



HAL
open science

Métabolisme énergétique et thérapie anticancéreuse : caractérisation des effets de dérivés désoufrés de la troglitazone sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires

Claire Muller

► To cite this version:

Claire Muller. Métabolisme énergétique et thérapie anticancéreuse : caractérisation des effets de dérivés désoufrés de la troglitazone sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires. Endocrinologie et métabolisme. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0305 . tel-02860580

HAL Id: tel-02860580

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02860580>

Submitted on 8 Jun 2020

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.



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

BioSE



ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT
ED 266

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 **Claire MULLER**

Métabolisme énergétique et thérapie anticancéreuse : caractérisation des effets de dérivés désoufrés de la troglitazone sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires

Le 17 Décembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Corinne ABBADIE	Professeur, UMR 8161 CNRS Institut Pasteur, Lille
	M. Stéphane ROCCHI	Directeur de recherche, C3M U 1065 INSERM, Nice
Examineurs :	Mme Danièle BENSOUSSAN	Professeur, UTCT CHU de Nancy-UL, Nancy
	M. Jérôme KLUZA	Maître de conférences, UMR-S 1172 INSERM, Lille
	M. Stéphane FLAMENT	Professeur, CRAN UMR 7039 CNRS-UL, Nancy Directeur de thèse
	Mme Sabine MAZERBOURG	Maître de conférences, CRAN UMR 7039 CNRS-UL, Nancy Co-directrice de thèse

Remerciements

Si je devais associer la thèse à une image, ce serait des montagnes russes. Pour moi la thèse aura été un mélange de hauts et de bas, de joie et de pleurs, beaucoup de doutes mais ce fut une expérience riche !

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Mme Corinne Abbadie et Stéphane Rocchi d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Merci à Danièle Bensoussan et Jérôme Kluza d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs.

Je remercie particulièrement Sabine Mazerbourg et Stéphane Flament de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse et de m'avoir fait confiance. Merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre bienveillance. Je vous suis reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner et je te remercie Sabine pour tes conseils. Bien qu'au début cela paraît déroutant de passer de l'autre côté, j'ai réellement aimé enseigner.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse. Merci à Marie et Elia pour leur aide technique. Merci à Stéphanie et Vanessa, pour leur aide en cytométrie. Merci à Michel Boisbrun pour votre enthousiasme et votre disponibilité. Dorian, je te remercie pour tes encouragements dans nos petits moments de désespoir et je te souhaite bon courage pour ta thèse et une jolie réussite ! Audrey, un grand merci pour ton aide, tes précieux conseils, tes encouragements, ta grande écoute et ton soutien. Je remercie également Frédéric Bost pour sa contribution technique.

Ma reconnaissance va particulièrement à Jérôme Kluza. Je vous remercie d'avoir suivi ce travail de thèse et pour votre précieuse aide. Merci à vous et au professeur Philippe Marchetti de m'avoir accueilli dans votre laboratoire ainsi que pour votre expertise scientifique et vos conseils. La réputation des ch'tis n'est plus à faire, j'ai eu un accueil des plus chaleureux. Merci à votre équipe (Anne, Raeka, Stéphanie, Nicolas, Quentin, Selim et William) de m'avoir aussi bien intégré, merci à eux pour leur aide, leur bienveillance, leur gentillesse et surtout leur humour. Merci de m'avoir laissé quasiment privatiser le Seahorse pendant 6 semaines ! Merci à William pour sa grande aide technique notamment durant ces longues journées d'extraction

de mitochondries... Bon courage aux thésards et à Nicolas pour la suite ! Je garde un excellent souvenir de mon séjour lillois, à vos côtés.

J'ai une pensée pour les autres personnes du laboratoire que je remercie pour leur soutien et leurs encouragements. Merci Catherine pour ta grande aide administrative et ta bonne humeur. Je n'oublie pas non plus Marine ou « grande Marine » que je remercie pour ses conseils et encouragements. J'ai aussi une pensée pour la deuxième Marine ou plutôt « petite Marine » à qui je souhaite une bonne continuation pour sa thèse !

Bien sûr, je n'oublie pas mes collègues Maëlle, Guillaume, Florian et Charlène qui sont devenus de vrais amis, oui oui... ! C'est avec beaucoup d'émotions que je vous remercie pour tous les moments que nous avons passés ensemble et pour ce que vous m'avez tous apporté. Je suis très heureuse que cette thèse vous ait mis sur mon chemin. Guigui ou « mon papa », merci pour ton humour authentique qui manque depuis ton départ. Je me rappellerai toujours de notre petite virée à tous en Bretagne où nous avons bien cru te perdre sur cette longue route de campagne lors de ce fou rire mémorable ! Je pense également à Amélie, merci pour sa joie et son rire si communicatif. Je vous souhaite le plus grand bonheur. Maëlle, ton arrivée a été une vague de fraîcheur et de bonne humeur ! Merci pour ta jolie façon de penser et ton ouverture d'esprit.

Floflo et Chacha, mes loulous, vous avez été mon rayon de soleil au quotidien et surtout dans les moments de doute lors de cette fin de thèse. Sans vous, cette dernière année de thèse aurait été tout autre. Je tiens aussi à m'excuser pour ma voix qui est trop souvent montée dans les aigus. Une chanson pour nous représenter ? Tous les cris les SOS... Floflo, tout a commencé le jour où nous avons manipulé pour la première fois ensemble où... sur un gros malentendu... tu m'as attribué un magnifique surnom que je n'ose pas dévoiler, mais que tous les 4 avez adopté ! Merci pour ta bienveillance, ta grande qualité d'écoute et ta technique de respiration des plus originales. Merci de me remettre sur le droit chemin lorsque je dévisse ma tête. Chacha, quel réconfort et quel bonheur d'avoir partagé le bureau de rédaction avec toi ! Devrai-je compter le nombre de rouleaux de papier que tu as écoulé avec tes larmes de rire ? Il ne vaut mieux pas... Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir tant épaulé et tant aidé lors de cette rédaction. Tu m'as été d'un énorme soutien !

Je remercie également Anaïs pour ces 5 années de fac passées ensemble teintées de joies, de rires et de beaucoup de stress ! Grâce à toi, j'ai appris le second degré ! Tu as été ma (deuxième)

plus belle rencontre dans cette fac et tu es devenue une amie qui m'est chère. Nous aurons survécu ensemble à ces 3 ans de thèse.

