alors Moon *et al.* ont suggéré qu'inhiber la glycolyse pourrait augmenter l'action anticancéreuse des composés. Les effets de la TGZ sur le nombre de cellules sont en effet potentialisés par une réduction de la concentration du glucose dans le milieu de culture des cellules cancéreuses de sein (T47D) et de côlon (HCT-116) (Moon *et al.* 2016). De même, la combinaison de la PGZ avec l'inhibiteur de glycolyse 2-DG entraîne une diminution significative de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC3 cultivées sous forme de sphéroïdes. Une désintégration des sphéroïdes est alors observée en réponse à cette combinaison PGZ+2-DG (Gottfried *et al.* 2011). Reynolds et Clem ont également démontré un effet synergique entre la TGZ et la metformine sur la viabilité des cellules cancéreuses pulmonaires (H460) et cervicales (HeLa 229) (Reynolds and Clem 2015). Ces données supportent ainsi l'utilisation des TZDs en thérapie combinatoire et illustrent le potentiel d'une stratégie thérapeutique ciblant le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses.

OBJECTIFS DE THESE

L'absence de réponse et la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux thérapies actuelles, ainsi que l'absence de thérapie ciblée pour les cancers du sein triple-négatifs, justifient le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des données de la littérature suggèrent qu'il serait intéressant de cibler le métabolisme énergétique souvent modifié dans les cellules cancéreuses. Dans ce contexte, des TZDs comme la CGZ présentent des effets antiprolifératifs qui pourraient résulter d'une altération du métabolisme énergétique. Notre laboratoire étudie depuis une dizaine d'années les mécanismes moléculaires PPARγ-indépendants impliqués dans les effets anticancéreux de la troglitazone et certains de ses dérivés comme la Δ2-TGZ, qui est incapable d'activer PPARγ mais possède toujours une activité anticancéreuse. Au cours de cette thèse, nous avons donc souhaité déterminer si la Δ2-TGZ modifiait le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été de caractériser les effets anticancéreux de la Δ2-TGZ dans de nouvelles conditions de traitement des cellules établies pour l'étude du métabolisme (milieu de culture contenant 10% de SVF). Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (triple-négatives hormono-indépendantes) et MCF-7 (hormono-dépendantes) ont été utilisées comme modèles d'étude pour ce travail. Les résultats obtenus sont présentés dans un article publié dans la revue *Cell Cycle* en 2016. Des données supplémentaires complètent cet article.

Le second objectif de ma thèse a été d'étudier les effets de la Δ2-TGZ sur le métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231. L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans ce manuscrit.

Dans une troisième partie de mon travail, nous avons caractérisé le mode d'action du 2-DG dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Utilisé comme témoin capable de perturber le métabolisme énergétique des cellules, ce composé présente un mode d'action plus complexe. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article sur le point d'être soumis. Des données supplémentaires complètent cet article.

Enfin, le dernier objectif de ma thèse a été de déterminer si la Δ2-TGZ est capable de potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie dans les cellules MDA-MB-231. Les premiers résultats obtenus sont présentés dans ce manuscrit.

MATERIEL & METHODES

Cette section a pour but de reprendre les méthodes mises en œuvre au cours de mon travail de thèse. Les méthodes détaillées dans les articles publiés ou mis en format publication seront reprises brièvement. Les techniques associées à l'étude de l'activité métabolique des cellules qui ne sont pas encore formatées seront décrites en détail. Nous avons également souhaité préciser la méthodologie employée pour déterminer l'indice de combinaison utilisé pour évaluer l'efficacité d'un traitement combinatoire selon la méthode de Chou-Talalay.

I. MOLECULES UTILISEES

La synthèse du composé Δ2-TGZ a été réalisée par Michel Broisbun (UMR 7565 CNRS-UL SRSMC, équipe Molécules Bioactives et Traceurs), selon la procédure expérimentale décrite par Salamone *et al.* (Salamone *et al.* 2012). La Δ2-TGZ a ensuite été mise en solution dans le solvant DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich) à une molarité de 50 mM.

Le 2-déoxyglucose (2-DG, Sigma-Aldrich) et le mannose (Sigma-Aldrich) ont été mis en solution dans de l'eau ultra-pure stérile, tandis que la staurosporine (Sigma-Aldrich) a été dissoute directement dans le milieu de culture. Pour ce qui est des agents de chimiothérapie, le paclitaxel (Sigma-Aldrich) et le 5-fluorouracile (Sigma-Aldrich) ont été dissous respectivement dans de l'éthanol absolu et du DMSO. Quant à la doxorubicine (Chlorhydrate de doxorubicine, TEVA), elle a été mise en solution dans de l'eau ultra-pure stérile.

II. CULTURE CELLULAIRE ET CONDITIONS DE TRAITEMENT

1. Lignées cellulaires

Durant ce travail, deux lignées de cellules cancéreuses mammaires humaines ont été utilisées: la lignée MDA-MB-231 et la lignée MCF-7. Ces deux lignées cellulaires, obtenues de l'organisation ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Etats-Unis), proviennent d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire survenu chez une femme âgée de 51 ans pour les MDA-MB-231 et une femme de 69 ans pour les MCF-7. Les cellules MDA-MB-231 appartiennent au sous-type Claudin-low et sont dites triple-négatives car elles n'expriment ni les récepteurs hormonaux (ER et PR), ni le récepteur HER2 : ces cellules sont donc hormono-indépendantes. Quant aux cellules MCF-7, elles appartiennent au sous-type Luminal A et elles sont hormono-dépendantes, exprimant ainsi les récepteurs des œstrogènes et de la progestérone. Ces cellules n'expriment pas le récepteur HER2 (Holliday and Speirs 2011).

2. Conditions de culture

La culture des cellules s'est effectuée dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) pour les cellules MDA-MB-231 et du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Essentiel Medium, Gibco®) pour les cellules MCF-7. Ces deux milieux, contenant du rouge phénol, ont été additionnés de 2 mM de L-glutamine (L-glu, Sigma-Aldrich) et de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma-Aldrich). Les cellules prolifèrent en monocouches dans des flacons de 75 cm^2 placés dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère contenant 5% de CO_2, avec 90% d'humidité. Les cellules étaient repiquées 2 fois par semaine.

3. Ensemencement et conditions de traitement

L'ensemencement des cellules est effectué à partir de cellules cultivées à 80% de confluence. Les cellules ont tout d'abord été rincées avec du PBS (phosphate-buffered saline) et traitées à la trypsine pendant 1 minute à 37°C (2 mL de solution trypsine-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) diluée à 0,05% dans du PBS (Gibco®)). Ensuite, 8 mL de milieu de culture (RPMI 1640 pour les MDA-MB-231 ou DMEM pour les MCF-7) contenant du SVF ont été ajoutés afin d'arrêter l'action de la trypsine. Les cellules ont été comptées grâce à une cellule de Neubauer, puis elles ont été ensemencées à la densité cellulaire appropriée dans leur milieu respectif contenant 10% de SVF et 2 mM de L-Glu. Le nombre de cellules ensemencées sera précisé pour chaque protocole. 24 heures après l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec les différentes molécules aux temps et concentrations indiqués, dans leur milieu de culture respectif contenant 2 mM de L-Glu et 1 ou 10% de SVF selon les expériences. Chaque traitement a été répété au moins trois fois.

III. NUMERATION CELLULAIRE PAR COLORATION AU CRISTAL VIOLET

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 20 000 et 15 000 cellules par puits respectivement. Les cellules ont ensuite été traitées comme décrit précédemment. Puis, à la fin du traitement, le nombre de cellules a été déterminé grâce à une coloration de l'ADN au cristal violet puis une quantification de l'absorbance. Le protocole de ce test est décrit précisément dans les articles 1 et 2.

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens	Taille
XBP-1	5'-TTACGAGAGAAAACTCATGGC-3'	5'-GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC-3'	282/256 pb
RPLPO	5'-ACAACCCAGCTCTGGAGAAA-3'	5'-TCGTTTGTACCCGTTGATGA-3'	530 pb

Tableau 15: Couples d'amorces utilisés pour les PCR conventionnelles. Les séquences des amorces sens et anti-sens, ainsi que la taille des produits de PCR attendus sont précisées pour chaque couple d'amorces. Pour *XBP-1*, les produits de PCR de 282 et 256 paires de base (pb) correspondent respectivement aux formes non épissées et épissées de l'ARNm de *XBP-1*.

IV. CARACTERISTATION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

1. Evaluation de la prolifération cellulaire par le test d'incorporation de BrdU

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 20 000 et 15 000 cellules par puits respectivement. Les cellules ont ensuite été traitées comme décrit précédemment et la prolifération cellulaire a été évaluée en mesurant la quantité de BrdU (analogue de la thymidine) incorporée dans les cellules. Le protocole de cette expérience est décrit dans l'article 1.

2. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées dans des flacons de 25 cm^2 à raison de 650 000 et 500 000 cellules par flacon respectivement. Les traitements ont ensuite été réalisés comme décrit auparavant. A la fin du traitement, les cellules ont été récoltées et leur ADN a été marqué à l'iodure de propidium. La répartition des cellules dans chacune des phases du cycle a été analysée par cytométrie en flux. Les différentes étapes de cette expérience sont détaillées dans l'article 1.

V. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES

1. Au niveau transcriptionnel par RT-PCR conventionnelle

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées dans des plaques 12 puits à raison de 180 000 et 160 000 cellules par puits. Les cellules ont ensuite été traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement, l'ARN total a été extrait grâce à du TRIzol® Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Les ARNs ont ensuite été transcrits en ADN complémentaires (ADNc) par transcription inverse (RT), en utilisant la RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific). Puis, les ADNc d'intérêt ont été amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 15) et en utilisant l'EconoTaq® DNA polymerase (Lucigen, Euromedex). Les produits de PCR ont finalement été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose afin d'évaluer l'expression des gènes d'intérêt. Chacune de ces étapes est décrite de façon détaillée dans les articles 1 et 2.

2. Au niveau traductionnel

2.1 <u>Par western blot</u>

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées dans des boîtes de culture de diamètre 6 cm à raison de 650 000 et 475 000 cellules par boîte respectivement. Les traitements ont ensuite été effectués comme indiqué auparavant. A la fin du traitement, les protéines totales

Anticorps	Fournisseur	Origine animale	Dilution	PM
Western Blot				
Anti-Actine	Santa Cruz Biotechnology	Chèvre	1/1000	43 kDa
Anti-phospho (Thr 172) AMPKα	Cell Signaling Technology	Lapin	1/1000	62 kDa
Anti-AMPKα	Cell Signaling Technology	Lapin	1/1000	62 kDa
Anti-BiP	United States Biological	Lapin	1/1000	78 kDa
Anti-Cycline D1	GeneTex	Lapin	1/1000	36 kDa
Anti-phospho (Ser51) eIF2α	Signalway Antibody	Lapin	1/1000	38 kDa
Anti-LAMP2	Santa Cruz Biotechnology	Mouse	1/1000	130 kDa
Anti-PERK	Cell Signaling Technology	Lapin	1/1000	140 kDa
Anti-PARP clivé	BD Pharmingen	Souris	1/1000	89 kDa
Anti-Sirt1	Bethyl Laboratories	Lapin	1/1000	117 kDa
Anti-α-Tubuline	GeneTex	Lapin	1/1000	55 kDa
Anti-IgG de lapin Peroxydase	Santa Cruz Biotechnology	Chèvre	1/10000	
Anti-IgG de souris Peroxydase	Santa Cruz Biotechnology	Chèvre	1/10000	
Anti-IgG de chèvre Peroxydase	Santa Cruz Biotechnology	Âne	1/10000	
Immunocytochimie				
Anti-CHOP	Santa Cruz Biotechnology	Souris	1/100	
Anti-IgG de souris Alexa Fluor® 555	Invitrogen	Chèvre	1/1000	

Tableau 16: Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot et d'immunocytochimie. Pour chaque anticorps est précisé son fournisseur, son origine animale, ainsi que les conditions de dilution utilisées. Dans le cas du western blot, le poids moléculaire de la protéine reconnue par l'anticorps est également précisé (PM).

ont été extraites des cellules et soumises à un western blot afin d'étudier l'expression des protéines d'intérêt.
Les différentes étapes de l'extraction protéique et du western blot sont décrites de façon détaillées dans les articles 1 et 2. Les caractéristiques des anticorps utilisés sont résumées dans le tableau 16.

2.2 Immunocytochimie

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées sur des lamelles de verre dans des plaques 12 puits, à raison de 180 000 et 160 000 cellules par puits respectivement. Les cellules ont été traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement, les cellules ont été fixées, perméabilisées et incubées avec les anticorps primaires anti-CHOP afin de détecter la protéine d'intérêt. Les anticorps secondaires couplés au fluorochrome Alexa Fluor® 555 ont ensuite été utilisés et les noyaux ont été colorés avec le Hoechst 33342 (Invitrogen). Les cellules ont été observées grâce à un microscope à fluorescence (Eclipse 80i, Nikon) couplé au logiciel de traitement d'image NESFBR (Nikon).
Les différentes étapes de la technique d'immunocytochimie sont décrites de manière détaillée dans les articles 1 et 2. Les caractéristiques des anticorps utilisés sont résumées dans le tableau 16.

VI. ETUDE DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES CELLULES

1. Dosage de l'ATP

Les cellules MDA-MB-231 ont été ensemencées à 800 000 cellules par boîte dans des boîtes de culture de diamètre 6 cm. Elles ont ensuite été traitées comme indiqué précédemment. A l'issue du traitement, les cellules ont été rincées avec du PBS, traitées à la trypsine (trypsine-EDTA diluée à 0,05% dans du PBS) et resuspendues dans du milieu de culture RPMI contenant 2 mM de L-Glu et 10% de SVF. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante et le culot a été rincé avec du PBS. Les culots cellulaires ont ensuite été conservés à sec à -20°C, jusqu'au moment du dosage.

Le dosage de l'ATP intracellulaire a été réalisé à l'aide du kit ENLITEN® ATP Assay System (Promega), basé sur de la chimioluminescence (luciférase). Les culots cellulaires, conservés à -20°C, ont été décongelés et lysés pendant 30 min sur glace dans du tampon de lyse contenant 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM d'EDTA, 1% de Triton X-100 et 1% d'acide trichloroacétique. A la fin de la lyse, le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation à 1000 rpm pendant 10 min à 4°C. L'acide trichloroacétique a ensuite été neutralisé et dilué à 0,1% par

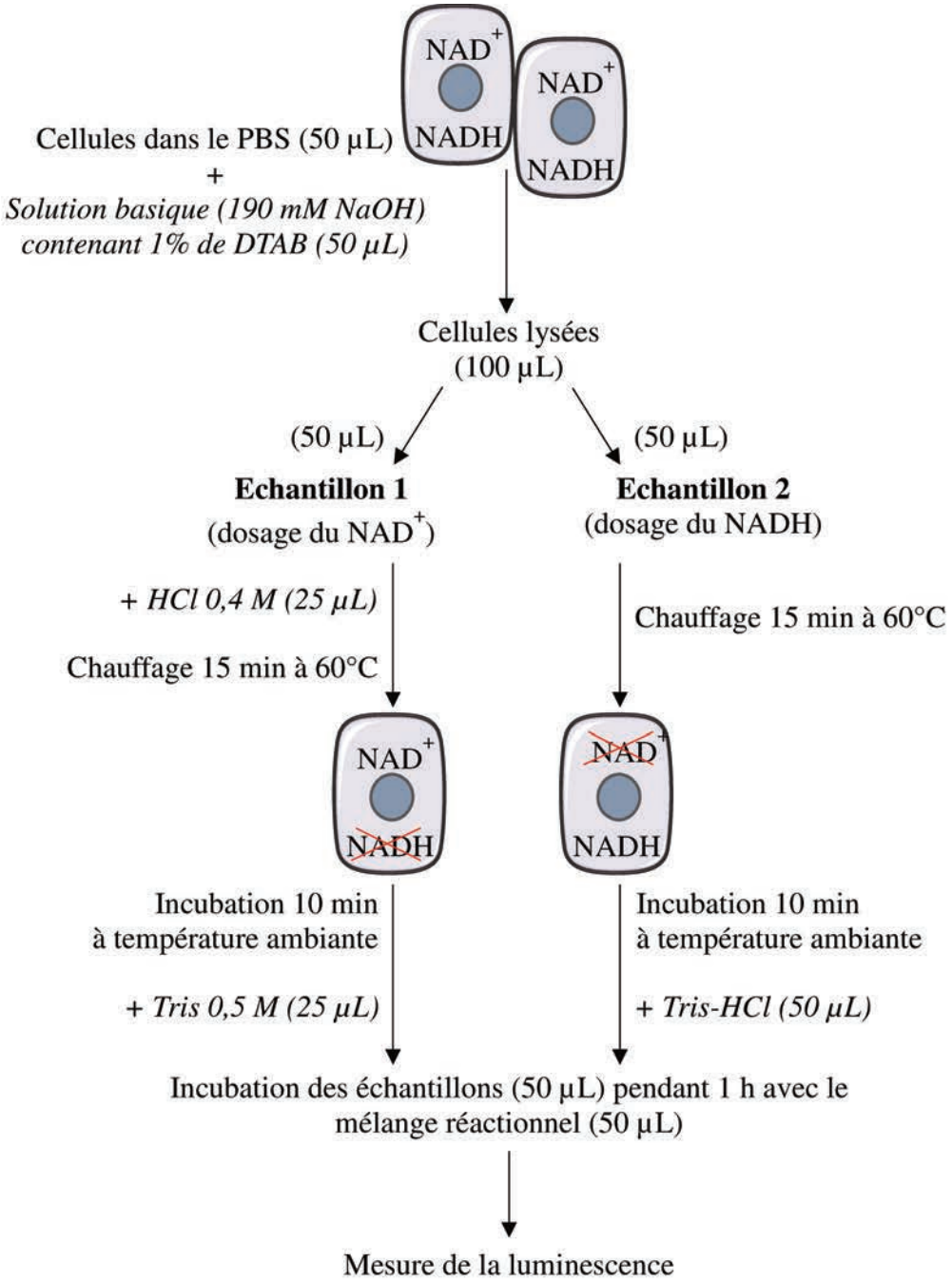

Figure 45 : Description schématique des différentes étapes du protocole de dosage du NAD^+ et NADH, réalisé à l'aide du kit NAD/NADH-Glo™ Assay (Promega). Les étapes du protocole sont celles décrites par le fabricant. DTAB, dodecyltrimethyl ammonium bromide; PBS, phosphate-buffered saline (adapté d'après Promega).

.

addition d'un tampon Tris-acétate 250 mM pH 7,75. La concentration protéique des échantillons a alors été déterminée en utilisant la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Biorad). Ensuite, chaque échantillon a été dilué au 10 000ème, puis 10 µL ont été ajoutés à 50 µL de mélange réactionnel contenant de la D-Luciférine. La luminescence émise a finalement été mesurée grâce à un luminomètre (VICTOR™ X3, PerkinElmer). Puis, la concentration en ATP des échantillons, exprimée en nmol/mg de protéines, a été déterminée grâce à une gamme étalon d'ATP réalisée en parallèle.

2. Dosage du NAD^+ et du NADH

Les cellules MDA-MB-231 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 20 000 cellules par puits. Les traitements ont été effectués comme décrit précédemment. A la fin du traitement, les quantités intracellulaires de NAD^+ et NADH ont été déterminées en utilisant le kit NAD/NADH-Glo™ Assay (Promega), basé sur de la chimioluminescence (luciférase). Les étapes du protocole, détaillées dans la figure 45, sont celles décrites par le fabricant. Le milieu de culture des cellules a tout d'abord été retiré et remplacé par du PBS, additionné d'une solution basique (190 mM NaOH) contenant 1% de DTAB (dodecyltrimethyl ammonium bromide) pour lyser les cellules. Le lysat cellulaire a ensuite été séparé en deux échantillons équivalents (échantillons 1 et 2) afin de doser séparément le NAD^+ et le NADH. L'échantillon 1 a reçu un traitement acide afin de neutraliser le NADH et doser ainsi le NAD^+, tandis que l'échantillon 2 a été incubé dans des conditions basiques pour neutraliser le NAD^+ et quantifier ainsi le NADH.

De l'acide chlorhydrique 0,4 M a tout d'abord été ajouté à l'échantillon 1 (Figure 45). Les échantillons 1 et 2 ont ensuite été chauffés pendant 15 min à 60°C. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, l'échantillon 1 a reçu du Tris 0,5 M afin de neutraliser l'acide chlorhydrique, tandis que l'échantillon 2 a été additionné de tampon Tris-HCl. Les deux échantillons ont ensuite été incubés pendant 1 heure avec le mélange réactionnel, contenant un précurseur de la luciférine. La luminescence émise, corrélée à la quantité de NAD^+ et NADH dans les échantillons 1 et 2 respectivement, a finalement été mesurée grâce à un luminomètre (VICTOR™ X3, PerkinElmer).

3. Etude de l'activité mitochondriale par oxygraphie

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées dans des flacons de 75 cm^2 et à 80% de confluence, elles ont été traitées comme décrit précédemment. A l'issue du traitement, les cellules ont été rincées avec du PBS, traitées à la trypsine (trypsine-EDTA diluée à 0,05 % dans du PBS) et

resuspendues dans du milieu de culture RPMI contenant 2 mM de L-glu et 10% de SVF. Les cellules ont ensuite été comptées en utilisant un compteur de cellules automatique (TC20™ Automated Cell Counter, Bio-Rad). Après une centrifugation à 1000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante, les cellules ont été reprises à raison de $5x10^6$ cellules/mL dans du milieu RPMI, additionné de 2 mM de L-glu et 10% de SVF.

La consommation d'oxygène des cellules a ensuite été mesurée grâce à un instrument d'oxygraphie (Hansatech Instruments), équipé d'une électrode à oxygène (électrode de Clark), placée sous une chambre de mesure thermostatée à 37°C. Les signaux générés par l'électrode ont été recueillis et traités informatiquement à l'aide du logiciel Oxygraph Plus (Hansatech Instruments).

Après calibration de l'électrode, 1 mL de la suspension cellulaire (cellules non perméabilisées) a été déposé dans la chambre d'oxygraphie, les cellules étant sous agitation constante grâce à la présence d'un agitateur magnétique. Les valeurs de consommation d'oxygène, exprimées en nmol d'O_2/min/10^6 cellules, ont ensuite été déterminées en temps réel par le logiciel Oxygraph Plus. La consommation d'oxygène basale des cellules, qui correspond à la consommation d'oxygène endogène, a tout d'abord été mesurée. Après stabilisation des valeurs de consommation d'oxygène endogène, les cellules ont été traitées dans la cuve d'oxygraphie avec 10 µg/mL d'oligomycine A (Sigma-Aldrich) et 10 µg/mL d'atractyloside (Sigma-Aldrich), afin d'inhiber respectivement l'ATP synthase et l'ADP/ATP translocase. La consommation d'oxygène a alors été mesurée en présence de ces inhibiteurs. Ensuite, 500 µL de l'agent découplant CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés dans la cuve d'oxygraphie tout en continuant le suivi de la consommation d'oxygène. Afin de s'assurer que la consommation d'oxygène est spécifiquement associée au fonctionnement de la chaîne respiratoire, le KCN (inhibiteur du complexe IV de la chaîne respiratoire, Sigma-Aldrich) est injecté dans la cuve d'oxygraphie. Il entraîne systématiquement un arrêt complet de la consommation d'oxygène.

4. Analyse de l'activité glycolytique par mesure de la production de lactate et de la consommation de glucose

Les cellules MDA-MB-231 ont été ensemencées à 20 000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. Les cellules ont été traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement, le milieu de culture a été collecté et sa concentration en glucose et en lactate a été mesurée par Frédéric Bost (Inserm U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, équipe « physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'obésité et du diabète »), grâce à un instrument

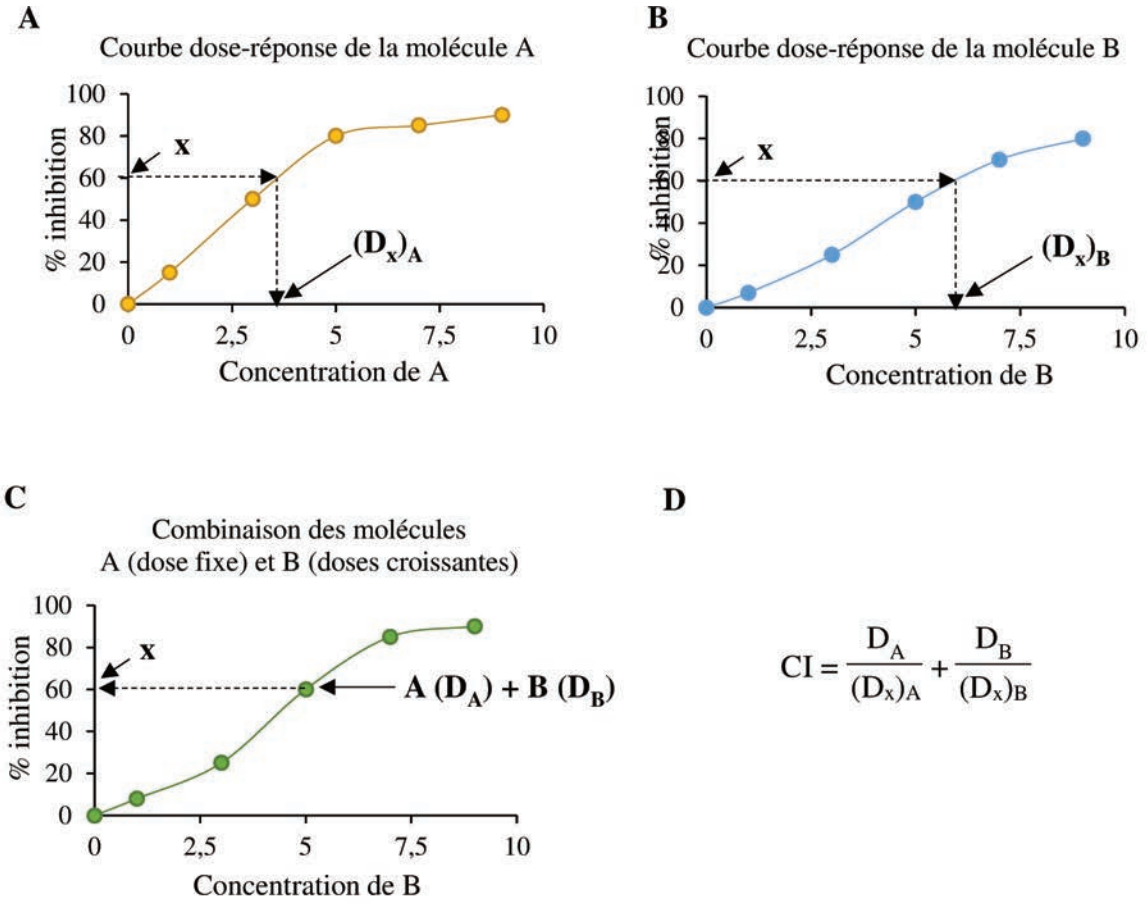

Figure 46 : Représentation graphique des paramètres calculés par le logiciel CompuSyn afin de déterminer l'indice de combinaison (CI). Les courbes dose-réponse des molécules A et B (A et B) ont été générées automatiquement par le logiciel CompuSyn, à partir des données de pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire obtenues par le test de coloration de l'ADN au cristal violet. Le graphique en C représente la courbe dose-réponse des molécules utilisées en combinaison avec une dose fixe de A et des doses croissantes de B. Sur cette courbe, D_A et D_B correspondent aux doses de molécules A et B qui en combinaison, ont conduit à un pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire de x%. A partir des courbes dose-réponse présentées dans les figures A et B, la dose de la molécule A et de la molécule B, qui utilisées seules donneraient un effet inhibiteur de x%, sont déterminées par projection et sont nommées $(Dx)_A$ et $(Dx)_B$. Ces valeurs permettent de calculer le CI d'après la formule présentée dans la figure D.

de mesure automatique (YSI 2950 Biochemistry Analyzer, YSI Life Sciences). Des échantillons contenant du milieu de culture, non incubé avec des cellules, ont été inclus dans l'analyse afin de déterminer la concentration basale du lactate et du glucose dans le milieu de culture. La production de lactate a ensuite été calculée en soustrayant la concentration basale du lactate dans le milieu de culture à la concentration en lactate mesurée pour chaque condition de traitement. Quant à la consommation de glucose, elle a été obtenue en soustrayant la concentration en glucose des échantillons à la concentration de glucose dans le milieu de culture. Le nombre de cellules a été déterminé en parallèle par une coloration de l'ADN au cristal violet, afin de normaliser les concentrations obtenues par rapport au nombre de cellules et de déterminer ainsi la production de lactate et la consommation de glucose par cellule.

VII. DETERMINATION DE L'INDICE DE COMBINAISON (CI) SELON LA METHODE DE CHOU-TALALAY

L'indice de combinaison (CI) permet de déterminer si deux molécules ont des effets synergiques, additifs ou antagonistes (Chou 2006). Cet indice a été calculé pour chacune des combinaisons de molécules testées, selon la méthode de Chou-Talalay en utilisant le logiciel gratuit CompuSyn (CompuSyn Version 1.0 de Ting-Chao Chou et Nick Martin, 2004).

Les cellules MDA-MB-231 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 20 000 cellules par puits. Elles ont ensuite été traitées comme décrit précédemment, avec deux molécules, utilisées seules ou en combinaison. Les molécules utilisées seules ont été appliquées à des doses croissantes, tandis qu'en combinaison, une molécule a été utilisée à une dose fixe (Δ2-TGZ) et l'autre a été appliquée à des doses croissantes (2-DG, doxorubicine, 5-fluorouracile ou paclitaxel). A la fin du traitement, le nombre de cellules a été déterminé pour chaque condition par une coloration de l'ADN au cristal violet. A partir de ces résultats, le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire a été calculé pour chaque concentration de molécule utilisée seule. Ces données ont alors été saisies dans le logiciel CompuSyn, qui a généré automatiquement une courbe dose-réponse pour chaque molécule (Figure 46A et B). Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire associé à chaque combinaison de doses de molécules a également été saisi dans le logiciel. Puis, l'indice de combinaison a été calculé selon la formule suivante :

$$CI = \frac{D_A}{(D_x)_A} + \frac{D_B}{(D_x)_B}$$

D_A et D_B sont les doses de molécules A et B qui en combinaison, ont conduit à un pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire de x% (Figure 46C). A partir de la courbe dose-réponse de la molécule A, on déduit par projection $(D_x)_A$ qui correspond à la dose de molécule A qui, utilisée seule, induirait un effet inhibiteur de x% (Figure 46A). $(D_x)_B$ est obtenu par projection à partir de la courbe dose-réponse de la molécule B (Figure 46B). Si le CI est égal à 1, alors les deux molécules ont des effets additifs. Un CI supérieur à 1 est en revanche indicateur d'un antagonisme. Quant à un CI inférieur à 1, il correspond à du synergisme.

VIII. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats présentés correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes. Ils sont représentés par la valeur moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (ESM). L'analyse statistique des données a été effectuée en réalisant une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, suivi d'un test de Bonferroni pour les comparaisons multi-groupes. Un test *t* de Student a quant à lui été utilisé pour les comparaisons entre deux groupes. Les tests statistiques ont été effectués sur le logiciel GraphPad InStat. Pour chaque comparaison, la valeur P a été calculée et les résultats ont été considérés statistiquement significatifs, très significatifs ou extrêmement significatifs pour une valeur P inférieure à 0,05; 0,01 ou 0,001 respectivement.

RESULTATS

I. CARACTERISATION DES EFFETS DE LA Δ2-TGZ EN MILIEU DE CULTURE CONTENANT 10% DE SERUM DE VEAU FŒTAL (ARTICLE 2)

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'un article publié en 2016 dans la revue Cell Cycle.

Δ2-Troglitazone promotes cytostatic rather than pro-apoptotic effects in breast cancer cells cultured in high serum conditions.

Audrey Berthe, Stéphane Flament, Stéphanie Grandemange, Marie Zaffino, Michel Boisbrun, Sabine Mazerbourg.

1. Objectifs

Les études menées précédemment au laboratoire afin de démontrer les effets anticancéreux de la Δ2-TGZ ont été réalisées en utilisant un milieu de culture contenant une quantité faible de sérum de veau fœtal (1%). Une privation des cellules en sérum peut toutefois provoquer un stress cellulaire, mimant en partie les conditions d'un stress métabolique (Pirkmajer and Chibalin 2011). Souhaitant étudier les effets de la Δ2-TGZ sur le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses, j'ai donc établi de nouvelles conditions de traitement des cellules. J'ai choisi d'utiliser le milieu de culture contenant 10% de SVF, dans lequel sont maintenues les lignées cellulaires en routine. Le premier objectif de mon travail a donc été de caractériser les effets de la Δ2-TGZ dans un tel milieu de culture.

Le second objectif de mon travail a été de comparer les effets de la Δ2-TGZ en conditions 1 et 10% de SVF et de déterminer si une privation des cellules cancéreuses en sérum potentialisait les effets antiprolifératifs de la Δ2-TGZ. En effet, des conditions restrictives en sérum apparaissent comme potentialisatrices de l'action de molécules anticancéreuses telles que des agents de chimiothérapie (Shi *et al.* 2012).

Les lignées de cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes MCF-7 et triple-négatives MDA-MB-231 ont été utilisées pour ce travail.

2. Résultats

Nous avons tout d'abord comparé les effets de la Δ2-TGZ sur le nombre de cellules en conditions 1 et 10% de SVF. Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de Δ2-TGZ et le nombre de cellules a été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Après 48 heures de traitement, la Δ2-TGZ induit dans les deux conditions de culture une diminution du nombre de cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Cependant, lorsque le milieu contient 10% de

SVF, des doses plus élevées de composé sont requises pour induire une diminution de 50% du nombre de cellules (IC_{50}). Un faible pourcentage de SVF semble ainsi potentialiser l'action de la Δ2-TGZ. En outre, les cellules MCF-7 sont plus sensibles à la Δ2-TGZ que les cellules MDA-MB-231 en conditions 10% de SVF, tandis que l'opposé est observé en conditions 1% de SVF.

Nous avons ensuite souhaité déterminer quels étaient les événements cellulaires mis en jeu par la Δ2-TGZ dans un milieu contenant 10% de SVF. Nous avons alors émis l'hypothèse que le composé pourrait induire la mort cellulaire par apoptose, comme cela avait été observé dans un milieu contenant 1% de SVF (Colin-Cassin *et al.* 2015). Les cellules ont été traitées avec 75 µM de Δ2-TGZ ou du DMSO (solvant de la molécule) et le clivage de PARP a été étudié par western blot. La Δ2-TGZ n'induit toutefois que faiblement le clivage de PARP après 72 heures de traitement, suggérant une absence d'induction de l'apoptose en condition 10% de SVF. Par contre, en marquant l'ADN à l'iodure de propidium et en analysant par cytométrie en flux la répartition des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire, un blocage du cycle cellulaire a été observé. Dès 48 heures de traitement, la Δ2-TGZ induit ainsi un arrêt en phase G_0/G_1. Ce résultat est en accord avec une diminution de la prolifération cellulaire (test d'incorporation de bromodesoxyuridine (BrdU)) et une baisse du taux de la cycline D1 (observée par western blot) qui est un régulateur majeur de la transition G_1/S du cycle cellulaire. La Δ2-TGZ a donc un effet cytostatique plutôt qu'apoptotique en milieu contenant 10% de SVF.

Nous avons étudié par ailleurs les effets de la Δ2-TGZ sur le stress du RE, puisqu'il était induit en condition 1% de SVF (Colin-Cassin *et al.* 2015). Nous avons analysé, par western blot et RT-PCR, différents acteurs de la réponse UPR (unfolded protein response) mise en place en cas de stress du RE. Dans les cellules MDA-MB-231, la Δ2-TGZ induit la phosphorylation de PERK et d'eIF2α, ainsi que le clivage de l'ARNm de *XBP-1*. L'expression de la protéine chaperonne BiP est aussi augmentée. Pour ce qui est des cellules MCF-7, seule l'expression de BiP est induite après traitement avec la Δ2-TGZ. Il n'y a pas de phosphorylation de PERK ou d'eIF2α, ni de clivage de l'ARNm de *XBP-1*. Nous avons toutefois observé par immunocytochimie une augmentation de l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP dans les deux lignées cellulaires. En milieu contenant 10% de SVF, la Δ2-TGZ induit donc un stress du RE dans les cellules cancéreuses mammaires. Toutefois, il est plus important dans les cellules MDA-MB-231 que dans les cellules MCF-7.

3. Conclusions

Nous avons donc montré que la Δ2-TGZ induit une diminution du nombre de cellules MCF-7 et MDA-MB-231 dans les deux conditions de culture. Cependant, la Δ2-TGZ induit des effets cytostatiques plutôt que des effets pro-apoptotiques en condition 10% de SVF. Ainsi, des conditions restrictives en sérum (milieu contenant 1% de SVF) apparaissent comme potentialisatrices des effets de la Δ2-TGZ, ce qui est cohérent avec ce qui a été montré précédemment pour d'autres agents anticancéreux.

CELL CYCLE
2016, VOL. 15, NO. 24, 3402–3412
http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2016.1245248

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REPORT

Δ2-Troglitazone promotes cytostatic rather than pro-apoptotic effects in breast cancer cells cultured in high serum conditions

Audrey Berthe [a,b], Stéphane Flament[a,b], Stéphanie Grandemange[a,b], Marie Zaffino[a,b], Michel Boisbrun[c,d], and Sabine Mazerbourg[a,b]

[a]Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, France; [b]CNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, France; [c]Université de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, France; [d]CNRS, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, France

ABSTRACT

We have previously shown that Δ2-Troglitazone (Δ2-TGZ) displayed anticancer effects on breast cancer cell lines grown in low serum conditions (1% fetal calf serum (FCS)). The present study was performed in order to characterize the effects of Δ2-TGZ in high serum containing medium and to determine if starvation could influence the response of breast cancer cells to this compound, keeping in mind the potential interest for breast cancer therapy. We observed that in high serum conditions (10% FCS), a 48 h treatment with Δ2-TGZ induced a decrease in cell numbers in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. The IC_{50} values were higher than in low serum conditions. Furthermore, in contrast to our previous results obtained in 1% FCS conditions, we observed that in 10% FCS-containing medium, MCF-7 cells were more sensitive to Δ2-TGZ than MDA-MB-231 cells. Δ2-TGZ also induced endoplasmic reticulum (ER) stress mainly in MDA-MB-231 cells. Besides, in high serum conditions, Δ2-TGZ induced a G_0/G_1 cell cycle arrest, an inhibition of BrdU incorporation and a reduced level of cyclin D1. We observed a limited cleavage of PARP and a limited proportion of cells in sub-G_1 phase. Thus, in high serum conditions, Δ2-TGZ displayed cytostatic effects rather than apoptosis as previously reported in 1% FCS-containing medium. Our results are in accordance with studies suggesting that serum starvation could potentiate the action of diverse anti-cancer agents.

ARTICLE HISTORY
Received 25 July 2016
Revised 30 September 2016
Accepted 30 September 2016

KEYWORDS
Breast cancer; thiazolidinediones; cell cycle; low serum conditions; high serum conditions

Introduction

Breast cancer is the most frequent cancer in women worldwide and the second cause of cancer death in more developed regions of the world, after lung cancer.[1] Current treatments for breast cancer are surgery, radiotherapy, chemotherapy as well as endocrine therapy for hormone receptor-positive breast tumors and targeted therapies for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-overexpressing tumors.[2] However, about 25% of estrogen receptor-positive breast cancer patients do not respond to the anti-estrogen tamoxifen and half of tamoxifen-treated patients develop a tamoxifen-resistant phenotype.[3] *de novo* and acquired resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab have also been identified.[4] Besides, no targeted therapy is available for aggressive triple-negative breast cancer which is characterized by the absence of expression of estrogen, progesterone, and HER2 receptors.[5] These limitations in breast cancer therapy are strong arguments for the search for optimized therapeutic strategies and the development of new therapeutic agents. In this context, fasting cycles have been shown to retard the growth of tumors and to sensitize various cancer cell types to chemotherapy.[6] In regard to the development of alternative or complementary anticancer agents, thiazolidinediones (TZDs) are interesting compounds.