Ma petite bande d'amis « BFFE » : Pierre, Océane, Laura et Justine, je me sens tellement chanceuse de vous avoir comme amis. Merci à vous d'être aussi curieux par rapport à mon sujet de thèse ! Pierre, un peu de masculinité parmi les 4 filles ! Le petit papi de la bande, merci d'être un ami aussi gentil et bienveillant. Océ, nos soirées du jeudi à Nancy lors de la P1, quels souvenirs ! Malgré la distance, tu sais être là pour nous. Vivement nos prochaines soirées vosgiennes ! Laura, enfin Milazz, merci de nous avoir fait voyager avec toi à travers tous tes périples, tu enrichies ma petite vie ! Je suis heureuse de partager avec toi une certaine façon de penser responsable et écologique. Juju, voilà 25 ans que nos chemins se sont croisés sur les bancs de la maternelle. Avec toi j'ai tout partagé. Tu es mon amie la plus fidèle, merci d'être la pétillante personne que tu es. Et merci d'être si enthousiaste à propos de mes mammosphères !

J'ai une pensée émue pour ma famille. Mes chers cousins, on dit que l'on ne choisit pas sa famille, moi je n'aurai pas hésité une seule seconde à vous choisir ! Nos « soirées cousins » sont chères à mon cœur. Je pense fort à mes grands-parents qui m'ont tellement chéri... Papa, Maman, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi, sans vous je ne serai jamais arrivée jusque-là. Même si vous ne me le dites pas forcément, je sais que vous êtes fiers de moi. Aujourd'hui c'est à mon tour de vous dire à quel point je suis fière d'avoir des parents comme vous. Je remercie également mes beaux-parents, Christine et Gérard, pour votre grande affection et vos encouragements.

Mes derniers mots sont pour toi, mon Romain. Tu as évidemment été ma plus belle rencontre à la fac et ma plus belle rencontre, tout simplement. Tu as toujours été mon plus grand soutien, merci de croire en moi. Merci également pour ta patience, ta folie et ton amour. Que la vie nous offre un bel avenir avec pleins de jolies choses à réaliser.

A ma marraine...

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. Le cancer du sein.....	8
1. Structure de la glande mammaire	8
2. Épidémiologie et facteurs de risque	9
2.1 Données épidémiologiques	9
2.2 Facteurs de risques	10
3. Hétérogénéité cellulaire intratumorale	11
4. La carcinogenèse mammaire	14
5. Classification des tumeurs mammaires	16
5.1 Classification histologique	16
5.2 Classification anatomopathologique	17
5.3 Classification moléculaire	18
6. Stratégies thérapeutiques	20
6.1 Traitements locorégionaux.....	20
6.2 Traitement systémique : la chimiothérapie	20
6.3 L'hormonothérapie	22
6.4 Les thérapies ciblées	23
7. Limites et résistance aux traitements.....	25
II. Métabolisme énergétique et cancer	26
1. Le métabolisme énergétique d'une cellule saine.....	26
1.1 La glycolyse	27
1.1.1 Fonctionnement et rendement de la glycolyse	27
1.1.2 Devenir du pyruvate et du NADH, H ⁺	28
1.1.3 Régulation de la glycolyse	29
1.2 Le métabolisme mitochondrial	29
1.2.1 Structure de la mitochondrie	29
1.2.2 Le cycle de Krebs	30
1.2.2.1 Fonctionnement et rendement du cycle de Krebs.....	30
1.2.2.2 Régulation du cycle de Krebs	31
1.2.3 La phosphorylation oxydative	31
1.2.3.1 La chaîne de transport d'électrons	32
1.2.3.2 Transport des électrons à travers les complexes de la chaîne respiratoire	32

1.2.3.3	Génération d'un gradient de protons	33
1.2.3.4	Rendement énergétique de la phosphorylation oxydative	35
1.2.3.5	Régulation de la phosphorylation oxydative	36
1.2.3.5.1	Régulation du taux de synthèse d'ATP	36
1.2.3.5.2	Régulation de l'efficacité de couplage	36
1.2.3.5.3	La biogenèse mitochondriale	37
1.2.3.5.4	Dynamique mitochondriale et phosphorylation oxydative	38
1.2.4	Implication de la mitochondrie dans d'autres processus cellulaires	39
1.2.4.1	La signalisation calcique	39
1.2.4.2	Production d'ERO	40
1.2.4.3	L'apoptose	41
2.	Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses	44
2.1	L'effet Warburg	44
2.2	Importance de la glycolyse aérobie pour les cellules cancéreuses.....	45
2.3	Importance du métabolisme mitochondrial dans les cellules cancéreuses	49
2.4	Hétérogénéité intratumorale et symbiose métabolique.....	52
2.5	Métabolisme énergétique des cellules souches cancéreuses.....	53
2.6	Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses et son implication en thérapie	55
III.	Les thiazolidinediones	58
1.	Présentation générale.....	58
2.	Activité antidiabétique des TZD	59
3.	Activité anticancéreuse des TZD	60
4.	Découverte de mécanismes anticancéreux PPAR γ -indépendants.....	62
4.1	Activité proapoptotique.....	63
4.2	Production d'ERO.....	63
4.3	Stress du RE.....	64
5.	Modification du métabolisme énergétique par les TZD.....	64
5.1	Restriction énergétique et dérivés de la $\Delta 2$ -CGZ	64
5.2	Atteinte mitochondriale par les TZD : un rôle dans l'effet antidiabétique ?	66
5.3	Atteinte mitochondriale par les TZD dans les cellules cancéreuses	68
6.	Toxicité et nouveaux dérivés.....	70
6.1	Mécanismes impliqués dans la toxicité de la TGZ	70
6.2	Vers de nouveaux dérivés de la TGZ.....	73
	CONTEXTE ET OBJECTIFS	75
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	77

I.	Molécules utilisées.....	78
II.	Culture cellulaire.....	78
1.	Lignées cellulaires.....	78
2.	Conditions de culture.....	79
3.	Ensemencement et conditions de traitement.....	79
III.	Numération cellulaire par le test de coloration nucléaire au cristal violet.....	80
IV.	Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	80
V.	Analyse de la mort cellulaire par apoptose.....	81
1.	Détection de mort cellulaire par apoptose par cytométrie en flux.....	81
2.	Mesure de l'activité des caspases 3/7.....	81
VI.	Immunoblot.....	81
1.	Extraction protéique.....	82
2.	Electrophorèse et transfert sur membrane.....	82
3.	Détection immunologique.....	82
VII.	Étude du métabolisme énergétique des cellules.....	83
1.	Dosage du NAD ⁺ et du NADH.....	83
2.	Évaluation du taux de consommation d'oxygène.....	83
3.	Extraction de mitochondries et mesure du taux de consommation d'oxygène.....	84
4.	Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène.....	85
5.	Analyse de l'activité glycolytique par mesure de la consommation de glucose et de la production de lactate.....	85
6.	Dosage d'ATP.....	86
VIII.	Détermination de l'indice de combinaison (CI) par la méthode de Chou-Talalay....	86
IX.	Culture tridimensionnelle des cellules.....	87
1.	Protocoles de traitement.....	87
	Protocole 1 : Impact sur la capacité des cellules à former des mammosphères.....	87
	Protocole 2 : Capacité des composés à affecter les mammosphères.....	87
2.	Détermination du nombre et de la taille des mammosphères.....	88
X.	Analyse statistique.....	88
	RÉSULTATS.....	89
I.	ÉTUDES DES EFFETS DE LA TGZ ET DES DÉRIVÉS DÉSOUFRÉS SUR LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES.....	90
1.	Comparaison des activités antiprolifératives de TZD soufrés et désoufrés.....	90
2.	Caractérisation des effets d'EP13.....	91
2.1	Étude du cycle cellulaire.....	91
2.2	Étude de la mort cellulaire par apoptose.....	92