TZDs, including compounds like troglitazone (TGZ), ciglitazone (CGZ), pioglitazone (PGZ), and rosiglitazone (RGZ), are a class of synthetic agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ), initially used as insulin sensitizers for the treatment of type 2 diabetes.[7] In addition, TZDs have been investigated as anticancer drugs. The molecular mechanisms underlying the anticancer effects have been extensively studied, but are still not fully elucidated. Increasing data show that this activity is mainly related to PPARγ-independent mechanisms. This has been demonstrated by experiments using PPARγ-antagonists, transfection of dominant-negative PPARγ isoforms, PPARγ-targeted RNA interference as well as PPARγ-inactive TZD derivatives like Δ2-TGZ or Δ2-CGZ.[8,9] Such Δ2 analogs have a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring and they are devoid of PPARγ activity. This attenuation of PPARγ activity is explained by the structural rigidity induced by the double bond introduction surrounding the heterocycle system.[10,11] In breast cancer cell lines, the number of viable cells was reduced after exposure to Δ2-TGZ.[12] Such a treatment induced a proteasome-dependent proteolysis of both cyclin D1 and estrogen receptor α in hormone-dependent breast cancer cell lines.[12-15] Besides, Δ2-TGZ induced an early increase in intracellular calcium followed by

CONTACT Sabine Mazerbourg sabine.mazerbourg@univ-lorraine.fr CRAN, UMR 7039, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, Cedex France.

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at www.tandfonline.com/kccy.

© 2016 Taylor & Francis

the ERK-dependent expression of early growth response gene-1.[16] Δ2-TGZ also triggered endoplasmic reticulum (ER) stress followed by apoptosis in both MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Nevertheless, apoptosis did not seem to be a consequence of ER stress in MCF-7 cells.[17]

Serum starvation is an experimental condition applied to limit undesirable effects on cell response due to the complex and non-standardized composition of serum.[18] It is also a routine procedure carried out to synchronize proliferating cells and to reduce basal cellular activity.[18] However, because of the reduction of the level of hormones and growth factors in the culture medium, serum starvation partially mimics the conditions of a metabolic stress.[18] It results in modulations of the cancer cell proteome and transcriptome, with almost 3,000 genes differentially expressed in MDA-MB-231 cells incubated either in 10% FBS (fetal bovine serum) or in 0.1% FBS-containing medium.[19,20] Serum starvation triggers complex and unpredictable time-dependent and cell type-dependent effects, such as cell-cycle arrest and increased sensitivity to apoptosis.[18,19,21]

In this context, culture conditions could influence the response of breast cancer cells to Δ2-TGZ. This compound was tested previously either in high serum conditions (5% or 10% fetal calf serum (FCS)-containing medium)[14, 22] or in a low serum environment (1% or 0% FCS-containing medium).[10,12,13,15-17] Most data from our laboratory were obtained from breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) cultured in 1% FCS-containing medium. In order to determine the impact of serum deprivation, we studied the effects of Δ2-TGZ on cells maintained in 10% FCS-containing medium. Our results show that in these conditions, Δ2-TGZ still induced a decrease in cell numbers but higher concentrations were required to obtain a drop of 50% compared to low serum conditions (1% FCS). Surprisingly, in 10% FCS-conditions, MCF-7 cells were more sensitive to Δ2-TGZ than MDA-MB-231 cells whereas the opposite was observed in 1% FCS conditions. Moreover, Δ2-TGZ induced cell cycle arrest rather than apoptosis, as previously reported in low serum conditions.

Results

Δ2-TGZ decreases less efficiently cell numbers in high serum conditions

At first, we investigated the effects of increasing concentrations of Δ2-TGZ on cell numbers and compared a treatment performed in 10% FCS- versus 1% FCS-containing medium. MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells were treated for 48 h and control cells received DMSO. Crystal violet staining assays revealed that higher concentrations of Δ2-TGZ were required to induce a 50% decrease in cell numbers in high serum conditions compared to low serum conditions (Fig. 1). Indeed, in MDA-MB-231 cells, the IC_{50} was 90.3 ± 4.6 μM in 10% FCS-conditions vs. 7.1 ± 0.5 μM in 1% FCS-conditions. Thus, Δ2-TGZ appeared 12.7-fold less efficient in high serum conditions. Similarly, in the hormone-dependent breast cancer cells MCF-7, the IC_{50} was 57.0 ± 4.4 μM in high serum conditions whereas it was 11.5 ± 0.9 μM in low serum conditions. Thus, in this cell line, Δ2-TGZ appeared 4.95-fold less efficient in high serum conditions. Interestingly, MCF-7 cells were more sensitive to Δ2-TGZ than MDA-MB-231 cells when the treatment was performed in 10% FCS-conditions whereas the opposite was observed in 1% FCS-conditions.

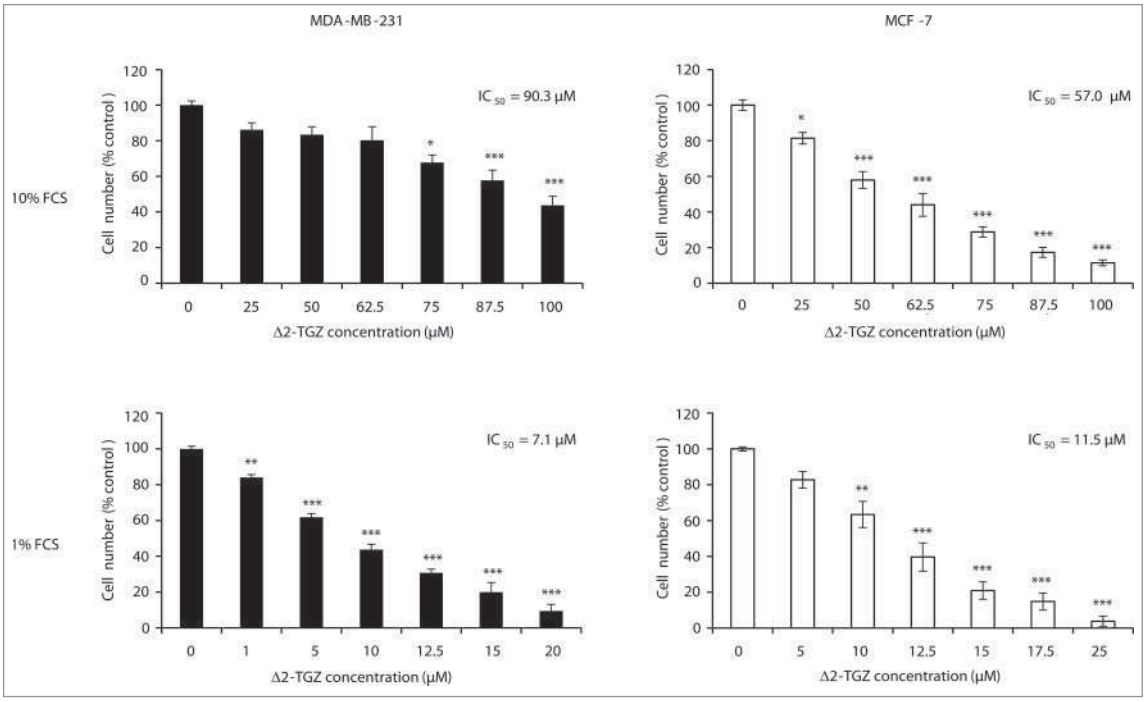

Figure 1. Δ2-TGZ decreases less efficiently cell numbers in high serum conditions. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 48 h with increasing concentrations of Δ2-TGZ in 10% or 1% FCS-containing medium. Control cells were treated with DMSO. Cell numbers were assessed by a crystal violet staining assay and the IC_{50} were determined. Results are depicted as mean ± s.e.m. of three independent counts performed in triplicate. Significant differences with control cells are indicated ($^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$).

Δ2-TGZ inhibits less efficiently cell proliferation in high serum conditions

Then, it was interesting to determine what kind of mechanism was involved in the decrease in cell numbers observed when Δ2-TGZ was applied in 10% FCS-containing medium. So, we used a BrdU incorporation assay to study cell proliferation (Fig. 2). MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 48 h with increasing concentrations of Δ2-TGZ in high (10% FCS-containing medium) or low serum (1% FCS-containing medium) conditions. Control cells were treated with DMSO.

In MDA-MB-231 cells, Δ2-TGZ treatment inhibited BrdU incorporation with an IC_{50} of 70.6 ± 0.8 μM in 10% FCS-conditions versus 3.8 ± 0.6 μM in 1% FCS-conditions. Thus, in this cell line, Δ2-TGZ was 18.6-fold less potent to inhibit cell proliferation in high serum conditions. In MCF-7 cells, BrdU incorporation was inhibited by Δ2-TGZ treatment with an IC_{50} of 58.6 ± 2.6 μM in 10% FCS-conditions vs. 10.4 ± 0.7 μM in 1% FCS-conditions. Thus, in this cell line, Δ2-TGZ was 5.6-fold less efficient to inhibit BrdU incorporation in high serum conditions. Besides, as described above for cell number analysis, when Δ2-TGZ was applied in 10% FCS-containing medium, MCF-7 was the most sensitive of the 2 cell lines whereas MDA-MB-231 was the most sensitive one in low serum conditions.

Δ2-TGZ triggers ER stress in high serum conditions

We have shown recently that Δ2-TGZ triggered ER stress in breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) when applied in low serum conditions.[17] In order to investigate if Δ2-TGZ still induced ER stress in 10% FCS-conditions, cells were treated with Δ2-TGZ during a time course in 10% FCS-containing medium and several players of the unfolded protein response (UPR) pathway that is activated in case of ER stress were studied. We focused on the pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and the eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α) that are responsible for a slowing down of protein translation and the inositol requiring enzyme 1 (IRE1)-dependent X-box-binding protein-1 (*XBP-1*) mRNA cleavage that is required for the synthesis of a highly active transcription factor responsible for the expression of the immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP), a chaperone that binds to unfolded proteins.[23] Δ2-TGZ was used at 75 μM and 60 μM for MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. These values were just above the IC_{50} values determined in BrdU incorporation assays. Control cells received DMSO.

In MDA-MB-231 cells, western blot analysis revealed an enhanced phosphorylation of PERK in case of exposure to Δ2-TGZ (Fig. 3A). Indeed, PERK displayed an electrophoretic mobility shift which was detected in samples collected 6 h after Δ2-TGZ treatment and was total after 72 h. The activation of PERK was confirmed by the phosphorylation of eIF2α on Ser51. Indeed, a 4.2-fold increase in phosphorylation at this site was detected 6 h after Δ2-TGZ treatment, and a 28.2-fold increase after 48 h. The phosphorylated form was still present after 72h. RT-PCR analyses also revealed a cleavage of *XBP-1* mRNA in MDA-MB-231 cells exposed to Δ2-TGZ (Fig. 3B). Indeed both spliced and unspliced *XBP-1* mRNA were detected 6 h after exposure to Δ2-TGZ and only spliced *XBP-1* mRNA were present after 72 h of treatment. Regarding the chaperone BiP, we observed a 6.6-fold induction of its expression after 24 h of treatment with Δ2-TGZ and this induction was still

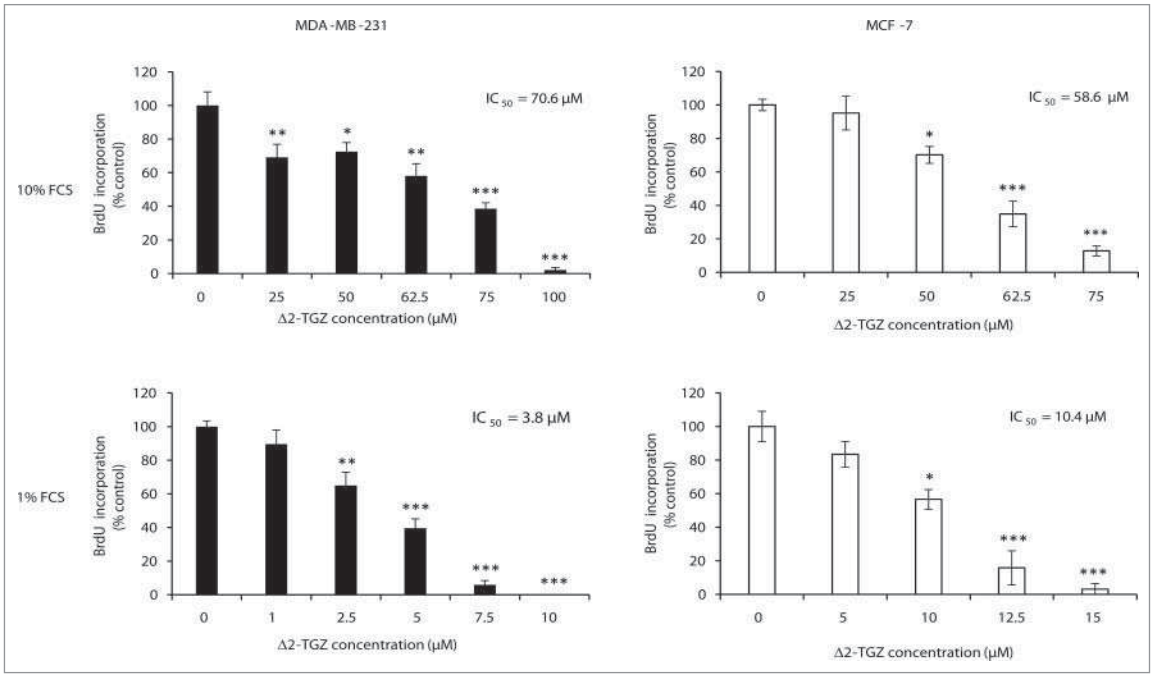

Figure 2. Δ2-TGZ inhibits less efficiently cell proliferation in high serum conditions. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 48 h with increasing concentrations of Δ2-TGZ in high serum (10%) or in low serum (1%) conditions. Control cells were treated with DMSO. Cell proliferation was evaluated by a BrdU incorporation assay using the BrdU Cell Proliferation Assay Kit and the IC_{50} were determined. Results are depicted as mean ± s.e.m. of three independent experiments performed in triplicate. *Significantly different from control cells ($P < 0.05$). **Very significantly different from control cells ($P < 0.01$). ***Extremely significantly different from control cells ($P < 0.001$).

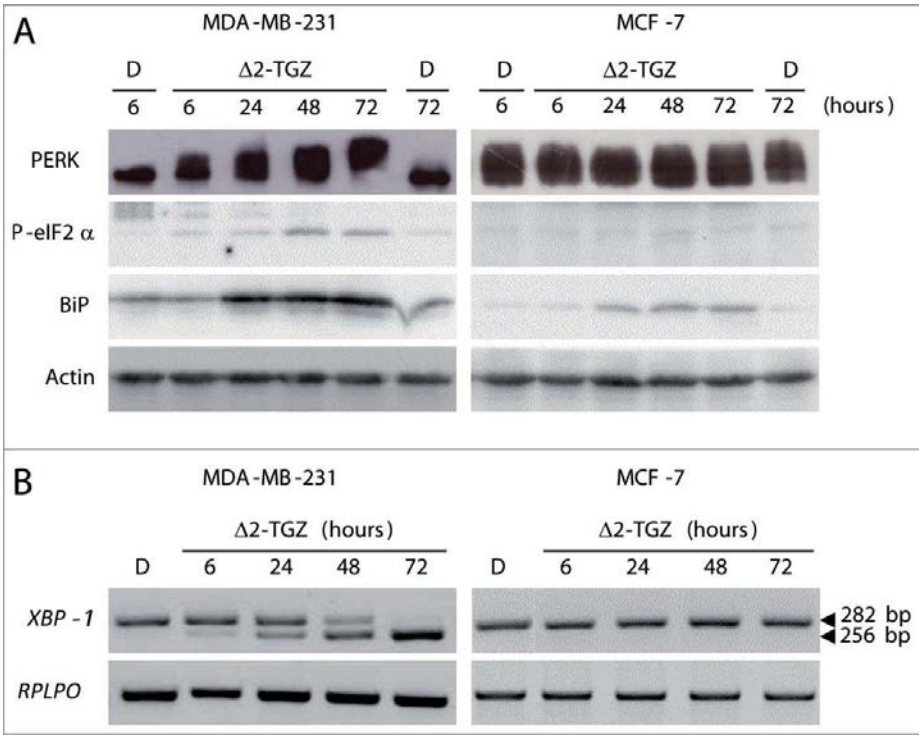

Figure 3. Δ2-TGZ triggers ER stress in high serum conditions. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for indicated times with Δ2-TGZ (75 μM and 60 μM, respectively) or DMSO in 10% FCS containing medium. Cells were harvested for protein (A) or RNA (B) analysis. (A) Western blot analysis was performed using anti-PERK, anti-P-eIF2α and anti-BIP antibodies. Actin was used as a loading control. (B) RT-PCR analysis. For *XBP-1*, the 282 bp-long and 256 bp-long PCR products correspond respectively to the unspliced and spliced forms of the mRNA. The housekeeping gene *RPLP0* was used as a control.

present after 72 h (Fig. 3A). We did not detect any of these events in control cells treated with DMSO.

We also studied the effects of Δ2-TGZ on ER stress in MCF-7 cells in 10% FCS-conditions. Δ2-TGZ did not induce the phosphorylation of PERK since no shift could be detected on protein gel blot whatever the time of treatment (Fig. 3A). We did not observe an increased phosphorylation of eIF2α either (Fig. 3A). Furthermore, no splicing of *XBP-1* mRNA was detected during the time course of Δ2-TGZ treatment (Fig. 3B). Nevertheless, we observed an increase of BiP expression in case of Δ2-TGZ treatment: it reached 1.7-fold at 6 h and 7.1-fold after 24 h. It was maintained after 72 h (Fig. 3A). Control cells did not show any increase of BiP expression.

When UPR is not sufficient to restore ER functions, apoptosis can be initiated. The transcription factor CEBP homologous protein (CHOP) can mediate this event.[24] MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 24 and 48 h with Δ2-TGZ (75 μM and 60 μM, respectively) in 10% FCS-containing medium and control cells received DMSO (Fig. 4). In both cell lines, immunolocalisation studies revealed a nuclear staining after 24 h of Δ2-TGZ treatment which was stronger after 48 h. No nuclear staining was observed in control cells at 24 and 48 h.

Δ2-TGZ induces cell cycle arrest rather than apoptosis in high serum conditions

We showed recently that Δ2-TGZ triggers apoptosis in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells when grown in 1% FCS-containing medium.[17] In order to determine if Δ2-TGZ also induced apoptosis in 10% FCS-conditions, both cell lines were treated for 72 h with Δ2-TGZ (75 μM for MDA-MB-231 cells and 60 μM for MCF-7 cells) in 10% FCS-containing medium. Control cells received DMSO. We also performed a 48 h treatment with the apoptosis inducing agent staurosporine (0.5 μM) as a positive control.

First, we studied by western blot the cleavage of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) that is a caspase substrate (Fig. 5A). In MDA-MB-231 cells exposed to DMSO, no cleaved PARP was detected at 48 h, whereas a residual level of cleaved PARP was present after 72 h. In cells exposed to staurosporine for 48 h, a high level of cleaved PARP was observed. In cells exposed to Δ2-TGZ, we did not observe a cleavage of PARP even after 72 h of treatment. In MCF-7 cells, we did not observe cleaved PARP in control cells exposed to DMSO. In cells exposed to staurosporine for 48 h, a high level of cleaved PARP was observed. The anti-cleaved PARP antibody revealed a faint band in cells treated for 72 h with Δ2-TGZ.

Besides, we also determined the percentage of cells in sub-G_1 phase, corresponding to the apoptotic cells, by flow cytometry (Fig. 5B). In MDA-MB-231 cells, 1.2 ± 0.1% and 1.1 ± 0.1% of control cells were detected in sub-G_1 phase at 48 and 72 h respectively. In cells exposed to Δ2-TGZ, there were 3.8 ± 0.4 and 4.8 ± 0.7% of cells in sub-G_1 phase after 48 and 72 h respectively, suggesting that Δ2-TGZ induced a slight increase of cells in sub-G_1 phase. In MCF-7 cells, 3.4 ± 0.6% of control cells were in sub-G_1 phase at 48 h and this percentage did not vary after 72 h (3.0 ± 0.9%). In cells treated with Δ2-TGZ, we observed 4.7 ± 0.4% of cells in sub-G_1 phase after 48 h and 9.5 ± 1.9% of cells after 72 h, suggesting that Δ2-TGZ

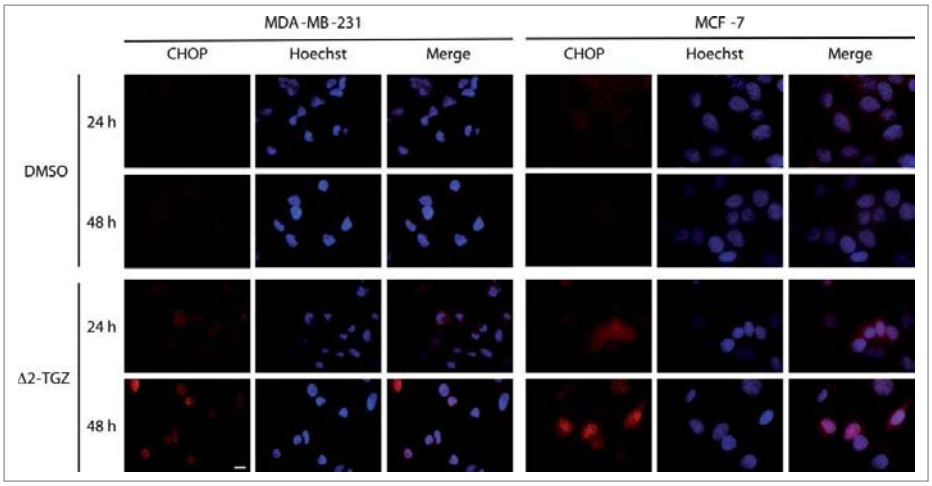

Figure 4. Δ2-TGZ treatment induces the expression of CHOP. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 24 and 48 h with Δ2-TGZ (75 μM for MDA-MB-231 and 60 μM for MCF-7) or DMSO. Cells were fixed and CHOP was immunodetected. Cells were also counterstained with Hoechst dye and the merged pictures are shown for each condition. Bar represents 10 μm.

enhanced the percentage of MCF-7 cells in sub-G_1 phase. Thus, Δ2-TGZ induced a slight increase of apoptotic cells in both cell lines.

Then, we hypothesized that when applied in high serum containing medium, Δ2-TGZ could induce a cell cycle arrest instead of triggering apoptosis. Hence, we determined the percentage of cells in each phase of the cell cycle by flow cytometry (Fig. 5B). In MDA-MB-231 cells, after 48 h of Δ2-TGZ treatment, in comparison to control cells, we observed an increase in the proportion of cells in the G_0/G_1 phase (71.5 ± 0.4% versus 60.0 ± 1.8%) and a decrease in the proportion of cells in the S phase (2.7 ± 0.2% vs. 15.7 ± 0.4%). The situation was similar after 72 h: 69.5 ± 0.2% versus 62.5 ± 0.8% in G_0/G_1 phase and 3.1 ± 0.6% vs. 13.7 ± 0.2% in S phase. The percentages of cells in G_2/M phase were not significantly different between control and treated cells (approximatively 21% of cells in both conditions after 48 and 72 h of treatment). The effects of Δ2-TGZ were similar in MCF-7 cells with an increase in the proportion of cells in the G_0/G_1 phase (80.2 ± 3.1% versus 62.1 ± 2.8%) and a decrease in the proportion of cells in the S phase (1.3 ± 0.2% vs. 13.8 ± 0.9%) after 48 h. After 72 h, the proportions of cells in G_0/G_1 phase and S phase were: 73.3

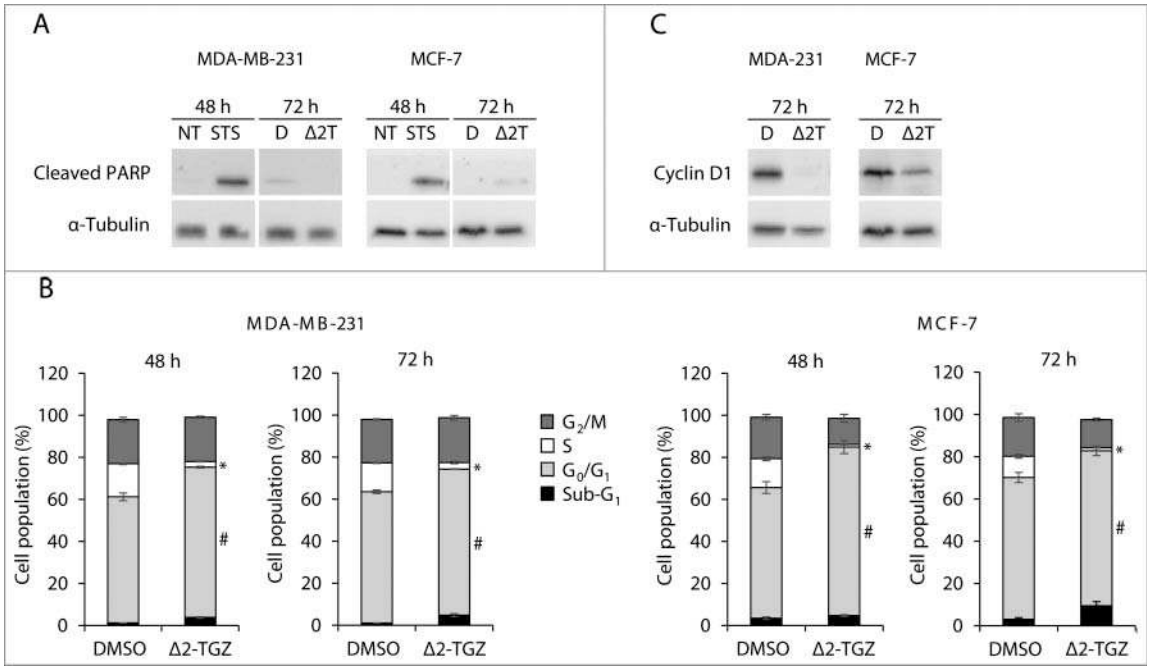

Figure 5. Δ2-TGZ induces cell cycle arrest rather than apoptosis in high serum conditions. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for indicated times with Δ2-TGZ (Δ2T, 75 μM for MDA-MB-231 and 60 μM for MCF-7) or the positive apoptosis control staurosporine (STS, 0.5 μM) in 10% FCS-containing medium. Control cells received DMSO (D; control for Δ2-TGZ treatment) or were non-treated (NT; control for STS treatment). Cells were then harvested for protein analysis (A, C) or fixed for cell cycle analysis (B). (A, C) 50 μg of total proteins were subjected to protein gel blot analysis using anti-cleaved PARP (A) and anti-cyclin D1 (C) antibodies. α-tubulin was used as a loading control. (B) Cells were stained with propidium iodide and the cellular DNA content was analyzed by flow cytometry. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was obtained for each condition. Results are depicted as mean ± s.e.m. of three independent experiments. *Significantly different from control cells in S phase ($P < 0.05$). #Significantly different from control cells in G_0/G_1 phase ($P < 0.05$).

± 2.2% versus 67.2 ± 2.4% and 1.6 ± 0.3% vs. 10.0 ± 0.9%, respectively. In contrast to MDA-MB-231 cells, a low decrease of cells in G_2/M phase was observed in MCF-7 cells treated with Δ2-TGZ: 12.4 ± 1.9 versus 19.7 ± 1.4% at 48 h and 13.3 ± 0.7% vs. 18.4 ± 1.7% at 72 h. Thus, Δ2-TGZ seems to induce a cell cycle arrest in G_0/G_1 phase in both cell lines.

In addition to this flow cytometry analysis, we studied cyclin D1 that is a major player of the G_1/S transition of the cell cycle. Western blot analysis showed that in MDA-MB-231 cells, cyclin D1 was detected in control cells but no signal was observed in cells treated with Δ2-TGZ for 72 h (Fig. 5C). In MCF-7 cells, the level of cyclin D1 was decreased in Δ2-TGZ-treated cells after 72 h (3.2-fold), but a residual level of protein was still detected. Thus, we observed a decrease of cyclin D1 expression in both cell lines after 72 h of treatment with Δ2-TGZ, in agreement with a cell cycle blockage in G_0/G_1 phase.

Discussion

The present study was performed in order to characterize the effects of Δ2-TGZ in high serum containing medium and to determine if serum starvation could influence the response of cancer cells to potential therapeutic agents.

In our previous studies where Δ2-TGZ treatment was performed in 1% FCS-conditions, an ATP-based cell viability assay indicated that after 24 h of treatment, the IC_{50} values were 16.6 μM for MDA-MB-231 cells and 29.7 μM for MCF-7 cells.[12] In the current study, the IC_{50} values obtained by a crystal violet staining assay were 7.1 μM for MDA-MB-231 cells and 11.5 μM for MCF-7 cells after 48 h of treatment in similar low serum conditions (1%). It was not surprising that these values were lower since treatment duration was longer (48 h). Nevertheless, the sensitivity of both cell lines to Δ2-TGZ was approximately the same: MCF-7 cells were 1.79-fold less sensitive than MDA-MB-231 cells after 24 h and 1.62-fold after 48 h. Thus, there was a consistency between our present and previous results although different methods were used to determine IC_{50} values.

Our comparative analysis also revealed a difference of sensitivity of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to Δ2-TGZ depending on the percentage of FCS in culture medium. Interestingly, similar results were obtained with genistein.[25] Indeed, MCF-7 cells were more sensitive than MDA-MB-231 cells when 10 μM of genistein was applied in 10% FCS conditions whereas the opposite situation was observed in 2% FCS conditions. This differential response could be the consequence of the difference of sensitivity of the breast cancer cell lines to growth factors, highly present in FBS. Indeed, triple-negative cells are more responsive to a large range of growth factors than other subtypes, likely modulating their sensitivity to antiproliferative compounds.[26] The higher amount of growth factors present in high serum conditions could also explain that higher concentrations of Δ2-TGZ were required to induce a decrease in cell numbers. These results are in agreement with the study of Yang *et al.* showing that 10 μM of Δ2-TGZ were sufficient to significantly reduce LNCaP prostate cancer cells viability after 24 h of treatment in serum-free conditions whereas no considerable effect was detected with up to 50 μM of Δ2-TGZ in 10% FCS conditions.[11] Thus, the reduced sensitivity of cells to Δ2-TGZ in high serum conditions is not restricted to breast cancer cells. Besides, a study reported that troglitazone, the parent molecule of Δ2-TGZ, activated the ERK pathway and induced $p21^{Cip/WAF1}$ in the colorectal cancer cell lines HCT15 and HT29 with a dose of 200 μM in 10% FBS-conditions, whereas 20 μM of TGZ were enough to induce these effects in 1% FBS-conditions.[27] Moreover, another study showed that a 7-fold increase in the IC_{50} of the antitumor drug Sorafenib (BAY 43–9006, Nexavar) was necessary to inhibit ERK 1/2 phosphorylation in MDA-MB-231 cells in presence of serum, compared to a low protein containing medium (0.1% Bovine Serum Albumin and 0% FCS-containing medium).[28] So, serum starvation enhances the action of Δ2-TGZ and of other antiproliferative compounds in cancer cells.

We further studied the effects of Δ2-TGZ on ER stress. In our previous studies performed in low serum conditions, we showed that Δ2-TGZ treatment was followed early by the activation of PERK/eIF2α and IRE1/XBP-1 axes of the UPR in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells.[17] We also observed in both cell lines a later increase in the expression of the chaperone BiP as well as the induction of CHOP, the latter being translocated in the nucleus. In this context, we showed that ER stress was not causative of apoptosis.[17] In the present work, the same responses were observed in MDA-MB-231 cells that were treated with Δ2-TGZ in high serum conditions. Since no apoptosis was detected, these results reinforced our conclusion on the absence of link between Δ2-TGZ-induced ER stress and apoptosis. In MCF-7 cells, when Δ2-TGZ treatment was performed in 10% FCS-conditions, we observed neither PERK and eIF2α phosphorylation nor the splicing of *XBP-1*. This suggests that MDA-MB-231 cells are more prone to activate ER stress pathways than MCF-7 cells. This is in agreement with our previous studies since in low serum conditions, starvation by itself (in absence of Δ2-TGZ treatment) triggered PERK-eIF2α axis activation in MDA-MB-231 cells. Moreover, we observed a lower amount of spliced *XBP-1* mRNA in MCF-7 cells than in MDA-MB-231 cells after Δ2-TGZ exposure.[17] Similarly, TZD18, a PPARα/γ dual agonist, and the indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet were reported to induce a more extended splicing of *XBP-1* mRNA in MDA-MB-231 cells than in MCF-7 cells.[29,30] Despite a higher susceptibility of MDA-MB-231 cells to ER stress activation than MCF-7 cells, we observed a later increase of BiP expression and CHOP induction in both cell lines in response to Δ2-TGZ in high serum conditions. Since PERK/eIF2α and IRE1/XBP-1 pathways were not activated in MCF-7 cells in 10% FCS conditions, a transcription factor like ATF6 could be involved in the stimulation of BiP and CHOP expressions in these cells.[31]

We then investigated apoptosis since it was triggered by Δ2-TGZ in low serum conditions.[17] In 10% FCS-conditions, Δ2-TGZ induced only a minor apoptotic response in both cell lines, as suggested by the limited cleavage of PARP and the slight increase of cells in sub-G_1 phase. This result was consistent with the effects of other compounds like the natural compound guttiferone F which was shown to trigger apoptosis of LNCaP and PC3 prostate cancer cells in serum-free conditions, whereas no apoptosis was detected in 10% FBS-conditions.[32] In small cell lung cancer cells, the tyrosine kinase inhibitor STI571 did not induce apoptosis in 10% FCS-conditions while this

event appeared in a serum-free medium supplemented with stem cell factor.[33] Nevertheless, apoptosis in high serum conditions could be induced by elevated doses of compounds as suggested for TGZ and resveratrol.[34,35] Indeed, 10 μM of troglitazone was enough to induce DNA fragmentation in 0.1% FCS-conditions, whereas more than 100 μM of TGZ was required in a 10% FCS-containing medium.[34] For resveratrol, 150 μM of compound, instead of 50 μM, were necessary to trigger apoptosis in MCF-7 cells.[35] Thus, we cannot exclude that, in our conditions, doses of Δ2-TGZ above 100 μM would activate an apoptotic response.

An explanation for the differential effect of Δ2-TGZ on apoptosis between low and high serum conditions could arise from a cellular stress triggered by serum starvation. Several data demonstrated that serum deprivation modifies cell physiology by mimicking the conditions of an "environmental stress," resulting in the initiation of different cellular and molecular responses according to the cell type and the duration of starvation.[18] We previously reported that MDA-MB-231 cells grown in low serum conditions displayed partial ER stress with phosphorylation of PERK and eIF2α.[17] Similar culture conditions induced an increase in the production of reactive oxygen species, leading to the initiation of apoptosis of 5123tc rat hepatoma cells.[36] This type of cell death was also detected in HN9.10e hippocampal neuroblasts incubated in 0.2% FBS-containing medium.[37] Furthermore, Levin *et al.* reported in a large study that culture of various human adenocarcinoma cells (breast, pancreatic, colon and ovarian cells) in low serum condition (0.5% FBS), compared to the well-fed condition of growth (10% FBS), led to an augmentation of proteins and phosphoproteins implicated in apoptotic pathways. They reported in particular an increase in p53 and decreases in Bad (Ser155), Bcl-xL and cIAP-1 proteins.[19] Thus, serum starvation could sensitize cancer cells to apoptosis. Nevertheless, some studies also describe the resistance of cancer cells to cell death induced by nutrient/serum deprived conditions. For instance, some members of the transcriptional regulator interacting with the PHD-bromodomain (TRIP-Br) family were reported to be involved in such phenomenon.[38,39] One might suggest that Δ2-TGZ could disturb the molecular mechanisms responsible for this protection against apoptosis.

Rather than apoptosis, we observed that Δ2-TGZ induced in both breast cancer cell lines a cell cycle blockage in G_0/G_1 phase, with a concomitant decrease of the number of cells in S phase, which is consistent with the inhibition of BrdU incorporation observed after 48 h of treatment. Similarly, in MDA-MB-435 breast carcinoma cells, 50 μM of TGZ induced the cell cycle arrest in G_0/G_1 phase after 64 h of treatment.[40] This G_0/G_1 arrest was in agreement with the reduced level of cyclin D1 since this protein is required for driving the G_1/S transition.[12,41] This is probably the result of proteolysis of cyclin D1 through an ubiquitin-dependent mechanism implicating the F-box protein β-transducin repeat-containing protein (β-TrCP) which has been described in several studies.[42,43]

To conclude, the present study shows that in high serum conditions (10% FCS), Δ2-TGZ still displayed anticancer effects on MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. MCF-7 cells were more sensitive to Δ2-TGZ than MDA-MB-231 cells in high serum conditions, whereas the opposite situation was observed in low serum conditions. Besides, Δ2-TGZ induced cytostatic effects in high serum conditions whereas apoptosis occurred in low serum conditions. This is in accordance with studies suggesting that serum starvation, as well as short-term starvation (glucose and serum restriction), enhanced the action of diverse chemotherapeutic agents in various cancer cells.[6,44] mTOR pathway could be involved in this process since it is inhibited in low serum conditions and mTOR inhibitors like rapamycin sensitize cancer cells to anticancer drugs.[45,46] Then, it could be on purpose to test the potentiating effect of the co-treatment rapamycin/Δ2-TGZ on breast cancer cells. Moreover, the starvation-based method was named the differential stress resistance since it potentiated the action of the chemotherapeutic agent toward cancer cells while being less deleterious for normal cells.[47] This condition could be taken into account for *in vivo* experiments in which Δ2-TGZ or its derivatives will be tested.

Materials and methods

Cell lines and reagents

MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection. Both cell lines were grown at 37°C under 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, 41965–039) for MCF-7 and Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Thermo Fisher Scientific, 21875–034) for MDA-MB-231. These phenol red containing media were supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) and fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich).

Δ2-TGZ was synthetized according to experimental procedures described previously.[48] The identity and purity of this compound were verified by proton nuclear magnetic resonance and elemental analysis. Δ2-TGZ was dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO). DMSO and staurosporine (STS) were obtained from Sigma-Aldrich.

Treatments

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded at the appropriate density in their respective medium supplemented with 10% FCS and incubated for 24 h to allow cell attachment. For crystal violet staining and BrdU incorporation assays, cells were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^4 cells/well (MDA-MB-231 cells) or 1.5×10^4 cells/well (MCF-7 cells). For Western immunoblotting analysis, cells were seeded in 60 mm-diameter culture dishes (6.5×10^5 cells/dish for MDA-MB-231 and 4.75×10^5 cells/dish for MCF-7). For RT-PCR analysis, cells were seeded in 12-well plates at a density of 1.8×10^5 cells/well (MDA-MB-231 cells) or 1.6×10^5 cells/well (MCF-7 cells). For immunofluorescence experiments, MDA-MB-231 cells (1.8×10^5) and MCF-7 cells (1.6×10^5) were seeded on glass coverslips in 12-well plates. For FACS analysis, cells were seeded in 25 cm^2 culture flasks (6.5×10^5 cells/flask for MDA-MB-231 and 5×10^5 cells/flask for MCF-7).

The cells were then treated in their respective media supplemented with either 1 or 10% FCS according to the experiment during various durations with either Δ2-TGZ, DMSO or STS at

the indicated concentrations. Each treatment was repeated at least 3 times.

Crystal violet staining assay

At the end of the treatment, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then fixed and stained for 20 min with 0.2% crystal violet (Sigma-Aldrich, C6158) in 2% ethanol. This staining solution was filtered prior to use with a syringe-driven filter unit (0.22 μm pore size, Millipore, SLGP033RS) to eliminate dye precipitates. Cells were then washed with distilled water to remove excess dye. The plates were dried and the dye was dissolved in 10% acetic acid. Cell number was determined by absorbance at 595 nm with a VICTOR^{TM} X3 multilabel plate reader (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). In each condition, the concentration leading to a decrease of 50% of the cell number (IC_{50}) was determined.

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay

Cell proliferation was measured using the BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Millipore, 2752) according to the manufacturer's instructions. Twenty μL of BrdU label solution were added to each well 24 h prior to the end of the treatment. The amount of BrdU incorporated in the cells was measured by absorbance at 450 nm with a VICTOR^{TM} X3 multilabel plate reader (PerkinElmer). In each condition, the concentration leading to a decrease of 50% of the BrdU incorporation (IC_{50}) was determined.

Western immunoblotting

At the end of the treatment, adherent cells were scraped in the culture medium containing the non-adherent cells and all cells were collected by centrifugation at 1000 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was rinsed with PBS and resuspended in 20 μL of lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors (cOmplete^{TM} Mini, Roche, Sigma-Aldrich, 11836153001) and phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, Calbiochem, Millipore, 524629). The cell lysate was clarified by centrifugation at 1000 rpm for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, 5000006).

50 μg of total proteins were mixed with 5× Laemmli buffer, heated (95°C, 5 min) and subjected to 12% SDS-PAGE (7% in case of PERK analysis). After electrophoresis, proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (Amersham, GE Healthcare Life science, 10600003). The homogeneity of loaded amounts and transfer efficiency were checked by Ponceau S staining of nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in TNT buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powder milk for 2 h at room temperature to reduce nonspecific binding of antibodies. They were then incubated with the primary antibodies diluted in the blocking solution overnight at 4°C. The rabbit monoclonal antibodies anti-BiP (United States Biological, Euromedex, B1770) and anti-PERK (Cell Signaling Technology, Ozyme, clone C33E10, 3192), the rabbit polyclonal antibodies anti-phospho (Ser51) eIF2α (Signalway Antibody, Euromedex, 11279), anti-α-Tubulin (GeneTex, Euromedex, GTX102079) and anti-cyclin D1 (GeneTex, GTX108624), the mouse monoclonal antibody anti-cleaved PARP (Asp214) (BD Pharmingen™, BD Biosciences, 552596) and the goat polyclonal antibody anti-Actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-1615) were diluted at 1:1000. Next, membranes were washed 3 times with TNT and incubated for 1 h with appropriate peroxidase-linked secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004, sc-2005, sc-2020) at room temperature. After three washings with TNT, membranes were developed with the Clarity™ Western ECL Substrate detection reagent (Bio-Rad Laboratories, 170–5061) using chemiluminescence and observed with a ChemiDoc™ XRS imaging system (Bio-Rad Laboratories, Marne-la-Coquette, France). Western blots were then subjected to quantification using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). The ratio between the intensity of the band of interest and actin or α-tubulin was calculated to obtain the level of induction of the protein of interest after treatment. For PERK electrophoretic mobility shift detection, blots were developed on X-ray films (Amersham, GE Healthcare Life science, 28-9888-21).

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

At the end of the treatment, total RNA was extracted using TRIzol® Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 15596018) according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was determined with a spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). For cDNA synthesis, 1 μg of RNA was mixed with 300 ng of random primers (Invitrogen, 48190011) in a final volume of 13 μL and incubated for 5 min at 65°C. The mixture was then supplemented with 1× Reaction Buffer, 1 mM of each dNTP and 200 U of RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, EP0451) for a final volume of 20 μL. The mixture was incubated for 10 min at 25°C, for 60 min at 42°C and subsequently for 10 min at 70°C in order to stop the reaction.

The cDNA were further amplified by PCR. The specific primers sequences are as follows : *XBP-1* (NM_005080) forward 5′-TTACGAGAGAAAACTCATGGC-3′, reverse 5′-GGGTCC AAGTTGTCCAGAATGC-3′, PCR products length 282/256 base pairs (bp); *RPLP0* (NM_053275) forward 5′-ACAACC-CAGCTCTGGAGAAA-3′, reverse 5′-TCGTTTGTACCCGTT-GATGA-3′, PCR product length 530 bp. PCR was carried out in a thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a final volume of 25 μL containing 2 μL of cDNA, 1× Reaction Buffer (without Mg), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP mix, 0.2 μM of each primer and 2.5 U of EconoTaq® DNA Polymerase (Lucigen, Euromedex, 30032–1). Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: (1) initial denaturation at 95°C for 2 min; (2) 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 45 s. Five PCR cycles were performed. (3) 95°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 45 s. Twenty five PCR cycles were performed, with the exception of the housekeeping gene *RPLP0* (ribosomal protein, large, P0) which was amplified with 20 cycles. (4) 10 min extension step at 72°C. The number of cycles was chosen to realize the analysis

in the linear phase of the PCR reaction. 25 μL of the PCR product were mixed with loading buffer (5 μL) and 15 μL of the mixture were submitted to electrophoresis in a 1% agarose gel (3% in case of *XBP-1* analysis) at 100 V for 30 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories).

Immunocytochemistry

At the end of the treatment, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min at room temperature. After three washings with PBS, cells were permeabilized for 10 min in PBS containing 0.5% Triton X-100, washed 3 times with PBS and incubated for 30 min in a blocking solution (0.1% Triton X-100, 4% bovine serum albumin in PBS buffer) to reduce nonspecific binding of antibodies. Preparations were then incubated with the mouse monoclonal antibody anti-CHOP (SC-7351, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:100 in the blocking solution overnight at 4°C. They were then washed 3 times in PBS/0.1% Triton X-100 and exposed for 1 h in the dark to Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen, A-21422) diluted at 1:1000 in PBS/0.1% Triton X-100. Finally, cells were rinsed 3 times with PBS and counterstained with Hoechst dye (Sigma-Aldrich, 17535-AAT) to visualize nuclei. Fluorescence labeling was observed under an Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Images were collected using LuciaG 4.81 software (Nikon).

Cell cycle analysis

At the end of the treatment, culture medium containing the non-adherent cells was collected. Adherent cells were washed with PBS, trypsined (0.05% trypsin-EDTA in PBS buffer, Thermo Fisher Scientific, 15400054) and resuspended in a medium containing 10% FCS. Non-adherent cells and trypsined cells were pooled and counted using a TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories). 1×10^6 cells were centrifuged at 500 g for 5 min at room temperature and the pellet was rinsed with PBS. Cells were then resuspended in 600 μL of PBS and 1,400 μL of cold absolute ethanol were added dropwise while vortexing the suspension to permeabilize and fix the cells efficiently. 5×10^5 cells were then centrifugated at 800 g for 10 min at room temperature. The pellet was resuspended in 500 μL of DNA staining solution containing 200 μg of RNAse A (Invitrogen, 12091021) and 2 μg of propidium iodide (PI) (Life Technologies˜, Thermo Fisher Scientific, P3566). Samples were incubated for 15 min in the dark at room temperature. Finally, cellular DNA content was determined with a BD FACSCalibur˜ flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) using CellQuest™ Pro software (BD Biosciences). 20,000 events were analyzed and the percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined.

Statistical analysis

The results of crystal violet staining assays, BrdU incorporation assays and those of cell cycle analysis were depicted as mean ± standard error of the mean (s.e.m) of at least 3 independent experiments. Statistical tests were performed using GraphPad InStat software. Data from BrdU incorporation and crystal violet staining assays were analyzed performing one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post test for multiple comparisons. Differences in which P-value was less than 0.05, 0.01 or 0.001 were statistically significant, very significant or extremely significant respectively. The results of cell cycle analysis were examined using a 2-tailed paired t test. Differences in which P-value was less than 0.05 were statistically significant.

Abbreviations

Δ2-TGZ	Δ2-Troglitazone
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein
BrdU	bromodeoxyuridine
CHOP	transcription factor CEBP homologous protein
cIAP-1	cellular inhibitor of apoptosis protein-1
DMSO	dimethyl sulfoxide
eIF2α	eukaryotic initiation factor 2α
ER	endoplasmic reticulum
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PERK	pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
STS	staurosporine
TGZ	troglitazone
TRIP-Br	transcriptional regulator interacting with the PHD-bromodomain
TZD	thiazolidinedione
UPR	unfolded protein response
XBP-1	X-box-Binding Protein1

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Alexandra Kleinclauss and Martine Chillet for technical assistance.

Funding

This work was supported by grants of the Université de Lorraine, CNRS, the Conseil Régional de Lorraine. Audrey Berthe was recipient of a PhD grant of the "Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche."

ORCID

Audrey Berthe http://orcid.org/0000-0002-7514-2682

References

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015; 136:E359-86; PMID:25220842; http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29210

[2] Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. Am Fam Physician 2010; 81:1339-46; PMID:20521754

[3] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005; 365:1687-717; PMID:15894097; http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0

[4] Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. Expert Rev Anticancer Ther 2011; 11:263-75; PMID:21342044; http://dx.doi.org/10.1586/era.10.226

[5] Schmadeka R, Harmon BE, Singh M. Triple-negative breast carcinoma: current and emerging concepts. Am J Clin Pathol 2014; 141:462-77; PMID:24619745; http://dx.doi.org/10.1309/AJCPQN8GZ8SILKGN

[6] Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, Pistoia V, Wei M, Hwang S, Merlino A, et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. Science translational medicine 2012; 4:124ra27; PMID:22323820; http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3003293

[7] Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. Diabet Med 1999; 16:179-92; PMID:10227562; http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-5491.1999.00023.x

[8] Wei S, Yang J, Lee SL, Kulp SK, Chen CS. PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones. Cancer Lett 2009; 276:119-24; PMID:18790559; http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.008

[9] Grillier-Vuissoz I, Mazerbourg S, Boisbrun M, SK Chapleur Y, Flament S. PPARγ-independent Activity of Thiazolidinediones: A PromisingMechanism of action for new anticancer drugs? Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis 2012; S8(2). Open access http://www.omicsonline.org/ppar-independent-activity-of-thiazolidinediones-a-promising-mechanism-of-action-for-new-anticancer-drugs-2157-2518.S8-002.php?aid=4245

[10] Shiau CW, Yang CC, Kulp SK, Chen KF, Chen CS, Huang JW. Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. Cancer Res 2005; 65:1561-9; PMID:15735046; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1677

[11] Yang CC, Ku CY, Wei S, Shiau CW, Chen CS, Pinzone JJ, Ringel MD, Chen CS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent repression of prostate-specific antigen expression by thiazolidinediones in prostate cancer cells. Mol Pharmacol 2006; 69:1564-70; PMID:16452400; http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.018333

[12] Colin C, Salamone S, Grillier-Vuissoz I, Boisbrun M, Kuntz S, Lecomte J, Chapleur Y, Flament S. New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat 2010; 124:101-10; PMID:20054646; http://dx.doi.org/10.1007/s10549-009-0700-y

[13] Lecomte J, Flament S, Salamone S, Boisbrun M, Mazerbourg S, Chapleur Y, Grillier-Vuissoz I. Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat 2008; 112:437-51; PMID:18204896; http://dx.doi.org/10.1007/s10549-007-9886-z

[14] Huang JW, Shiau CW, Yang YT, Kulp SK, Chen KF, Brueggemeier RW, Shapiro CL, Chen CS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. Mol Pharmacol 2005; 67:1342-8; PMID:15653552; http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.007732

[15] Weng JR, Chen CY, Pinzone JJ, Ringel MD, Chen CS. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multifacets of the antitumor effect of thiazolidinediones. Endocr Relat Cancer 2006; 13:401-13; PMID:16728570; http://dx.doi.org/10.1677/erc.1.01182

[16] Chbicheb S, Yao X, Rodeau JL, Salamone S, Boisbrun M, Thiel G, Spohn D, Grillier-Vuissoz I, Chapleur Y, Flament S, et al. EGR1 expression: a calcium and ERK1/2 mediated PPARgamma-independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. Biochem Pharmacol 2011; 81:1087-97; PMID:21338579; http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.02.006

[17] Colin-Cassin C, Yao X, Cerella C, Chbicheb S, Kuntz S, Mazerbourg S, Boisbrun M, Chapleur Y, Diederich M, Flament S, et al. PPARgamma-inactive Delta2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. Mol Carcinog 2015; 54:393-404; PMID:24293218; http://dx.doi.org/10.1002/mc.22109

[18] Pirkmajer S, Chibalin AV. Serum starvation: caveat emptor. Am J Physiol Cell Physiol 2011; 301:C272-9; PMID:21613612; http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00091.2011

[19] Levin VA, Panchabhai SC, Shen L, Kornblau SM, Qiu Y, Baggerly KA. Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines. J Proteome Res 2010; 9:179-91; PMID:19894763; http://dx.doi.org/10.1021/pr900392b

[20] Kim SW, Kim SJ, Langley RR, Fidler IJ. Modulation of the cancer cell transcriptome by culture media formulations and cell density. Int J Oncol 2015; 46:2067-75; PMID:25776572

[21] Shin JS, Hong SW, Lee SL, Kim TH, Park IC, An SK, Lee WK, Lim JS, Kim KI, Yang Y, et al. Serum starvation induces G1 arrest through suppression of Skp2-CDK2 and CDK4 in SK-OV-3 cells. Int J Oncol 2008; 32:435-9; PMID:18202766

[22] Wei S, Lin LF, Yang CC, Wang YC, Chang GD, Chen H, Chen CS. Thiazolidinediones modulate the expression of beta-catenin and other cell-cycle regulatory proteins by targeting the F-box proteins of Skp1-Cul1-F-box protein E3 ubiquitin ligase independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Mol Pharmacol 2007; 72:725-33; PMID:17569795; http://dx.doi.org/10.1124/mol.107.035287

[23] Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. Int Rev Cell Mol Biol 2013; 301:215-90; PMID:23317820; http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1

[24] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO Rep 2006; 7:880-5; PMID:16953201; http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400779

[25] Dampier K, Hudson EA, Howells LM, Manson MM, Walker RA, Gescher A. Differences between human breast cell lines in susceptibility towards growth inhibition by genistein. Br J Cancer 2001; 85:618-24; PMID:11506505; http://dx.doi.org/10.1054/bjoc.2001.1980

[26] Niepel M, Hafner M, Pace EA, Chung M, Chai DH, Zhou L, Muhlich JL, Schoeberl B, Sorger PK. Analysis of growth factor signaling in genetically diverse breast cancer lines. BMC Biol 2014; 12:20; PMID:24655548; http://dx.doi.org/10.1186/1741-7007-12-20

[27] Kim JA, Park KS, Kim HI, Oh SY, Ahn Y, Oh JW, Choi KY. Troglitazone activates p21Cip/WAF1 through the ERK pathway in HCT15 human colorectal cancer cells. Cancer Lett 2002; 179:185-95; PMID:11888673; http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00869-2

[28] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, et al. BAY 43–9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. Cancer Res 2004; 64:7099-109; PMID:15466206; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1443

[29] Zang C, Liu H, Bertz J, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E, Eucker J. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor

alpha/gamma, in human breast cancer cells. Mol Cancer Ther 2009; 8:2296-307; PMID:19671747; http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0347

[30] Galluzzi L, De Santi M, Crinelli R, De Marco C, Zaffaroni N, Duranti A, Brandi G, Magnani M. Induction of endoplasmic reticulum stress response by the indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet in human breast cancer cell lines. PLoS One 2012; 7:e43249; PMID:22905241; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043249

[31] Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol 2000; 20:6755-67; PMID:10958673; http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.18.6755-6767.2000

[32] Li X, Lao Y, Zhang H, Wang X, Tan H, Lin Z, Xu H. The natural compound Guttiferone F sensitizes prostate cancer to starvation induced apoptosis via calcium and JNK elevation. BMC Cancer 2015; 15:254; PMID:25885018; http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1292-z

[33] Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. Clin Cancer Res 2000; 6:3319-26; PMID:10955819

[34] Ohta K, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:2170-7; PMID:11344222

[35] Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernandez-Salguero PM. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. Biochem Pharmacol 2002; 64:1375-86; PMID:12392819; http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01296-0

[36] Pandey S, Lopez C, Jammu A. Oxidative stress and activation of proteasome protease during serum deprivation-induced apoptosis in rat hepatoma cells; inhibition of cell death by melatonin. Apoptosis 2003; 8:497-508; PMID:14601556; http://dx.doi.org/10.1023/A:1025542424986

[37] Voccoli V, Mazzoni F, Garcia-Gil M, Colombaioni L. Serum-withdrawal-dependent apoptosis of hippocampal neuroblasts involves Ca++ release by endoplasmic reticulum and caspase-12 activation. Brain Res 2007; 1147:1-11; PMID:17399692; http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.145

[38] Jung S, Li C, Duan J, Lee S, Kim K, Park Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Cheon CI, et al. TRIP-Br1 oncoprotein inhibits autophagy, apoptosis, and necroptosis under nutrient/serum-deprived condition. Oncotarget 2015; 6:29060-75; PMID:26334958

[39] Li C, Jung S, Lee S, Jeong D, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Cheon CI, Kim C, Kang YS, et al. Nutrient/serum starvation derived TRIP-Br3 down-regulation accelerates apoptosis by destabilizing XIAP. Oncotarget 2015; 6:7522-35; PMID:25691055; http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3112

[40] Lu M, Kwan T, Yu C, Chen F, Freedman B, Schafer JM, Lee EJ, Jameson JL, Jordan VC, Cryns VL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists promote TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest. J Biol Chem 2005; 280:6742-51; PMID:15569667; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411519200

[41] Yang K, Hitomi M, Stacey DW. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. Cell Div 2006; 1:32; PMID:17176475; http://dx.doi.org/10.1186/1747-1028-1-32

[42] Wei S, Yang HC, Chuang HC, Yang J, Kulp SK, Lu PJ, Lai MD, Chen CS. A novel mechanism by which thiazolidinediones facilitate the proteasomal degradation of cyclin D1 in cancer cells. J Biol Chem 2008; 283:26759-70; PMID:18650423; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M802160200

[43] Wei S, Chu PC, Chuang HC, Hung WC, Kulp SK, Chen CS. Targeting the oncogenic E3 ligase Skp2 in prostate and breast cancer cells with a novel energy restriction-mimetic agent. PLoS One 2012; 7:e47298; PMID:23071779; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047298

[44] Shi Y, Felley-Bosco E, Marti TM, Orlowski K, Pruschy M, Stahel RA. Starvation-induced activation of ATM/Chk2/p53 signaling sensitizes cancer cells to cisplatin. BMC Cancer 2012; 12:571; PMID:23211021; http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-571

[45] Hanly EK, Bednarczyk RB, Tuli NY, Moscatello AL, Halicka HD, Li J, Geliebter J, Darzynkiewicz Z, Tiwari RK. mTOR inhibitors sensitize thyroid cancer cells to cytotoxic effect of vemurafenib. Oncotarget 2015; 6:39702-13; PMID:26284586

[46] Leontieva OV, Blagosklonny MV. DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. Aging 2010; 2:924-35; PMID:21212465; http://dx.doi.org/10.18632/aging.100265

[47] Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:8215-20; PMID:18378900; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0708100105

[48] Salamone S, Colin C, Grillier-Vuissoz I, Kuntz S, Mazerbourg S, Flament S, Martin H, Richert L, Chapleur Y, Boisbrun M. Synthesis of new troglitazone derivatives: anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. Eur J Med Chem 2012; 51:206-15; PMID:22409968; http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.02.044

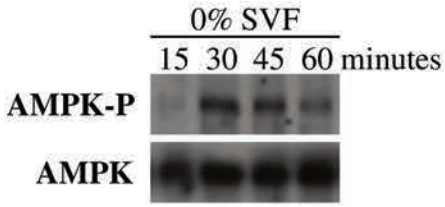

Figure 47 : Une privation de sérum induit l'activation du senseur énergétique AMPK. Les cellules MCF-7 ont été incubées pendant les temps indiqués dans un milieu de culture ne contenant pas de sérum de veau fœtal (0% SVF). A la fin de la culture, les protéines totales ont été extraites et soumises à un western blot afin d'analyser la phosphorylation d'AMPK. L'homogénéité des dépôts a été vérifiée en utilisant comme référence l'AMPK totale.

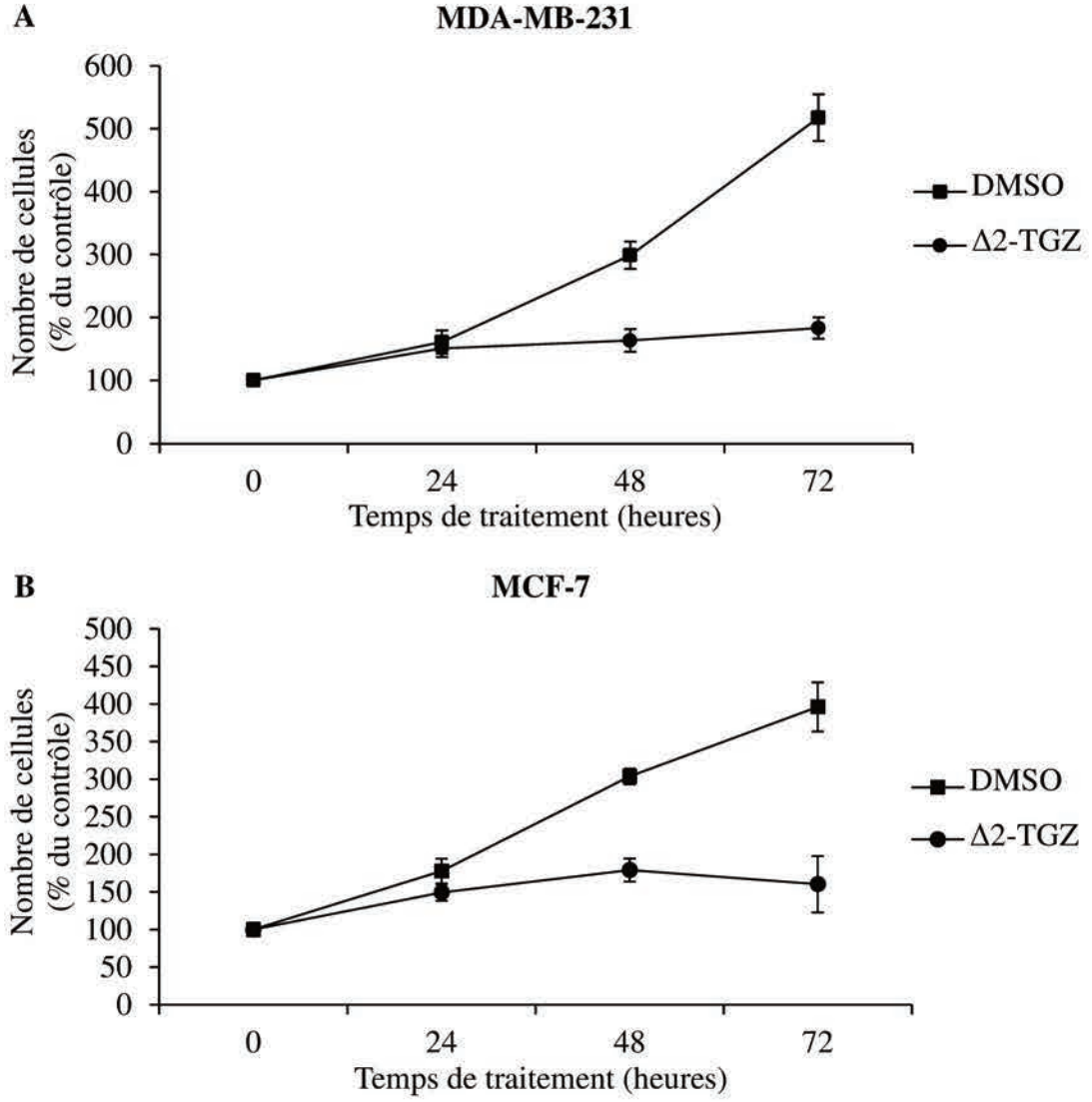

Figure 48 : La Δ2-TGZ provoque une stagnation du nombre de cellules au cours du temps. Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été traitées pendant 24, 48 et 72 h avec une dose fixe de Δ2-TGZ (75 µM pour les MDA-MB-231 et 60 µM pour les MCF-7) ou de DMSO (0,15% pour les MDA-MB-231 et 0,12% pour les MCF-7). Les cellules contrôles étaient non traitées. A la fin du traitement, le nombre de cellules a été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (ESM) d'au moins trois expériences indépendantes.

4. Résultats complémentaires

4.1 Etude du senseur énergétique AMPK dans des conditions de culture restrictives en sérum

Nous avons souhaité vérifier qu'une privation des cellules en sérum peut entraîner un stress métabolique qui peut être évalué par le suivi du niveau de phosphorylation du senseur énergétique AMPK (Haigis and Sinclair 2010). Les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 ont été incubées pendant 15, 30, 45 et 60 min dans un milieu de culture ne contenant pas de sérum de veau fœtal (milieu 0% SVF). Ensuite, nous avons étudié par western blot le niveau de phosphorylation d'AMPK sur la thréonine 172, cette phosphorylation étant nécessaire à l'activation de la protéine kinase (Krishan *et al.* 2015). Une augmentation de la phosphorylation d'AMPK est visible dès 30 min de culture dans un milieu 0% SVF (Figure 47). Cette phosphorylation est maintenue après 45 minutes d'incubation, puis elle diminue progressivement après 60 minutes. AMPK est donc activé en réponse à une privation des cellules en sérum, suggérant ainsi que des conditions restrictives en sérum peuvent provoquer un stress métabolique dans les cellules cancéreuses mammaires.

4.2 Etude des effets de la Δ2-TGZ sur le nombre de cellules au cours d'une cinétique de traitement

Les effets dose-dépendants de la Δ2-TGZ ont été étudié à 48h et cela nous a permis de définir l'IC_{50} de la molécule (voir l'article ci-dessus). Durant cette étude, nous avons également analysé les effets antiprolifératifs de la molécule sur plusieurs jours de traitement dans un milieu de culture contenant 10% de SVF. Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été traitées pendant 24, 48 et 72 heures avec une dose fixe de Δ2-TGZ (75 et 60 µM respectivement) ou de DMSO (0,15 et 0,12% respectivement). Le nombre de cellules a ensuite été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Dans les cellules ayant reçu du DMSO, le nombre de cellules augmente progressivement au cours du temps (Figure 48). Par contre, dans les cellules traitées avec la Δ2-TGZ, le nombre de cellules a tendance à se stabiliser et ne plus augmenter après 24 heures de traitement. La Δ2-TGZ induit donc une stagnation du nombre de cellules au cours du temps, ce qui est en accord avec ses effets cytostatiques en conditions 10% SVF.

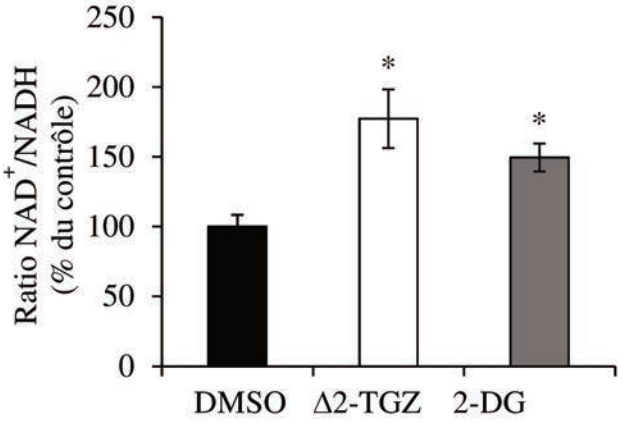

Figure 49 : La Δ2-TGZ et le 2-DG induisent une augmentation du ratio NAD^+/NADH. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 h avec 75 µM de Δ2-TGZ ou 5 mM de 2-DG. Les cellules contrôles ont reçu du DMSO (0,15 %). A l'issue du traitement, les cellules ont été lysées et les quantités de NAD^+ et NADH ont été déterminées en utilisant le kit NAD/NADH-Glo™ Assay (Promega), basé sur de la chimioluminescence. Le ratio $NAD^{+/}$NADH a ensuite été calculé pour chaque condition. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM de trois expériences indépendantes, réalisées chacune en duplicat. Les différences significatives entre les cellules témoins et traitées sont indiquées (*, $P < 0,05$; test de Student).

II. ETUDE DES EFFETS DE LA Δ2-TGZ SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES MDA-MB-231

Comme indiqué dans le paragraphe III.5 de l'introduction, les effets anticancéreux des TZDs pourraient être associés à une modification du métabolisme énergétique. Ces composés sont en effet capables d'induire un blocage de la glycolyse ou bien d'altérer l'activité mitochondriale (Feinstein *et al.* 2005, Wei *et al.* 2010). Dans cette partie de mon travail, l'objectif a donc été d'étudier les effets de la Δ2-TGZ sur le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires. La lignée cellulaire triple-négative MDA-MB-231 a été utilisée comme modèle d'étude.

1. Etude du métabolisme énergétique dans sa globalité

Lorsque le métabolisme énergétique d'une cellule est perturbé, des variations du ratio NAD^+/NADH peuvent être observées (Christensen *et al.* 2014). Nous avons donc commencé par étudier le ratio NAD^+/NADH. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 heures avec 75 µM de Δ2-TGZ, 5 mM de 2-Déoxyglucose (2-DG) ou du DMSO (0,15%). Le 2-DG a servi de contrôle positif capable de perturber le métabolisme énergétique des cellules en ciblant la glycolyse. Après 24 heures de traitement, la Δ2-TGZ et le 2-DG induisent une augmentation significative du ratio NAD^+/NADH (Figure 49).

La Δ2-TGZ modifie donc le métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231. Cela pourrait résulter d'une action sur la glycolyse et/ou sur la fonction mitochondriale, qui sont les deux voies principales du métabolisme énergétique dans une cellule. Nous avons donc évalué les effets de la Δ2-TGZ sur ces deux voies.

2. Etude de la respiration mitochondriale

Afin d'étudier les effets de la Δ2-TGZ sur la fonction mitochondriale, nous avons évalué l'activité respiratoire des cellules MDA-MB-231, en mesurant la consommation d'oxygène des cellules par oxygraphie (électrode de Clark). Nous avons tout d'abord déterminé la consommation basale d'oxygène des cellules, qui correspond à la consommation d'oxygène endogène (c'est-à-dire sans apport de substrats exogènes). Les cellules ont été traitées avec 75 µM de Δ2-TGZ ou du DMSO. Après 24 heures de traitement avec la Δ2-TGZ, la consommation d'oxygène endogène des cellules est réduite pratiquement de moitié (Figure 50A). Le composé semble donc altérer la respiration mitochondriale.

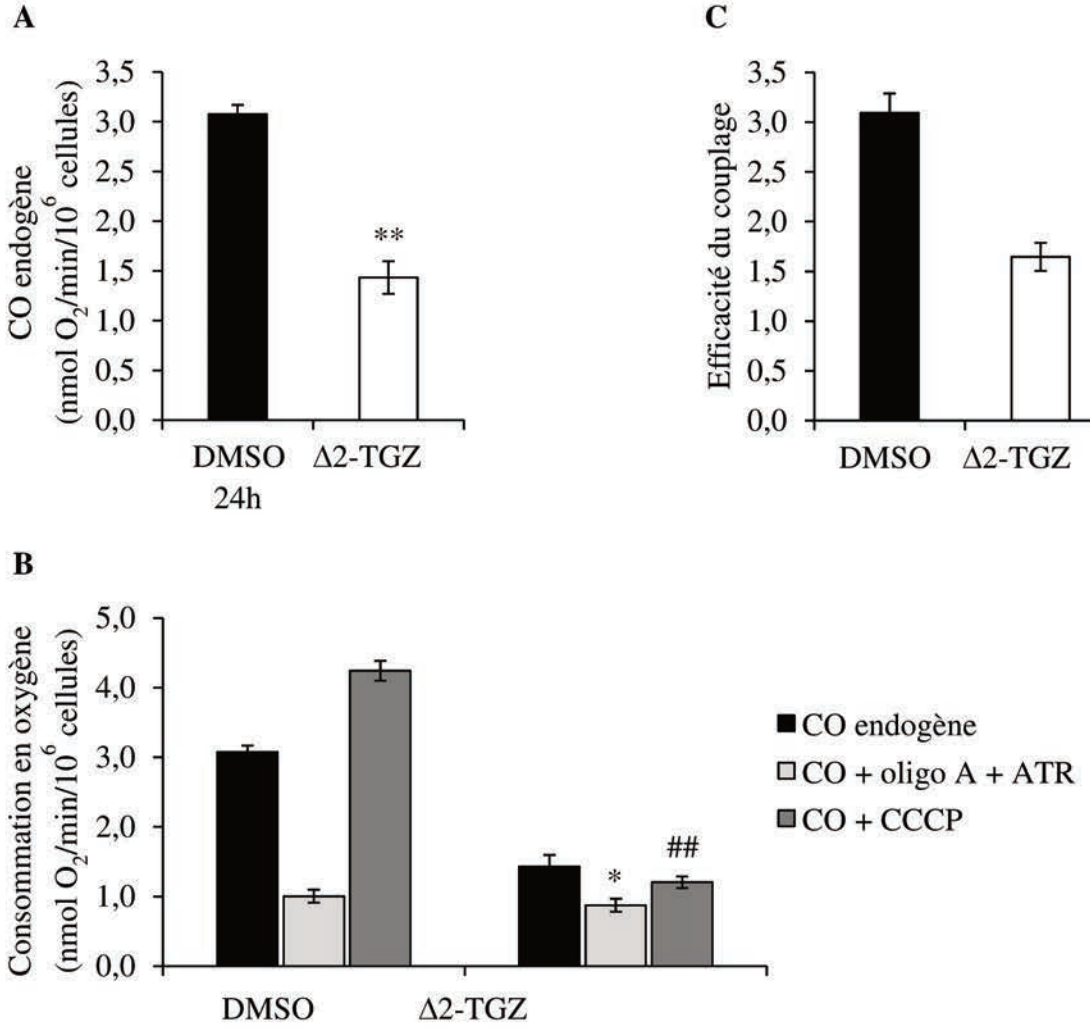

Figure 50 : La Δ2-TGZ altère la respiration mitochondriale. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 h avec 75 µM de Δ2-TGZ ou du DMSO (0,15%), puis leur consommation en oxygène (CO) a été mesurée par oxygraphie (électrode de Clark). (A) La CO endogène, correspondant à la CO basale des cellules, a été déterminée. **, Significativement différent des cellules témoins ($P < 0,01$; test de student). (B) La CO des cellules a été mesurée en absence ou en présence de la combinaison oligomycine A (oligo A, 10 µg/mL) + atractyloside (ATR, 10 µg/mL) et de carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP, 500 nM). *, Significativement différent des cellules témoins ayant reçu la combinaison oligo A + ATR ($P < 0,05$; test de Student). ##, Très significativement différent des cellules témoins ayant reçu du CCCP ($P < 0,01$; test de Student). (C) L'efficacité du couplage a ensuite été déterminée en calculant le rapport entre la respiration endogène des cellules et la respiration en présence d'oligomycine A et d'atractyloside. Les résultats présentés (A, B et C) correspondent à la moyenne ± ESM de trois expériences indépendantes.

Nous avons ensuite mesuré la consommation d'oxygène des cellules en présence de différents composés qui modulent le fonctionnement de la chaîne respiratoire, afin de mieux définir l'impact de la Δ2-TGZ sur la phosphorylation oxydative mitochondriale. Nous avons tout d'abord utilisé l'oligomycine A (oligo A) et l'atractyloside (ATR) qui sont des inhibiteurs respectifs de l'ATP synthase et de l'ADP/ATP translocase. Dans une mitochondrie ayant une activité normale, l'oxydation des substrats est habituellement couplée à la synthèse d'ATP (Brand and Nicholls 2011). Ainsi, suite à une inhibition de l'ATP synthase, la phosphorylation oxydative est ralentie et la consommation d'oxygène est alors réduite. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 heures avec la Δ2-TGZ ou le DMSO et la consommation d'oxygène des cellules a été mesurée en présence d'oligo A et d'ATR. Dans les cellules témoins ayant reçu les deux inhibiteurs, la consommation d'oxygène est diminuée de 67,3% par rapport à la consommation d'oxygène endogène des cellules (Figure 50B). Par contre, dans les cellules traitées avec la Δ2-TGZ, la consommation d'oxygène baisse de seulement 38,9% en présence des inhibiteurs. Ainsi, la consommation d'oxygène diminue moins dans les cellules traitées avec la Δ2-TGZ que dans les cellules témoins. Les cellules ayant reçu la Δ2-TGZ ne semblent donc pas diminuer fortement leur consommation d'oxygène en réponse à l'inhibition de l'ATP synthase, ce qui suggère un découplage des mitochondries dans ces cellules.
Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'efficacité du couplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP, qui représente la part d'oxygène consommé utilisée pour la synthèse d'ATP (Brand and Nicholls 2011). Ce paramètre peut être déterminé en calculant le rapport entre la respiration endogène des cellules et la respiration en présence d'oligomycine A et d'atractyloside. Plus la valeur du rapport est élevée, plus l'oxydation des substrats est couplée à la synthèse d'ATP. L'efficacité du couplage est réduite pratiquement de moitié dans les cellules traitées avec la Δ2-TGZ (Figure 50C). Ces résultats confirment ainsi le découplage des mitochondries dans les cellules traitées avec la Δ2-TGZ.

Nous avons également utilisé l'agent découplant CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) qui provoque une fuite de protons à travers la membrane mitochondriale interne et entraîne ainsi une accélération de l'activité de la chaîne respiratoire qui vise à rétablir le gradient de protons. Il en résulte alors une augmentation de la consommation d'oxygène (Kadenbach 2003). Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec la Δ2-TGZ (75 µM) ou le DMSO et la consommation d'oxygène des cellules a été mesurée en présence de CCCP. Dans les cellules témoins ayant reçu du CCCP, la consommation d'oxygène est augmentée d'environ 38% (Figure 50B). Par contre, dans les cellules traitées

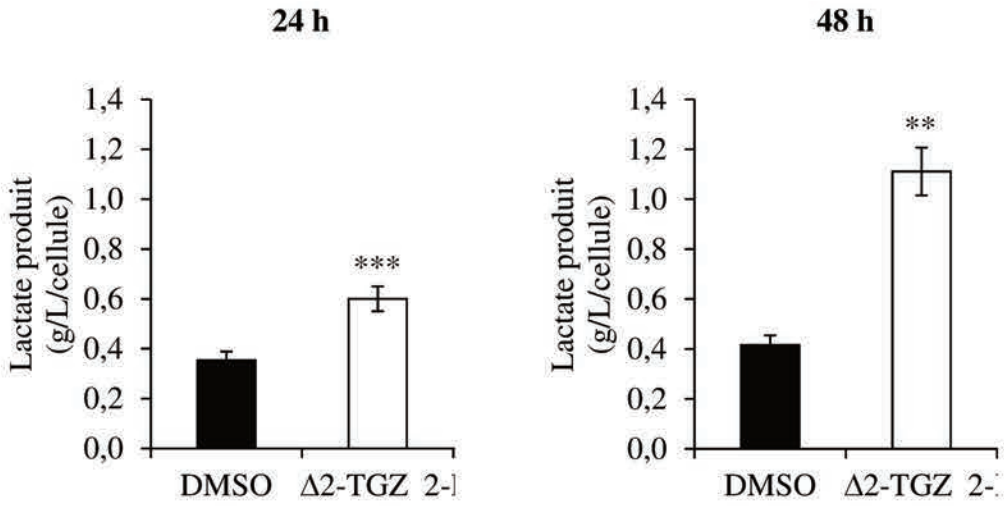

Figure 51 : La Δ2-TGZ induit une augmentation de la production de lactate. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 et 48 h avec 75 µM de Δ2-TGZ ou du DMSO (0,15%). A la fin du traitement, la concentration de lactate présent dans le milieu de culture a été déterminée grâce à un analyseur biochimique (YSI 2950 Biochemistry Analyzer) et le nombre de cellules a été obtenu par une coloration de l'ADN au cristal violet. La quantité de lactate produit par cellule a ensuite été calculée pour chaque condition. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM d'au moins quatre expériences indépendantes. Les différences significatives entre les cellules témoins et traitées sont indiquées (**, P < 0,01; ***, P < 0,001; test de Student).

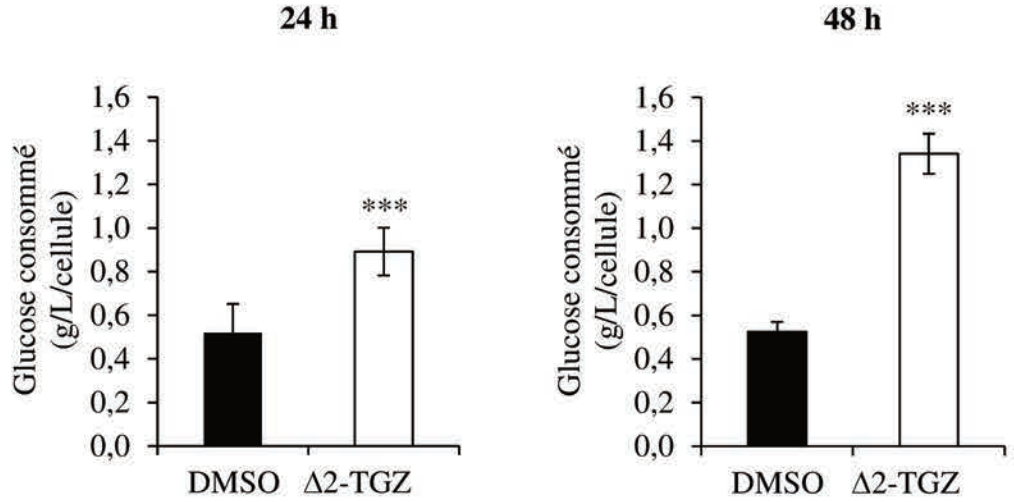

Figure 52 : Les cellules traitées avec la Δ2-TGZ consomment plus de glucose. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 et 48 h avec 75 µM de Δ2-TGZ ou du DMSO (0,15%). A l'issue du traitement, la concentration de glucose présent dans le milieu de culture a été évaluée grâce à un analyseur biochimique (YSI 2950 Biochemistry Analyzer) et le nombre de cellules a été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. La quantité de glucose consommé par cellule a ensuite été calculée pour chaque condition. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM de quatre expériences indépendantes. Les différences significatives entre les cellules témoins et traitées sont indiquées (***, P < 0,001; test de Student).

avec la Δ2-TGZ, la consommation d'oxygène varie très peu (diminution de 16% environ). Les cellules traitées avec la Δ2-TGZ ne parviennent donc pas à accélérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

L'ensemble de ces résultats montrent que les cellules traitées avec la Δ2-TGZ ont une consommation d'oxygène faible et découplée de la synthèse d'ATP. En présence du composé, la vitesse de la chaîne respiratoire, qui se traduit par la consommation d'oxygène, ne peut être ni fortement accélérée, ni ralentie. L'ensemble de ces données suggèrent que la Δ2-TGZ altère le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

3. Etude de la glycolyse

En parallèle de la respiration mitochondriale, nous avons évalué les effets de la Δ2-TGZ sur la glycolyse. L'activité glycolytique d'une cellule peut être indirectement appréciée en mesurant sa consommation de glucose et sa production de lactate (TeSlaa and Teitell 2014). Ainsi, les cellules ont été traitées pendant 24 et 48 heures avec 75 µM de Δ2-TGZ ou du DMSO et les concentrations de lactate et de glucose dans le milieu de culture ont été mesurées grâce à un analyseur biochimique (YSI 2950 Biochemistry Analyzer), en collaboration avec Frédéric Bost (INSERM U1065, Université de Nice). Le nombre de cellules a été déterminé en parallèle par une coloration de l'ADN au cristal violet. Ces deux données nous ont permis de calculer la production de lactate et la consommation de glucose par cellule. Après 24 et 48 heures de traitement, la Δ2-TGZ induit une augmentation de la production de lactate par cellule de 1,7 fois et de 2,7 fois, respectivement. La production de lactate est stable entre 24 et 48 heures dans les cellules témoins (Figure 51). De la même manière, la consommation de glucose augmente de 1,7 fois après 24 heures de traitement et de 2,6 fois après 48 heures. La production de lactate est stable entre 24 et 48 heures dans les cellules témoins (Figure 52). La Δ2-TGZ induit donc une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate, suggérant une augmentation de l'activité glycolytique.