3.	Conclusion.....	93
II.	ETUDE DE L'ACTION DES TZD SUR LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE.....	93
1.	Effet de l'absence du soufre sur la respiration mitochondriale.....	94
2.	Etude de l'action d'EP13 sur le métabolisme énergétique.....	96
2.1	Impact sur le métabolisme énergétique de manière générale.....	96
2.2	Impact sur le fonctionnement mitochondrial.....	96
2.2.1	Mesure de la consommation d'oxygène et des paramètres bioénergétiques.....	96
2.2.2	Mesure de la consommation d'oxygène de mitochondries isolées.....	97
2.2.3	Mesure de la production d'ERO.....	98
2.3	Impact sur la glycolyse.....	98
2.4	L'augmentation de la glycolyse correspond-elle à un mécanisme de compensation métabolique ?.....	99
2.4.1	Dosage de l'ATP intracellulaire.....	99
2.4.2	Effet de la combinaison d'EP13 et du 2-desoxyglucose.....	99
2.5	L'effet anticancéreux d'EP13 dépend-il d'une inhibition du transport de pyruvate dans la mitochondrie ?.....	100
3.	Conclusion.....	101
III.	ETUDE DE LA COMBINAISON D'EP13 AVEC DES AGENTS DE CHIMIOTHÉRAPIE.....	101
1.	Étude de combinaison selon le protocole A.....	102
2.	Étude de combinaison selon le protocole B.....	103
3.	Étude de combinaison selon le protocole C.....	103
4.	Conclusion.....	104
IV.	MISE EN PLACE D'UNE CULTURE CELLULAIRE TRIDIMENSIONNELLE ..	105
1.	Mise au point d'un protocole de culture de mammosphères.....	105
2.	Détermination de l'impact d'EP13 sur les mammosphères.....	107
2.1	Effet d'EP13 sur la capacité des cellules à former des mammosphères.....	108
2.2	Effet d'EP13 sur la capacité à affecter les mammosphères déjà formées.....	109
3.	Conclusion.....	109
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	111
I.	Intérêt potentiel des dérivés désoufrés de la TGZ.....	112
II.	EP13 perturbe le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires.....	114
1.	Quel est le mécanisme d'action d'EP13 ?.....	114
2.	Quelles sont les cibles mitochondriales d'EP13 ?.....	116
3.	Existe-t-il un lien entre l'altération du métabolisme énergétique et l'induction d'apoptose par EP13 ?.....	118

III. Une potentielle utilisation thérapeutique d'EP13 ?.....	119
IV. EP13 peut-il cibler la population de CSC ?.....	123
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126
ANNEXES	153

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1-9

$\Delta\Psi_m$	Potentiel de membrane
ΔpH	Gradient de pH
2-DG	2-Désoxyglucose
5-FU	5-Fluorouracile

A

ABC	ATP Binding Cassette
Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ACS	Acyl-CoA Synthase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNmt	Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial
ADP	Adénosine Diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALDH1	Aldéhyde Déshydrogénase 1
AMP	Adenosine Monophosphate
AMPK	AMP-activated protein Kinase
Apaf-1	Apoptotic protein activating factor-1
ARALAR	Transporteur aspartate/glutamate
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATG7	Autophagy Related 7
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine Triphosphate

B

Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
BRCA1, 2	BReast Cancer Associated 1, 2
Bsep	Bile salt export pump

C

CAF	Cancer Associated Fibroblast
-----	------------------------------

CD24, 44	Cluster of Differentiation 24, 44
CDK 4/6	Cyclin-Dependent Kinase 4/6
CGZ	Ciglitazone
CHC	α -Cyano-4-Hydroxycinnamate
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CI	Indice de Combinaison
CITED2	Cbp/p300-interacting Transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal Domain 2
CK	Cytokératine
CO ₂	Dioxyde de carbone
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CSMa	Cellule Souche Mammaire
CT	Chimiothérapie
CYP	Cytochrome P450

D

DCA	Dichloroacétate
DHFU	Dihydrofluorouracile
DIABLO	Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein with Low pI
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPD	Dihydropyrimidine Déshydrogénase
DR	Death Receptor
Drp1	Dynamamin related protein 1
DTAB	Dodecyltrimethyl Ammonium Bromide
DTT	Dithiotréitol

E

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EFA	Efatutazone
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Récepteur des œstrogènes
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ERMA	Energy Restriction Mimetic Agents
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESA	Epithelial-Specific Antigen

F

FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas	Fas ligand

FasR	Fas Receptor
FATP	Fatty Acid Transport Protein
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxy-D-glucose
FdUDP	Fluorodéoxyuridine Diphosphate
FdUMP	Fluorodéoxyuridine Monophosphate
FdUTP	Fluorodéoxyuridine Triphosphate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FMN	Flavine Mononucléotide
FUDP	Fluorouridine Diphosphate
FUMP	Fluorouridine Monophosphate
FUTP	Fluorouridine Triphosphate

G

GLUT	Glucose Transporter
GPx	Gluthation Peroxydase
GRP78	Glucose-Regulated Protein, 78 kDa
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion S-Transférase
GSTM1	Glutathion S-Transférase Mu 1
GSTT1	Glutathion S-Transférase Theta 1
GTP	Guanosine Triphosphate

H

H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor-1 α
HIF-2 α	Hypoxia Inducible Factor-2 α
HK 1, 2	Hexokinase 1, 2

I

IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IC ₅₀	Half-maximal inhibitory concentration
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
IL6	Interleukine-6
INCa	Institut National du Cancer
IRE1 α	Inositol Requiring Enzyme 1 α

K, L

KCN	Cyanure de potassium
KLF6	Krueppel-Like Factor 6
LDH	Lactate Déshydrogénase

LH-RH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LKB1	Liver Kinase B1
LPL	Lipoprotéine Lipase