Afin de confirmer que la Δ2-TGZ n'est par un ERMA comme le dérivé de la Δ2-CGZ OSU-CG12 ou le 2-DG, nous avons évalué l'impact d'un excédent de glucose dans le milieu de culture sur les effets de la Δ2-TGZ sur le nombre de cellules. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 48 heures avec 75 µM de Δ2-TGZ, 5 mM de 2-DG ou du DMSO, dans un milieu de culture contenant 2 ou 10 mg/mL de glucose, 2 mg/mL étant la concentration habituelle de glucose dans le milieu de culture. Le 2-DG induit une diminution du nombre de cellules dans le milieu de culture contenant 2 mg/mL de glucose, tandis que ses effets

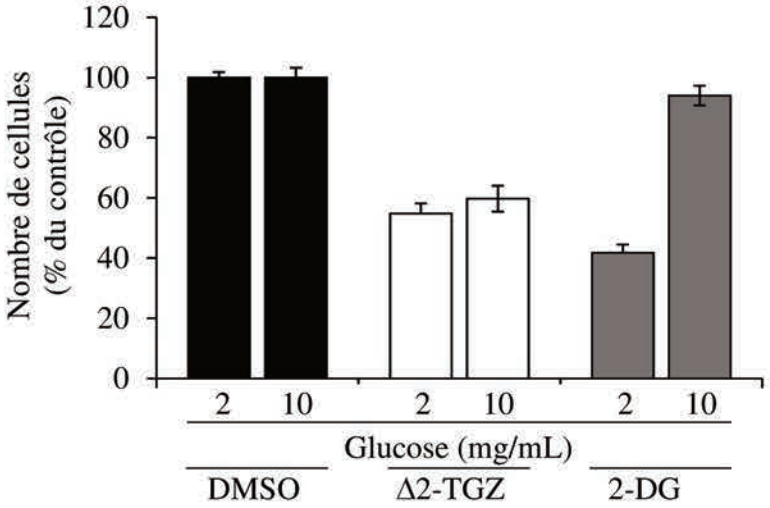

Figure 53 : Les effets de la Δ2-TGZ sur le nombre de cellules ne sont pas atténués en présence d'un excédent de glucose dans le milieu de culture. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 48 h avec de la Δ2-TGZ (75 µM), du 2-DG (5 mM) ou du DMSO (0,15%), dans un milieu de culture contenant 2 ou 10 mg/mL de glucose. A la fin du traitement, le nombre de cellules a été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM de quatre expériences indépendantes.

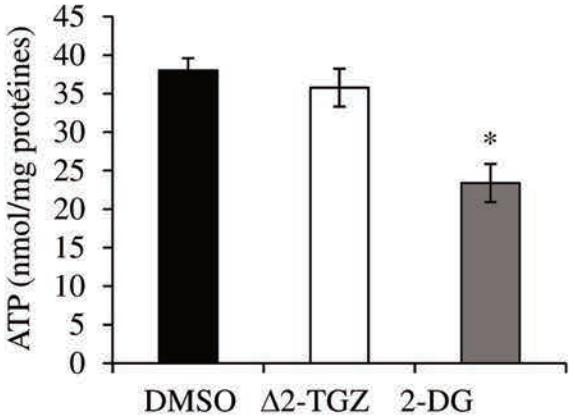

Figure 54 : Contrairement au 2-DG, la Δ2-TGZ n'induit pas de variation de la quantité d'ATP intracellulaire. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 h avec 75 µM de Δ2-TGZ ou 5 mM de 2-DG. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,15%). A l'issue du traitement, la quantité d'ATP intracellulaire a été mesurée en utilisant le kit ENLITEN® ATP Assay System, basé sur de la chimioluminescence. La concentration protéique a été déterminée en parallèle par dosage protéique avec la méthode de Bradford. Puis la quantité d'ATP par mg de protéines a été calculée pour chaque condition. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM de trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les cellules témoins et traitées sont indiquées (*, $p < 0,05$; test de Student).

antiprolifératifs sont annulés en présence de 10 mg/mL de glucose (Figure 53). Quant à la Δ2-TGZ, elle réduit de moitié le nombre de cellules dans les deux conditions de culture. Ainsi, la présence d'un excédent de glucose dans le milieu de culture ne modifie pas les effets antiprolifératifs de la Δ2-TGZ, contrairement au 2-DG (Figure 53). La Δ2-TGZ n'altère donc pas le métabolisme du glucose comme le 2-DG ou l'OSU-CG12 (Wei *et al.* 2010).

L'augmentation de la glycolyse observée après une traitement avec la Δ2-TGZ pourrait viser à compenser le blocage de la respiration mitochondriale, pour maintenir un niveau suffisant d'énergie dans les cellules. Un tel mécanisme de compensation semble être induit dans les cellules cancéreuses en réponse à plusieurs TZDs, telles que la TGZ et la PGZ, comme décrit dans le paragraphe III.5.2 de l'introduction.

4. La glycolyse : un mécanisme compensateur en réponse à l'atteinte mitochondriale ?

4.1 Dosage de l'ATP intracellulaire

La mesure de la production d'ATP dans les cellules permet d'évaluer l'impact de la perturbation du métabolisme induite par la Δ2-TGZ sur la production d'énergie par les cellules. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec la Δ2-TGZ (75 µM), le 2-DG (5 mM) ou le DMSO et la quantité d'ATP intracellulaire a été mesurée grâce au kit ENLITEN® ATP Assay (Promega) basé sur de la chimioluminescence. Le 2-DG a été utilisé comme témoin capable de perturber le métabolisme énergétique et de diminuer la production d'ATP intracellulaire. Dans les cellules traitées avec le 2-DG, la quantité d'ATP produit diminue de façon significative (Figure 54). Par contre, dans les cellules traitées avec la Δ2-TGZ, aucune baisse significative de la quantité d'ATP n'a été détectée. Contrairement au 2-DG, la Δ2-TGZ n'induit donc pas de variation de la quantité d'ATP intracellulaire.

Ainsi, les cellules parviennent à synthétiser de l'ATP en quantité suffisante, malgré la perturbation du métabolisme énergétique induite par la Δ2-TGZ. Nous pouvons donc présumer que la stimulation de la glycolyse compense la perte d'énergie au niveau de la mitochondrie.

4.2 Etude des senseurs énergétiques AMPK et Sirt1

Une altération du métabolisme énergétique pourrait entrainer l'activation de senseurs tels que l'AMPK et Sirt1. L'activation de l'AMPK dépend d'une augmentation du ratio AMP/ATP qui permet sa phosphorylation sur la thréonine 172 (Krishan *et al.* 2015). Nous avons analysé par western blot l'état phosphorylation d'AMPK. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées

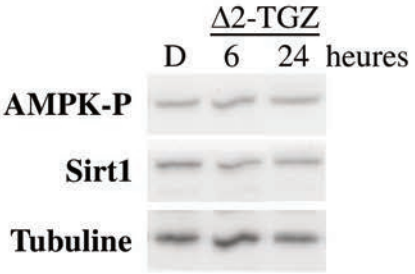

Figure 55 : La Δ2-TGZ n'induit ni la phosphorylation d'AMPK, ni l'expression de Sirt1. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 6 et 24 h avec la Δ2-TGZ (75 µM) ou le DMSO (D, 0,15%). A la fin du traitement, les protéines totales ont été extraites et soumises à un western blot afin d'analyser la phosphorylation d'AMPK et l'expression de Sirt1. La tubuline a été utilisée comme protéine de référence et témoin de charge des puits.

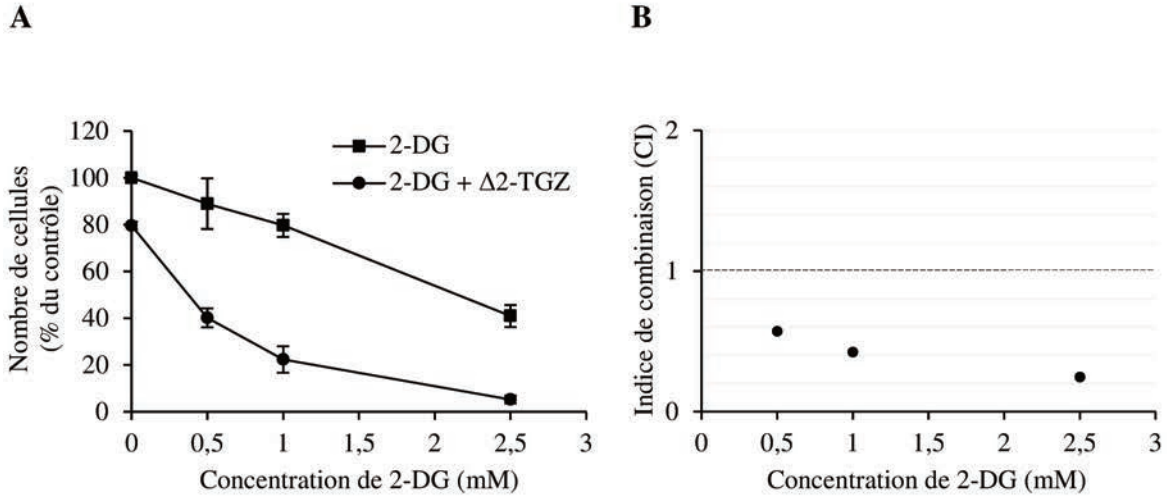

Figure 56 : La Δ2-TGZ et le 2-DG induisent de façon synergique une diminution du nombre de cellules. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 72 h avec les composés Δ2-TGZ (15 µM) ou 2-DG (0,5; 1 et 2,5 mM), utilisés seuls ou en combinaison. Les cellules contrôles étaient non-traitées. Le nombre de cellules a ensuite été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet (A) et l'indice de combinaison (CI) a été calculé pour chaque combinaison de doses (B), d'après la méthode de Chou-Talalay. Un CI inférieur à 1 correspond à des effets synergiques entre les deux molécules. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM d'au moins trois expériences indépendantes.

pendant 6 et 24 heures avec 75 µM de Δ2-TGZ ou du DMSO. Quelles que soient les durées de traitement, aucune augmentation de la phosphorylation d'AMPK n'est visible (Figure 55). La Δ2-TGZ ne semble donc pas induire l'activation d'AMPK dans les cellules MDA-MB-231. Ces données confortent notre résultat précédent montrant une absence de variation de la production d'ATP intracellulaire.

Sirt1 est une désacétylase sensible à une augmentation du niveau de NAD^+ (Haigis and Sinclair 2010). Puisque la Δ2-TGZ induit une hausse du ratio NAD^+/NADH, nous avons cherché à déterminer si le niveau d'expression de Sirt1 est augmenté en réponse à la Δ2-TGZ. Les cellules ont été traitées pendant 6 et 24 heures avec la Δ2-TGZ ou le DMSO et le niveau d'expression de Sirt1 a été évalué par western blot. Comme montré dans la figure 55, la Δ2-TGZ n'induit pas de variation du niveau d'expression de Sirt1, quel que soit le temps de traitement. Ces résultats suggèrent donc que la Δ2-TGZ n'induit pas Sirt1. Toutefois, outre son expression, l'activité de Sirt1 est également augmentée suite à un stress énergétique (Haigis and Sinclair 2010). Il faudrait donc étudier l'activité de Sirt1, avant de conclure quant aux effets de la Δ2-TGZ sur ce senseur énergétique.

4.3 Etude des effets de la combinaison Δ2-TGZ + 2-DG sur le nombre de cellules

Afin de montrer que la glycolyse est un mécanisme de compensation énergétique suite à un défaut de fonctionnement de la mitochondrie, nous avons réalisé un traitement combinant la Δ2-TGZ avec l'inhibiteur de la glycolyse, le 2-DG. Les cellules ont été traitées pendant 72 heures avec la Δ2-TGZ et le 2-DG, utilisés seuls ou en combinaison, et le nombre de cellules a été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Une diminution dose-dépendante du nombre de cellules est observée avec des doses croissantes de 2-DG, tandis que la Δ2-TGZ utilisée seule à 15 µM (dose très inférieure à l'IC_{50}) induit une baisse d'environ 20% du nombre de cellules (Figure 56A). Le traitement combinatoire entraîne une diminution accrue du nombre de cellules, et ce quelle que soit la concentration de 2-DG.

A partir de ces résultats, nous avons déterminé l'indice de combinaison (CI) pour chaque combinaison de doses, d'après la méthode de Chou-Talalay décrite dans la section Matériels et méthodes. Un CI inférieur, égal ou supérieur à 1 correspond respectivement à des effets synergiques, additifs ou antagonistes entre deux molécules. Dans cette étude, le CI est inférieur à 1, quelle que soit la combinaison de doses analysée (Figure 56B). La Δ2-TGZ et le 2-DG ont donc des effets synergiques.

Le synergisme observé entre la Δ2-TGZ et le 2-DG est en accord avec la dépendance vis à vis de la glycolyse des cellules traitées avec la Δ2-TGZ. Ce résultat confirme que la glycolyse serait un mécanisme de compensation en réponse à l'altération du fonctionnement mitochondrial. Par ailleurs, il met ainsi en avant le potentiel d'une stratégie anticancéreuse ciblant conjointement la glycolyse et l'activité mitochondriale.

5. Conclusion

La Δ2-TGZ modifie donc le fonctionnement de la chaîne respiratoire des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. En réponse à ce stress énergétique, la glycolyse est stimulée permettant de maintenir un niveau d'ATP intracellulaire stable. L'importance de la modification du métabolisme énergétique induit par la Δ2-TGZ dans son action anti-cancéreuse reste à démontrer. Néanmoins, la Δ2-TGZ se présente comme un nouveau composé pouvant être inclus potentiellement dans des stratégies anticancéreuses ciblant le métabolisme énergétique.

III. CARACTERISATION DU MODE D'ACTION DU 2-DG DANS LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES (ARTICLE 3)

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'un article qui sera soumis dans Molecular Cancer Therapeutics.

Proteins N-glycosylation alteration and glycolysis inhibition both contribute to the antiproliferative action of 2-deoxyglucose in breast cancer cells.

Audrey Berthe, Marie Zaffino, Claire Muller, Frédéric Bost, François Foulquier, Marine Houdou, Sabine Mazerbourg, Stéphane Flament.

1. Contexte

Lors de la caractérisation des effets de la Δ2-TGZ en milieu de culture contenant 10% de SVF, nous avons utilisé le 2-DG comme témoin capable d'altérer le métabolisme énergétique des cellules. Toutefois, les effets anticancéreux de ce composé ne sont pas uniquement dus à une inhibition de la glycolyse. En effet, le 2-DG se comporte également comme un analogue du mannose et perturbe ainsi le processus de N-glycosylation des protéines dans le RE, menant à l'induction d'un stress du RE (Kurtoglu *et al.* 2007, Xi *et al.* 2014). A ce jour, beaucoup d'études ont permis de démontrer les effets anticancéreux du 2-DG *in vitro* et *in vivo* (Kuntz *et al.* 2014). Cependant, il n'est pas déterminé de façon systématique si l'action du composé est liée à l'inhibition de la glycolyse, à l'interférence de la N-glycosylation des protéines ou bien à la combinaison des deux mécanismes. L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer la contribution de l'inhibition de la glycolyse et de la perturbation de la N-glycosylation des protéines dans les effets anticancéreux du 2-DG dans les cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes MCF-7 et hormono-indépendantes triple négatives MDA-MB-231.

2. Résultats

Nous avons tout d'abord étudié les effets du 2-DG sur le nombre de cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de composé et le nombre de cellules a été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Le 2-DG induit une diminution du nombre de cellules, avec une efficacité relativement similaire entre les cellules MCF-7 (IC_{50} = 3,1 mM) et MDA-MB-231 (IC_{50} = 4,2 mM).

Nous avons ensuite étudié les effets du 2-DG sur le stress du RE dans les deux lignées cancéreuses mammaires. Nous avons alors analysé, par western blot et RT-PCR, différents acteurs de la réponse UPR. Dans les cellules MDA-MB-231, le 2-DG induit de façon transitoire

la phosphorylation de PERK et le clivage de l'ARNm de *XBP-1*. L'expression de la protéine chaperonne BiP est aussi augmentée. Pour ce qui est des cellules MCF-7, la phosphorylation de PERK et l'expression de BiP sont induites de façon transitoire en réponse au 2-DG, tandis qu'il n'y a pas clivage de l'ARNm de *XBP*-1. Ensuite, nous avons montré par immunocytochimie que CHOP est induit dans les cellules MDA-MB-231 mais pas dans les cellules MCF-7. Le 2-DG provoque donc dans les deux lignées cellulaires un stress du RE transitoire qui est toutefois plus marqué dans les cellules MDA-MB-231.

Par la suite, nous avons souhaité déterminer si le stress du RE induit par le 2-DG résultait d'une perturbation de la N-glycosylation des protéines. Les effets du 2-DG sur ce processus peuvent être inhibés par un apport exogène de mannose dans le milieu de culture des cellules (Kurtoglu *et al.* 2007). Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont donc été traitées avec du 2-DG, en présence ou non de mannose, et nous avons analysé par western blot le niveau de glycosylation de LAMP2 (lysosomal-associated membrane protein 2), qui est une protéine fortement N-glycosylée. Dans les deux lignées cellulaires, le 2-DG induit une altération de la glycosylation de LAMP2, qui n'est plus observée en présence de mannose. Le 2-DG perturbe donc le processus de N-glycosylation des protéines dans les cellules cancéreuses mammaires.
Afin de montrer que la perturbation de la N-glycosylation était à l'origine du stress du RE, la phosphorylation de PERK, l'expression de BiP et de CHOP ont été analysées lors d'un co-traitement 2-DG/mannose. L'addition de mannose atténue fortement l'effet du 2-DG sur ces trois marqueurs de la réponse UPR. Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7, le stress du RE induit par le 2-DG semble donc être la conséquence de l'altération de la N-glycosylation des protéines.

Nous avons étudié en parallèle les effets du 2-DG sur l'activité glycolytique des cellules cancéreuses mammaires, en évaluant la production de lactate. Le 2-DG induit une diminution de la production de lactate dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Cet effet n'est pas reversé par la présence de mannose. La glycolyse est donc inhibée par le 2-DG dans les cellules cancéreuses mammaires. Cette action du 2-DG est indépendante de son rôle dans la perturbation de la N-glycosylation des protéines dans le RE.

Afin de déterminer la contribution relative de l'inhibition de la glycolyse et de la N-glycosylation des protéines dans les effets anticancéreux du 2-DG, les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été traitées avec du 2-DG, en présence ou non de mannose, puis le nombre de cellules a été analysé par une coloration de l'ADN au cristal violet. La présence de mannose

n'inhibe qu'en partie les effets du 2-DG sur le nombre de cellules, la perturbation de la N-glycosylation des protéines comptant pour environ 42% des effets anticancéreux du 2-DG.

3. Conclusion

Cette étude nous a donc permis de mieux caractériser le mode d'action du 2-DG dans les cellules cancéreuses mammaires. Nous avons ainsi démontré que l'inhibition de la glycolyse et la perturbation de la N-glycosylation des protéines contribuent l'une et l'autre aux effets anticancéreux du 2-DG dans les cellules cancéreuses mammaires.

Proteins N-glycosylation alteration and glycolysis inhibition both contribute to the antiproliferative action of 2-deoxyglucose in breast cancer cells.

Audrey Berthe[a,b], Marie Zaffino[a,b], Claire Muller[a,b], Frédéric Bost[c,d], François Foulquier[e] Marine Houdou[e], Sabine Mazerbourg[a,b*], Stéphane Flament[a,b]

[a]Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France
[b]CNRS UMR 7039, CRAN, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France
[c]Inserm U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Team «Cellular and molecular physiopathology of obesity and diabetes» Nice, F-06204, France
[d]Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculty of Medicine, Nice, F-06204, France
[e] Université de Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et fonctionnelle, F- 59000 Lille, France

*Address correspondence to this author at: CRAN, UMR 7039, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France. Tel: 011 33(0) 3 72 74 51 84; e-mail: sabine.mazerbourg@univ-lorraine.fr

Key words: breast cancer, 2-deoxyglucose, glycolysis, N-glycosylation

Abbreviated title: Effects of 2-deoxyglucose on breast cancer cells

Definitions for all abbreviations

2-DG, 2-Deoxyglucose
BiP, Binding immunoglobulin protein
CHOP, transcription factor CEBP homologous protein
DMSO, dimethyl sulfoxide
eIF2α, eukaryotic initiation factor 2α
ER, endoplasmic reticulum
FACS, fluorescence-activated cell sorting
FBS, fetal bovine serum
Grp94, glucose-regulated protein 94
HUVEC, human umbilical vein endothelial cells
IC_{50}, half maximal inhibitory concentration
LAMP2, lysosomal-associated membrane protein 2

PARP, poly(ADP-ribose) polymerase

PERK, pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase

PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma

UPR, unfolded protein response

XBP-1, X-box-Binding Protein-1

ABSTRACT

The metabolism of cancer cells generally differs from that of normal cells since most cancer cells elicit a high rate of glycolysis and lactate fermentation, even under normal oxygen concentrations. This suggests that targeting energy metabolism and especially glycolysis could be an interesting approach to differentially affect cancer cells. In this context, 2-deoxyglucose (2-DG) could be used due to its ability to compete with glucose but this compound is also known to affect the protein N-linked glycosylation pathway by the substitution of the mannose sugar. In this study, we studied the effects of 2-DG treatment in two breast cancer cell lines in order to determine the part played by glycolysis inhibition and N-linked glycosylation interference. We observed that the sugar analog behaves as an anticancer agent with a relative similar efficiency between the hormone-dependent MCF-7 (IC_{50} = 3.1 mM) and hormone-independent MDA-MB-231 breast cancer cells (IC_{50} = 4.2 mM). 2-DG interfered with N-linked glycosylation in both cell lines as illustrated by the modified profile of migration of the protein Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2) and induced a transient ER stress, that was more sustained in MDA-MB-231 cells. Both changes were abrogated by competition with exogenous mannose. As expected, 2-DG also slowed down glycolysis with a marked decrease of lactate production in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells. The effects of 2-DG on lactate production were unaffected by addition of mannose. Regarding cell number, the addition of exogenous mannose partially reversed the effects of 2-DG in both cell lines. Then, N-glycosylation interference accounts for 38 and 47 % of 2-DG anti-cancerous effect in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. Thus, N-linked glycosylation interference and glycolysis disruption both contribute to the anticancer properties of 2-DG in breast cancer cells.

Introduction

As evidenced by Otto Warburg in the 1920s, the metabolism of cancer cells generally differs from that of normal cells. Indeed, most cancer cells elicit a high rate of glycolysis and lactate fermentation, even under normal oxygen concentrations. Tumor tissues were reported to metabolize around 10 times more glucose to lactate than normal tissues under aerobic conditions (1). This phenomenon, called the Warburg effect, could arise from mutations in oncogenes and tumor suppressors that alter tumor cell metabolism but could be also an adaptation to tumor microenvironment constraints such as hypoxia (2). This altered metabolism responds to requirements of rapid proliferating tumor cells, namely rapid ATP generation, stimulated biosynthesis of macromolecules and maintenance of cellular redox homeostasis (2). As a result, cancer cells display a high rate of glucose uptake (2). This metabolic property is clinically exploited, by positron emission tomography (PET) imaging with 2-[^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose, for diagnosis and staging of cancer as well as for monitoring tumor response to therapy and disease recurrence (3).

Upregulation of glycolysis was reported to promote invasive tumor growth and metastatic capacity, being thus correlated with poor prognosis, enhanced tumor aggressiveness and incidence of metastasis (4). The disrupted metabolism of cancer cells could also contribute to drug resistance in cancer therapy (5). Hence, consequent efforts have been initiated to develop anticancer treatments targeting tumor glycolysis. Such compounds appeared attractive since they increased the efficacy of various chemotherapeutic agents such as paclitaxel and trastuzumab and they reduced resistance of cancer cells to chemotherapy or radiotherapy (6). Among them, 2-deoxy-D-glucose (2-DG) emerged as an interesting candidate. This sugar analogue was demonstrated to display anticancer activity in numerous *in vitro* and *in vivo* studies (7). Furthermore, it was shown to improve the chemosensitivity and radiosensitivity of various cancer cells (gliomas, osteosarcomas or breast cancer for example) in combination therapies (7).

2-DG is a glucose analogue, in which the hydroxyl group at the second carbon atom was substituted by hydrogen. Competition with glucose occurs at different levels in the glycolytic pathway. At first, 2-DG decreases the glucose uptake, and *vice versa*, suggesting a competition between both sugars for cell entry (8). 2-DG and glucose are then phosphorylated by hexokinase, but 2-DG-6-phosphate cannot be further metabolized through the glycolysis, resulting in its accumulation in cells. As a consequence, phosphoglucoisomerase and hexokinase are respectively competitively and non-competitively inhibited by 2-DG-6-phosphate (9,10). The blockage of glycolysis by 2-DG results in ATP levels decrease (11).

Due the structural similarity of glucose with mannose, 2-DG also competes with mannose for the process of N-linked glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum (ER). It is converted in the nucleoside-disphosphate derivative GDP-2-DG, before being incorporated in lipid-linked oligosaccharides precursors (12,13). The resulting intermediates cannot be further extended by the addition of mannosyl residues, leading to a disruption of glycosylation of proteins (12). As a result, misfolded N-glycoproteins accumulate in the ER leading to ER stress and the activation of unfolded protein response (UPR) (14). This interference with the N-linked glycosylation process can however be reversed by addition of exogenous mannose (14).

Despite numerous studies, the relative contribution of glycolysis inhibition and N-linked glycosylation interference in the anticancer effects of 2-DG has not been systematically evaluated. Here, we studied the effects of 2-DG on both glycolysis and N-linked glycosylation interference in breast cancer cells. We observed that the sugar analog behaves as an anticancer agent with a relative similar efficiency between hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cells. 2-DG interfered with N-linked glycosylation and induced a transient ER stress that was more sustained in MDA-MB-231 cells. Both changes were abrogated by competition with exogenous mannose. 2-DG also slowed down glycolysis with a marked decrease of lactate production in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells. The effects of 2-DG on lactate production were unaffected by addition of an excess of mannose. Addition of exogenous mannose only partially reversed the effects of 2-DG on cell number. Thus, N-linked glycosylation interference and glycolysis disruption both contribute to the anticancer properties of 2-DG in breast cancer cells.

Materials and Methods

Cell Culture and Treatments

MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Both cell lines were grown at 37°C under 5% CO_2 in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) for MDA-MB-231 and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®) for MCF-7. These phenol red containing media were supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich).

Breast cancer cells were seeded at the appropriate density in their respective medium and incubated for 24 h to allow cell attachment. Cells were then treated for various times with 2-DG (Sigma-Aldrich) and/or mannose (Sigma-Aldrich) at the indicated concentrations. 2-DG and mannose were dissolved in water. Each treatment was repeated at least three times.

Crystal Violet Staining Assay

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were seeded in 96-well plates at a density of 2 x 10^4 cells/well and 1.5 x 10^4 cells/well, respectively. At the end of the treatment, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). They were fixed and stained for 20 min with 0.2% crystal violet (Sigma-Aldrich) in 2% ethanol. This staining solution was filtered prior use with a syringe-driven filter unit (0.22 µm pore size, Millipore, Temecula, CA, USA) to eliminate dye precipitates. Cells were then washed with distilled water to remove excess dye. The plates were dried and the dye was dissolved in 10% acetic acid. Cell number was determined by absorbance at 595 nm with a VICTOR™ X3 multilabel plate reader (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). The concentration of 2-DG leading to a decrease of 50% of the cell number (IC_{50}) was determined.

Western Immunoblotting

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were seeded in 60 mm-diameter culture dishes at a density of 8.0 x 10^5 cells/dish and 6.5 x 10^5 cells/dish, respectively. At the end of the treatment, adherent cells were scraped in the culture medium containing the non-adherent cells and all cells were collected by centrifugation at 1000 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was rinsed with PBS and resuspended in 20 µL of lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitors (cOmplete™ Mini, Roche, Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, Calbiochem, Millipore). The cell lysate was

clarified by centrifugation at 1000 rpm for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

50 µg of total proteins were mixed with 5x Laemmli buffer supplemented with 1,4-Dithiothreitol (DTT), heated (95°C, 5 min) and subjected to 12% SDS-PAGE (7% in case of PERK analysis). After electrophoresis, proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (Amersham, GE Healthcare Life sciences, Vélizy-Villacoublay, France). The homogeneity of loaded amounts and transfer efficiency were checked by Ponceau S staining of nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in TNT buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powdered milk for 1 h at room temperature to reduce nonspecific binding of antibodies. They were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies in blocking solution. The rabbit monoclonal antibodies anti-BiP (B1770, United States Biological, Euromedex, Souffelweyersheim, France) and anti-PERK (clone C33E10, 3192, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France), the mouse monoclonal anti-LAMP2 (sc-18822, Santa Cruz Biotechology, Heidelberg, Germany) and the goat polyclonal antibody anti-Actin (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology) were diluted at 1:1000. Next, membranes were washed 3 times with TNT and incubated at room temperature for 1 h with appropriate peroxidase-linked secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:10 000. After three washes with TNT, membranes were developed with the Clarity™ Western ECL Substrate detection reagent (Bio-Rad Laboratories) using chemiluminescence and observed with a ChemiDoc™ XRS imaging system (Bio-Rad Laboratories). For PERK electrophoretic mobility shift detection, blots were developed on X-ray films (Amersham, GE Healthcare Life sciences).

Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were seeded in 12-well plates at a density of 1.8 x 10^5 cells/well and 1.6 x 10^5 cells/well, respectively. At the end of the treatment, total RNA was extracted using TRIzol® Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was determined with a spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific). For cDNA synthesis, 1 µg of RNA was mixed with 300 ng of random primers (Invitrogen) in a final volume of 13 µL and incubated for 5 min at 65°C. The mixture was then supplemented with 1x Reaction Buffer, 1 mM of each dNTP and 200 U of RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific) for a final volume of 20 µL. The mixture was incubated

for 10 min at 25°C, for 60 min at 42°C and subsequently for 10 min at 70°C in order to stop the reaction.

The cDNAs were further amplified by PCR. The specific primers sequences were : *XBP-1* (NM_005080) forward 5'-TTACGAGAGAAAACTCATGGC-3', reverse 5'-GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC-3', PCR products length 282/256 base pairs (bp); *RPLP0* (NM_053275; ribosomal protein, large, P0) forward 5'-ACAACCCAGCTCTGGAGAAA-3', reverse 5'-TCGTTTGTACCCGTTGATGA-3', PCR product length 530 bp. PCR was carried out in a thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a final volume of 25 µL containing 2 µL of cDNA, 1x Reaction Buffer (without Mg), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP mix, 0.2 µM of each primer and 2.5 U of EconoTaq® DNA Polymerase (Lucigen, Euromedex). Negative controls were always included. Amplification was carried out under the following conditions: (1) initial denaturation at 95°C for 2 min; (2) 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 45 s. Five PCR cycles were performed. (3) 95°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 45 s. Twenty five and twenty PCR cycles were performed for *XBP-1* gene and the housekeeping gene *RPLP0*, respectively. (4) 10 min extension step at 72°C. The number of cycles was chosen to realize the analysis in the linear phase of the PCR reaction. 25 µL of the PCR product were mixed with loading buffer (5 µL) and 15 µL of the mixture were submitted to electrophoresis (in a 3% agarose gel in case of *XBP-1* analysis and a 1% agarose gel for *RPLP0*) at 100 V for 30 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories).

Immunocytochemistry

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were seeded on glass coverslips in 12-well plates at a density of 1.8 x 10^5 and 1.6 x 10^5 cells/well, respectively. At the end of the treatment, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min at room temperature. After three washes with PBS, cells were permeabilized for 10 min in PBS containing 0.5% Triton X-100, washed three times with PBS and incubated for 30 min in a blocking solution (0.1% Triton X-100, 4% bovine serum albumin in PBS buffer) to reduce nonspecific binding of antibodies. Preparations were then incubated with the mouse monoclonal antibody anti-CHOP (SC-7351, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:100 in the blocking solution overnight at 4 °C. They were then washed three times in PBS/0.1% Triton X-100 and exposed for 1 h in the dark to Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) diluted at 1:1000 in

PBS/0.1% Triton X-100. Finally, cells were rinsed three times with PBS and counterstained with Hoechst dye (Sigma-Aldrich) to visualize nuclei. Fluorescence labelling was observed under an Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Images were collected using LuciaG 4.81 software (Nikon).

Measurement of Lactate Production

At the end of the treatment, cell culture media were collected for each condition and lactate concentration was measured using an YSI 2950 Biochemistry Analyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH, USA). Samples containing only medium without cultured cells were included in the experiment to determine the endogenous lactate concentration (blank value). Production of lactate was calculated by subtracting the blank value from the lactate concentration measured for each condition. The values were normalized to cell number evaluated by crystal violet staining assay.

Statistical Analysis

The results of crystal violet staining assays and lactate production measurements were depicted as mean ± standard error of the mean (s.e.m) of at least three independent experiments. Statistical analysis were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post test for multiple comparisons (GraphPad InStat software, San Diego, CA, USA). Differences in which P-value was less than 0.05, 0.01 or 0.001 were statistically significant, very significant or extremely significant, respectively.

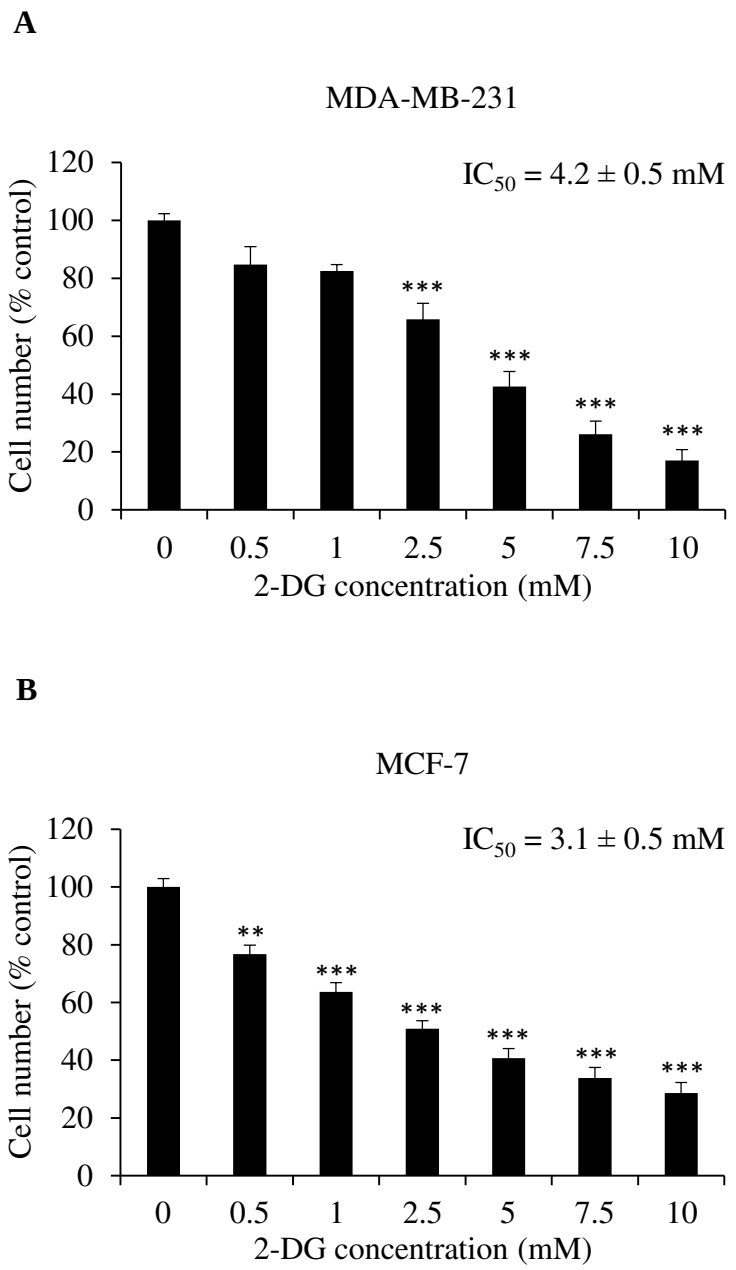

Figure 1: 2-DG induces a decrease in cell number. MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B) cells were treated for 48 h with increasing concentrations of 2-DG. Control cells were not treated. Cell number was evaluated by a crystal violet staining assay and the IC_{50} were determined. Results are depicted as mean ± s.e.m. of at least three independent counts performed in triplicate. Significant differences with control cells are indicated (**, P<0.01; ***, P<0.001).

Results

2-DG treatment exhibits anticancer effects on MDA-MB-231 and MCF-7 cells.

To assess the antiproliferative properties of 2-DG on breast cancer cells, two different breast cancer cell lines (hormone-independent MDA-MB-231 and hormone-dependent MCF-7 cells) were treated for 48 h with increasing concentrations of 2-DG (from 0 mM to 10 mM). The impact of such treatment on cells number was assayed by crystal violet staining and revealed that 2-DG induced a significant dose-dependent decrease in the number of cells in both cell lines (Figure 1). The concentration leading to a 50% decrease in cell number (IC_{50}) was 4.2 ± 0.5 mM and 3.1 ± 0.5 mM in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. Thus, both the hormone-dependent and -independent breast cancer cell lines were sensitive to 2-DG.

2-DG treatment triggers transient ER stress in breast cancer cells.

In order to determine if 2-DG induced ER stress in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, we performed a time course treatment with 2-DG and we studied several players of the unfolded protein response (UPR) that is initiated followed ER stress. We focused our analysis on (i) the phosphorylation of the pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) that is implicated in the slowing down of mRNA translation, (ii) the cleavage of the inositol requiring enzyme 1 (IRE1)-dependent X-box-binding protein-1 (*XBP-1*) mRNA, required to generate the active form of the transcription factor and (iii) the expression of the immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP), a luminal ER chaperone that binds to ER accumulating unfolded proteins, which is regulated by factors including XBP-1 [Bravo R 2013 301]. We used 2-DG concentrations of 5 and 4 mM for MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. These doses were just above the IC_{50} values obtained from the crystal violet staining assays.

In MDA-MB-231 cells, we observed by western immunoblotting an early transient increased phosphorylation of PERK, as demonstrated by its transient mobility shift (Figure 2A). This shift in molecular weight was evident after 6 h of treatment with 2-DG and then progressively decreased up to 72 h. RT-PCR analysis also revealed a transient cleavage of *XBP-1* mRNA in 2-DG-treated cells (Figure 2B). Indeed, both spliced and unspliced forms of *XBP-1* mRNA were only observed after 6 h of exposure to 2-DG. The spliced form was not yet detectable after 1 h and was no more present after 24 h. Regarding the chaperone BiP, its expression increased in response to 2-DG with a maximum of induction after 24 h and it was maintained up to 72 h (Figure 2A). Control cells did not exhibit any of these modifications.

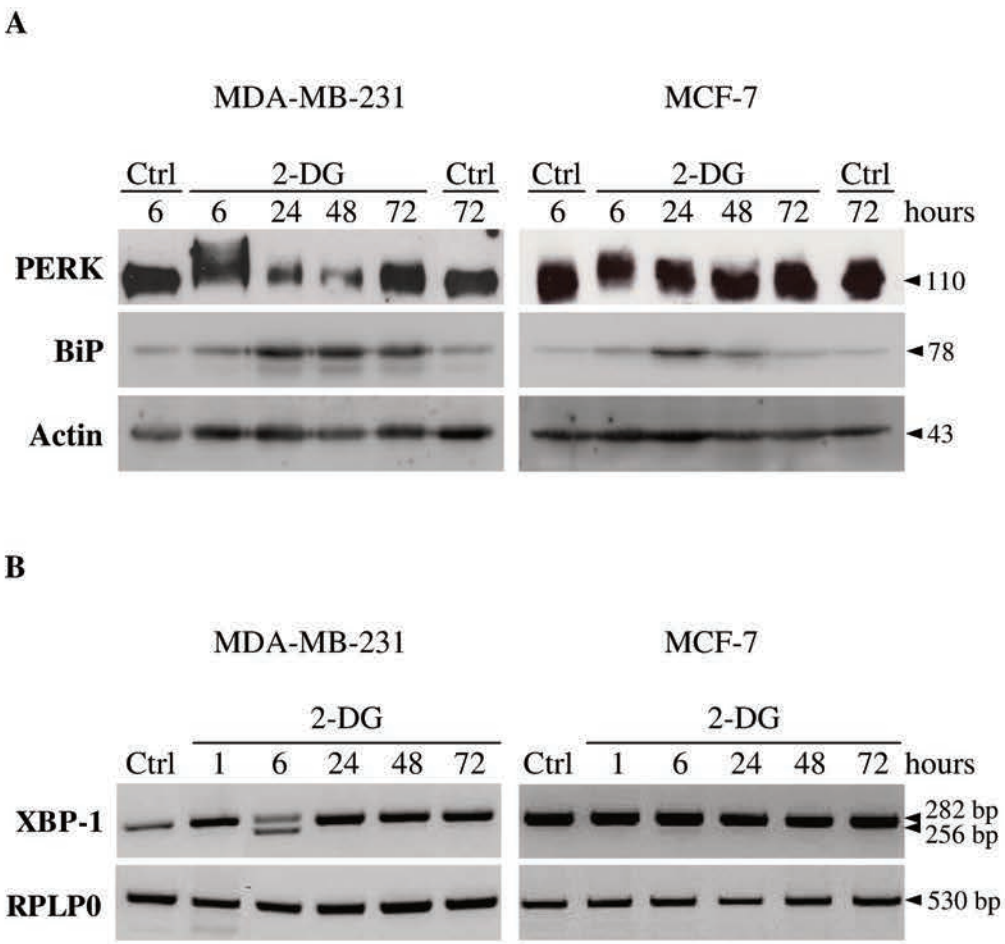

Figure 2: 2-DG triggers a transient ER stress. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for indicated times with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) or were not treated (Control, Ctrl). Cells were harvested for protein (A) or RNA (B) analysis. (A) PERK phosphorylation and BiP expression were detected by western blotting. Actin was used as a loading control. Protein MW (KDa) are indicated on the right. (B) XBP-1 mRNA expression was studied by RT-PCR. The 282 bp-long and 256 bp-long PCR products correspond respectively to the unspliced and spliced forms of XBP-1 mRNA. The housekeeping gene RPLP0 was used as an internal control.

In MCF-7 cells, 6 h after addition of 2-DG, PERK displayed a high electrophoretic shift which then gradually decreased (Figure 2A). No splicing of *XBP-1* mRNA was detected after exposure to 2-DG (Figure 2B). The expression of BiP was enhanced with a maximum of after 24 h of exposure to 2-DG (Figure 2A). The expression of the chaperone decreased after 48 h. We did not detect any of these events in control cells.

We also studied the transcription factor CEBP homologous protein (CHOP), a mediator of apoptosis whose expression is induced when the UPR is not sufficient to restore ER functions. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 24 and 48 h with 2-DG. In MDA-MB-231 cells, immunocytochemistry analysis revealed the induction of CHOP after 24 h of treatment, with both cytoplasmic and nuclear localizations (Figure 3). CHOP was still detected after 48 h but the immunostaining intensity was lower. In MCF-7 cells, CHOP protein was not induced after 2-DG treatment (Figure 3). We did not detect any induction of CHOP in control cells of both cell lines.

2-DG treatment disrupts the N-linked glycosylation pathway in breast cancer cells.

By the use of competition with mannose, we further wanted to determine whether the induction of ER stress observed in 2-DG-treated cells could arise from the disruption of the N-linked glycosylation of proteins. To tackle this point, the steady-state glycosylation status of LAMP2, an extensively N- glycosylated lysosomal resident protein, was followed in MCF-7 and MDA-MB-231 exposed to 2-DG treatment for 24 or 48 h in the presence or absence of mannose. As presented on western blots (Figure 4), a more pronounced decrease in LAMP2 molecular weight in cells exposed to 2-DG cells was observed compared to untreated cells. Remarkably, when mannose was added to the cell culture, the altered gel mobility of LAMP2 was completely suppressed in cells treated with 2-DG. One can also notice that 2-DG treatment in MDA-MB-231 cells alters the stability of LAMP2 likely due to the N-glycosylation defect. The mannose treatment also suppresses this observed decreased intensity of the immunodetection signal. Altogether these results demonstrate that (i) 2-DG treatment disrupts the N-linked glycosylation pathway and (ii) the mannose supplementation prevents the action of 2-DG on this pathway.

The 2-DG-induced disruption of the N-linked glycosylation pathway leads to ER stress in breast cancer cells.

In order to assess whether ER stress induced by 2-DG treatment was a consequence of the alteration of the N-linked glycosylation of proteins, cells were exposed to 2-DG in the presence

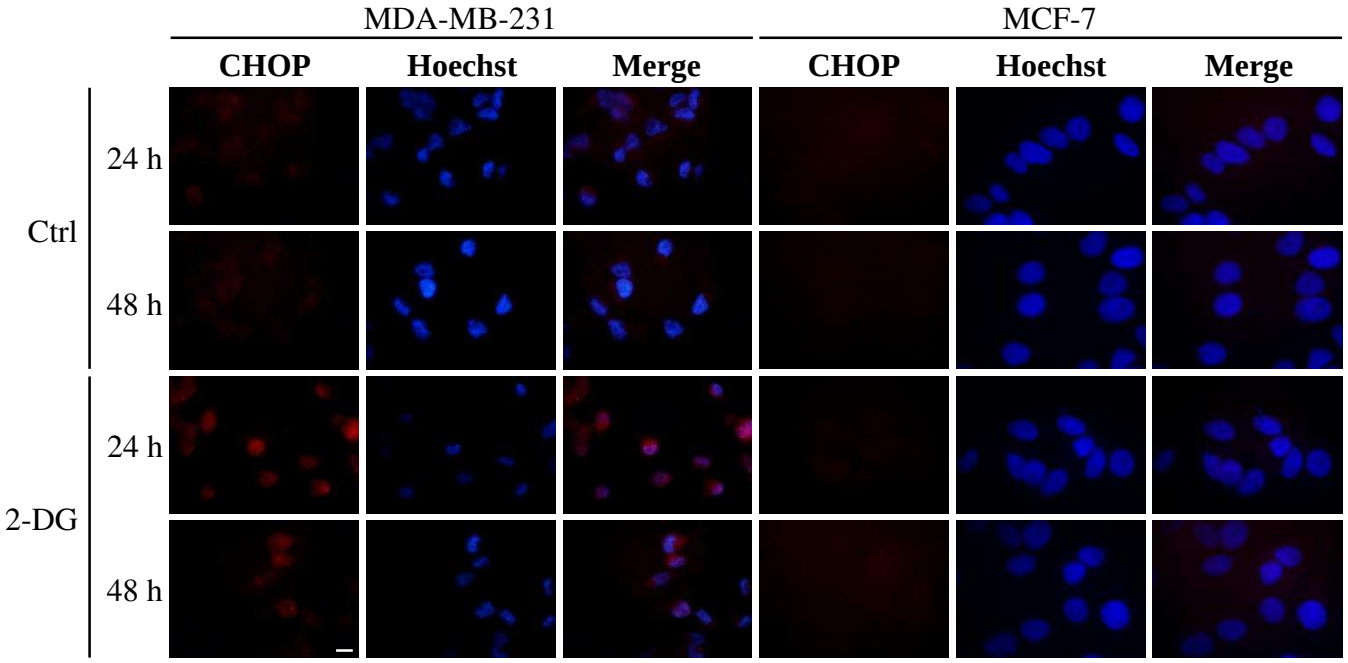

Figure 3: 2-DG induces the expression of CHOP in MDA-MB-231 cells, but not in MCF-7 cells. Cells were treated or not (Control, Ctrl) for 24 and 48 h with 2-DG (5 mM for MDA-MB-231 and 4 mM for MCF-7). Cells were fixed and subjected to CHOP immunodetection. Cells were counterstained with Hoechst dye and the merged pictures were presented for each condition. Bar represents 10 µm.

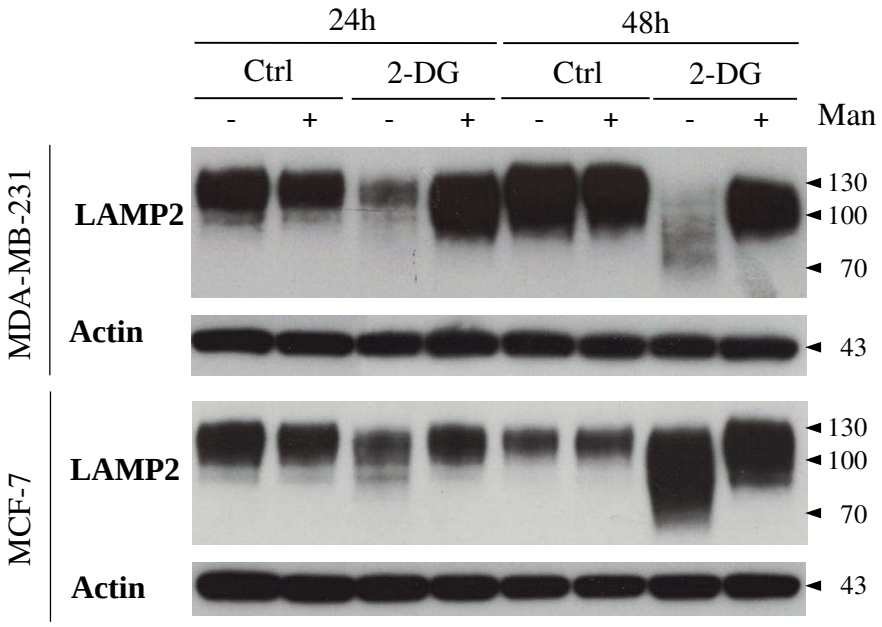

Figure 4: Mannose prevents the observed 2-DG-induced alteration of N-linked protein glycosylation. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated or not (Ctrl) with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) in the presence (+) or absence (-) of mannose (Man, 1 mM).Western blot analysis was then performed using anti-LAMP2 and anti-actin antibodies. Actin was used as a loading control. Protein MW (KDa) are indicated on the right.

or absence of mannose to follow the expression of ER stress markers. At first, whatever the cell line and the ER stress marker studied, we did not detect any modification in control cells in the presence or absence of mannose (Figure 5). In both cell lines, the presence of mannose prevented the phosphorylation of PERK and the induction of BiP expression, usually observed in response to 2-DG treatment (Figure 5A). Similarly, in MDA-MB-231 cells, the cleavage of *XBP-1* mRNA observed after 6 h treatment with 2-DG was absent in the presence of mannose (Figure 5B). The increase in the expression of CHOP induced by a 24 h 2-DG treatment of MDA-MB-231 cells was also highly reduced in the presence of mannose (Figure 5C). Due to the absence of XBP-1 mRNA cleavage and CHOP expression in 2-DG treated MCF-7 cells, the impact of competition with mannose was not studied in this cell line. Thus, in the two breast cancer cells, addition of exogenous mannose attenuated the effects of 2-DG on N-linked glycosylation of proteins and on the resulting ER stress.

2-DG treatment still induces a blockage of glycolysis in the presence of mannose.

MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 48 h with 2-DG and the production of lactate was measured as an indicator of the glycolytic activity of breast cancer cells. After addition of 2-DG, we detected a 2.3-fold and 3.3-fold decrease in lactate production (Figure 6A) in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively (Figure 6B). Production of lactate was thus significantly reduced in 2-DG-treated cells. Then, we analyzed the effects of exogenous mannose on the 2-DG-induced inhibition of glycolysis. In control cells, the presence of mannose did not modify lactate production in both cell lines (Figure 6). Addition of mannose did not impact the lactate production induced by 2-DG in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. So, addition of mannose specifically altered ER stress related to 2-DG-induced inhibition of N-linked glycosylation without disturbing the 2-DG induced glycolytic inhibition.

The anticancer effect of 2-DG is attenuated in the presence of mannose.

To characterize the relative contribution of glycosylation and glycolysis inhibition in the anticancer effects of 2-DG, MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for 48 h with 2-DG in the presence or absence of mannose and cell number was evaluated by a crystal violet staining assay. First, addition of mannose alone did not modify the cell number compared to control conditions (Figure 7). In MDA-MB-231 cells, a 70% decrease in the cell number was observed in 2-DG-treated cells (Figure 7A). In the presence of mannose, this decrease was limited to 44%. Thus in MDA-MB-231 cells, mannose reduced the anticancer effect of 2-DG by 38% (1

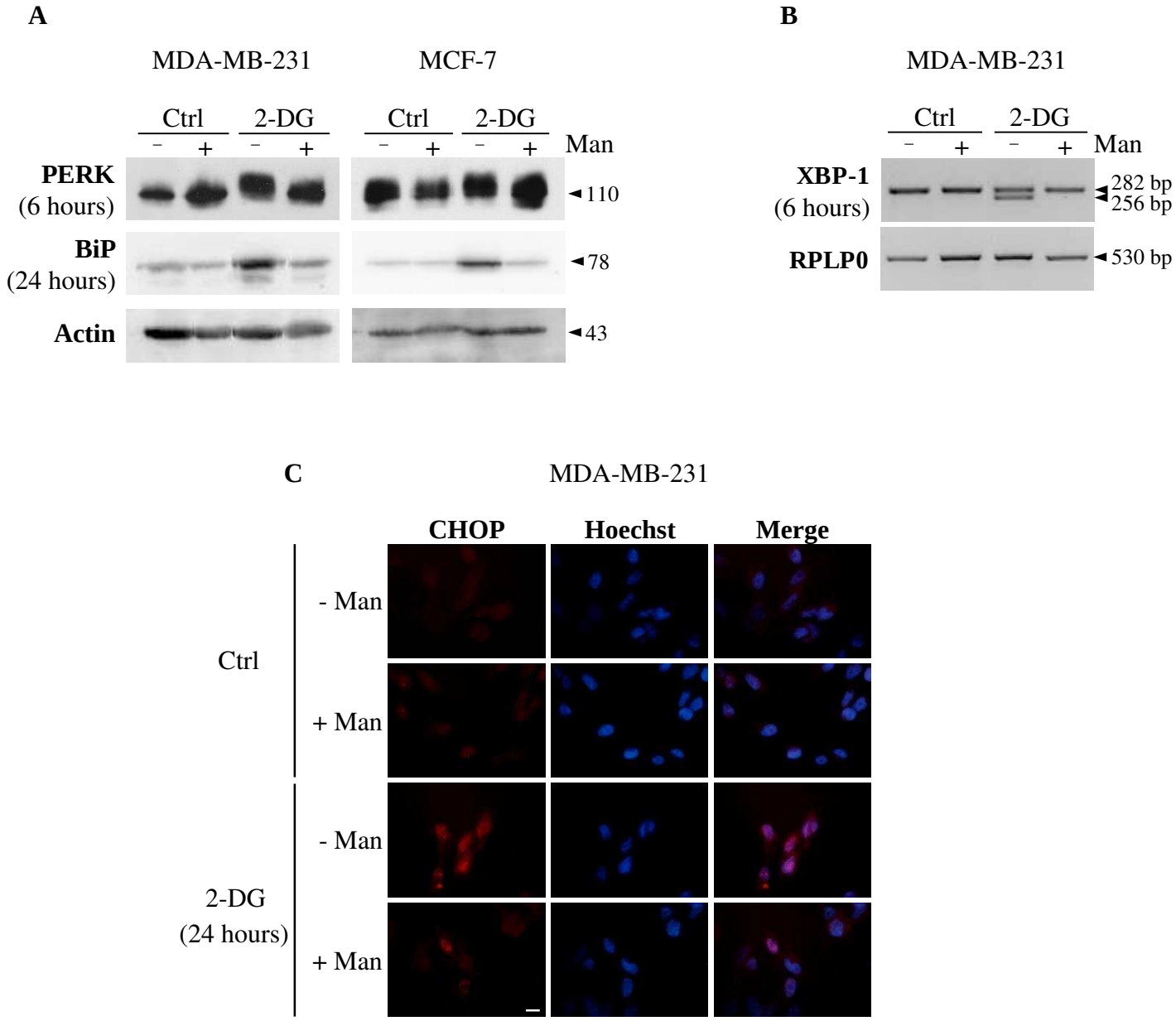

Figure 5: Mannose prevents 2-DG-induced ER stress. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated or not (Control, Ctrl) for indicated times with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) in the presence (+) or absence (-) of mannose (Man, 1 mM). Cells were harvested for protein (A, C) or RNA (B) analysis. (A) Western blot analysis was performed using anti-PERK and anti-BiP antibodies. Actin was used as a loading control. Protein MW (KDa) are indicated on the right. (B) RT-PCR analysis was carried out using specific primers to detect XBP-1 mRNA expression. The 282 bp-long and 256 bp-long PCR products correspond respectively to the unspliced and spliced forms of XBP-1 mRNA. The housekeeping gene RPLP0 was used as a control. (C) MDA-MB-231 cells were fixed and CHOP protein was immunodetected. Cells were additionally counterstained with Hoechst dye and the merged photos were presented for each condition. Bar represents 10 µm.

– 44%/70%). In MCF-7 cells, a 42% reduction in the number of 2-DG-treated cells was detected (Figure 7B). In the presence of mannose, cell number was only diminished by 22%. Thus in MCF-7 cells, mannose reduced the anticancer effect of 2-DG by 47% (1 – 22%/42%). Interference with N-linked glycosylation of proteins thus appeared to contribute to around 42% of the anticancer effects of 2-DG in these breast cancer cells.

DISCUSSION

It has been demonstrated that 2-DG, known as a glycolytic inhibitor, reduces energy production in several types of cancer cells (Kuntz 2014). However, 2-DG exhibits several intracellular activities and its mode of action is more complex. In the present work, we studied two breast cancer cell lines in order to determine the part played by glycolysis inhibition and N-linked glycosylation interference, respectively, in the anticancer effect of 2-DG.

First, we characterized the effects of 2-DG on breast cancer cells by analyzing cell number. Our results showed that both MDA-MB-231 cells (hormone-independent) and MCF-7 cells (hormone-dependent) were affected by 2-DG. The IC_{50} we measured after 48 h (3.1 mM and 4.2 mM for MCF-7 and MDA-MB-231 cells respectively) were in the millimolar range previously reported in other studies for these cancer cell lines. For instance, the IC_{50} described for MCF-7 cells in three different studies were 4.2 mM after 72 h, 8.1 mM after 96 h and around 8 mM after 120 h (15-17). In MDA-MB-231 an IC_{50} around 10 mM was reported after a 48 h treatment (18). Another study also reported the sensitivity of MDA-MB-231 cells in case of a 48 h treatment with high doses of 2-DG (20 mM) but IC_{50} values were not calculated (19). Although all these values are in the millimolar range, the differences among the studies could be explained by the kind of test used to measure cell number and by the duration of the treatment. The medium used for cell growth and its glucose concentration could also enter into account (20). Difference in sensitivity to 2-DG between cell lines has already been reported. For instance, Aft *et al.*, studied four different breast cancer cell lines and observed varying sensitivity to the cytostatic effect of 2-DG with SkBr3 being the most sensitive one (21). These differences in sensitivity could be the result of differences in the kinetics of 2-DG uptake. Indeed, it has been reported that the uptake of ^{3}H-2-DG was faster in MCF-7 than in MDA-MB-231 cells (22).

In the present work, we report that 2-DG alters the N-glycosylation process in breast cancer cell lines, reinforcing the data obtained by Kurtoglu *et al.* in MDA-MB-231 cells (14). Beside, competition with mannose completely prevents the interference of 2-DG with both N-

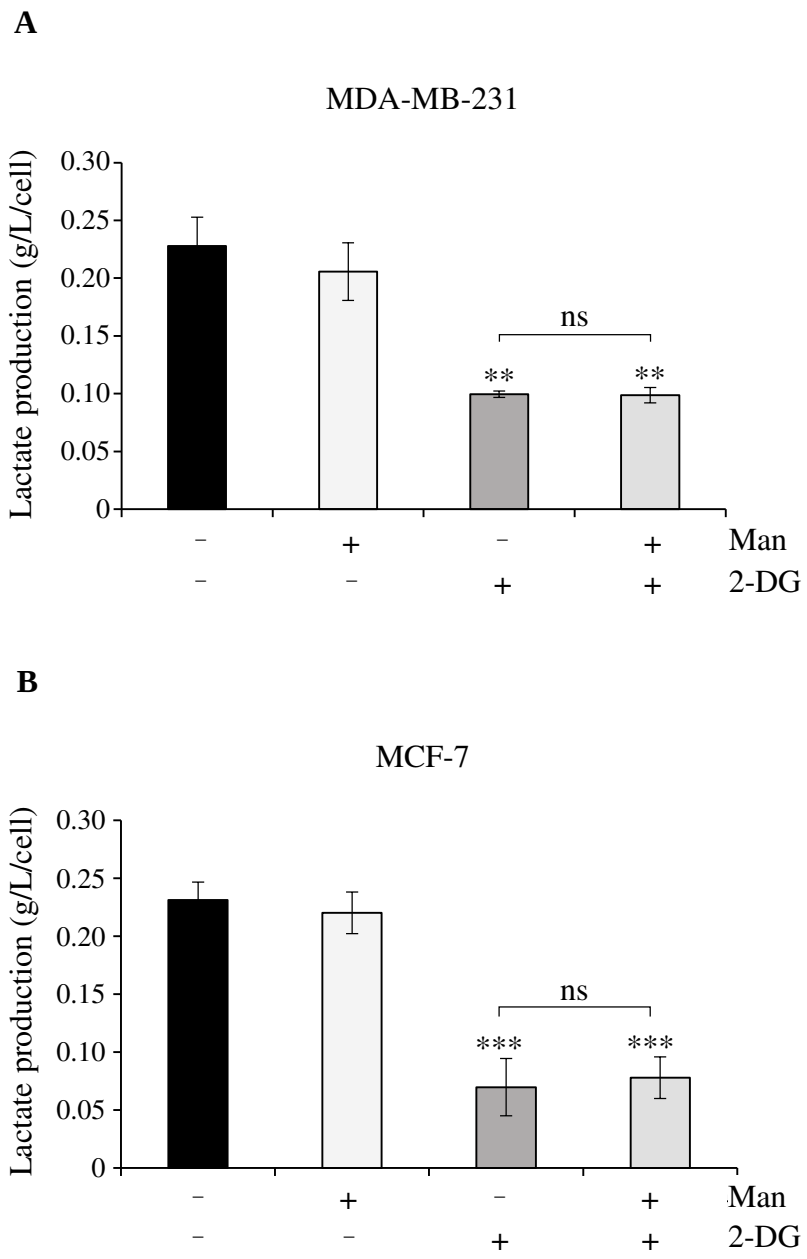

Figure 6: 2-DG reduces lactate production, even in the presence of mannose. MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B) cells were treated or not for 48 h with 2-DG (5 and 4 mM, respectively), in the presence (+) or absence (-) of mannose (Man, 1 mM). Lactate concentration in culture medium was assessed using a biochemistry analyser and cell number was evaluated by a crystal violet staining assay. Production of lactate per cell was then calculated for each condition. Results are depicted as mean ± s.e.m. of three independent experiments. **, P<0.01 compared with control cells. ***, P<0.001 compared with control cells. Not significant (ns) between conditions with or without mannose.

glycosylation and ER stress. These data strongly suggest that ER stress is the consequence of the N-glycosylation alteration observed in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. Then, we further analyzed several players of the UPR activated in case of ER stress. The phosphorylation of PERK, the splicing of *XBP-1* mRNA, and the induction of the chaperone BiP were studied at several time points and revealed that ER stress and the UPR were transient. These events were observed in both cell lines except *XBP-1* mRNA splicing which was not seen in MCF-7 cells. This difference between the two cell lines is in agreement with other studies. Indeed, Δ2-TGZ (a troglitazone derivative), TZD18 (a PPARα/γ dual agonist), and the indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet were reported to induce a more extended splicing of *XBP-1* mRNA in MDA-MB-231 cells compared to MCF-7 cells (23-25). Our results showing the induction of ER stress and the activation of the UPR by 2-DG in breast cancer cells are in agreement with other studies. For instance, the induction of BiP/GRP78 was reported in MDA-MB-231 treated with 10 mM 2-DG and this could be transient since a peak of BiP expression was observed at 16 h (18). The induction of BiP and GRP94, another ER chaperone, were also reported in this cell line after a 24 h treatment with 4 mM 2-DG but no time-course analysis was performed (14). The induction of ER stress and UPR by 2-DG was described with more details in other cell types including SkBr3 (breast cancer), 1420 (pancreatic cancer), MDA-MB-435 (melanoma), Rh4 (alveolar rhabdomyosarcoma) and HUVEC (14,26-29). The induction of ER stress in several conditions seems to be protective for the cells (for a review see (7)). In the case of the 2-DG treatment performed in our study, one might suggest that it could be the case since MCF-7 cells are less efficient to trigger the UPR and they are more sensitive to 2-DG than MDA-MB-231 cells. Nevertheless, the results of our competition experiments using mannose disagree with a protective role of ER stress since mannose, compound that prevents this process, reverses 2-DG cytotoxicity. Such a reversion of ER stress and UPR in presence of mannose has never been described for these two cell lines but was previously observed in other cell types (14,28,29). If ER stress is not protective and the cell can not overcome this process, the up-regulation of CHOP could lead to the activation of an UPR-specific apoptotic pathway (30). Indeed, we confirm that 2-DG induces CHOP expression in MDA-MB-231, but surprisingly we were not able to detect CHOP protein in MCF-7 cells. This absence could be explained by the partial ER stress response observed in MCF-7 cells (weak PERK phosphorylation level, absence of *XBP-1* mRNA cleavage and low BiP protein expression level). This data strongly suggest that CHOP protein may not be the mediator of the 2-DG-induced cytotoxic effect associated with the N-glycosylation alteration in MCF-7 cells. This absence of link between apoptosis and ER stress has been previously illustrated in MCF-7 and LNCaP cells treated with

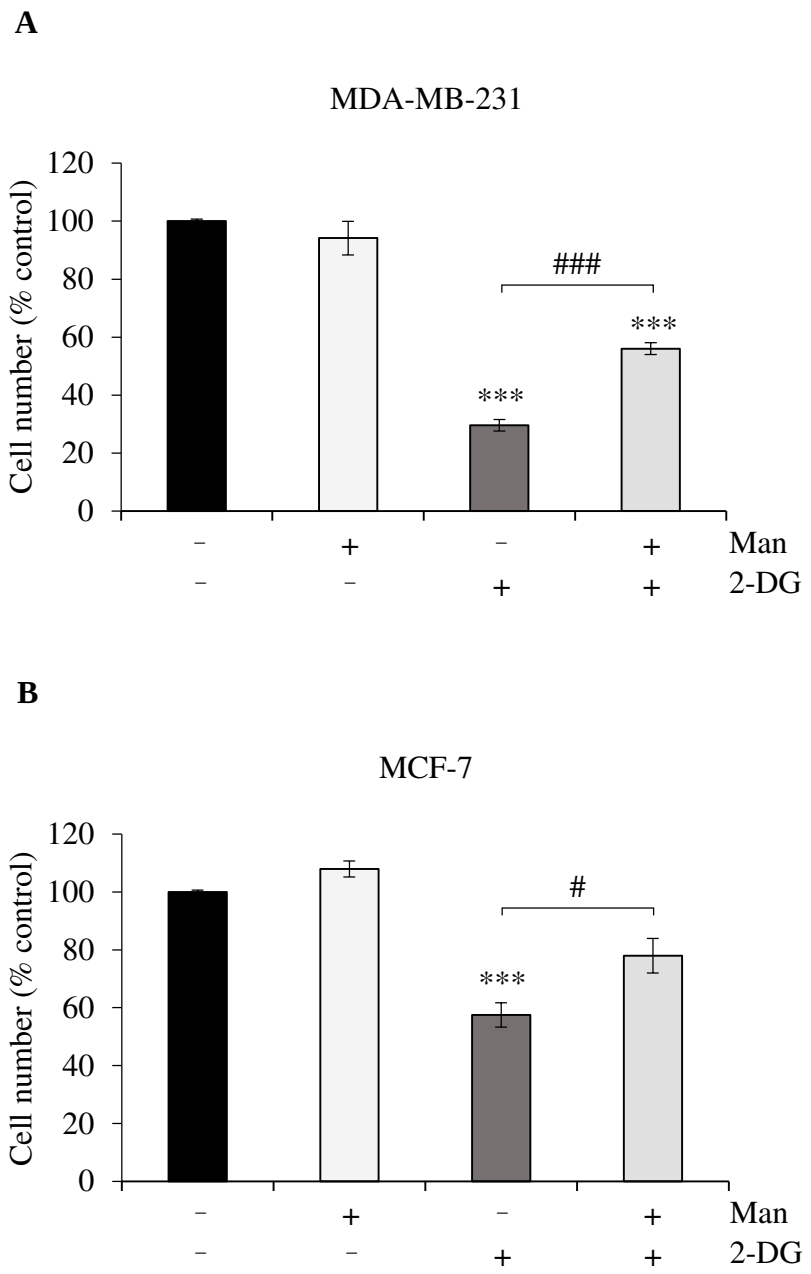

Figure 7: Effects of 2-DG on cell number are attenuated in the presence of mannose. MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B) cells were treated or not for 48 h with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) in the presence (+) or absence (-) of mannose (Man, 1 mM). Cell number was determined by a crystal violet staining assay. Results are depicted as mean ± s.e.m. of three independent counts performed in triplicate. ***, P<0.001 compared with control cells. #, P<0.05 between conditions with or without mannose. ###, P<0.001 between conditions with or without mannose.

thiazolidinediones compounds (16,31). In contrast, in lymphoma and rhabdomyosarcoma cells, 2-DG induces an UPR-mediated mitochondrial apoptosis involving CHOP and ATF-4 (29,32,33). This discrepancy could be dependant on the cellular context.

Then, we analyzed the effects of 2-DG on glycolysis. We observed in both MCF-7 and MDA-MB-231 exposed to 2-DG for 48 h that lactate production was greatly reduced (2.3-fold and 3.3-fold in MDA-MB-231 and MCF-7 cells respectively). This result is in agreement with other studies performed in MCF-7 in which the inhibiting effect of 2-DG on glycolysis were appreciated by ATP measurement (15,17,34). In the presence of mannose, ER stress and UPR did not occur but the decrease in lactate production was still observed in MDA-MB-231 and MCF-7 cells treated with 2-DG indicating that mannose did not interfere with glycolysis inhibition. This was also described in other cell types, including pancreatic cancer cells (1420), breast cancer cells (SkBr3) and melanoma cells (MDA-MB-235) (35). Since in absence of ER stress and UPR, cell number was still affected by 2-DG, it indicates that inhibition of glycolysis is involved in the anticancer effect of 2-DG in our two cell lines.
Thus it appears that both protein N-glycosylation and glycolysis inhibitions contribute to the anticancer effect of 2-DG in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. In these two cell lines, we used 2-DG at concentrations slightly higher than the IC_{50} we measured. It could be interesting to complete this work by an analysis of the effect of lower doses. Indeed, a hierarchy of 2-DG's activity could exist where at low concentrations it interferes with N-linked glycosylation but at moderate concentrations glycolysis is also inhibited (36). This could be due to the 50 times lower concentration of mannose as compared to glucose found not only in culture medium but also in human blood (26). In the B precursor acute lymphoblastic leukemia cells (Bp-ALL), 2-DG induced cell death that depends on the inhibition of both pathways (37). This is different of what occurs in other cancer cells in which N-linked glycosylation and the related ER stress are a predominant mechanism of 2-DG cytotoxicity. Indeed, alteration of N-linked glycosylation is the major mechanism by which low-dose of 2-DG induces cell death in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells (37). 2-DG acts through inhibition of N-linked glycosylation and UPR in SkBr3 and pancreatic 1420 cancer cells to induce cell death (14). ER stress also mediates rhabdomyosarcoma cell death since mannose completely protects from 2-DG (29,33). 2-DG also induces HUVEC apoptosis mainly by interfering with endothelial N-linked glycosylation, UPR induction and activation of UPR-mediated apoptotic pathway (28). In gastrointestinal stromal tumors, mannose counteracts the growth inhibiting

effects of 2-DG whereas pyruvate, the product of glycolysis that rescues cells from 2-DG-induced energy starvation did not affect cell growth (38).

To conclude, our study provides a better understanding of the action of 2-DG in an hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. 2-DG, at the concentration we used, acts not only through glycolysis inhibition but also by interference with the N-glycosylation of proteins. This last property opens new therapeutic perspective for this compound, such as angiogenic inhibition of endothelial cells (39). In cancer cells, these data could be useful for future studies since 2-DG seems promising to enhance chemosensitivity and radiosensitivity in combination therapies (7).

GRANT SUPPORT

This project was funded by University of Lorraine and Région of Lorraine.

REFERENCES

1. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nature reviews Cancer 2011;11(5):325-37.
2. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nature reviews Cancer 2011;11(2):85-95.
3. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. Nature reviews Cancer 2002;2(9):683-93.
4. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nature reviews Cancer 2004;4(11):891-9.
5. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. Cell death & disease 2013;4:e532.
6. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. Frontiers in pharmacology 2011;2:49.
7. Kuntz S, Mazerbourg S, Boisbrun M, Cerella C, Diederich M, Grillier-Vuissoz I, et al. Energy restriction mimetic agents to target cancer cells: comparison between 2-deoxyglucose and thiazolidinediones. Biochem Pharmacol 2014;92(1):102-11.
8. Nakada HI, Wick AN. The effect of 2-deoxyglucose on the metabolism of glucose, fructose, and galactose by rat diaphragm. The Journal of biological chemistry 1956;222(2):671-6.
9. Chen W, Gueron M. The inhibition of bovine heart hexokinase by 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate: characterization by 31P NMR and metabolic implications. Biochimie 1992;74(9-10):867-73.
10. Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. The Journal of biological chemistry 1957;224(2):963-9.
11. Karczmar GS, Arbeit JM, Toy BJ, Speder A, Weiner MW. Selective depletion of tumor ATP by 2-deoxyglucose and insulin, detected by 31P magnetic resonance spectroscopy. Cancer research 1992;52(1):71-6.
12. Datema R, Schwarz RT. Formation of 2-deoxyglucose-containing lipid-linked oligosaccharides. Interference with glycosylation of glycoproteins. European journal of biochemistry 1978;90(3):505-16.
13. Schmidt MF, Schwarz RT, Scholtissek C. Nucleoside-diphosphate derivatives of 2-deoxy-D-glucose in animal cells. European journal of biochemistry 1974;49(1):237-47.
14. Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. Mol Cancer Ther 2007;6(11):3049-58.

15. Tagg SL, Foster PA, Leese MP, Potter BV, Reed MJ, Purohit A, et al. 2-Methoxyoestradiol-3,17-O,O-bis-sulphamate and 2-deoxy-D-glucose in combination: a potential treatment for breast and prostate cancer. British journal of cancer 2008;99(11):1842-8.

16. Wei S, Kulp SK, Chen CS. Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones. The Journal of biological chemistry 2010;285(13):9780-91.

17. Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, Thompson HJ. 2-Deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: effects on mammary carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro. Cancer research 2005;65(15):7023-30.

18. Huang YY, Liu H, Li Y, Pu LJ, Jiang CC, Xu JC, et al. Down-regulation of RIP1 by 2-deoxy-D-glucose sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. European journal of pharmacology 2013;705(1-3):26-34.

19. Andringa KK, Coleman MC, Aykin-Burns N, Hitchler MJ, Walsh SA, Domann FE, et al. Inhibition of glutamate cysteine ligase activity sensitizes human breast cancer cells to the toxicity of 2-deoxy-D-glucose. Cancer research 2006;66(3):1605-10.

20. Kaplan O, Navon G, Lyon RC, Faustino PJ, Straka EJ, Cohen JS. Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. Cancer research 1990;50(3):544-51.

21. Aft RL, Zhang FW, Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. British journal of cancer 2002;87(7):805-12.

22. Moreira L, Araujo I, Costa T, Correia-Branco A, Faria A, Martel F, et al. Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. Experimental cell research 2013;319(12):1784-95.

23. Galluzzi L, De Santi M, Crinelli R, De Marco C, Zaffaroni N, Duranti A, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress response by the indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet in human breast cancer cell lines. PloS one 2012;7(8):e43249.

24. Zang C, Liu H, Bertz J, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. Molecular cancer therapeutics 2009;8(8):2296-307.

25. Berthe A, Flament S, Grandemange S, Zaffino M, Boisbrun M, Mazerbourg S. Delta2-Troglitazone promotes cytostatic rather than pro-apoptotic effects in breast cancer cells cultured in high serum conditions. Cell cycle 2016;15(24):3402-12.

26. Liu H, Kurtoglu M, Cao Y, Xi H, Kumar R, Axten JM, et al. Conversion of 2-deoxyglucose-induced growth inhibition to cell death in normoxic tumor cells. Cancer Chemother Pharmacol 2013;72(1):251-62.

27. Ramirez-Peinado S, Leon-Annicchiarico CL, Galindo-Moreno J, Iurlaro R, Caro-Maldonado A, Prehn JH, et al. Glucose-starved cells do not engage in prosurvival autophagy. J Biol Chem 2013;288(42):30387-98.

28. Merchan JR, Kovacs K, Railsback JW, Kurtoglu M, Jing Y, Pina Y, et al. Antiangiogenic activity of 2-deoxy-D-glucose. PloS one 2010;5(10):e13699.

29. Ramirez-Peinado S, Alcazar-Limones F, Lagares-Tena L, El Mjiyad N, Caro-Maldonado A, Tirado OM, et al. 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. Cancer research 2011;71(21):6796-806.

30. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes & development 1998;12(7):982-95.

31. Colin-Cassin C, Yao X, Cerella C, Chbicheb S, Kuntz S, Mazerbourg S, et al. PPARγ-inactive Δ2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. Mol Carcinog 2015;54(5):393-404.

32. Zagorodna O, Martin SM, Rutkowski DT, Kuwana T, Spitz DR, Knudson CM. 2-deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. Oncogene 2012;31(22):2738-49.

33. Leon-Annicchiarico CL, Ramirez-Peinado S, Dominguez-Villanueva D, Gonsberg A, Lampidis TJ, Munoz-Pinedo C. ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. The FEBS journal 2015;282(18):3647-58.

34. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC, Jr., Joseph J, et al. Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. Cancer research 2012;72(10):2634-44.

35. Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M, Liu X, et al. 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. Cancer Chemother Pharmacol 2011;67(4):899-910.

36. Xi H, Kurtoglu M, Lampidis TJ. The wonders of 2-deoxy-D-glucose. IUBMB life 2014;66(2):110-21.

37. DeSalvo J, Kuznetsov JN, Du J, Leclerc GM, Leclerc GJ, Lampidis TJ, et al. Inhibition of Akt potentiates 2-DG-induced apoptosis via downregulation of UPR in acute lymphoblastic leukemia. Mol Cancer Res 2012;10(7):969-78.

38. Muhlenberg T, Grunewald S, Treckmann J, Podleska L, Schuler M, Fletcher JA, et al. Inhibition of KIT-glycosylation by 2-deoxyglucose abrogates KIT-signaling and combination with ABT-263 synergistically induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor. PloS one 2015;10(3):e0120531.

39. Kovacs K, Decatur C, Toro M, Pham DG, Liu H, Jing Y, et al. 2-Deoxy-Glucose Downregulates Endothelial AKT and ERK via Interference with N-Linked Glycosylation, Induction of Endoplasmic Reticulum Stress, and GSK3beta Activation. Molecular cancer therapeutics 2016;15(2):264-75.