M

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCT1	Monocarboxylate Transporter 1
MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter
MEC	Matrice Extracellulaire
MEK	MAPK/ERK Kinase
MFE	Mammosphere Forming Efficiency
Mfn1, 2	Mitofusin 1, 2
MOMP	Perméabilisation de la Membrane Mitochondriale externe
MMP	Métalloprotéases Matricielles
MPC1, 2	Mitochondrial Pyruvate Carrier 1, 2
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTOT	mitochondrial Target of Thiazolidinediones
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

N

NAC	N-acétylcystéine
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NOX	NADPH oxidase
NRF	Nuclear Respiratory Factor

O

O ₂	Dioxygène
O ₂ ^{-•}	Anion superoxide
OCR	Oxygen consumption rate
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
Opa 1	Optic atrophy 1
OPRT	Orotate Phosphoribosyltransférase

P

PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1

PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PDK1	Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1
PERK	Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase-like endoplasmic reticulum kinase
PGC1- α	Peroxisome-proliférateur-activated receptor γ co-activator-1 α
PGZ	Pioglitazone
pHe	pH extracellulaire
pHi	pH intracellulaire
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKM2	Pyruvate Kinase type M2
POX	Proline Oxydase
PPAR γ	Peroxisome Proliférateur-Activated Receptor- γ
PPRE	Peroxisome Proliférateur Response Element
PSN	Piosuccinimide
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PR	Récepteur de la Progestérone
Pyk2	Protein Tyrosine Kinase 2

R

RE	Réticulum Endoplasmique
RGZ	Rosiglitazone
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RR	Ribonucléotide Réductase
RSN	Rosisuccinimide
RXR	Retinoid X Receptor

S

SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SERD	Selective Estrogen Receptor Degradation
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulators
Sirt1	Silent information regulator 1/sirtuin 1
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SOD	Superoxyde Dismutase
Sp1	Stimulating protein 1
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
SVF	Serum de Veau Fœtal

T

TAM	Macrophages Associés à la Tumeur
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TEP	Tomographie par Emission de Positons
Tfam	Transcription Factor A Mitochondrial
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGZ	Troglitazone
TIM	Translocase of the Inner mitochondrial Membrane
TK	Thymidine Kinase
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNM	Tumor Nodes Metastasis
TNT	Tris-HCl, NaCl, Tween
TOM	Translocase of the Outer mitochondrial Membrane
TP	Thymidine Phosphorylase
TP53	Tumor Protein 53
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain
TRAIL	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor
TrCP	β -Transducin repeat-Containing Protein
TS	Thymidylate Synthase
TSN	Trosuccinimide
TZD	Thiazolidinediones

U

UCP	Uncoupling Protein
UGT1A1	UDP-Glucuronyltransférase 1A1
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UPR	Unfolded Protein Response

V

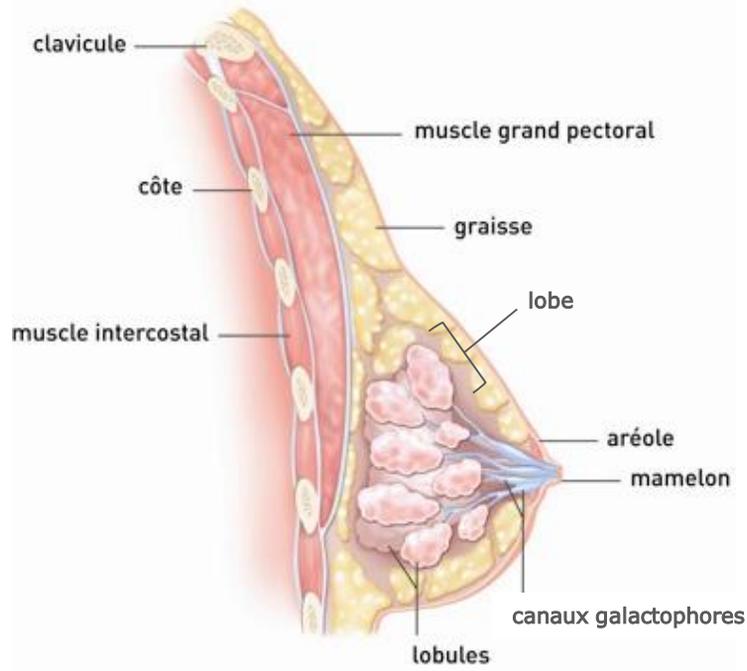
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

X

XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
------	---

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A



B

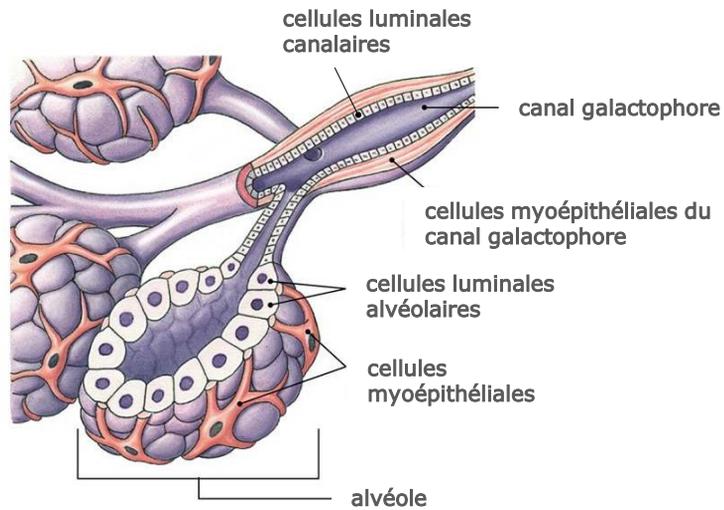


Figure 1 : Anatomie du sein et structure alvéolaire. A. La glande mammaire est composée d'alvéoles qui s'associent en lobules se regroupant eux-mêmes en lobes. L'ensemble est drainé par des canaux convergeant vers le mamelon. B. Les alvéoles contiennent une couche de cellules luminales alvéolaires et canales reposant sur une couche de cellules myoépithéliales (adapté de INCa et Associate Degree Nursing Physiology Review).