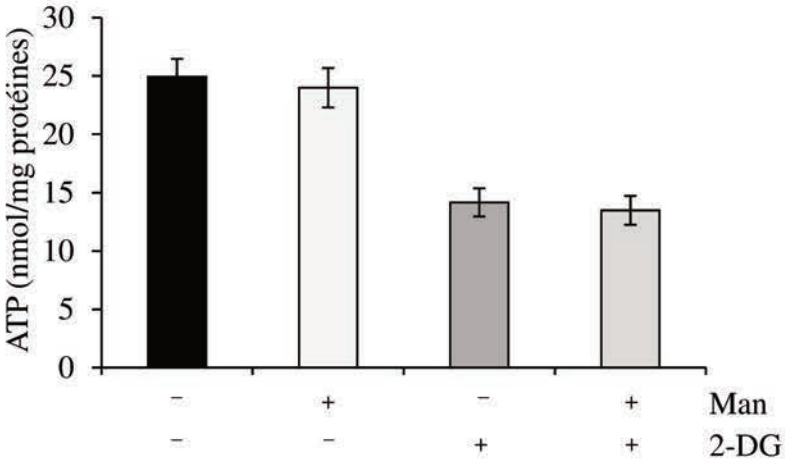

Figure 57 : Le 2-DG induit une diminution du niveau d'ATP, même en présence de mannose. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 h avec 5 mM de 2-DG, en présence (+) ou en absence (-) de mannose (Man, 1 mM). Les cellules contrôles étaient non traitées. A l'issue du traitement, la quantité d'ATP intracellulaire a été mesurée en utilisant le kit ENLITEN® ATP Assay System, basé sur de la chimioluminescence. La concentration protéique a été déterminée en parallèle par dosage protéique avec la méthode de Bradford. Puis la quantité d'ATP par mg de protéines a été calculée pour chaque condition. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM de quatre expériences indépendantes.

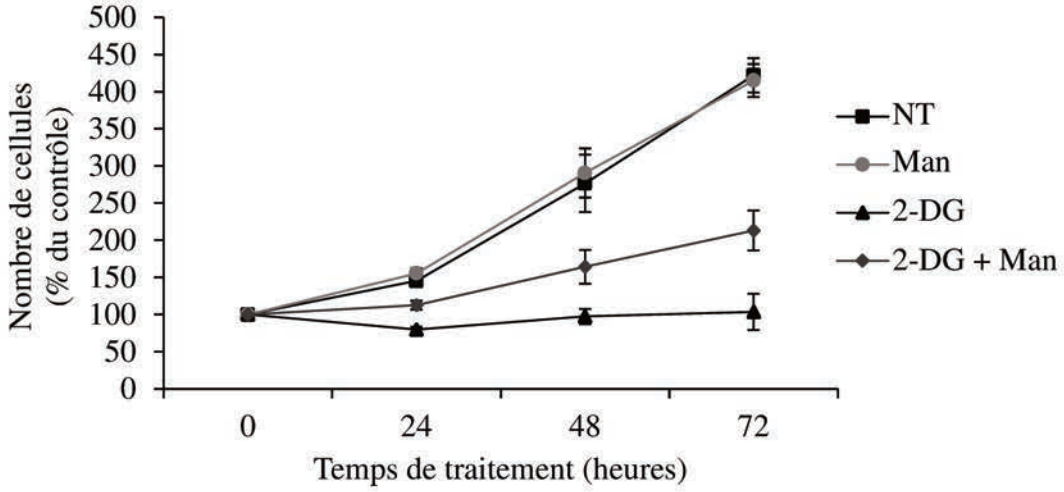

Figure 58 : La présence de mannose atténue les effets du 2-DG sur le nombre de cellules au cours du temps. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24, 48 et 72 h avec 5 mM de 2-DG, en présence ou non de mannose (Man, 1 mM). Les cellules contrôles étaient non traitées. A la fin du traitement, le nombre de cellules a été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM de trois expériences indépendantes.

4. Résultats complémentaires

4.1 Etude des effets du 2-DG sur le niveau d'ATP intracellulaire en présence ou non de mannose

Parallèlement à l'analyse de la production de lactate, nous avons mesuré la quantité d'ATP intracellulaire, afin d'évaluer le statut métabolique des cellules cancéreuses mammaires. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 heures avec 5 mM de 2-DG. Les cellules contrôles étaient non traitées. La quantité d'ATP intracellulaire a ensuite été déterminée grâce à grâce au kit ENLITEN® ATP Assay (Promega) basé sur de la chimioluminescence. Dans les cellules ayant reçu du 2-DG, le niveau d'ATP diminue d'environ 1,8 fois par rapport aux cellules non traitées (Figure 57). Le 2-DG induit donc une réduction du niveau d'ATP dans les cellules MDA-MB-231. L'ajout de mannose (1 mM), utilisé seul ou en présence de 2-DG, n'induit pas de variation du niveau d'ATP (Figure 57). Ces données confirment que l'addition de mannose n'interfère pas avec la perturbation du métabolisme énergétique induite par le 2-DG dans les cellules cancéreuses mammaires.

4.2 Etude des effets du 2-DG sur le nombre de cellules lors d'une cinétique de traitement en présence ou non de mannose

Nous avons analysé les effets antiprolifératifs du 2-DG sur plusieurs jours de traitement. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24, 48 et 72 heures avec une dose fixe de 2-DG (5 mM). Les cellules contrôles étaient non traitées. Le nombre de cellules a ensuite été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Dans les cellules non traitées, le nombre de cellules augmente progressivement au cours du temps (Figure 58). Par contre, dans les cellules traitées, le 2-DG induit une stagnation du nombre de cellules au cours du temps. Cet effet est en partie atténué par l'ajout de 1 mM de mannose puisque le nombre de cellules co-traitées avec le 2-DG et le mannose double au bout de 72 h de culture. La réversion par le mannose n'est que partielle puisque le nombre de cellules co-traitées est deux fois plus faible que le nombre de cellules non-traitées ou traitées avec le mannose seul au bout de 72 h de culture.

Ces résultats confirment que l'atteinte de la N-glycosylation contribue en partie aux effets antiprolifératifs du 2-DG dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

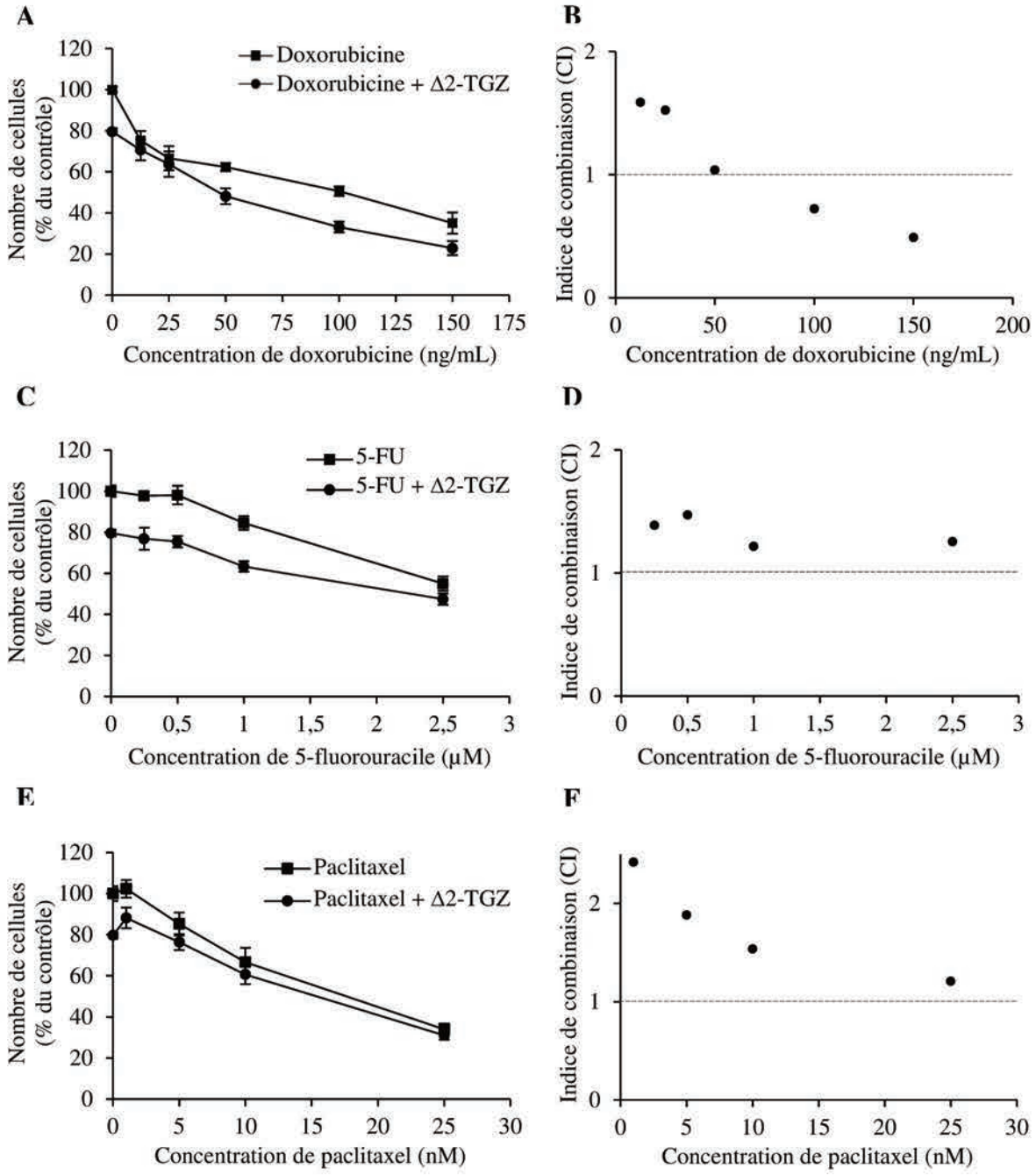

Figure 59 : La Δ2-TGZ augmente les effets de la doxorubicine sur le nombre de cellules, tandis que des effets antagonistes sont observés avec le 5-fluorouracile (5-FU) et le paclitaxel. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 72 h avec les molécules 5-FU (0,25; 0,5; 1 et 2,5 µM) (A), doxorubicine (12,5; 25; 50; 100 et 150 ng/mL) (B) et paclitaxel (1; 5; 10 et 25 nM) (C), utilisées seules ou en combinaison avec la Δ2-TGZ (15 µM). Les cellules témoins étaient non-traitées (A) ou bien elles ont reçu soit du DMSO (0,001%; solvant du 5-FU, B), soit de l'éthanol (0,02%; solvant du paclitaxel, C). Le nombre de cellules a ensuite été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet (A, C, E) et l'indice de combinaison (CI) a été calculé pour chaque combinaison de doses (B, D, F) d'après la méthode de Chou-Talalay. Un CI inférieur, égal ou supérieur à 1 correspond respectivement à des effets synergiques, additifs ou antagonistes entre deux molécules. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± ESM d'au moins trois expériences indépendantes.

IV. ETUDE PRELIMINAIRE SUR L'UTILISATION DE LA Δ2-TGZ EN THERAPIE COMBINATOIRE

Comme décrit dans le paragraphe III.3 de l'introduction, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les TZDs, utilisées en thérapie combinatoire, sont capables d'augmenter les effets de différentes molécules anticancéreuses. Plus généralement, des agents ciblant le métabolisme énergétique peuvent potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie (Zhao *et al.* 2013). Dans une dernière partie de mon travail, j'ai donc débuté une étude sur l'utilisation de la Δ2-TGZ en thérapie combinatoire avec de la doxorubicine, du 5-fluorouracile (5-FU) et du paclitaxel, trois agents communément utilisés en chimiothérapie pour le traitement du cancer du sein. Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ont été choisies comme modèle d'étude. Elles ont été traitées pendant 72 heures avec la doxorubicine, le 5-FU et le paclitaxel, utilisés seuls ou en combinaison avec une dose faible de Δ2-TGZ (15 µM). Le nombre de cellules a ensuite été déterminé par une coloration de l'ADN au cristal violet. Une diminution progressive du nombre de cellules est observée avec des doses croissantes d'agent de chimiothérapie (5-FU, doxorubicine ou paclitaxel), tandis qu'une dose fixe (15 µM) de Δ2-TGZ induit une baisse d'environ 20% du nombre de cellules (Figure 59A, C et E). Pour des concentrations faibles de 5-FU (inférieures à 2,5 µM) et de paclitaxel (inférieures à 25 nM) ou bien des concentrations élevées de doxorubicine (supérieures à 25 ng/mL), la diminution du nombre de cellules est plus forte dans les cellules co-traitées avec la Δ2-TGZ que dans les cellules traitées avec une seule molécule. Les effets sur le nombre de cellules sont en revanche similaires avec ou sans Δ2-TGZ pour des doses élevées de 5-FU et de paclitaxel (2,5 µM et 25 nM respectivement) ou bien des concentrations faibles de doxorubicine (12,5 et 25 ng/mL).

A partir de ces résultats, nous avons ensuite calculé le CI pour chaque combinaison de doses, selon la méthode de Chou-Talalay. Un CI inférieur, égal ou supérieur à 1 correspond respectivement à des effets synergiques, additifs ou antagonistes entre deux molécules. Le 5-FU et le paclitaxel sont associés à un CI supérieur à 1, quelle que soit la concentration de molécule utilisée (Figure 59D et F). Le CI tend toutefois vers 1 lorsque la concentration en paclitaxel augmente. Quant à la doxorubicine, le CI est soit supérieur à 1 pour des doses faibles de composé (12,5 et 25 ng/mL), soit il est égal ou inférieur à 1 pour des concentrations élevées de molécule (CI de 1,03 pour 50 ng/mL et CI>1 pour 100 et 150 ng/mL) (Figure 59B). Des effets antagonistes sont donc observés avec le 5-FU et le paclitaxel. La Δ2-TGZ et la doxorubicine ont quant à elles soit des effets antagonistes pour des concentrations faibles (12,5 et 25 ng/mL) de doxorubicine, soit des effets additifs pour 50 ng/mL de doxorubicine. Par

contre, des effets synergiques sont observés avec des doses plus élevées de doxorubicine (100 et 150 ng/mL).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la Δ2-TGZ ne potentialise pas les effets anticancéreux du 5-FU et du paclitaxel mais en revanche, elle augmente l'action de la doxorubicine sur les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Dans cette discussion générale, nous avons choisi de ne pas reprendre les éléments déjà discutés dans les articles. Il s'agit plutôt de se focaliser sur quelques points de mon travail.

Les travaux menés au laboratoire durant ces dernières années ont permis de mieux caractériser les effets anticancéreux des TZDs. Notre équipe s'est intéressée plus particulièrement à la TGZ et à certains de ses dérivés comme la Δ2-TGZ qui est incapable d'activer PPARγ mais possède toujours une activité anticancéreuse. Nous avons donc contribué à mieux comprendre les mécanismes moléculaires PPARγ-indépendants impliqués dans les effets anti-cancéreux de ces molécules. Cependant, le ou les mécanismes moléculaires initiateurs ne sont pas identifiés à ce jour. Plusieurs données suggèrent qu'une altération du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses serait à l'origine des effets des TZDs (Wei *et al.* 2010). Aussi, dans le but de tester cette hypothèse et de mieux comprendre le mode d'action de la Δ2-TGZ, l'objectif principal de ma thèse a donc été de déterminer si ce composé perturbe le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires.

I. LA Δ2-TGZ ALTERE LE METABOLISME ENERGETIQUE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Au cours de ce travail, nous avons montré que la Δ2-TGZ perturbe le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Ce composé altère en effet la respiration mitochondriale des cellules, menant à une stimulation de la glycolyse.

Les résultats de cette étude sont cohérents avec les données précédemment obtenues pour d'autres TZDs. En effet, Moon *et al.* ont démontré que la TGZ altère la respiration mitochondriale et stimule l'activité glycolytique des cellules cancéreuses de sein T47D et de côlon HCT116 (Moon *et al.* 2016). De même, la PGZ induit une diminution de la consommation d'oxygène et stimule la production de lactate dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC3 (Gottfried *et al.* 2011). La Δ2-TGZ et d'autres TZDs semblent donc perturber le métabolisme énergétique de la même façon, suggérant un mécanisme d'action commun. D'un autre côté, des résultats différents ont été obtenus avec des dérivés de la Δ2-CGZ. Les composés OSU-CG12, OSU-CG30 et OSU-CG5 bloquent en effet l'entrée du glucose dans divers types de cellules cancéreuses (prostate, côlon et pancréas) (Wei *et al.* 2010, Lin *et al.* 2012, Wang and Green 2012, Arafa el *et al.* 2014, Lai *et al.* 2014, Shin *et al.* 2014). De plus, une baisse de la production de lactate et une diminution du taux de glycolyse ont été constatées en réponse à l'OSU-CG12 dans les cellules LNCaP (Wei *et al.* 2010). Les effets induits par la Δ2-TGZ diffèrent donc de ceux induits par les dérivés OSU. En accord avec cette hypothèse, nous avons

observé que contrairement à l'OSU-CG12, les effets antiprolifératifs de la Δ2-TGZ ne sont pas atténués en présence d'un excédent de glucose dans le milieu de culture des cellules MDA-MB-231.

Les modes d'action divergents de la Δ2-TGZ et des dérivés OSU pourraient être dus à l'atteinte d'une cible cellulaire distincte, tandis que la similarité d'action entre la Δ2-TGZ et d'autres TZDs pourrait résulter de l'atteinte d'une même cible dans la mitochondrie.

1. Quelles est la cible mitochondriale de la Δ2-TGZ ?

A ce jour, aucune cible cellulaire n'a été identifiée pour la Δ2-TGZ. Plusieurs cibles mitochondriales ont par contre été décrites pour d'autres TZDs. Au vu des résultats obtenus dans ce travail, nous pouvons donc suggérer quelques cibles potentielles de la Δ2-TGZ dans la mitochondrie. Tout d'abord, dans les années 2000, Brunmair *et al.* ont démontré que plusieurs TZDs, comme la TGZ, la PGZ et la RGZ, sont capables d'inhiber l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire dans les tissus musculaires et hépatiques murins (Brunmair *et al.* 2004). Nous pouvons donc imaginer une même action pour la Δ2-TGZ. Cette hypothèse paraît d'autant plus intéressante que la metformine, dont le mode d'action repose sur l'inhibition du complexe I, induit des effets similaires à ceux de la Δ2-TGZ dans la mitochondrie. De fait, dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, cette molécule provoque une diminution de la consommation d'oxygène endogène, associée à un découplage des mitochondries (Andrzejewski *et al.* 2014). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la Δ2-TGZ sur l'activité du complexe I. García-Ruiz *et al.* ont également démontré récemment que la PGZ est capable de se fixer sur des sous-unités du complexe I et d'entraîner un désassemblage de ce complexe *in vitro* et *in vivo*, entraînant ainsi une diminution de son activité (Garcia-Ruiz *et al.* 2013). L'action mitochondriale de la Δ2-TGZ pourrait donc être due à une interaction directe avec le complexe I. Néanmoins, le coenzyme NADH est le substrat de l'enzyme du complexe I, c'est-à-dire de la NADH déshydrogénase (Moussard 2006). Ainsi, si la Δ2-TGZ interagit avec le complexe I et l'inhibe, alors nous devrions observer une accumulation de NADH dans les cellules traitées avec la Δ2-TGZ. Nous avons cependant constaté dans les cellules MDA-MB-231 une augmentation du ratio NAD^+/NADH en réponse à la Δ2-TGZ, suggérant plutôt une accumulation de NAD^+. La Δ2-TGZ pourrait donc ne pas cibler directement le complexe I. Le métabolisme du NAD est toutefois très complexe, au-delà de sa simple utilisation dans le métabolisme énergétique. Ces suppositions doivent donc être considérées avec précaution. Par ailleurs, outre le complexe I, un ciblage des autres complexes de la chaîne respiratoire par les TZDs a également été suggéré. Dans des mitochondries isolées de foie de rat ou de cœur bovin,

la CGZ et la TGZ induisent en effet une diminution de l'activité des complexe II, IV et V, tandis que la PGZ et la RGZ provoquent une baisse de l'activité du complexe III (Nadanaciva *et al.* 2007, Soller *et al.* 2007, Sanz *et al.* 2011). De même que le complexe I, nous devrions donc évaluer l'effet de la Δ2-TGZ sur l'activité des autres complexes de la chaîne respiratoire dans les mitochondries des cellules MDA-MB-231.

Divakaruni *et al.* ont par ailleurs contesté la pertinence physiologique de l'inhibition du complexe I par les TZDs, suggérant que des doses supra-physiologiques (30 et 100 µM) ont été utilisées pour démontrer cette inhibition (Divakaruni *et al.* 2013). A des doses plus faibles de composé (10µM), ces chercheurs ont identifié une autre cible des TZDs : le transporteur de pyruvate mTOT (ou MPC pour mitochondrial pyruvate carrier) (Colca *et al.* 2013). Ils ont montré que les TZDs bloquent le transport du pyruvate dans la mitochondrie en inhibant l'activité de mTOT, ce qui entraîne une diminution de la respiration mitochondriale dans les cellules musculaires (Divakaruni *et al.* 2013). Dans notre étude, nous avons également observé une diminution de la consommation d'oxygène par les cellules MDA-MB-231 traitées avec la Δ2-TGZ. De plus, cette consommation d'oxygène est faiblement augmentée en présence de l'agent découplant FCCP, suggérant que les cellules traitées avec la Δ2-TGZ ne parviennent pas à stimuler l'activité de la chaîne respiratoire et donc à augmenter leur consommation d'oxygène. Une explication à ce phénomène pourrait en fait reposer sur un manque de substrats pour les complexes de la chaîne respiratoire, dû à l'absence de pyruvate dans la mitochondrie. En effet, le pyruvate permet de produire les coenzymes NADH et $FADH_2$ (substrats respectifs des complexes I et II de la chaîne respiratoire) grâce à sa transformation dans la mitochondrie en acétyl-CoA, qui est ensuite utilisé dans le cycle de Krebs pour générer plus de NADH et de $FADH_2$ (Moussard 2006). En réduisant la quantité de pyruvate dans la mitochondrie, une inhibition du transporteur mTOT par la Δ2-TGZ pourrait donc diminuer la production de coenzymes NADH et $FADH_2$ et entraîner ainsi un ralentissement de la chaîne respiratoire, ce qui est cohérent avec les effets de la Δ2-TGZ observés dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, cette hypothèse n'exclut pas l'hypothèse précédente d'une inhibition des complexes de la chaîne respiratoire par la Δ2-TGZ. En effet, le blocage des complexes par le dérivé de la TGZ pourrait être la conséquence secondaire du manque de pyruvate dans la mitochondrie. Il est toutefois nécessaire de souligner que des voies anaplérotiques existent dans une cellule afin de réapprovisionner le cycle de Krebs en cas de manque de certains intermédiaires (Moussard 2006). D'autres précurseurs, tels que l'acide aminé glutamine, pourraient donc être utilisés pour pallier le manque de pyruvate dans la mitochondrie. Par ailleurs, Divakaruni *et al.* ont montré

que les effets des TZDs sur l'activité mitochondriale sont inhibés par un apport exogène de méthypyruvate, qui traverse librement la membrane interne mitochondriale sans utiliser le transporteur mTOT (Divakaruni *et al.* 2013). Afin de tester l'hypothèse d'une inhibition de mTOT par la Δ2-TGZ, nous devrions donc étudier les effets de ce composé sur la consommation d'oxygène des cellules MDA-MB-231, en présence de méthylpyruvate.

A ce jour, plusieurs partenaires directs ont été identifiés pour les TZDs et leur dérivés, dont notamment PPARγ, le complexe I de la chaîne respiratoire et le transporteur de pyruvate mTOT. Finalement, compte-tenu du nombre important d'études sur le mode d'action des TZDs, il ne semble pas se dégager l'existence d'un récepteur-type pour ces molécules ou d'un récepteur spécifique pour chaque TZD. Ces molécules semblent plutôt avoir plusieurs cibles intracellulaires et cela pourrait expliquer la diversité de leurs actions. Le laboratoire a lancé un projet afin d'identifier des partenaires intracellulaires ou membranaires de AB186 par une analyse protéomique basée sur une approche SRP (surface plasmon resonance)-MS (spectrométrie de masse) sur biopuces en collaboration avec la plateforme CLIPP (Dijon, Université de Bourgogne) et le laboratoire FEMTO (Département MN2S UMR 6174 CNRS-Université de Franche Comté de Besançon). Les composés sont immobilisés sur des biopuces. Les interactions entre chaque composé greffé et les protéines des extraits des différents compartiments cellulaires sont mesurées grâce aux techniques sensibles de SRP. Les protéines retenues sont analysées sur les biopuces par spectrométrie de masse MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) et/ou ESI (Electrospray ionization). Les données obtenues seront traitées grâce à des outils de biostatistique et de bio-informatique de manière à extraire des informations solides.

2. Quel est le mécanisme d'action de la Δ2-TGZ dans la mitochondrie ?

Outre l'identification de sa cible mitochondriale, il serait également pertinent de mieux caractériser le mécanisme d'action de la Δ2-TGZ dans la mitochondrie. En effet, dans cette étude, nous avons obtenu des premiers résultats sur les effets du composé sur la respiration mitochondriale, qui nécessitent d'être approfondis. Tout d'abord, nous pourrions préciser l'action découplante de la Δ2-TGZ, en évaluant l'évolution du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules cancéreuses mammaires exposées à ce composé. Moon *et al.* ont observé une diminution du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules cancéreuses de sein T47D et de côlon HCT116 traitées avec la TGZ (Moon *et al.* 2016). Ce résultat a également été obtenu dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 en réponse à la molécule parente de la Δ2-TGZ (Friday *et al.* 2011). Nous pourrions donc

aussi observer une diminution du potentiel membranaire mitochondrial en réponse à la Δ2-TGZ. Ce résultat serait alors cohérent avec l'induction d'un découplage extrinsèque, qui correspond à une augmentation de la perméabilité de la membrane interne aux cations et aux protons, à l'origine d'une fuite de protons suivie d'une diminution du gradient électrochimique (Kadenbach 2003).

Par ailleurs, l'atteinte de la respiration mitochondriale par la Δ2-TGZ pourrait être associée à une augmentation de la production mitochondriale de ROS. En effet, Pérez-Ortiz *et al.* ont montré que la CGZ, la RGZ et la PGZ, induisent une hausse de la production de ROS dans les cellules C6 de gliome de rat, probablement via l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire (Perez-Ortiz *et al.* 2007). De même, Moon *et al.* ont rapporté une augmentation de la production de ROS dans les cellules cancéreuses HCT116 et T47D traitées avec la TGZ (Moon *et al.* 2016). Il serait donc intéressant de déterminer l'effet de la Δ2-TGZ sur le stress oxydant. Cette analyse semble d'autant plus pertinente que l'induction d'un découplage mitochondrial peut être associée à une réduction de la production de ROS (Kadenbach 2003).

En plus de la production de ROS, la TGZ induit aussi une augmentation de la transcription du gène codant le co-activateur transcriptionnel PGC1-α, impliqué dans la biogenèse des mitochondries, dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et LCC9 (Skildum *et al.* 2011). De même, une augmentation du nombre de copies d'ADNmt et une stimulation de l'expression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire ont été observées en réponse à la PGZ dans les cellules de carcinome embryonnaire NT2 (Ghosh *et al.* 2007). La perturbation de la mitochondrie par la Δ2-TGZ pourrait donc être associée à une stimulation de la biogenèse des mitochondries. Cette hypothèse est intéressante puisque ce processus est activé en réponse à différentes conditions de stress afin de favoriser l'adaptation d'une cellule à des besoins énergétiques (Jornayvaz and Shulman 2010). Nous pourrions aussi imaginer que la baisse de la consommation d'oxygène observée dans les cellules MDA-MB-231 traitées avec la Δ2-TGZ résulte en fait d'une diminution du nombre de mitochondries dans les cellules.

Par ailleurs, un autre mécanisme d'adaptation des cellules à un stress énergétique repose sur la capacité des mitochondries à adapter leur morphologie selon les besoins en énergie de la cellule. En effet, ces organites sont présents soit sous la forme de multiples unités (organisation par défaut), soit ils forment un large réseau tubulaire composé de nombreuses ramifications (en cas de stress énergétique) (Westermann 2012) Nous pourrions donc aussi étudier la morphologie des mitochondries dans les cellules MDA-MB-231 exposées à la Δ2-TGZ.

3. Quel est l'impact de la perturbation du métabolisme énergétique dans les effets anti-cancéreux de la Δ2-TGZ ?

Au cours de ce travail, nous avons observé une altération du métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231 en réponse à la Δ2-TGZ. Cependant, nous n'avons pas évalué l'impact de cette perturbation du métabolisme sur les effets anti-cancéreux de la Δ2-TGZ. Une telle évaluation ne pourra sans doute être effectuée de façon exacte que lorsque l'on aura défini de façon plus précise le mécanisme d'action, voire la cible du composé dans la mitochondrie. Il serait donc tout d'abord intéressant de déterminer si le transporteur de pyruvate mTOT ou le complexe I de la chaîne respiratoire est la cible mitochondriale de la Δ2-TGZ. Ensuite, grâce à une atténuation des effets du composé sur sa cible (utilisation de méthylpyruvate ou apport exogène de succinate comme substrat du complexe II), il sera possible d'évaluer l'importance de la perturbation du métabolisme énergétique dans les effets anticancéreux de ce dérivé de la TGZ.

La comparaison de plusieurs données de la littérature avec nos résultats permet néanmoins d'émettre quelques hypothèses. Tout d'abord, Wei *et al.* ont postulé que la restriction énergétique induite par l'OSU-CG12 est à l'origine des différentes actions de ce composé, tels que le stress du RE ou bien l'activation de la β-TrCP. Puisqu'un stress du RE et une diminution d'expression de la cycline D1, qui est une cible de la β-TrCP, ont été observées en réponse à la Δ2-TGZ, alors nous pourrions imaginer que les effets de ce composé sur le métabolisme énergétique sont à l'origine de son action dans les cellules cancéreuses mammaires. En accord avec cette hypothèse, Lim *et al.* ont démontré qu'une altération de la fonction mitochondriale par un traitement à l'oligomycine des cellules hépatiques humaines sk-HepI est associée à une induction d'un stress du RE (Lim *et al.* 2009). De même, dans les cellules cancéreuses de côlon T84 et COLO 205, le composé naturel andrographolide induit un stress du RE, via une augmentation de la production de ROS (Banerjee *et al.* 2017). L'altération du métabolisme mitochondrial par la Δ2-TGZ pourrait donc être à l'origine de l'initiation d'un stress du RE. Ces hypothèses devront toutefois être testées lors de l'analyse approfondie du mécanisme d'action de la Δ2-TGZ.

II. INTERET THERAPEUTIQUE DE LA Δ2-TGZ

Puisque cibler le métabolisme énergétique des cellules tumorales apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement du cancer, alors il semble pertinent d'évaluer si la capacité de la Δ2-TGZ à altérer l'activité mitochondriale des cellules cancéreuses mammaires peut représenter un intérêt du point de vue thérapeutique.

1. Une fenêtre thérapeutique suffisamment large pour la Δ2-TGZ ?

Cibler le métabolisme énergétique des cellules tumorales constitue en effet une piste intéressante pour traiter le cancer. Néanmoins, la réussite de cette stratégie repose sur la différence métabolique qui peut exister entre cellules saines et cellules cancéreuses. Or, les voies métaboliques utilisées par les cellules tumorales sont souvent activées dans les cellules normales en prolifération, ce qui peut être à l'origine d'une certaine toxicité. Beaucoup de cellules non transformées utilisent en effet la glycolyse aérobie et le métabolisme mitochondrial lorsqu'elles se multiplient rapidement : c'est le cas notamment des lymphocytes (Lunt and Vander Heiden 2011, Wang and Green 2012). Un défi majeur à relever est donc d'obtenir une fenêtre thérapeutique suffisamment large pour affecter le métabolisme énergétique des cellules tumorales, tout en préservant les cellules saines (Lunt and Vander Heiden 2011, Vander Heiden 2011). Dans note étude, nous n'avons pas caractérisé les effets de la Δ2-TGZ dans des cellules non malignes. Il sera donc primordial par la suite de déterminer si l'atteinte de la mitochondrie par ce composé est associée ou non à des effets cytotoxiques dans les cellules saines. Ben Sahra *et al.* ont montré que la metformine ne modifie pas l'activité du complexe I dans les cellules épithéliales prostatiques normales P69 et elle ne diminue pas la viabilité de ces cellules (Ben Sahra *et al.* 2010). De la même manière, la TGZ et le STG28, un dérivé de la Δ2-TGZ, induisent une faible cytotoxicité dans les cellules épithéliales prostatiques non malignes (PrEC) (Wei *et al.* 2010). La Δ2-TGZ pourrait donc aussi présenter une faible toxicité sur les cellules normales. La possibilité d'affecter préférentiellement les cellules cancéreuses pourrait reposer sur la production de ROS induite par la Δ2-TGZ dans les cellules cancéreuses mammaires. Les cellules tumorales se caractérisent en effet par un stress oxydant plus important que les cellules normales. L'induction d'une production supplémentaire de ROS peut donc induire la mort des cellules tumorales, tandis que les cellules normales peuvent résister grâce à un système antioxydant optimal (Trachootham *et al.* 2009). Les cellules cancéreuses sont cependant également capables de s'adapter à des niveaux élevés de ROS en développant un système antioxydant performant : elles peuvent donc résister aux agents anticancéreux dont le mécanisme d'action repose sur l'induction d'un stress oxydant. De plus, la surproduction de ROS peut entraîner des mutations dans les cellules cancéreuses et permettre ainsi l'adaptation et la survie d'une sous-population de cellules cancéreuses résistantes (Marchetti *et al.* 2015, Kim *et al.* 2016). La stratégie de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses grâce à l'induction d'un stress oxydant doit donc être considérée avec précaution.

Par ailleurs, un second aspect à prendre en compte dans le risque de toxicité de la Δ2-TGZ repose sur la question de l'hépatotoxicité. La TGZ a en effet été retirée du marché en raison de sa toxicité hépatique. Celle-ci pourrait être due en partie à une altération de la respiration mitochondriale, à un stress oxydant, ainsi qu'à des changements de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale des hépatocytes. Dans les cellules hépatiques en culture, ainsi que dans des mitochondries isolées de foie de rat ou de souris, la TGZ induit en effet une diminution de la consommation d'oxygène et elle inhibe l'activité des complexes I à IV (Okuda *et al.* 2010, Porceddu *et al.* 2012, Hu *et al.* 2015). Le niveau d'ATP est également diminué, tandis que la production de ROS est augmentée dans les hépatocytes (Haskins *et al.* 2001, Tirmenstein *et al.* 2002, Narayanan *et al.* 2003, Shishido *et al.* 2003, Rachek *et al.* 2009, Hu *et al.* 2015). La TGZ induit alors des dommages à l'ADN mitochondrial, une peroxydation membranaire, ainsi qu'une diminution du niveau intracellulaire de GSH (Narayanan *et al.* 2003, Rachek *et al.* 2009). De plus, une perméabilité transitoire de la mitochondrie, suivie de la mort des cellules, est déclenchée en réponse à la TGZ, avec un gonflement mitochondrial, une baisse du potentiel membranaire mitochondrial, une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, ainsi qu'une altération des structures mitochondriales, comme les crêtes (Haskins *et al.* 2001, Tirmenstein *et al.* 2002, Narayanan *et al.* 2003, Bova *et al.* 2005, Masubuchi *et al.* 2006, Okuda *et al.* 2010, Hu *et al.* 2015). De telles données suggèrent que la mitochondrie pourrait être le médiateur de l'hépatotoxicité de la TGZ. Toutefois, la toxicité hépatique de la TGZ est idiosyncratique et imprévisible, suggérant donc que des mécanismes très divers pourraient être mis en jeu selon les individus, au-delà de l'unique altération de la fonction mitochondriale (Chojkier 2005). Par ailleurs, la PGZ et la CGZ altèrent le fonctionnement de la mitochondrie mais n'entraînent pourtant pas de toxicité hépatique. Il sera donc intéressant de poursuivre la caractérisation du mode d'action de la Δ2-TGZ vis-à-vis de son action potentielle sur la mitochondrie et de préciser ses effets sur des hépatocytes humains. Ces deux aspects une fois précisés pourront ouvrir la voie à des études *in vivo*.

2. L'action de la Δ2-TGZ peut-elle être potentialisée ?

Outre la question de sa toxicité, l'intérêt thérapeutique de la Δ2-TGZ dépend également de son efficacité. Durant ce travail, nous avons effectivement observé que le dérivé de la TGZ est capable de perturber le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Cependant, comme indiqué par l'absence de variation du niveau d'ATP, les effets de la Δ2-TGZ sont atténués par l'induction d'un mécanisme de compensation (stimulation de la glycolyse), en réponse à l'atteinte de la mitochondrie. Ainsi, l'intérêt thérapeutique de la Δ2-

TGZ pourrait être limité. Plusieurs stratégies peuvent néanmoins être envisagées afin d'augmenter l'action de ce composé et/ou de valoriser son potentiel comme agent ciblant la mitochondrie.

La stratégie du jeûne de courte durée

Lee *et al.* ont démontré *in vitro* que des conditions de culture mimant un jeûne de courte durée (ou STS pour short-term starvation) sont capables de potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie (Lee *et al.* 2012). En effet, dans différents types de cellules cancéreuses murines et humaines (carcinome épidermoïde, neuroblastome, mélanome, gliome, cancer de la prostate, du sein, du col de l'utérus et du côlon), les effets de la doxorubicine et/ou du cyclophosphamide sont augmentés lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu de culture mimant les conditions d'un jeûne, c'est-à-dire un milieu de culture restrictif en glucose (0,5 g/L) et en facteurs de croissance (1% FBS (Fetal Bovine Serum)). Les effets des molécules de chimiothérapie sont également potentialisés par un jeûne de courte durée *in vivo*. En effet, des périodes de jeûne (absence de nourriture et accès seulement à de l'eau) appliquées à des souris durant les 48 heures qui précèdent l'administration de molécules de chimiothérapie (doxorubicine ou cyclophosphamide) entraînent un retard de la croissance de différents types de tumeurs (cancer du sein, mélanome, gliome) allogreffées ou xénogreffées. De plus, dans des modèles murins métastatiques de neuroblastome, de mélanome et d'adénocarcinomes mammaires, la combinaison de la chimiothérapie avec des périodes de jeûne résulte en une augmentation à long terme du temps de survie sans cancer (Lee *et al.* 2012). L'application d'un jeûne de courte durée apparaît donc comme une stratégie thérapeutique intéressante pour augmenter l'effet de la chimiothérapie. De tels résultats ont également été observés *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles de cancer (cerveau, poumon, sein et côlon), lorsqu'un jeûne de courte durée est combiné à la radiothérapie ou à un inhibiteur de tyrosine kinase, comme le regorafenib ou le crizotinib (Safdie *et al.* 2012, Caffa *et al.* 2015). Des conditions de culture restrictives en sérum (1% FBS) et en glucose (0,5 g/L) augmentent les effets de la metformine sur la viabilité des cellules cancéreuses murines CT26 (côlon) et 4T1 (sein). De même, *in vivo*, la progression de tumeurs du sein et du côlon est ralentie chez des souris ayant reçu de la metformine, en combinaison avec des périodes de jeûne de 48 heures (Marini *et al.* 2016). La stratégie du jeûne de courte durée présente donc un large potentiel. Dans notre cas, nous avons observé une augmentation des effets anticancéreux de la Δ2-TGZ lorsque les cellules cancéreuses mammaires étaient cultivées dans des conditions de culture restrictives en sérum

(1% SVF). Nous pouvons donc imaginer qu'un jeûne de courte durée pourrait potentialiser d'autant plus l'action de la Δ2-TGZ.

La stratégie du jeûne de courte durée est par ailleurs d'autant plus intéressante car non seulement elle augmente la sensibilité des cellules cancéreuses à différents traitements, mais elle protège aussi les cellules normales des effets toxiques des composés anticancéreux. En effet, dans des conditions de culture restrictives en glucose (0,5 g/L) et en sérum (1% FBS), les cellules gliales non tumorales résistent mieux à un traitement avec du cyclophosphamide, qu'en présence d'une quantité habituelle de glucose dans le milieu (1 g/L). De même, une période de jeûne, appliquée pendant 48 à 60 heures avant l'injection d'étoposide, augmente la survie des souris exposées à des doses élevées de cette molécule, sans signe de toxicité, contrairement aux souris témoins n'ayant pas subi de jeûne avant l'administration de la molécule(Raffaghello *et al.* 2008). L'application d'un jeûne de courte durée semble donc aussi pouvoir réduire les effets secondaires des traitements anticancéreux. L'observation de ce phénomène, plus connu sous le nom de résistance différentielle au stress (DSR), a alors conduit à l'initiation d'essais cliniques, afin d'évaluer le potentiel clinique du jeûne de courte durée. Les premiers résultats sont encourageants puisque cette stratégie est faisable et bien tolérée par les patients. De plus, une réduction des effets secondaires associés à la chimiothérapie a été rapportée lors de la combinaison de la chimiothérapie avec des périodes de jeûne (Safdie *et al.* 2009, de Groot *et al.* 2015, Dorff *et al.* 2016). Afin d'approfondir ces premiers résultats, d'autres études cliniques sont actuellement en cours de réalisation.

Cibler conjointement la glycolyse et le métabolisme mitochondrial

Puisque les cellules semblent compenser les effets inhibiteurs de la Δ2-TGZ sur la respiration mitochondriale par une stimulation de la glycolyse, alors nous avons imaginé que la combinaison de ce composé avec l'inhibiteur de glycolyse 2-DG pourrait inhiber le phénomène de compensation observé et augmenter ainsi les effets de la Δ2-TGZ dans les cellules MDA-MB-231. C'est ce que nous avons observé puisque le nombre de cellules diminue plus fortement dans les cellules co-traitées avec la Δ2-TGZ et le 2-DG, que dans les cellules ayant reçu une seule molécule. De plus, les deux composés présentent des effets synergiques. Inhiber la glycolyse apparaît donc comme une stratégie intéressante pour potentialiser les effets de la Δ2-TGZ. Une telle potentialisation a été observée auparavant lors de la combinaison de la PGZ avec le 2-DG, qui entraîne une diminution significative de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC3 cultivées sous forme de sphéroïdes (Gottfried *et al.* 2011). De même, la metformine augmente l'action du 2-DG dans les cellules LNCaP. Cette

combinaison entraîne notamment une diminution sévère du niveau d'ATP intracellulaire, suivie de l'initiation de l'apoptose qui n'est pas induite par les molécules utilisées seules (Ben Sahra *et al.* 2010). Il semble donc pertinent de combiner des molécules ciblant les deux voies principales du métabolisme énergétique.

Une telle stratégie paraît d'autant plus intéressante que les cellules saines semblent être peu sensibles à l'inhibition conjointe de la glycolyse et du métabolisme mitochondrial. En effet, Ben Sahra *et al.* ont constaté que contrairement aux cellules cancéreuses LNCaP, la combinaison metformine+2-DG n'entraîne qu'une diminution faible de la viabilité des cellules épithéliales prostatiques normales P69 (Ben Sahra *et al.* 2010). De même, la combinaison de la metformine avec l'inhibiteur de GLUT4 ritonavir est associée à une diminution synergique de la prolifération des cellules myélomateuses L363, JJN3 et KMS11, tandis que la prolifération des cellules non cancéreuses est peu affectée par cette combinaison (Dalva-Aydemir *et al.* 2015). Cibler conjointement la glycolyse et le métabolisme mitochondrial pourrait donc être associé à un index thérapeutique favorable, ce qui renforce d'autant plus le potentiel de cette stratégie.

D'autre part, Garofalo *et al.* ont suggéré que les effets thérapeutiques de la metformine pourraient être limités dans des conditions d'hypoxie. En effet, ces auteurs ont montré que des conditions de culture mimant une hypoxie (culture des cellules en présence de dichlorure de cobalt) entraînent une diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses de sarcome TC-71 et ASP-14 à la metformine (Garofalo *et al.* 2013). De même, l'action de la metformine sur la viabilité des cellules cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231 est réduite lorsque les cellules sont cultivées pendant 96 heures en conditions d'hypoxie (1% d'oxygène) (Ariaans *et al.* 2017). Cette baisse de sensibilité des cellules hypoxiques à la metformine pourrait s'expliquer par une reprogrammation du métabolisme énergétique des cellules, induite en réponse à l'hypoxie par le facteur de transcription HIF1 (hypoxia inducible factor 1). En effet, grâce à son activité transcriptionnelle, HIF1 stimule la glycolyse, tandis qu'il inhibe la respiration mitochondriale (Eales *et al.* 2016, Martinez-Outschoorn *et al.* 2017). Ainsi, les cellules hypoxiques pourraient être moins sensibles à des agents ciblant la mitochondrie, comparé à des cellules normoxiques. De plus, l'action des molécules ciblant le métabolisme énergétique peut également être restreinte par l'hétérogénéité métabolique des tumeurs, ainsi que par le processus de symbiose métabolique mis en place au sein des tumeurs entre les cellules hypoxiques et normoxiques, ainsi qu'entre les cellules tumorales et stromales (Sonveaux *et al.* 2008, Martinez-Outschoorn *et al.* 2017). L'utilisation de la Δ2-TGZ en monothérapie pourrait donc être associée à un

potentiel thérapeutique limitant. Néanmoins, l'utilisation de plusieurs agents ciblant conjointement la glycolyse et le métabolisme mitochondrial pourrait sans doute cibler l'ensemble des cellules d'une tumeur, qu'elles utilisent plutôt la glycolyse, la respiration mitochondriale, ou bien les deux voies métaboliques. Ces données renforcent ainsi le potentiel d'une stratégie ciblant conjointement les deux voies principales du métabolisme énergétique.

3. La Δ2-TGZ peut-elle potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie ?

De nombreuses études ont permis de démontrer que les TZDs, utilisées en thérapie combinatoire, sont capables d'augmenter les effets de différentes molécules anticancéreuses, comme des agents de chimiothérapie ou bien des molécules de thérapie ciblée (Frohlich and Wahl 2015). Nous avons donc imaginé que la Δ2-TGZ pourrait revêtir un intérêt thérapeutique en potentialisant l'action d'agents de chimiothérapie. Cette hypothèse semblait d'autant plus intéressante que des composés ciblant le métabolisme énergétique, comme le 2-DG ou la metformine, augmentent aussi l'action de diverses molécules anticancéreuses (Rocha *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2013). Nous avons donc débuté un travail préliminaire sur l'utilisation de la Δ2-TGZ en thérapie combinatoire. A l'issue de ce travail, nous avons constaté que le dérivé de la TGZ ne potentialise pas l'action du 5-FU et du paclitaxel, mais elle augmente en revanche les effets de la doxorubicine sur le nombre de cellules MDA-MB-231. La Δ2-TGZ pourrait donc présenter un intérêt en thérapie combinatoire. Néanmoins, ces résultats ne constituent que des données préliminaires et une telle utilisation de la Δ2-TGZ requiert auparavant de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des résultats obtenus dans cette étude.

Le paclitaxel est un agent antimitotique, se fixant sur la tubuline et stabilisant les microtubules, tandis que le 5-FU est un antimétabolite, interférant avec la synthèse de l'ARN et de l'ADN (Jordan and Wilson 2004, Martinez-Outschoorn *et al.* 2017). Ces deux agents de chimiothérapie ciblent donc les cellules en prolifération. Cependant, nous avons montré qu'à 75 µM, la Δ2-TGZ induit un blocage du cycle cellulaire en phase G_0/G_1 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7. Bien qu'ici la Δ2-TGZ ait été utilisée à seulement 15 µM, nous pouvons donc imaginer que le dérivé de la TGZ bloque la prolifération des cellules MDA-MB-231 et limite ainsi l'action du 5-FU et du paclitaxel. En ce qui concerne la doxorubicine, elle cible également les cellules en division, puisqu'elle inhibe la topo-isomérase II et elle s'intercale dans l'ADN, inhibant ainsi les processus de réplication et de transcription de l'ADN (Lansiaux and Pourquier 2011). La Δ2-TGZ pourrait donc également restreindre l'action de cet agent anticancéreux. Nous avons cependant observé des effets additifs ou synergiques pour des doses élevées de doxorubicine combinées à la Δ2-TGZ. Une telle

potentialisation pourrait être due à l'action de la doxorubicine dans la mitochondrie. En effet, cette molécule induit une altération de l'activité mitochondriale, associée notamment à une baisse de la respiration, une augmentation de la production de ROS, ainsi qu'une diminution de la quantité d'ATP intracellulaire (Kuznetsov *et al.* 2011). De plus, la doxorubicine entraîne aussi la production de ROS, lorsqu'elle est métabolisée par des enzymes d'oxydoréductions comme la cytochrome P450 réductase (Meredith and Dass 2016). Nous pouvons donc imaginer que la potentialisation des effets de la doxorubicine par la Δ2-TGZ résulte de l'atteinte conjointe de la mitochondrie par ces deux molécules.

D'autre part, Zhao *et al.* ont montré que le 5-FU induit une augmentation de l'activité glycolytique dans les cellules cancéreuses de poumon A549. En effet, une hausse de la production de lactate et une stimulation de la consommation de glucose ont été observées en réponse au 5-FU dans les cellules A549. Une augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT1, de la lactate déshydrogénase A, ainsi que de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 ont également été constatées (Zhao *et al.* 2014). Les cellules cancéreuses semblent donc répondre au 5-FU en stimulant la glycolyse, ce qui contribue sans doute aux effets antagonistes de cet agent et de la Δ2-TGZ. De fait, puisque l'action de la Δ2-TGZ sur la mitochondrie est contrecarrée par une stimulation compensatoire de la glycolyse, alors l'induction de cette voie métabolique par le 5-FU limite probablement l'effet anticancéreux du dérivé de la TGZ dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231. Le cisplatine, qui est un agent alkylant, induit quant à lui une diminution de l'activité glycolytique dans les cellules cancéreuses A549 (Zhao *et al.* 2014). De même, l'anticorps monoclonal trastuzumab, ciblant le récepteur HER2, induit une diminution de la consommation de glucose et une réduction de la production de lactate dans les cellules cancéreuses mammaires BT474 et ZR-7530 (Zhao *et al.* 2011). Contrairement au 5-FU et au paclitaxel, la Δ2-TGZ pourrait donc sans doute augmenter l'action d'autres agents anticancéreux.

Par ailleurs, l'absence de potentialisation entre la Δ2-TGZ et les composés 5-FU et paclitaxel pourrait également être due au protocole de traitement utilisé durant cette étude. Reddy *et al.* ont en effet démontré que dans les cellules cancéreuses A549 et H522, la TGZ augmente de façon synergique les effets de la cisplatine et du paclitaxel, seulement si les cellules sont traitées d'abord avec un des deux agents de chimiothérapie, puis avec la TGZ. Des effets antagonistes sont en revanche observés lorsque les cellules sont traitées d'abord avec la TGZ (Reddy *et al.* 2008). Dans notre étude, les molécules ont été administrées de façon concomitante dans les cellules MDA-MB-231. Il serait donc intéressant de tester différents protocoles de traitement

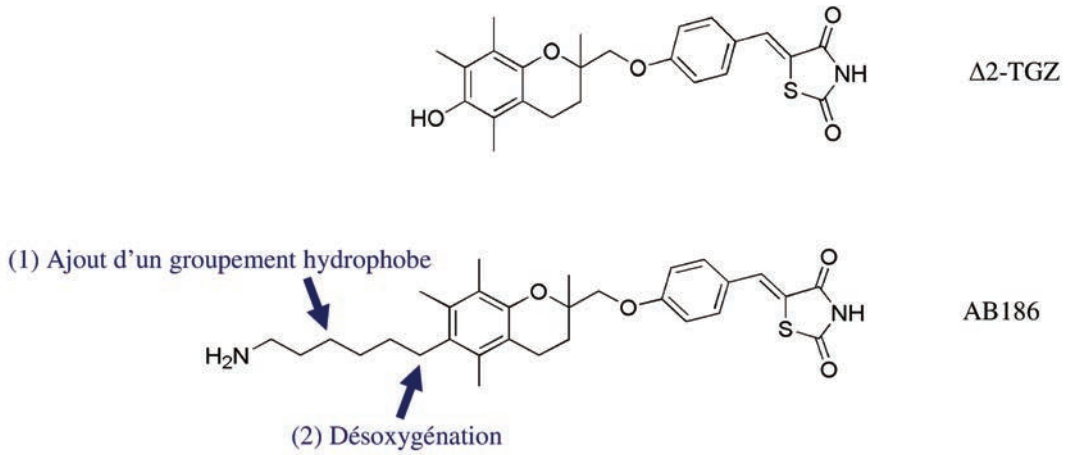

Figure 60 : Structures chimiques de la Δ2-TGZ et de son dérivé AB186. Sur ce schéma, sont représentées les modifications apportées à la Δ2-TGZ afin de synthétiser AB186 (adapté de Bordessa *et al.* 2014).

et de déterminer ainsi si un traitement séquentiel des cellules peut augmenter l'efficacité d'agents de chimiothérapie en combinaison avec la Δ2-TGZ.

III. DE NOUVEAUX DERIVES DE LA Δ2-TGZ

En parallèle de mon travail de thèse, nos collègues chimistes (UMR 7565 CNRS-Université de Lorraine) ont continué à faire évoluer la structure chimique de la Δ2-TGZ. En effet, l'utilisation clinique des dérivés de la TGZ repose sur deux impératifs : 1) l'augmentation de leur efficacité avec une IC_{50} se rapprochant du nanomolaire; 2) la diminution de leur toxicité hépatique. Plusieurs composés ont ainsi été développés, dont AB186 qui est un dérivé désoxygéné et substitué de la Δ2-TGZ, la substitution de l'oxygène étant une stratégie choisie pour limiter la production de dérivés réactifs hépatotoxiques de type quinone (Bordessa *et al.* 2014, Mazerbourg *et al.* 2016). La structure chimique de ce composé, breveté en 2013 (Brevet FR 2 986 231 A1, 2013; PCT WO 2013/110796 A1, 2013), est présentée en figure 60. AB186 est très prometteur avec une IC_{50} de 6 µM et une toxicité hépatique réduite. Ainsi, à 200 µM, il diminue la viabilité des hépatocytes de seulement 20%, par rapport à la Δ2-TGZ qui, à la même concentration, induit la mort de plus de la moitié des hépatocytes humains (Bordessa *et al.* 2014). Plus récemment, un dérivé de AB186, nommé EP13, présente des propriétés très intéressantes avec une efficacité supérieure à celle d'AB186. Des études sont en cours au laboratoire avec ces deux dérivés très prometteurs. Dans le prolongement du travail effectué durant cette thèse, il sera important de déterminer si ces composés altèrent aussi le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdulkareem I. et Zurmi I. (2012). "Review of hormonal treatment of breast cancer." *Nigerian journal of clinical practice* **15**(1): 9.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Jonhson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Walter P. (2015). Molecular biology of the cell.

Aloraifi F., Boland M.R., Green A.J. et Geraghty J.G. (2015). "Gene analysis techniques and susceptibility gene discovery in non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer." *Surg Oncol* **24**(2): 100-109.

Altenberg B. et Greulich K.O. (2004). "Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes." *Genomics* **84**(6): 1014-1020.

Andela V.B., Altuwaijri S., Wood J. et Rosier R.N. (2005). "Inhibition of beta-oxidative respiration is a therapeutic window associated with the cancer chemo-preventive activity of PPARgamma agonists." *FEBS Lett* **579**(7): 1765-1769.

Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R. et Young I.G. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* **290**(5806): 457-465.

Andrzejewski S., Gravel S.P., Pollak M. et St-Pierre J. (2014). "Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics." *Cancer Metab* **2**: 12.

Arafa el S.A., Abdelazeem A.H., Arab H.H. et Omar H.A. (2014). "OSU-CG5, a novel energy restriction mimetic agent, targets human colorectal cancer cells in vitro." *Acta Pharmacol Sin* **35**(3): 394-400.

Ariaans G., Jalving M., Vries E.G. et Jong S. (2017). "Anti-tumor effects of everolimus and metformin are complementary and glucose-dependent in breast cancer cells." *BMC Cancer* **17**(1): 232.

Arnal-Morvan B. et Laganier M. (2015). Anticancer du sein : prévenir et accompagner.

Arner P. (2003). "The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones." *Trends Endocrinol Metab* **14**(3): 137-145.

Arteaga C.L., Sliwkowski M.X., Osborne C.K., Perez E.A., Puglisi F. et Gianni L. (2011). "Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives." *Nat Rev Clin Oncol* **9**(1): 16-32.

Artwohl M., Furnsinn C., Waldhausl W., Holzenbein T., Rainer G., Freudenthaler A., Roden M. et Baumgartner-Parzer S.M. (2005). "Thiazolidinediones inhibit proliferation of microvascular and macrovascular cells by a PPARgamma-independent mechanism." *Diabetologia* **48**(3): 586-594.

Balinsky D., Platz C.E. et Lewis J.W. (1984). "Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues." *J Natl Cancer Inst* **72**(2): 217-224.

Banerjee A., Banerjee V., Czinn S. et Blanchard T. (2017). "Increased reactive oxygen species levels cause ER stress and cytotoxicity in andrographolide treated colon cancer cells." *Oncotarget* **8**(16): 26142-26153.

Beaudry M., Chiasson S. et Lauzière J. (2006). Biologie de l'allaitement : le sein, le lait, le geste. Québec (Québec), Canada, Presses de l'Université du Québec.

Ben Sahra I., Laurent K., Giuliano S., Larbret F., Ponzio G., Gounon P., Le Marchand-Brustel Y., Giorgetti-Peraldi S., Cormont M., Bertolotto C., Deckert M., Auberger P., Tanti J.F. et Bost F. (2010). "Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells." *Cancer Res* **70**(6): 2465-2475.

Bertucci F., Finetti P., Cervera N., Esterni B., Hermitte F., Viens P. et Birnbaum D. (2008). "How basal are triple-negative breast cancers?" *Int J Cancer* **123**(1): 236-240.

Binder-Foucard F., Belot A., Delafosse P., Remontet L., Woronoff A. et Bossard N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012, Partie.

Blanquicett C., Roman J. et Hart C.M. (2008). "Thiazolidinediones as anti-cancer agents." *Cancer Ther* **6**(A): 25-34.

Blatt S., Voelxen N., Sagheb K., Pabst A.M., Walenta S., Schroeder T., Mueller-Klieser W. et Ziebart T. (2016). "Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years." *Clin Oral Investig* **20**(8): 2097-2104.

Bordessa A., Colin-Cassin C., Grillier-Vuissoz I., Kuntz S., Mazerbourg S., Husson G., Vo M., Flament S., Martin H., Chapleur Y. et Boisbrun M. (2014). "Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: towards more active and less toxic compounds." *Eur J Med Chem* **83**: 129-140.

Boujard D., Anselme B., Cullin C. et Raguenes-Nicol C. (2015). Biologie cellulaire et moléculaire - Tout le cours en fiches, Dunod.

Bova M.P., Tam D., McMahon G. et Mattson M.N. (2005). "Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells." *Toxicol Lett* **155**(1): 41-50.

Brand M.D. (2005). "The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 897-904.

Brand M.D. (2010). "The sites and topology of mitochondrial superoxide production." *Exp Gerontol* **45**(7-8): 466-472.

Brand M.D. et Nicholls D.G. (2011). "Assessing mitochondrial dysfunction in cells." *Biochem J* **435**(2): 297-312.

Bravo R., Parra V., Gatica D., Rodriguez A.E., Torrealba N., Paredes F., Wang Z.V., Zorzano A., Hill J.A., Jaimovich E., Quest A.F. et Lavandero S. (2013). "Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration." *Int Rev Cell Mol Biol* **301**: 215-290.

Britt K., Ashworth A. et Smalley M. (2007). "Pregnancy and the risk of breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **14**(4): 907-933.

Bruce Alberts D.B., Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis Martin Raff, Keith Roberts Petter Walter (2005). L'essentiel de la biologie cellulaire. Paris, Flammarion médecine-sciences.

Brunmair B., Gras F., Neschen S., Roden M., Wagner L., Waldhausl W. et Furnsinn C. (2001). "Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated changes in gene expression." *Diabetes* **50**(10): 2309-2315.

Brunmair B., Staniek K., Gras F., Scharf N., Althaym A., Clara R., Roden M., Gnaiger E., Nohl H., Waldhausl W. et Furnsinn C. (2004). "Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?" *Diabetes* **53**(4): 1052-1059.

Burns P.A. et Wilson D.J. (2003). "Angiogenesis mediated by metabolites is dependent on vascular endothelial growth factor (VEGF)." *Angiogenesis* **6**(1): 73-77.

Busiello R.A., Savarese S. et Lombardi A. (2015). "Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism." *Front Physiol* **6**: 36.

Caffa I., D'Agostino V., Damonte P., Soncini D., Cea M., Monacelli F., Odetti P., Ballestrero A., Provenzani A., Longo V.D. et Nencioni A. (2015). "Fasting potentiates the anticancer activity of tyrosine kinase inhibitors by strengthening MAPK signaling inhibition." *Oncotarget* **6**(14): 11820-11832.

Cairns R.A., Harris I.S. et Mak T.W. (2011). "Regulation of cancer cell metabolism." *Nat Rev Cancer* **11**(2): 85-95.

Cantor J.R. et Sabatini D.M. (2012). "Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces." *Cancer Discov* **2**(10): 881-898.

Cariou B., Charbonnel B. et Staels B. (2012). "Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment." *Trends Endocrinol Metab* **23**(5): 205-215.

Carriere A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.C., Penicaud L. et Casteilla L. (2006). "[Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]." *Med Sci (Paris)* **22**(1): 47-53.

Cavalli L.R., Varella-Garcia M. et Liang B.C. (1997). "Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA." *Cell Growth Differ* **8**(11): 1189-1198.

Centre de Sénologie des Coteaux from http://centre-des-coteaux.be/our-causes/comprendre-le-cancer-du-sein

Chadha N., Bahia M.S., Kaur M. et Silakari O. (2015). "Thiazolidine-2,4-dione derivatives: programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions." *Bioorg Med Chem* **23**(13): 2953-2974.

Charafe-Jauffret E., Chaffanet M., Bertucci F., Ginestier C., Jacquemier J., deLapeyriere O. et Birnbaum D. (2007). "[Towards an integrated cellular and molecular: definition of breast cancers]." *Med Sci (Paris)* **23**(6-7): 626-632.

Chbicheb S., Yao X., Rodeau J.L., Salamone S., Boisbrun M., Thiel G., Spohn D., Grillier-Vuissoz I., Chapleur Y., Flament S. et Mazerbourg S. (2011). "EGR1 expression: a calcium and ERK1/2 mediated PPARgamma-independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells." *Biochem Pharmacol* **81**(9): 1087-1097.

Chen C.H., Huang P.H., Chu P.C., Chen M.C., Chou C.C., Wang D., Kulp S.K., Teng C.M., Wang Q. et Chen C.S. (2011). "Energy restriction-mimetic agents induce apoptosis in prostate cancer cells in part through epigenetic activation of KLF6 tumor suppressor gene expression." *J Biol Chem* **286**(12): 9968-9976.

Chen H., Fan Y.H., Natarajan A., Guo Y., Iyasere J., Harbinski F., Luus L., Christ W., Aktas H. et Halperin J.A. (2004). "Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2,4-dione and 2,4-thione derivatives as inhibitors of translation initiation." *Bioorg Med Chem Lett* **14**(21): 5401-5405.

Chen K.H., Tung P.Y., Wu J.C., Chen Y., Chen P.C., Huang S.H. et Wang S.M. (2008). "An acidic extracellular pH induces Src kinase-dependent loss of beta-catenin from the adherens junction." *Cancer Lett* **267**(1): 37-48.

Chen W. et Gueron M. (1992). "The inhibition of bovine heart hexokinase by 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate: characterization by 31P NMR and metabolic implications." *Biochimie* **74**(9-10): 867-873.

Chen Y.R. et Zweier J.L. (2014). "Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation." *Circ Res* **114**(3): 524-537.

Cheng B., Yang X., An L., Gao B. et Liu X. (2010). "Arsenic trioxide-induced apoptosis of Hep-2 cell line through modulating intracellular glutathione (GSH) level." *Auris Nasus Larynx* **37**(1): 89-94.

Cheong S.J., Lee C.M., Kim E.M., Lim S.T., Sohn M.H. et Jeong H.J. (2015). "The effect of PPAR-gamma agonist on (18)F-FDG PET imaging for differentiating tumors and inflammation lesions." *Nucl Med Biol* **42**(2): 85-91.

Chiche J., Brahimi-Horn M.C. et Pouyssegur J. (2010). "Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer." *J Cell Mol Med* **14**(4): 771-794.

Chojkier M. (2005). "Troglitazone and liver injury: in search of answers." *Hepatology* **41**(2): 237-246.

Chou T.C. (2006). "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies." *Pharmacol Rev* **58**(3): 621-681.

Christensen C.E., Karlsson M., Winther J.R., Jensen P.R. et Lerche M.H. (2014). "Non-invasive in-cell determination of free cytosolic [NAD+]/[NADH] ratios using hyperpolarized glucose show large variations in metabolic phenotypes." *J Biol Chem* **289**(4): 2344-2352.

Chung A.S., Lee J. et Ferrara N. (2010). "Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis." *Nat Rev Cancer* **10**(7): 505-514.

Colca J.R., McDonald W.G., Cavey G.S., Cole S.L., Holewa D.D., Brightwell-Conrad A.S., Wolfe C.L., Wheeler J.S., Coulter K.R., Kilkuskie P.M., Gracheva E., Korshunova Y., Trusgnich M., Karr R., Wiley S.E., Divakaruni A.S., Murphy A.N., Vigueira P.A., Finck B.N. et Kletzien R.F. (2013). "Identification of a mitochondrial target of thiazolidinedione insulin sensitizers (mTOT)--relationship to newly identified mitochondrial pyruvate carrier proteins." *PLoS One* **8**(5): e61551.

Colca J.R., McDonald W.G., Waldon D.J., Leone J.W., Lull J.M., Bannow C.A., Lund E.T. et Mathews W.R. (2004). "Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**(2): E252-260.

Colin-Cassin C., Yao X., Cerella C., Chbicheb S., Kuntz S., Mazerbourg S., Boisbrun M., Chapleur Y., Diederich M., Flament S. et Grillier-Vuissoz I. (2015). "PPARγ-inactive Δ2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells." *Mol Carcinog* **54**(5): 393-404.

Colin C., Salamone S., Grillier-Vuissoz I., Boisbrun M., Kuntz S., Lecomte J., Chapleur Y. et Flament S. (2010). "New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines." *Breast Cancer Res Treat* **124**(1): 101-110.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996). "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." *Lancet* **347**(9017): 1713-1727.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). "Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease." *Lancet* **360**(9328): 187-195.

Colmers I.N., Bowker S.L. et Johnson J.A. (2012). "Thiazolidinedione use and cancer incidence in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis." *Diabetes Metab* **38**(6): 475-484.

Coujard R., Racadot J. et Poirier J. (1980). Precis d'histologie humaine. Quebec, Presses de l'Universite Laval.

Cowpli-Bony A., Remontet L., Guizard A., Voirin N., Monnereau A. et Bouvier A. (2016). "Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine, 1989–2013. Partie 1–Tumeurs solides." *Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice (Fra).*

Cross R.L. (2004). "Molecular motors: turning the ATP motor." *Nature* **427**(6973): 407-408.

Cutts S.M., Nudelman A., Rephaeli A. et Phillips D.R. (2005). "The power and potential of doxorubicin-DNA adducts." *IUBMB Life* **57**(2): 73-81.

Dalva-Aydemir S., Bajpai R., Martinez M., Adekola K.U., Kandela I., Wei C., Singhal S., Koblinski J.E., Raje N.S., Rosen S.T. et Shanmugam M. (2015). "Targeting the metabolic plasticity of multiple myeloma with FDA-approved ritonavir and metformin." *Clin Cancer Res* **21**(5): 1161-1171.

Damon M. et Collin A. (2006). "Quel est le rôle des protéines découplantes mitochondriales chez les mammifères et les oiseaux?" *PRODUCTIONS ANIMALES-PARIS-INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-* **19**(4): 287.

Dang C.V., Hamaker M., Sun P., Le A. et Gao P. (2011). "Therapeutic targeting of cancer cell metabolism." *J Mol Med (Berl)* **89**(3): 205-212.

Danhier P., Banski P., Payen V.L., Grasso D., Ippolito L., Sonveaux P. et Porporato P.E. (2017). "Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect." *Biochim Biophys Acta.*

Dartois L., Fagherazzi G., Baglietto L., Boutron-Ruault M.C., Delaloge S., Mesrine S. et Clavel-Chapelon F. (2016). "Proportion of premenopausal and postmenopausal breast cancers attributable to known risk factors: Estimates from the E3N-EPIC cohort." *Int J Cancer* **138**(10): 2415-2427.

Daubisse-Marliac L., Delafosse P., Boitard J.B., Poncet F., Grosclaude P. et Colonna M. (2011). "Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries." *Ann Oncol* **22**(2): 329-334.

Davies K.M., Strauss M., Daum B., Kief J.H., Osiewacz H.D., Rycovska A., Zickermann V. et Kuhlbrandt W. (2011). "Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14121-14126.

Day C. (1999). "Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs." *Diabet Med* **16**(3): 179-192.

de Groot S., Vreeswijk M.P., Welters M.J., Gravesteijn G., Boei J.J., Jochems A., Houtsma D., Putter H., Van der Hoeven J.J., Nortier J.W., Pijl H. et Kroep J.R. (2015). "The effects of short-term fasting on tolerance to (neo) adjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients: a randomized pilot study." *BMC Cancer* **15**: 652.

DeBerardinis R.J. et Cheng T. (2010). "Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer." *Oncogene* **29**(3): 313-324.

DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G. et Thompson C.B. (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." *Cell Metab* **7**(1): 11-20.

DeBerardinis R.J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S. et Thompson C.B. (2007). "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19345-19350.

Dello Russo C., Gavrilyuk V., Weinberg G., Almeida A., Bolanos J.P., Palmer J., Pelligrino D., Galea E. et Feinstein D.L. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes." *J Biol Chem* **278**(8): 5828-5836.

Dias K., Dvorkin-Gheva A., Hallett R.M., Wu Y., Hassell J., Pond G.R., Levine M., Whelan T. et Bane A.L. (2017). "Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics." *PLoS One* **12**(1): e0168669.

Distler A.M., Kerner J. et Hoppel C.L. (2008). "Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes." *Proteomics* **8**(19): 4066-4082.

Divakaruni A.S., Wiley S.E., Rogers G.W., Andreyev A.Y., Petrosyan S., Loviscach M., Wall E.A., Yadava N., Heuck A.P., Ferrick D.A., Henry R.R., McDonald W.G., Colca J.R., Simon M.I., Ciaraldi T.P. et Murphy A.N. (2013). "Thiazolidinediones are acute, specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(14): 5422-5427.

Dorff T.B., Groshen S., Garcia A., Shah M., Tsao-Wei D., Pham H., Cheng C.W., Brandhorst S., Cohen P., Wei M., Longo V. et Quinn D.I. (2016). "Safety and feasibility of fasting in combination with platinum-based chemotherapy." *BMC Cancer* **16**: 360.

Dupont W.D., Parl F.F., Hartmann W.H., Brinton L.A., Winfield A.C., Worrell J.A., Schuyler P.A. et Plummer W.D. (1993). "Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia." *Cancer* **71**(4): 1258-1265.

Duran-Sandoval D., Thomas A.C., Bailleul B., Fruchart J.C. et Staels B. (2003). "[Pharmacology of PPARalpha, PPARgamma and dual PPARalpha/gamma agonists in clinical development]." *Med Sci (Paris)* **19**(8-9): 819-825.

Eales K.L., Hollinshead K.E. et Tennant D.A. (2016). "Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells." *Oncogenesis* **5**: e190.

Elston T., Wang H. et Oster G. (1998). "Energy transduction in ATP synthase." *Nature* **391**(6666): 510-513.

Emadi A., Jones R.J. et Brodsky R.A. (2009). "Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary." *Nat Rev Clin Oncol* **6**(11): 638-647.

Eroles P., Bosch A., Perez-Fidalgo J.A. et Lluch A. (2012). "Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways." *Cancer Treat Rev* **38**(6): 698-707.

Evans D.G., Shenton A., Woodward E., Lalloo F., Howell A. et Maher E.R. (2008). "Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family." *BMC Cancer* **8**: 155.

Fan J., Kamphorst J.J., Mathew R., Chung M.K., White E., Shlomi T. et Rabinowitz J.D. (2013). "Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia." *Mol Syst Biol* **9**: 712.

Fan Y.H., Chen H., Natarajan A., Guo Y., Harbinski F., Iyasere J., Christ W., Aktas H. et Halperin J.A. (2004). "Structure-activity requirements for the antiproliferative effect of troglitazone derivatives mediated by depletion of intracellular calcium." *Bioorg Med Chem Lett* **14**(10): 2547-2550.

Feinstein D.L., Spagnolo A., Akar C., Weinberg G., Murphy P., Gavrilyuk V. et Dello Russo C. (2005). "Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?" *Biochem Pharmacol* **70**(2): 177-188.

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D. et Bray F. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer* **136**(5): E359-386.

Fogal V., Richardson A.D., Karmali P.P., Scheffler I.E., Smith J.W. et Ruoslahti E. (2010). "Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation." *Mol Cell Biol* **30**(6): 1303-1318.

Fondation ARC (2016). Brochure "LES CANCERS DU SEIN."

Foretz M. et Viollet B. (2014). "Les nouvelles promesses de la metformine-Vers une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action." *médecine/sciences* **30**(1): 82-92.

Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M. et Evans R.M. (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." *Cell* **83**(5): 803-812.

Frezza C. et Gottlieb E. (2009). "Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders." *Semin Cancer Biol* **19**(1): 4-11.

Friday E., Oliver R., 3rd, Welbourne T. et Turturro F. (2011). "Glutaminolysis and glycolysis regulation by troglitazone in breast cancer cells: Relationship to mitochondrial membrane potential." *J Cell Physiol* **226**(2): 511-519.

Frohlich E. et Wahl R. (2015). "Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones." *Biomed Res Int* **2015**: 845340.

Fryer L.G., Parbu-Patel A. et Carling D. (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways." *J Biol Chem* **277**(28): 25226-25232.

Fujita T., Sugiyama Y., Taketomi S., Sohda T., Kawamatsu Y., Iwatsuka H. et Suzuoki Z. (1983). "Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent." *Diabetes* **32**(9): 804-810.

Furnsinn C., Brunmair B., Neschen S., Roden M. et Waldhausl W. (2000). "Troglitazone directly inhibits CO(2) production from glucose and palmitate in isolated rat skeletal muscle." *J Pharmacol Exp Ther* **293**(2): 487-493.

Furnsinn C., Neschen S., Noe C., Bisschop M., Roden M., Vogl C., Schneider B. et Waldhausl W. (1997). "Acute non-insulin-like stimulation of rat muscle glucose metabolism by troglitazone in vitro." *Br J Pharmacol* **122**(7): 1367-1374.

Gajria D. et Chandarlapaty S. (2011). "HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies." *Expert Rev Anticancer Ther* **11**(2): 263-275.

Gambhir S.S. (2002). "Molecular imaging of cancer with positron emission tomography." *Nat Rev Cancer* **2**(9): 683-693.

Garcia-Ruiz I., Solis-Munoz P., Fernandez-Moreira D., Munoz-Yague T. et Solis-Herruzo J.A. (2013). "Pioglitazone leads to an inactivation and disassembly of complex I of the mitochondrial respiratory chain." *BMC Biol* **11**: 88.

Gardner O.S., Shiau C.W., Chen C.S. et Graves L.M. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress." *J Biol Chem* **280**(11): 10109-10118.

Garofalo C., Capristo M., Manara M.C., Mancarella C., Landuzzi L., Belfiore A., Lollini P.L., Picci P. et Scotlandi K. (2013). "Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug." *PLoS One* **8**(12): e83832.

Gatenby R.A., Gawlinski E.T., Gmitro A.F., Kaylor B. et Gillies R.J. (2006). "Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study." *Cancer Res* **66**(10): 5216-5223.

Gatenby R.A. et Gillies R.J. (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nat Rev Cancer* **4**(11): 891-899.

Gauzeran D. (2015). Des lésions à risque aux cancers des muqueuses orales, Initiatives Sante.

Gewirtz D.A. (1999). "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin." *Biochem Pharmacol* **57**(7): 727-741.

Ghosh S., Patel N., Rahn D., McAllister J., Sadeghi S., Horwitz G., Berry D., Wang K.X. et Swerdlow R.H. (2007). "The thiazolidinedione pioglitazone alters mitochondrial function in human neuron-like cells." *Mol Pharmacol* **71**(6): 1695-1702.

Glodkowska-Mrowka E., Manda-Handzlik A., Stelmaszczyk-Emmel A., Seferynska I., Stoklosa T., Przybylski J. et Mrowka P. (2016). "PPARgamma ligands increase antileukemic activity of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells." *Blood Cancer J* **6**: e377.

Goetze K., Walenta S., Ksiazkiewicz M., Kunz-Schughart L.A. et Mueller-Klieser W. (2011). "Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release." *Int J Oncol* **39**(2): 453-463.

Gomes L.C., Di Benedetto G. et Scorrano L. (2011). "During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability." *Nat Cell Biol* **13**(5): 589-598.

Gottfried E., Rogenhofer S., Waibel H., Kunz-Schughart L.A., Reichle A., Wehrstein M., Peuker A., Peter K., Hartmannsgruber G., Andreesen R. et Kreutz M. (2011). "Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids." *Cancer Chemother Pharmacol* **67**(1): 117-126.

Green D.R. et Llambi F. (2015). "Cell Death Signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**(12).

Grillier-Vuissoz I., Mazerbourg S., Boisbrun M., S. K., Chapleur Y. et Flament S. (2012). "PPARγ-independent Activity of Thiazolidinediones: A PromisingMechanism of Action for New Anticancer Drugs?" *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis.*

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." *Lancet* **365**(9472): 1687-1717.

Groussard C., Morel I., Chevanne M., Monnier M., Cillard J. et Delamarche A. (2000). "Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study." *J Appl Physiol (1985)* **89**(1): 169-175.

Gu G., Dustin D. et Fuqua S.A. (2016). "Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment." *Curr Opin Pharmacol* **31**: 97-103.

Guh J.H., Chang W.L., Yang J., Lee S.L., Wei S., Wang D., Kulp S.K. et Chen C.S. (2010). "Development of novel adenosine monophosphate-activated protein kinase activators." *J Med Chem* **53**(6): 2552-2561.

Haigis M.C. et Sinclair D.A. (2010). "Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance." *Annu Rev Pathol* **5**: 253-295.

Hanahan D. et Weinberg R.A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Haskins J.R., Rowse P., Rahbari R. et de la Iglesia F.A. (2001). "Thiazolidinedione toxicity to isolated hepatocytes revealed by coherent multiprobe fluorescence microscopy and correlated with multiparameter flow cytometry of peripheral leukocytes." *Arch Toxicol* **75**(7): 425-438.

Hayashi J., Takemitsu M. et Nonaka I. (1992). "Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by introduction of mitochondrial DNA from normal human cells." *Somat Cell Mol Genet* **18**(2): 123-129.

Henry R.R. (1997). "Thiazolidinediones." *Endocrinol Metab Clin North Am* **26**(3): 553-573.

Hofer A. et Wenz T. (2014). "Post-translational modification of mitochondria as a novel mode of regulation." *Exp Gerontol* **56**: 202-220.

Holliday D.L. et Speirs V. (2011). "Choosing the right cell line for breast cancer research." *Breast Cancer Res* **13**(4): 215.

Holmstrom K.M. et Finkel T. (2014). "Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(6): 411-421.

Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D.B. et Johnston P.G. (2013). "Cancer drug resistance: an evolving paradigm." *Nat Rev Cancer* **13**(10): 714-726.

Hood D.A., Irrcher I., Ljubicic V. et Joseph A.M. (2006). "Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle." *J Exp Biol* **209**(Pt 12): 2265-2275.

Hosios A.M., Hecht V.C., Danai L.V., Johnson M.O., Rathmell J.C., Steinhauser M.L., Manalis S.R. et Vander Heiden M.G. (2016). "Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells." *Dev Cell* **36**(5): 540-549.

Houghton P.J. (2010). "Everolimus." *Clin Cancer Res* **16**(5): 1368-1372.

Hsieh C.C., Trichopoulos D., Katsouyanni K. et Yuasa S. (1990). "Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study." *Int J Cancer* **46**(5): 796-800.

Hu D., Wu C.Q., Li Z.J., Liu Y., Fan X., Wang Q.J. et Ding R.G. (2015). "Characterizing the mechanism of thiazolidinedione-induced hepatotoxicity: An in vitro model in mitochondria." *Toxicol Appl Pharmacol* **284**(2): 134-141.

Huang J.W., Shiau C.W., Yang Y.T., Kulp S.K., Chen K.F., Brueggemeier R.W., Shapiro C.L. et Chen C.S. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells." *Mol Pharmacol* **67**(4): 1342-1348.

INCa, Institut national du cancer. from http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque.

INCa, Institut national du cancer (2009). "Cancer du sein in situ, collection Recommandations et référentiels."

INCa, Institut national du cancer (2012). "Le cancer du sein : état des lieux en 2012".

INCa, Institut national du cancer (2013). "Les traitements des cancers du sein, collection Guides patients Cancer info."

INCa, Institut national du cancer (2016a). "Les cancers en France, Les Données."

INCa, Institut national du cancer (2016b). "Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015 /États des lieux et enjeux, appui à la décision."

Inserm. from http://www.inserm.fr/dossiers-d-information/therapie-ciblee.