I. LE CANCER DU SEIN

1. *Structure de la glande mammaire*

Le sein est un organe bilatéral situé sur la paroi thoracique antérieure chez l'Homme. Il présente une protubérance centrale, le mamelon, entourée d'un disque cutané pigmenté, l'aréole. Il abrite des glandes exocrines, les glandes mammaires qui ont pour principale fonction de produire et sécréter du lait afin de nourrir le nouveau-né (Inman *et al.*, 2015). Les glandes mammaires se présentent sous la forme d'une grappe composée d'alvéoles (ou acini), unités de base sécrétrices de lait, drainés par des canaux alvéolaires. L'association de plusieurs alvéoles et de leurs canaux forme un lobule drainé par un canal lobulaire puis plusieurs lobules s'agencent en lobes (15 à 20 chez la femme) eux-mêmes drainés par des canaux galactophores convergeant séparément jusqu'au mamelon afin d'acheminer le lait vers l'extérieur (Figure 1A). Le sein se développe tout au long de la vie de la femme : depuis le stade embryonnaire, lors de la puberté où apparaissent les principaux changements puis à l'âge adulte et durant la grossesse où il atteint son stade de maturité maximal puis subit l'involution, jusqu'à la ménopause. Ces processus se déroulent sous l'influence de nombreux facteurs de croissance et d'hormones telles que les hormones sexuelles (œstrogène et progestérone).

La glande mammaire est organisée en deux compartiments : le compartiment mésenchymateux (ou stroma) entourant le compartiment épithélial. L'épithélium mammaire est constitué de deux types cellulaires formant une bicouche : une couche interne de cellules luminales et une couche externe de cellules myoépithéliales (cellules basales). Les cellules luminales peuvent être divisées en cellules luminales canalaire bordant la lumière des canaux et en cellules luminales alvéolaires bordant la lumière des alvéoles (Figure 1B). Ces dernières synthétisent et sécrètent le lait durant la période de lactation puis la contraction des cellules myoépithéliales permet l'éjection du lait (Javed and Lteif, 2013; Zhou *et al.*, 2019).

La membrane basale sépare l'épithélium mammaire du stroma sous-jacent. Le stroma est principalement constitué de tissu adipeux ainsi que de matrice extracellulaire (MEC), de cellules du système immunitaire, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de fibres nerveuses et de fibroblastes (Polyak and Kalluri, 2010; Javed and Lteif, 2013). Ces différents composants forment le microenvironnement de l'épithélium mammaire qui régule la fonction des cellules épithéliales mammaires notamment grâce à des interactions paracrines influençant *in fine* le développement et la fonction de la glande mammaire (Polyak and Kalluri, 2010; Javed and Lteif, 2013; Inman *et al.*, 2015).

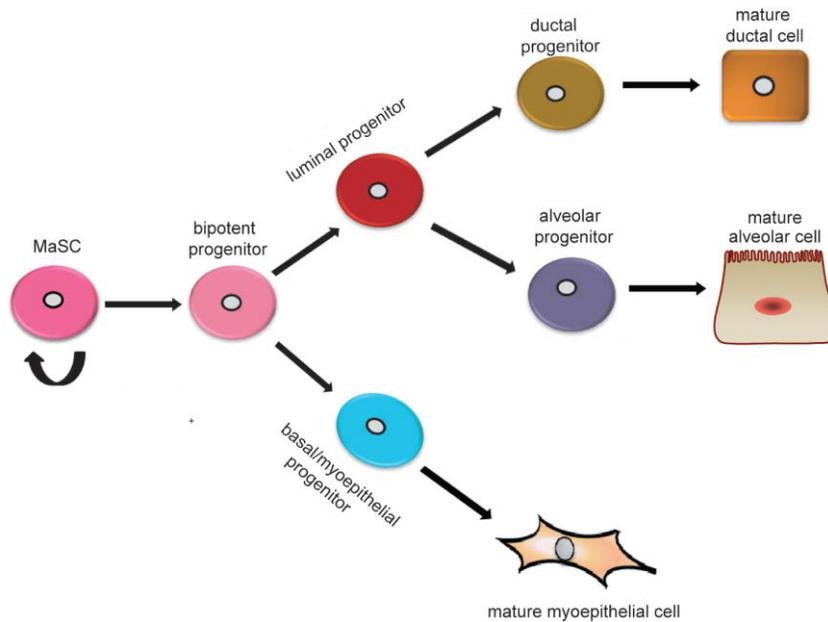


Figure 2 : Modèle hypothétique de la hiérarchie de l'épithélium mammaire. Les cellules souches mammaires peuvent subir une division symétrique, afin de maintenir leur pool, ou asymétrique au cours de laquelle elles donnent naissance à un progéniteur bipotent. Ce dernier donne naissance à un progéniteur luminal et à un progéniteur myoépithélial. Le progéniteur luminal se différencie en progéniteur canalaire ou alvéolaire qui se différencient ensuite respectivement en cellule canalaire et cellule alvéolaire. Le progéniteur myoépithélial se différencie directement en cellule myoépithéliale. MaSC, Mammary gland stem cells (d'après Yang *et al.*, 2017).

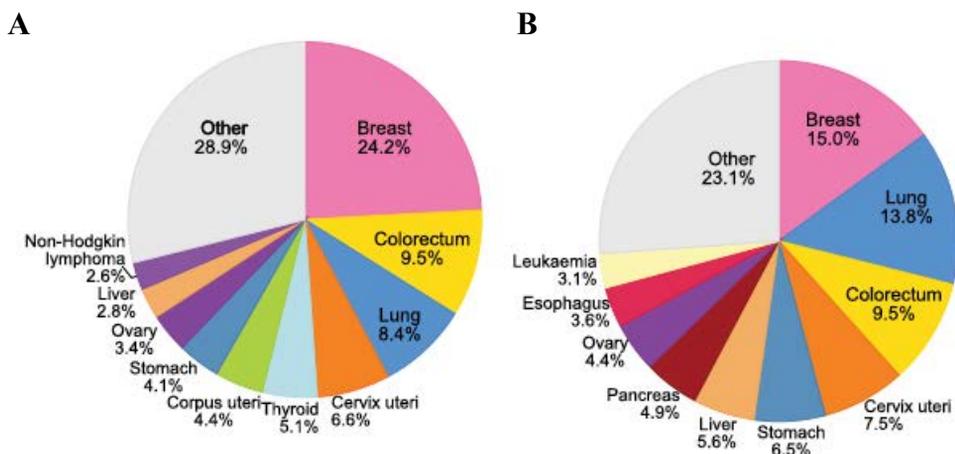


Figure 3 : Répartition des cancers les plus fréquents chez la femme dans le monde en 2018. Les diagrammes représentent la distribution (%) des nouveaux cas de cancer (A) et de décès (B) par type de cancer estimés chez la femme en 2018. L'aire de chaque secteur est proportionnelle au nombre de nouveaux cas et de décès estimés (d'après de Bray *et al.*, 2018).

L'épithélium mammaire est organisé de manière hiérarchique et sa description est nécessaire pour la compréhension de l'hétérogénéité tumorale et l'origine cellulaire des différents sous-types moléculaires du cancer du sein (Visvader, 2009; Visvader and Stingl, 2014).