Israelsen W.J. et Vander Heiden M.G. (2015). "Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer." *Semin Cell Dev Biol* **43**: 43-51.

Jastroch M., Divakaruni A.S., Mookerjee S., Treberg J.R. et Brand M.D. (2010). "Mitochondrial proton and electron leaks." *Essays Biochem* **47**: 53-67.

Javed A. et Lteif A. (2013). "Development of the human breast." *Semin Plast Surg* **27**(1): 5-12.

Jiang C., Ting A.T. et Seed B. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* **391**(6662): 82-86.

Jose C., Bellance N. et Rossignol R. (2011). "Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma?" *Biochim Biophys Acta* **1807**(6): 552-561

Jordan M.A. et Wilson L. (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." *Nat Rev Cancer* **4**(4): 253-265.

Jornayvaz F.R. et Shulman G.I. (2010). "Regulation of mitochondrial biogenesis." *Essays Biochem* **47**: 69-84.

Julien L.A. et Roux P.P. (2010). "[mTOR, the mammalian target of rapamycin]." *Med Sci (Paris)* **26**(12): 1056-1060.

Kadenbach B. (2003). "Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1604**(2): 77-94.

Karczmar G.S., Arbeit J.M., Toy B.J., Speder A. et Weiner M.W. (1992). "Selective depletion of tumor ATP by 2-deoxyglucose and insulin, detected by 31P magnetic resonance spectroscopy." *Cancer Res* **52**(1): 71-76.

Kerr J.F., Wyllie A.H. et Currie A.R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.

Kim J., Kim J. et Bae J.S. (2016). "ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy." *Exp Mol Med* **48**(11): e269.

Kim S.L., Kim E.M., Cheong S.J., Lee C.M., Kim D.W., Jeong H.J., Lim S.T., Sohn M.H. et Yim C.Y. (2009). "The effect of PPAR-gamma agonist on (18)F-FDG uptake in tumor and macrophages and tumor cells." *Nucl Med Biol* **36**(4): 427-433.

Kiraz Y., Adan A., Kartal Yandim M. et Baran Y. (2016). "Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis." *Tumour Biol* **37**(7): 8471-8486.

Konrad D., Rudich A., Bilan P.J., Patel N., Richardson C., Witters L.A. et Klip A. (2005). "Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells." *Diabetologia* **48**(5): 954-966.

Koppenol W.H., Bounds P.L. et Dang C.V. (2011). "Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism." *Nat Rev Cancer* **11**(5): 325-337.

Krishan S., Richardson D.R. et Sahni S. (2015). "Adenosine monophosphate-activated kinase and its key role in catabolism: structure, regulation, biological activity, and pharmacological activation." *Mol Pharmacol* **87**(3): 363-377.

Kuhlbrandt W. (2015). "Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes." *BMC Biol* **13**: 89.

Kuntz S., Mazerbourg S., Boisbrun M., Cerella C., Diederich M., Grillier-Vuissoz I. et Flament S. (2014). "Energy restriction mimetic agents to target cancer cells: comparison between 2-deoxyglucose and thiazolidinediones." *Biochem Pharmacol* **92**(1): 102-111.

Kurtoglu M., Gao N., Shang J., Maher J.C., Lehrman M.A., Wangpaichitr M., Savaraj N., Lane A.N. et Lampidis T.J. (2007). "Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation." *Mol Cancer Ther* **6**(11): 3049-3058.

Kuznetsov A.V., Margreiter R., Amberger A., Saks V. et Grimm M. (2011). "Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death." *Biochim Biophys Acta* **1813**(6): 1144-1152.

Lai I.L., Chou C.C., Lai P.T., Fang C.S., Shirley L.A., Yan R., Mo X., Bloomston M., Kulp S.K., Bekaii-Saab T. et Chen C.S. (2014). "Targeting the Warburg effect with a novel glucose transporter inhibitor to overcome gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells." *Carcinogenesis* **35**(10): 2203-2213.

Lamouille S., Xu J. et Derynck R. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(3): 178-196.

Lansiaux A. et Pourquier P. (2011). "[Molecular determinants of response to topoisomerase II inhibitors]." *Bull Cancer* **98**(11): 1299-1310.

Larousse (1995). Larousse médical. Paris, Larousse.

LeBleu V.S., O'Connell J.T., Gonzalez Herrera K.N., Wikman H., Pantel K., Haigis M.C., de Carvalho F.M., Damascena A., Domingos Chinen L.T., Rocha R.M., Asara J.M. et Kalluri R. (2014). "PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis." *Nat Cell Biol* **16**(10): 992-1003, 1001-1015.

LeBrasseur N.K., Kelly M., Tsao T.S., Farmer S.R., Saha A.K., Ruderman N.B. et Tomas E. (2006). "Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(1): E175-181.

Lecomte J., Flament S., Salamone S., Boisbrun M., Mazerbourg S., Chapleur Y. et Grillier-Vuissoz I. (2008). "Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines." *Breast Cancer Res Treat* **112**(3): 437-451.

Lee C. et Longo V.D. (2011). "Fasting vs dietary restriction in cellular protection and cancer treatment: from model organisms to patients." *Oncogene* **30**(30): 3305-3316.

Lee C., Raffaghello L., Brandhorst S., Safdie F.M., Bianchi G., Martin-Montalvo A., Pistoia V., Wei M., Hwang S., Merlino A., Emionite L., de Cabo R. et Longo V.D. (2012). "Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy." *Sci Transl Med* **4**(124): 124ra127.

Lee E.Y. et Muller W.J. (2010). "Oncogenes and tumor suppressor genes." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(10): a003236.

Leone N., Voirin N., Roche L., Binder-Foucard F., Woronoff A., Delafosse P., Remontet L., Bossard N. et Uhry Z. (2015). "Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015." *Rapport technique. Saint-Maurice (Fra): Institut de veille sanitaire*.

Leygue E. et Murphy L.C. (2013). "A bi-faceted role of estrogen receptor beta in breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **20**(3): R127-139.

Liedtke C., Mazouni C., Hess K.R., Andre F., Tordai A., Mejia J.A., Symmans W.F., Gonzalez-Angulo A.M., Hennessy B., Green M., Cristofanilli M., Hortobagyi G.N. et Pusztai L. (2008). "Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer." *J Clin Oncol* **26**(8): 1275-1281.

Ligue contre le cancer from https://www.ligue-cancer.net/.

Lim J.H., Lee H.J., Ho Jung M. et Song J. (2009). "Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance." *Cell Signal* **21**(1): 169-177.

Lin H.Y., Kuo Y.C., Weng Y.I., Lai I.L., Huang T.H., Lin S.P., Niu D.M. et Chen C.S. (2012). "Activation of silenced tumor suppressor genes in prostate cancer cells by a novel energy restriction-mimetic agent." *Prostate* **72**(16): 1767-1778.

Liou G.Y. et Storz P. (2010). "Reactive oxygen species in cancer." *Free Radic Res* **44**(5): 479-496.

Locasale J.W. et Cantley L.C. (2010). "Altered metabolism in cancer." *BMC Biol* **8**: 88.

Longley D.B., Harkin D.P. et Johnston P.G. (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." *Nat Rev Cancer* **3**(5): 330-338.

Lunt S.Y. et Vander Heiden M.G. (2011). "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation." *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 441-464.

Luo J., Margolis K.L., Wactawski-Wende J., Horn K., Messina C., Stefanick M.L., Tindle H.A., Tong E. et Rohan T.E. (2011). "Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study." *BMJ* **342**: d1016.

Macias H. et Hinck L. (2012). "Mammary gland development." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**(4): 533-557.

MacMahon B., Cole P., Lin T.M., Lowe C.R., Mirra A.P., Ravnihar B., Salber E.J., Valaoras V.G. et Yuasa S. (1970). "Age at first birth and breast cancer risk." *Bull World Health Organ* **43**(2): 209-221.

Mader S.S. (2010). Biologie humaine. Bruxelles, De Boeck.

Malhotra G.K., Zhao X., Band H. et Band V. (2010). "Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers." *Cancer Biol Ther* **10**(10): 955-960.

Marchetti P., Guerreschi P., Mortier L. et Kluza J. (2015). "Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics." *Int J Cell Biol* **2015**: 283145.

Marini C., Bianchi G., Buschiazzo A., Ravera S., Martella R., Bottoni G., Petretto A., Emionite L., Monteverde E., Capitanio S., Inglese E., Fabbi M., Bongioanni F., Garaboldi L., Bruzzi P., Orengo A.M., Raffaghello L. et Sambuceti G. (2016). "Divergent targets of glycolysis and oxidative phosphorylation result in additive effects of metformin and starvation in colon and breast cancer." *Sci Rep* **6**: 19569.

Martinez-Outschoorn U.E., Peiris-Pages M., Pestell R.G., Sotgia F. et Lisanti M.P. (2017). "Cancer metabolism: a therapeutic perspective." *Nat Rev Clin Oncol* **14**(1): 11-31.

Masubuchi Y., Kano S. et Horie T. (2006). "Mitochondrial permeability transition as a potential determinant of hepatotoxicity of antidiabetic thiazolidinediones." *Toxicology* **222**(3): 233-239.

Mathieu M. (2007). "Les sous-types moléculaires des cancers du sein." *La Lettre du Sénologue-n*: 33-34.

Mazerbourg S., Kuntz S., Grillier-Vuissoz I., Berthe A., Geoffroy M., Flament S., Bordessa A. et Boisbrun M. (2016). "Reprofiling of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment?" *Curr Top Med Chem* **16**(19): 2115-2124.

Mazurek S. (2011). "Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(7): 969-980.

McIlwain D.R., Berger T. et Mak T.W. (2013). "Caspase functions in cell death and disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(4): a008656.

Medina R.A. et Owen G.I. (2002). "Glucose transporters: expression, regulation and cancer." *Biol Res* **35**(1): 9-26.

Mellitus T.E.C.o.t.D.a.C.o.D. (2003). "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." *Diabetes Care* **26**(suppl 1): s5-s20.

Meredith A.M. et Dass C.R. (2016). "Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism." *J Pharm Pharmacol* **68**(6): 729-741.

Migdal C. et Serres M. (2011). "[Reactive oxygen species and oxidative stress]." *Med Sci (Paris)* **27**(4): 405-412.

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G. et Gianni L. (2004). "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." *Pharmacol Rev* **56**(2): 185-229.

Mitchell P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." *Nature* **191**: 144-148.

Mochiki E., Kuwano H., Katoh H., Asao T., Oriuchi N. et Endo K. (2004). "Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer." *World J Surg* **28**(3): 247-253.

Molnar-Stanciu D., Guimas V., Bensalem A. et Thiery-Vuillemin A. (2012). "[Targeted therapy and breast cancer: state of the art]." *Pathol Biol (Paris)* **60**(4): 254-263.

Moon S.H., Lee S.J., Jung K.H., Quach C.H., Park J.W., Lee J.H., Cho Y.S. et Lee K.H. (2016). "Troglitazone Stimulates Cancer Cell Uptake of 18F-FDG by Suppressing Mitochondrial Respiration and Augments Sensitivity to Glucose Restriction." *J Nucl Med* **57**(1): 129-135.

Moore K.L. et Dalley A.F. (2001). Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques. Paris, De Boeck.

Moreno-Sanchez R., Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A. et Saavedra E. (2007). "Energy metabolism in tumor cells." *FEBS J* **274**(6): 1393-1418.

Morrow M., Strom E.A., Bassett L.W., Dershaw D.D., Fowble B., Giuliano A., Harris J.R., O'Malley F., Schnitt S.J., Singletary S.E., Winchester D.P., American College of R., American College of S., Society of Surgical O. et College of American P. (2002). "Standard for breast conservation therapy in the management of invasive breast carcinoma." *CA Cancer J Clin* **52**(5): 277-300.

Moussard C. (2006). Biochimie structurale et métabolique : cours. Bruxelles; [Paris], De Boeck.

Nadanaciva S., Dykens J.A., Bernal A., Capaldi R.A. et Will Y. (2007). "Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration." *Toxicol Appl Pharmacol* **223**(3): 277-287.

Nakada H.I. et Wick A.N. (1956). "The effect of 2-deoxyglucose on the metabolism of glucose, fructose, and galactose by rat diaphragm." *J Biol Chem* **222**(2): 671-676.

Narayanan P.K., Hart T., Elcock F., Zhang C., Hahn L., McFarland D., Schwartz L., Morgan D.G. et Bugelski P. (2003). "Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment." *Cytometry A* **52**(1): 28-35.

Ojuka E.O., Jones T.E., Han D.H., Chen M., Wamhoff B.R., Sturek M. et Holloszy J.O. (2002). "Intermittent increases in cytosolic Ca2+ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(5): E1040-1045.

Okuda T., Norioka M., Shitara Y. et Horie T. (2010). "Multiple mechanisms underlying troglitazone-induced mitochondrial permeability transition." *Toxicol Appl Pharmacol* **248**(3): 242-248.

Omar H.A., Tolba M.F. et Saber-Ayad M.M. (2014). "Potential targets of energy restriction mimetic agents in cancer cells." *Future Oncol* **10**(16): 2547-2550.

Osellame L.D., Blacker T.S. et Duchen M.R. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**(6): 711-723.

Paik S., Shak S., Tang G., Kim C., Baker J., Cronin M., Baehner F.L., Walker M.G., Watson D., Park T., Hiller W., Fisher E.R., Wickerham D.L., Bryant J. et Wolmark N. (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." *N Engl J Med* **351**(27): 2817-2826.

Palakurthi S.S., Aktas H., Grubissich L.M., Mortensen R.M. et Halperin J.A. (2001). "Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation." *Cancer Res* **61**(16): 6213-6218.

Pan M.H., Chiou Y.S., Chen L.H. et Ho C.T. (2015). "Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: specific epigenetic related molecular targets." *Mol Nutr Food Res* **59**(1): 21-35.

Park Y.H., Lee S.J., Cho E.Y., Choi Y.L., Lee J.E., Nam S.J., Yang J.H., Shin J.H., Ko E.Y., Han B.K., Ahn J.S. et Im Y.H. (2011). "Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes." *Ann Oncol* **22**(7): 1554-1560.

Parker J.S., Mullins M., Cheang M.C., Leung S., Voduc D., Vickery T., Davies S., Fauron C., He X., Hu Z., Quackenbush J.F., Stijleman I.J., Palazzo J., Marron J.S., Nobel A.B., Mardis E., Nielsen T.O., Ellis M.J., Perou C.M. et Bernard P.S. (2009). "Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes." *J Clin Oncol* **27**(8): 1160-1167.

Parker W.B. et Cheng Y.C. (1990). "Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil." *Pharmacol Ther* **48**(3): 381-395.

Pastorino J.G., Shulga N. et Hoek J.B. (2002). "Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis." *J Biol Chem* **277**(9): 7610-7618.

Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Castello-Cros R., Flomenberg N., Witkiewicz A.K., Frank P.G., Casimiro M.C., Wang C., Fortina P., Addya S., Pestell R.G., Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F. et Lisanti M.P. (2009). "The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma." *Cell Cycle* **8**(23): 3984-4001.

Payen V.L., Porporato P.E., Baselet B. et Sonveaux P. (2016). "Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway." *Cell Mol Life Sci* **73**(7): 1333-1348.

Pedersen P.L., Mathupala S., Rempel A., Geschwind J.F. et Ko Y.H. (2002). "Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention." *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 14-20.

Perez-Ortiz J.M., Tranque P., Burgos M., Vaquero C.F. et Llopis J. (2007). "Glitazones induce astroglioma cell death by releasing reactive oxygen species from mitochondria: modulation of cytotoxicity by nitric oxide." *Mol Pharmacol* **72**(2): 407-417.

Perez-Ortiz J.M., Tranque P., Vaquero C.F., Domingo B., Molina F., Calvo S., Jordan J., Cena V. et Llopis J. (2004). "Glitazones differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." *J Biol Chem* **279**(10): 8976-8985.

Perkins G.A. et Frey T.G. (2000). "Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy." *Micron* **31**(1): 97-111.

Pernicova I. et Korbonits M. (2014). "Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer." *Nat Rev Endocrinol* **10**(3): 143-156.

Perou C.M. (2010). "Molecular stratification of triple-negative breast cancers." *Oncologist* **15 Suppl 5**: 39-48.

Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., Van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lonning P.E., Borresen-Dale A.L., Brown P.O. et Botstein D. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.

Pfeiffer T., Schuster S. et Bonhoeffer S. (2001). "Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways." *Science* **292**(5516): 504-507.

Pirkmajer S. et Chibalin A.V. (2011). "Serum starvation: caveat emptor." *Am J Physiol Cell Physiol* **301**(2): C272-279.

Porceddu M., Buron N., Roussel C., Labbe G., Fromenty B. et Borgne-Sanchez A. (2012). "Prediction of liver injury induced by chemicals in human with a multiparametric assay on isolated mouse liver mitochondria." *Toxicol Sci* **129**(2): 332-345.

Porporato P.E., Dhup S., Dadhich R.K., Copetti T. et Sonveaux P. (2011). "Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review." *Front Pharmacol* **2**: 49.

Porporato P.E., Payen V.L., Perez-Escuredo J., De Saedeleer C.J., Danhier P., Copetti T., Dhup S., Tardy M., Vazeille T., Bouzin C., Feron O., Michiels C., Gallez B. et Sonveaux P. (2014). "A mitochondrial switch promotes tumor metastasis." *Cell Rep* **8**(3): 754-766.

Pourquier P. (2011). "[Alkylating agents]." *Bull Cancer* **98**(11): 1237-1251.

Promega. from https://france.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/nad-nadh-glo-assay-protocol.pdf?la=fr-fr.

Rabinowitz J.D. et White E. (2010). "Autophagy and metabolism." *Science* **330**(6009): 1344-1348.

Rachek L.I., Yuzefovych L.V., Ledoux S.P., Julie N.L. et Wilson G.L. (2009). "Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes." *Toxicol Appl Pharmacol* **240**(3): 348-354.

Raffaghello L., Lee C., Safdie F.M., Wei M., Madia F., Bianchi G. et Longo V.D. (2008). "Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(24): 8215-8220.

Ralph S.J., Low P., Dong L., Lawen A. et Neuzil J. (2006). "Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **1**(3): 327-346.

Ralph S.J., Rodriguez-Enriquez S., Neuzil J. et Moreno-Sanchez R. (2010). "Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger." *Mol Aspects Med* **31**(1): 29-59.

Ramsden D.B., Ho P.W., Ho J.W., Liu H.F., So D.H., Tse H.M., Chan K.H. et Ho S.L. (2012). "Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction." *Brain Behav* **2**(4): 468-478.

Rebbeck T.R., Kauff N.D. et Domchek S.M. (2009). "Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers." *J Natl Cancer Inst* **101**(2): 80-87.

Reddy R.C., Srirangam A., Reddy K., Chen J., Gangireddy S., Kalemkerian G.P., Standiford T.J. et Keshamouni V.G. (2008). "Chemotherapeutic drugs induce PPAR-gamma expression and show sequence-specific synergy with PPAR-gamma ligands in inhibition of non-small cell lung cancer." *Neoplasia* **10**(6): 597-603.

Reece J.B. et Campbell N.A. (2012). Campbell biologie. Saint-Laurent; Montréal, ERPI ; Pearson.

Reynolds M.R. et Clem B.F. (2015). "Troglitazone suppresses glutamine metabolism through a PPAR-independent mechanism." *Biol Chem* **396**(8): 937-947.

Reznikov A. (2015). "Hormonal impact on tumor growth and progression." *Exp Oncol* **37**(3): 162-172.

Rivera E. et Gomez H. (2010). "Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone." *Breast Cancer Res* **12 Suppl 2**: S2.

Rizzuto R., De Stefani D., Raffaello A. et Mammucari C. (2012). "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(9): 566-578.

Rocha G.Z., Dias M.M., Ropelle E.R., Osorio-Costa F., Rossato F.A., Vercesi A.E., Saad M.J. et Carvalheira J.B. (2011). "Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth." *Clin Cancer Res* **17**(12): 3993-4005.

Romero-Garcia S., Lopez-Gonzalez J.S., Baez-Viveros J.L., Aguilar-Cazares D. et Prado-Garcia H. (2011). "Tumor cell metabolism: an integral view." *Cancer Biol Ther* **12**(11): 939-948.

Romero-Garcia S., Moreno-Altamirano M.M., Prado-Garcia H. et Sanchez-Garcia F.J. (2016). "Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance." *Front Immunol* **7**: 52.

Rosen E.D. et Spiegelman B.M. (2001). "PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth." *J Biol Chem* **276**(41): 37731-37734.

Russo J. et Russo I.H. (2004). "Development of the human breast." *Maturitas* **49**(1): 2-15.

Safdie F., Brandhorst S., Wei M., Wang W., Lee C., Hwang S., Conti P.S., Chen T.C. et Longo V.D. (2012). "Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy." *PLoS One* **7**(9): e44603.

Safdie F.M., Dorff T., Quinn D., Fontana L., Wei M., Lee C., Cohen P. et Longo V.D. (2009). "Fasting and cancer treatment in humans: A case series report." *Aging (Albany NY)* **1**(12): 988-1007.

Salamone S., Colin C., Grillier-Vuissoz I., Kuntz S., Mazerbourg S., Flament S., Martin H., Richert L., Chapleur Y. et Boisbrun M. (2012). "Synthesis of new troglitazone derivatives: anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study." *Eur J Med Chem* **51**: 206-215.

Samuel V.T., Petersen K.F. et Shulman G.I. (2010). "Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism." *Lancet* **375**(9733): 2267-2277.

HAS (haute autorité de santé) (2015). "Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé. Dépistage et prévention du cancer du sein."

Sanz M.N., Sanchez-Martin C., Detaille D., Vial G., Rigoulet M., El-Mir M.Y. et Rodriguez-Villanueva G. (2011). "Acute mitochondrial actions of glitazones on the liver: a crucial parameter for their antidiabetic properties." *Cell Physiol Biochem* **28**(5): 899-910.

Sawayama H., Ishimoto T., Watanabe M., Yoshida N., Sugihara H., Kurashige J., Hirashima K., Iwatsuki M., Baba Y., Oki E., Morita M., Shiose Y. et Baba H. (2014). "Small molecule agonists of PPAR-gamma exert therapeutic effects in esophageal cancer." *Cancer Res* **74**(2): 575-585.

Scarpulla R.C. (2008). "Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function." *Physiol Rev* **88**(2): 611-638.

Scatena R., Bottoni P., Martorana G.E., Ferrari F., De Sole P., Rossi C. et Giardina B. (2004). "Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications." *Biochem Biophys Res Commun* **319**(3): 967-973.

Schacter J.L., Henson E.S. et Gibson S.B. (2014). "Estrogen regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 expression in breast cancer cells." *PLoS One* **9**(6): e100364.

Schieber M. et Chandel N.S. (2014). "ROS function in redox signaling and oxidative stress." *Curr Biol* **24**(10): R453-462.

Schmidt O., Pfanner N. et Meisinger C. (2010). "Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 655-667.

Sena L.A. et Chandel N.S. (2012). "Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species." *Mol Cell* **48**(2): 158-167.

Sendoel A. et Hengartner M.O. (2014). "Apoptotic cell death under hypoxia." *Physiology (Bethesda)* **29**(3): 168-176.

Sharma G.N., Dave R., Sanadya J., Sharma P. et Sharma K.K. (2010). "Various types and management of breast cancer: an overview." *J Adv Pharm Technol Res* **1**(2): 109-126.

Shi Y., Felley-Bosco E., Marti T.M., Orlowski K., Pruschy M. et Stahel R.A. (2012). "Starvation-induced activation of ATM/Chk2/p53 signaling sensitizes cancer cells to cisplatin." *BMC Cancer* **12**: 571.

Shiau C.W., Yang C.C., Kulp S.K., Chen K.F., Chen C.S. et Huang J.W. (2005). "Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma." *Cancer Res* **65**(4): 1561-1569.

Shimizu M. et Moriwaki H. (2008). "Synergistic Effects of PPARgamma Ligands and Retinoids in Cancer Treatment." *PPAR Res* **2008**: 181047.

Shin S.J., Kim J.Y., Kwon S.Y., Mun K.C., Cho C.H. et Ha E. (2014). "Ciglitazone enhances ovarian cancer cell death via inhibition of glucose transporter-1." *Eur J Pharmacol* **743**: 17-23.

Shishido S., Koga H., Harada M., Kumemura H., Hanada S., Taniguchi E., Kumashiro R., Ohira H., Sato Y., Namba M., Ueno T. et Sata M. (2003). "Hydrogen peroxide overproduction in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes." *Hepatology* **37**(1): 136-147.

Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N. et Arbel N. (2010). "VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death." *Mol Aspects Med* **31**(3): 227-285.

Skelhorne-Gross G. et Nicol C.J. (2012). "The Key to Unlocking the Chemotherapeutic Potential of PPARgamma Ligands: Having the Right Combination." *PPAR Res* **2012**: 946943.

Skildum A., Dornfeld K. et Wallace K. (2011). "Mitochondrial amplification selectively increases doxorubicin sensitivity in breast cancer cells with acquired antiestrogen resistance." *Breast Cancer Res Treat* **129**(3): 785-797.

Smolkova K., Plecita-Hlavata L., Bellance N., Benard G., Rossignol R. et Jezek P. (2011). "Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(7): 950-968.

Société canadienne du cancer from http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/treatment/chemotherapy/?region=on.

Soller M., Drose S., Brandt U., Brune B. et von Knethen A. (2007). "Mechanism of thiazolidinedione-dependent cell death in Jurkat T cells." *Mol Pharmacol* **71**(6): 1535-1544.

Sonveaux P., Vegran F., Schroeder T., Wergin M.C., Verrax J., Rabbani Z.N., De Saedeleer C.J., Kennedy K.M., Diepart C., Jordan B.F., Kelley M.J., Gallez B., Wahl M.L., Feron O. et Dewhirst M.W. (2008). "Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice." *J Clin Invest* **118**(12): 3930-3942.

Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J.S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C.M., Lonning P.E., Brown P.O., Borresen-Dale A.L. et Botstein D. (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8418-8423.

Srivastava N., Kollipara R.K., Singh D.K., Sudderth J., Hu Z., Nguyen H., Wang S., Humphries C.G., Carstens R., Huffman K.E., DeBerardinis R.J. et Kittler R. (2014). "Inhibition of cancer cell proliferation by PPARgamma is mediated by a metabolic switch that increases reactive oxygen species levels." *Cell Metab* **20**(4): 650-661.

Stock C., Gassner B., Hauck C.R., Arnold H., Mally S., Eble J.A., Dieterich P. et Schwab A. (2005). "Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na+/H+ exchange." *J Physiol* **567**(Pt 1): 225-238.

Stram A.R. et Payne R.M. (2016). "Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse." *Cell Mol Life Sci* **73**(21): 4063-4073.

Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M. et Samali A. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." *EMBO Rep* **7**(9): 880-885.

Tait S.W. et Green D.R. (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 621-632.

Tamatani T., Ferdous T., Takamaru N., Hara K., Kinouchi M., Kuribayashi N., Ohe G., Uchida D., Nagai H., Fujisawa K. et Miyamoto Y. (2012). "Antitumor efficacy of sequential treatment with docetaxel and 5-fluorouracil against human oral cancer cells." *Int J Oncol* **41**(3): 1148-1156.

Tan A.S., Baty J.W., Dong L.F., Bezawork-Geleta A., Endaya B., Goodwin J., Bajzikova M., Kovarova J., Peterka M., Yan B., Pesdar E.A., Sobol M., Filimonenko A., Stuart S., Vondrusova M., Kluckova K., Sachaphibulkij K., Rohlena J., Hozak P., Truksa J., Eccles D., Haupt L.M., Griffiths L.R., Neuzil J. et Berridge M.V. (2015). "Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA." *Cell Metab* **21**(1): 81-94.

TeSlaa T. et Teitell M.A. (2014). "Techniques to monitor glycolysis." *Methods Enzymol* **542**: 91-114.

Tirmenstein M.A., Hu C.X., Gales T.L., Maleeff B.E., Narayanan P.K., Kurali E., Hart T.K., Thomas H.C. et Schwartz L.W. (2002). "Effects of troglitazone on HepG2 viability and mitochondrial function." *Toxicol Sci* **69**(1): 131-138.

Tontonoz P. et Spiegelman B.M. (2008). "Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma." *Annu Rev Biochem* **77**: 289-312.

Trachootham D., Alexandre J. et Huang P. (2009). "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" *Nat Rev Drug Discov* **8**(7): 579-591.

Van 't Veer L.J., Dai H., Van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Bernards R. et Friend S.H. (2003). "Expression profiling predicts outcome in breast cancer." *Breast Cancer Res* **5**(1): 57-58.

Van der Bliek A.M., Shen Q. et Kawajiri S. (2013). "Mechanisms of mitochondrial fission and fusion." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(6).

Vander A.J., Sherman J.H., Luciano D.S., Widmaier E.P., Raff H., Strang K.T., Erskine M. et Pradel J.-L. (2009). Physiologie humaine les mécanismes du fonctionnement de l'organisme. Montréal (Québec); Paris, Chenelière éducation ; Maloine.

Vander Heiden M.G. (2011). "Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens." *Nat Rev Drug Discov* **10**(9): 671-684.

Vander Heiden M.G., Cantley L.C. et Thompson C.B. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* **324**(5930): 1029-1033.

Vanderperre B., Bender T., Kunji E.R. et Martinou J.C. (2015). "Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis." *Curr Opin Cell Biol* **33**: 35-41.

Vegran F., Boidot R., Michiels C., Sonveaux P. et Feron O. (2011). "Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis." *Cancer Res* **71**(7): 2550-2560.

Viale G. (2012). "The current state of breast cancer classification." *Ann Oncol* **23 Suppl 10**: x207-210.

Visvader J.E. (2009). "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis." *Genes Dev* **23**(22): 2563-2577.

Vos S.M., Tretter E.M., Schmidt B.H. et Berger J.M. (2011). "All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(12): 827-841.

Vyas S., Zaganjor E. et Haigis M.C. (2016). "Mitochondria and Cancer." *Cell* **166**(3): 555-566.

Wahba H.A. et El-Hadaad H.A. (2015). "Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer." *Cancer Biol Med* **12**(2): 106-116.

Walenta S., Schroeder T. et Mueller-Klieser W. (2004). "Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology." *Curr Med Chem* **11**(16): 2195-2204.

Wang H.Y., Zhang Y., Zhou Y., Lu Y.Y., Wang W.F., Xin M. et Guo X.L. (2016). "Rosiglitazone elevates sensitization of drug-resistant oral epidermoid carcinoma cells to vincristine by G2/M-phase arrest, independent of PPAR-gamma pathway." *Biomed Pharmacother* **83**: 349-361.

Wang R. et Green D.R. (2012). "The immune diet: meeting the metabolic demands of lymphocyte activation." *F1000 Biol Rep* **4**: 9.

Warburg O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* **123**(3191): 309-314.

Warburg O. (1926). Uber den Stoffwechsel der Tumoren : Arbeiten aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie-Berlin-Dahlem. Berlin, Julius Springer.

Watson I.R., Takahashi K., Futreal P.A. et Chin L. (2013). "Emerging patterns of somatic mutations in cancer." *Nat Rev Genet* **14**(10): 703-718.

Wei S., Chu P.C., Chuang H.C., Hung W.C., Kulp S.K. et Chen C.S. (2012). "Targeting the oncogenic E3 ligase Skp2 in prostate and breast cancer cells with a novel energy restriction-mimetic agent." *PLoS One* **7**(10): e47298.

Wei S., Kulp S.K. et Chen C.S. (2010). "Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones." *J Biol Chem* **285**(13): 9780-9791.

Wei S., Lin L.F., Yang C.C., Wang Y.C., Chang G.D., Chen H. et Chen C.S. (2007). "Thiazolidinediones modulate the expression of beta-catenin and other cell-cycle regulatory proteins by targeting the F-box proteins of Skp1-Cul1-F-box protein E3 ubiquitin ligase independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Mol Pharmacol* **72**(3): 725-733.

Wei S., Yang H.C., Chuang H.C., Yang J., Kulp S.K., Lu P.J., Lai M.D. et Chen C.S. (2008). "A novel mechanism by which thiazolidinediones facilitate the proteasomal degradation of cyclin D1 in cancer cells." *J Biol Chem* **283**(39): 26759-26770.

Wei S., Yang J., Lee S.L., Kulp S.K. et Chen C.S. (2009). "PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones." *Cancer Lett* **276**(2): 119-124.

Weinberg S.E. et Chandel N.S. (2015). "Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy." *Nat Chem Biol* **11**(1): 9-15.

Weinhouse S. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." *Science* **124**(3215): 267-269.

Weiss J.R., Moysich K.B. et Swede H. (2005). "Epidemiology of male breast cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(1): 20-26.

Wenner C.E., Spirtes M.A. et Weinhouse S. (1952). "Metabolism of neoplastic tissue. II. A survey of enzymes of the citric acid cycle in transplanted tumors." *Cancer Res* **12**(1): 44-49.

Westermann B. (2012). "Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission." *Biochim Biophys Acta* **1817**(10): 1833-1838.

White E. (2012). "Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer." *Nat Rev Cancer* **12**(6): 401-410.

Wick A.N., Drury D.R., Nakada H.I. et Wolfe J.B. (1957). "Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose." *J Biol Chem* **224**(2): 963-969.

Williams N.R., Pigott K.H., Brew-Graves C. et Keshtgar M.R. (2014). "Intraoperative radiotherapy for breast cancer." *Gland Surg* **3**(2): 109-119.

Witsch E., Sela M. et Yarden Y. (2010). "Roles for growth factors in cancer progression." *Physiology (Bethesda)* **25**(2): 85-101.

Wu Z., Xie Y., Morrison R.F., Bucher N.L. et Farmer S.R. (1998). "PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes." *J Clin Invest* **101**(1): 22-32.

Xi H., Kurtoglu M. et Lampidis T.J. (2014). "The wonders of 2-deoxy-D-glucose." *IUBMB Life* **66**(2): 110-121.

Yang C.C., Ku C.Y., Wei S., Shiau C.W., Chen C.S., Pinzone J.J., Ringel M.D. et Chen C.S. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent repression of prostate-specific antigen expression by thiazolidinediones in prostate cancer cells." *Mol Pharmacol* **69**(5): 1564-1570.

Yang C.C., Wang Y.C., Wei S., Lin L.F., Chen C.S., Lee C.C., Lin C.C. et Chen C.S. (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent suppression of androgen receptor expression by troglitazone mechanism and pharmacologic exploitation." *Cancer Res* **67**(7): 3229-3238.

Yang F., Petsalaki E., Rolland T., Hill D.E., Vidal M. et Roth F.P. (2015). "Protein domain-level landscape of cancer-type-specific somatic mutations." *PLoS Comput Biol* **11**(3): e1004147.

Yang F.G., Zhang Z.W., Xin D.Q., Shi C.J., Wu J.P., Guo Y.L. et Guan Y.F. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines." *Acta Pharmacol Sin* **26**(6): 753-761.

Yin F., Wakino S., Liu Z., Kim S., Hsueh W.A., Collins A.R., Van Herle A.J. et Law R.E. (2001). "Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators." *Biochem Biophys Res Commun* **286**(5): 916-922.

Yki-Jarvinen H. (2004). "Thiazolidinediones." *N Engl J Med* **351**(11): 1106-1118.

Yoon M.J., Lee G.Y., Chung J.J., Ahn Y.H., Hong S.H. et Kim J.B. (2006). "Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha." *Diabetes* **55**(9): 2562-2570.

Yue W., Yager J.D., Wang J.P., Jupe E.R. et Santen R.J. (2013). "Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis." *Steroids* **78**(2): 161-170.

Yuneva M.O., Fan T.W., Allen T.D., Higashi R.M., Ferraris D.V., Tsukamoto T., Mates J.M., Alonso F.J., Wang C., Seo Y., Chen X. et Bishop J.M. (2012). "The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type." *Cell Metab* **15**(2): 157-170.

Zhao J.G., Ren K.M. et Tang J. (2014). "Overcoming 5-Fu resistance in human non-small cell lung cancer cells by the combination of 5-Fu and cisplatin through the inhibition of glucose metabolism." *Tumour Biol* **35**(12): 12305-12315.

Zhao Y., Butler E.B. et Tan M. (2013). "Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics." *Cell Death Dis* **4**: e532.

Zhao Y., Liu H., Liu Z., Ding Y., Ledoux S.P., Wilson G.L., Voellmy R., Lin Y., Lin W., Nahta R., Liu B., Fodstad O., Chen J., Wu Y., Price J.E. et Tan M. (2011). "Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism." *Cancer Res* **71**(13): 4585-4597.

Zhou J., Zhang W., Liang B., Casimiro M.C., Whitaker-Menezes D., Wang M., Lisanti M.P., Lanza-Jacoby S., Pestell R.G. et Wang C. (2009). "PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(11): 2334-2342.

Zu X.L. et Guppy M. (2004). "Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(3): 459-465.

Résumé
L'absence de réponse et la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux thérapies actuelles, ainsi que l'absence de thérapie ciblée pour les tumeurs mammaires triple-négatives, justifient le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le cancer du sein. Des données de la littérature indiquent qu'il serait intéressant de cibler le métabolisme énergétique souvent modifié dans les cellules cancéreuses.
Dans ce contexte, des thiazolidinediones (TZD) comme la ciglitazone présentent des effets antiprolifératifs qui pourraient résulter d'une atteinte du métabolisme énergétique. Notre laboratoire étudie d'autres TZD dérivées de la troglitazone (TGZ). Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à déterminer si la Δ2-Troglitazone (Δ2-TGZ), dérivé de la TGZ à action PPARγ-indépendante, modifie le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires.
Jusqu'à présent, les expériences menées au laboratoire étaient réalisées dans un milieu de culture contenant 1% de sérum de veau fœtal (SVF) qui crée un stress peu propice à l'étude du métabolisme. Nous avons donc d'abord caractérisé les effets de la Δ2-TGZ dans un milieu de culture contenant 10% SVF. Dans ces conditions, la Δ2-TGZ diminue toujours la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, mais les doses requises sont plus élevées. En outre, la Δ2-TGZ induit des effets cytostatiques plutôt que l'apoptose.
Nous avons ensuite montré que la Δ2-TGZ induit une augmentation du ratio NAD^+/NADH dans les cellules MDA-MB-231, preuve d'une perturbation du métabolisme énergétique. Celle-ci consiste en un blocage de la respiration mitochondriale que les cellules tendent à compenser par une stimulation de la glycolyse. Parallèlement, nous avons caractérisé le mode d'action du 2-désoxyglucose, utilisé comme témoin positif de l'inhibition de la glycolyse. L'action antiproliférative de ce composé est due à la fois à l'inhibition de la glycolyse et à la perturbation de la N-glycosylation des protéines dans les cellules cancéreuses mammaires.
Enfin, nous avons montré que la Δ2-TGZ potentialise les effets cytotoxiques de la doxorubicine dans les cellules MDA-MB-231.
Il nous reste à déterminer la part des altérations métaboliques impliquées dans les effets anti-cancéreux de la Δ2-TGZ.

Mots clés : cancer du sein, métabolisme énergétique, thiazolidinediones, mitochondrie, restriction énergétique, 2-désoxyglucose

Abstract
The absence of response and the resistance of cancer cells to therapies, as well as the absence of targeted therapies for triple-negative breast tumours are strong arguments for the development of new therapeutic strategies. Data from the literature suggest that it could be interesting to target energy metabolism that is often modified in cancer cells. In this context, thiazolidinediones (TZDs) as ciglitazone display antiproliferative effects that could be the result of energy metabolism alteration. During this PhD, we aimed at determining if Δ2-Troglitazone (Δ2-TGZ), that is devoid of PPARγ activity, could modify energy metabolism of breast cancer cells.
The experiments performed previously used a culture medium containing 1% of fetal calf serum (FCS) that is rather a stress inducing condition that can disturb cell metabolism. Thus, we first characterized the effects of Δ2-TGZ in a 10% FCS containing medium. In this case, Δ2-TGZ still decreases cell proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, but it requires high doses. Besides, Δ2-TGZ induces cell cycle arrest instead of apoptosis.
Then, we have shown that Δ2-TGZ induced an increase of the NAD^+/NADH ratio in MDA-MB-231 cells, that is indicative of energy metabolism modification. The latter is due to a decrease in oxidative phosphorylation. We also observed an increase in glycolytic activity that is probably a compensatory mechanism. During this part of our work, we have also characterized the mechanisms involved in the anticancer activity of 2-deoxyglucose that we used as a positive control of glycolysis inhibition. We have shown that in breast cancer cells, this compound acts not only by glycolysis inhibition but also by protein N-glycosylation alteration.
Finally, we have shown that Δ2-TGZ potentiates the cytotoxic effects of doxorubicine in MDA-MB-231 cells.
We have now to determine the part of metabolic alterations that are involved in the anti-cancer effects of Δ2-TGZ.

Key words : breast cancer, energetic metabolism, thiazolidinediones, mitochondria, energy restriction, 2-deoxyglucose