Dans la glande mammaire, il existe une population de cellules nécessaires au bon développement de l'organe et au maintien de l'homéostasie du tissu, les cellules souches mammaires (CSMa). Ces cellules possèdent une capacité d'auto-renouveaulement et de différenciation à lignage multiple à l'origine de toutes les lignées composant l'épithélium mammaire (Liu *et al.*, 2005; Visvader, 2009). Les CSMa sont dites multipotentes : une seule cellule souche épithéliale mammaire est capable de reconstituer un arbre mammaire entier (Shackleton *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2006). Elles sont localisées dans un microenvironnement spécifique appelé « niche » qui joue un rôle crucial dans leur maintien, leur fonction et leur différenciation (Yang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019). Les CSMa subissent soit une division symétrique au cours de laquelle une cellule souche donne deux cellules filles identiques à la cellule souche mère permettant l'expansion de la population de cellules souches, soit une division asymétrique donnant une cellule fille identique à la cellule souche mère (assurant le maintien du pool) et une cellule progénitrice (ou progéniteur) hautement proliférative (Figure 2). Ces progéniteurs sont engagés dans une voie de différenciation : soit vers le lignage luminal produisant à terme les cellules luminales canalaire et alvéolaires soit vers le lignage myoépithélial (Liu *et al.*, 2005).

2. Épidémiologie et facteurs de risque

2.1 Données épidémiologiques

Tous sexes confondus, le cancer du sein est le deuxième cancer le plus couramment diagnostiqué dans le monde en 2018 juste après le cancer du poumon. Avec 2,1 millions de nouveaux cas estimés chez la femme, il représente 24,2% des nouveaux cas de cancers (Figure 3A). Il est ainsi le cancer le plus fréquent loin devant le cancer du côlon-rectum et du poumon chez la femme. Il représente également la première cause de décès par cancer chez la femme avec 626 679 décès estimés en 2018 à travers le monde (Figure 3B) (Bray *et al.*, 2018). Son taux d'incidence est plus élevé dans les pays développés (Amérique du Nord, Europe, Australie) alors que la mortalité touche davantage les pays moins développés.

En France métropolitaine, d'après le rapport de l'INCa (Institut National du Cancer), le cancer du sein représente 31,8% de l'ensemble des cancers féminins soit 58 968 nouveaux cas estimés en 2017. Avec 11 833 décès estimés, il cause le plus grand nombre de décès par cancer chez la

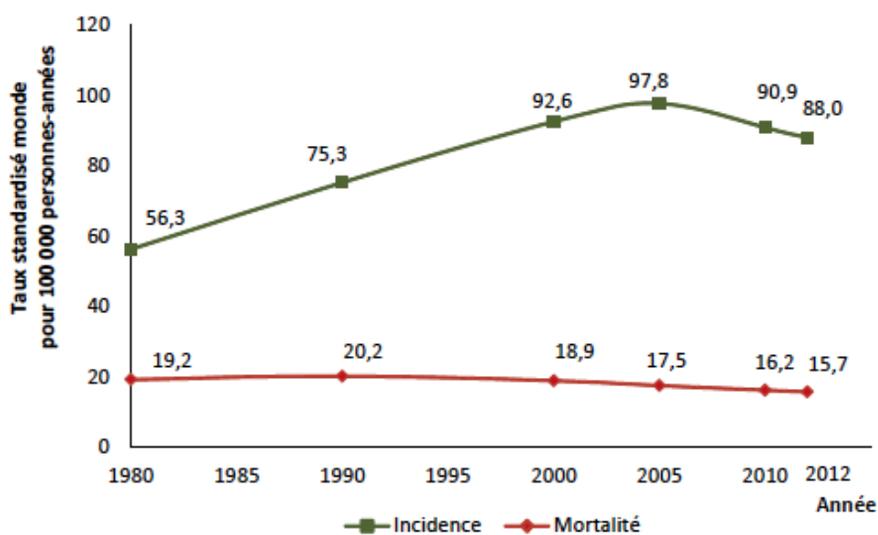


Figure 4 : Evolution des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein chez la femme en France de 1980 à 2012. L'incidence du cancer du sein a augmenté jusqu'en 2005 puis a diminué jusqu'en 2012 (courbe verte). La mortalité est restée stable puis tend à baisser depuis 2005 (courbe rouge) (d'après INCa, 2017).

femme (INCa, 2017). Néanmoins, le cancer du sein reste un cancer de bon pronostic avec 85 et 76% de survie nette après 5 ans et 10 ans respectivement pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 2010 (Cowppli-Bony *et al.*, 2016; INCa, 2017).

L'incidence du cancer du sein a nettement augmenté entre 1980 et 2000 (Figure 4). Cependant une diminution du taux d'incidence standardisé de 1,5% par an est observée entre les années 2005 et 2012. Cette baisse concerne principalement les femmes de 50 à 69 ans et peut être attribuée à la baisse de l'utilisation des traitements hormonaux lors de la ménopause (Bray *et al.*, 2018). Quant à la mortalité, elle reste assez stable depuis 1980 avec une diminution de 1,5% par an du taux standardisé entre 2005 et 2012 (Figure 4). Le diagnostic plus précoce de ces cancers grâce au développement des dépistages organisés et individuels ainsi que l'amélioration de la prise en charge thérapeutique contribuent à la baisse de mortalité (Binder-Foucard *et al.*, 2013, Cowppli-Bony *et al.*, 2016).

2.2 Facteurs de risques

Le cancer du sein est une pathologie multifactorielle qui présente des facteurs de risques internes et externes.

Le principal facteur de risque interne est le sexe de l'individu. En effet, le cancer du sein chez l'homme est rare. Il représente moins de 1% de tous les cancers du sein. L'âge est également important, puisque près de 80% des cancers du sein sont diagnostiqués chez les femmes de plus de 50 ans (INCa, 2017). En plus du sexe et de l'âge, les antécédents individuels et familiaux sont également des facteurs de risque internes déterminants. Une femme ayant eu un cancer du sein présente un risque 3 à 4 fois plus élevé de développer une nouvelle tumeur dans l'autre sein par rapport à une femme sans antécédent. De plus, certaines lésions mammaires prolifératives comme l'hyperplasie atypique sont associées à une augmentation du risque de cancer du sein. Les femmes ayant été traitées par radiothérapie au niveau du thorax présentent un risque plus élevé de développer un cancer du sein de manière dépendante de l'âge et de la dose totale reçue. Au-delà des antécédents individuels, 20 à 30% des cancers mammaires surviennent chez des femmes ayant des antécédents de cancer au sein dans leur famille. Des études montrent que le risque de contracter un cancer du sein est presque deux fois plus élevé lorsqu'une parente de premier degré (mère, sœur ou fille) a développé ce type de maladie, notamment si celui-ci est diagnostiqué avant la ménopause. Il peut s'agir d'une mutation génétique transmise d'une génération à l'autre, on parle alors de cancer héréditaire. Cependant, ces cancers liés à une prédisposition génétique ne représentent que 5 à 10% des cancers du sein. Certains gènes de prédisposition au cancer du sein ont été mis en évidence, les plus courants

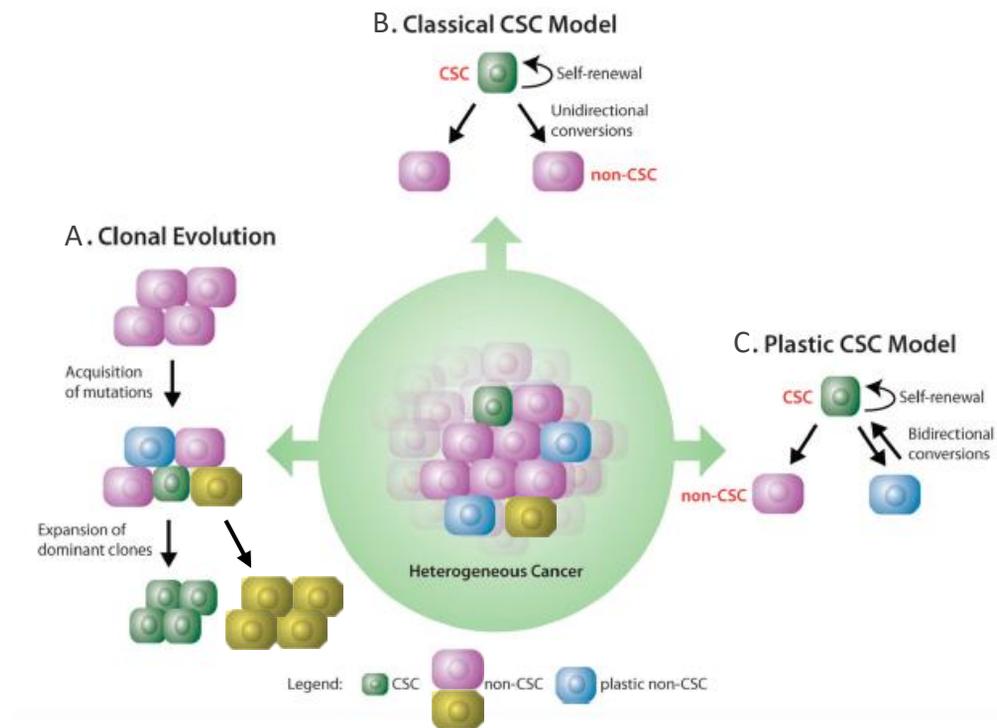


Figure 5 : L'hétérogénéité cellulaire intratumorale : 3 modèles. Afin d'expliquer l'hétérogénéité intratumorale, trois modèles ont été proposés. Le premier correspond au modèle d'évolution clonale (A) selon lequel chaque cellule de l'épithélium mammaire peut subir une mutation oncogénique à l'origine d'un clone tumoral. Les clones tumoraux évoluent différemment en fonction des altérations génétiques ou épigénétiques qu'ils accumulent. Le modèle de cellules souches cancéreuses (CSC) (B) propose que l'hétérogénéité provient de la capacité des CSC, situées au sommet de la hiérarchie, à donner des cellules cancéreuses à différents stades souche et de différenciation. Le modèle plastique des CSC (C) est un modèle évolutif dans lequel les cellules cancéreuses peuvent être converties en CSC ce qui implique que les cellules cancéreuses peuvent constamment renouveler le pool de CSC (adapté de Marjanovic *et al.*, 2013).

étant les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (BReast Cancer 1 et 2) codant des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Une mutation au niveau de ces deux gènes n'entraîne pas obligatoirement le développement d'un cancer du sein, néanmoins on estime qu'une femme porteuse d'une mutation au niveau du gène *BRCA1* ou *BRCA2* a 55 à 65% et 45%, respectivement, de risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie. Bien que moins fréquentes, des mutations au niveau des gènes *ATM*, *TP53*, *CHEK2* ou encore *PTEN* peuvent également conduire à un cancer du sein (INCa; Feng *et al.*, 2018).

Un autre paramètre pouvant également influencer le développement du cancer du sein est l'histoire hormonale d'une femme, c'est-à-dire l'exposition à des taux d'œstrogènes et de progestérone tout au long de sa vie. Il peut s'agir d'hormones endogènes pour lesquelles une longue exposition (pouvant être liée à l'apparition des premières menstruations avant l'âge de 12 ans ou à une ménopause tardive survenant après 55 ans) entraîne une légère augmentation du risque de cancer du sein. Il peut aussi s'agir d'hormones exogènes liées à l'utilisation de contraceptifs oraux (et théoriquement les implants contraceptifs) ou de l'hormonothérapie substitutive qui sont associées à un risque augmenté de cancer du sein ; toutefois ce risque semble être réversible une fois le traitement arrêté (Feng *et al.*, 2018).

D'autres facteurs peuvent être associés à l'apparition de tumeurs mammaires comme la consommation d'alcool, le tabagisme, une alimentation déséquilibrée, une surcharge pondérale (notamment après la ménopause) ou le manque d'activité physique (INCa, 2017). Certains produits chimiques, comme le bisphénol A, en se comportant comme des perturbateurs endocriniens sont suspectés d'avoir un rôle dans le développement des cancers du sein (Briskin, 2008).

3. Hétérogénéité cellulaire intratumorale

Les tumeurs mammaires comprennent des populations cellulaires hétérogènes. Pour expliquer cette hétérogénéité intratumorale, deux premiers modèles ont été proposés : le modèle stochastique ou d'évolution clonale et le modèle hiérarchique ou de cellules souches cancéreuses (CSC) (Figure 5).

Selon le modèle d'évolution clonale, une cellule de l'épithélium sain appelée cellule d'origine subit une première mutation oncogénique générant une tumeur bénigne (Figure 5A). La transformation et la progression tumorale résultent de l'acquisition de mutations séquentielles à la base de plusieurs clones tumoraux génétiquement et phénotypiquement différents (Clevers, 2011; Marjanovic *et al.*, 2013). L'accumulation d'altérations génétiques ou de modifications

Cellules souches cancéreuses	Caractéristiques	Implication dans la carcinogénèse
	Auto-renouvellement	Capacité d'initier une tumeur (tumorigénicité) Prolifération anarchique
	Capacité à se différencier	Hétérogénéité intratumorale
	Expression de l'activité télomérase Prolifération lente Dormance et durée de vie longue Forte capacité de réparation de l'ADN	Risque d'accumuler des mutations Résistance aux traitements
	Activation des voies de signalisation anti-apoptotiques	Résistance aux traitements
	Capacité de survie sans adhérer à un substrat Capacité de migration	Invasion et métastases
	Résistance à l'hypoxie	Chimiorésistance Radiorésistance Récidive du cancer
	Augmentation de l'activité de transport membranaire	Chimiorésistance
	Activation des voies de signalisation anti-oxydantes Forte activité du système de piégeage des ERO	Radiorésistance Chimiorésistance

Tableau 1: Caractéristiques des CSC et leur implication dans la carcinogénèse (d'après Dontu, 2003, Wicha *et al.*, 2006, Ginestier *et al.*, 2007 et Lee and Hall, 2016).

épigénétiques par certains clones leur donnent un avantage sur les autres clones dans la capacité de propagation des tumeurs ; ceci permet la sélection et l'expansion des clones les plus agressifs de façon indépendante, ce qui est à l'origine de l'hétérogénéité cellulaire (Clevers, 2011; Marjanovic *et al.*, 2013; Shackleton, 2010).

Le modèle de CSC implique une organisation hiérarchique des cellules au sein de la tumeur avec à l'apex de cette hiérarchie, les CSC (Figure 5B). Ces CSC partagent avec les cellules souches normales la capacité d'auto-renouvellement, régulée par les voies de signalisation Wnt, Notch et Hedgehog, et de différenciation (Dittmer, 2018). Cette petite population de CSC tumorigène (capacité de formation d'une tumeur) serait responsable de l'initiation et de la progression tumorale (Papaccio *et al.*, 2017). Par division symétrique, elles donnent naissance à d'autres CSC tumorigènes et grâce à la division asymétrique elles génèrent des cellules différenciées, non tumorigènes et phénotypiquement différentes, les cellules cancéreuses. Ces cellules cancéreuses formant la majorité de la masse tumorale auraient perdu leur pouvoir tumorigène et contribueraient peu à la progression tumorale (Shackleton *et al.*, 2009; Shackleton, 2010). Les CSC produisent donc plusieurs types de cellules cancéreuses à différents états souche et de différenciation, contribuant à l'hétérogénéité intratumorale (Charafe-Jauffret *et al.*, 2008; Marjanovic *et al.*, 2013; Carnero and Leonart, 2016). Les CSC ont été identifiées dans des tumeurs solides pour la première fois en 2003. Al-Hajj et son équipe ont pu identifier et isoler une population de CSC, caractérisée par l'expression des marqueurs de surface CD44 et ESA (epithelial-specific antigen) et l'absence d'expression du marqueur de surface CD24 (CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺) à partir de tumeurs mammaires. Un faible nombre de cellules CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺ est capable de reformer une tumeur après une transplantation chez des souris immunodéprimées. Les tumeurs ainsi générées présentent la même hétérogénéité phénotypique que dans la tumeur initiale d'où proviennent les CSC, démontrant leur caractère tumorigène (Al-Hajj *et al.*, 2003). Les propriétés des CSC et leur implication dans la carcinogénèse sont résumées dans le tableau 1.

Toutefois, ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs puisque les CSC peuvent subir l'évolution clonale. Les CSC peuvent être la cible de mutations génétiques générant de nouvelles CSC et leurs progéniteurs différenciés renforçant l'hétérogénéité cellulaire intratumorale (Brooks *et al.*, 2015). De plus au sein d'une tumeur, plusieurs populations de CSC phénotypiquement distinctes pourraient coexister. Certains travaux indiquent qu'il peut exister une population de CSC participant à la formation et à la progression tumorale ainsi qu'une population de CSC capable de dissémination pour former des métastases. Ces cellules

subissent la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) à la suite d'altérations génétiques ou épigénétiques régulées par le microenvironnement tumoral (Brabletz *et al.*, 2005; Dieter *et al.*, 2011; Brooks *et al.*, 2015). Ainsi, Charafe-Jauffret et son équipe ont montré que des CSC mammaires exprimant l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1⁺) injectées à des souris immunodéprimées induisent la formation de métastases (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009). De plus, pour la première fois en 2006, une équipe a mis en évidence la présence de CSC CD44⁺/CD24⁻ dans la moelle osseuse de patientes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce (Balic *et al.*, 2006). Malgré la capacité d'invasion des CSC mammaires CD44⁺/CD24⁻, ce phénotype ne serait pas suffisant pour résider et proliférer au niveau des sites métastatiques (Sheridan *et al.*, 2006).

Plusieurs origines des CSC ont été proposées. Elles proviendraient probablement de la transformation de cellules souches normales due à la dérégulation des voies de signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement ou de progéniteurs précoces acquérant la capacité d'auto-renouvellement, suite à des altérations génétiques ou épigénétiques (Dontu, 2003; Liu *et al.*, 2005; Wicha *et al.*, 2006; Papaccio *et al.*, 2017). Par ailleurs, les cellules cancéreuses présenteraient un fort degré de plasticité cellulaire leur permettant de réacquérir un phénotype de CSC par dédifférenciation ou reprogrammation (Marjanovic *et al.*, 2013; Carnero and Lleona, 2016). Ce phénomène est à l'origine de l'établissement d'un troisième modèle d'hétérogénéité intra tumorale, le modèle de plasticité des CSC ou modèle plastique des CSC (Figure 5C). En plus des composantes intrinsèques (altérations génétiques et épigénétiques), des composantes extrinsèques aux cellules, comme certains facteurs du microenvironnement tumoral, peuvent contribuer à ce switch et bien au-delà interviennent dans l'hétérogénéité intratumorale et jouent un rôle déterminant dans la progression tumorale (Marjanovic *et al.*, 2013). Aussi, une étude a montré que des cellules épithéliales mammaires humaines transformées ou non peuvent se dédifférencier spontanément en cellules souches *in vitro* et *in vivo* sans manipulation génétique (Chaffer *et al.*, 2011). Par ailleurs, des cellules cancéreuses subissant la TEM acquièrent des propriétés caractéristiques de CSC avec un phénotype CD44⁺/CD24⁻ qui leur permet de s'adapter à l'environnement du site métastatique (Mani *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2008). Ainsi, selon le contexte (microenvironnement ou mutation), les CSC sont à l'origine de métastases possédant un phénotype différent ou non de la tumeur primaire contenant des cellules plus ou moins différenciées (Marjanovic *et al.*, 2013).

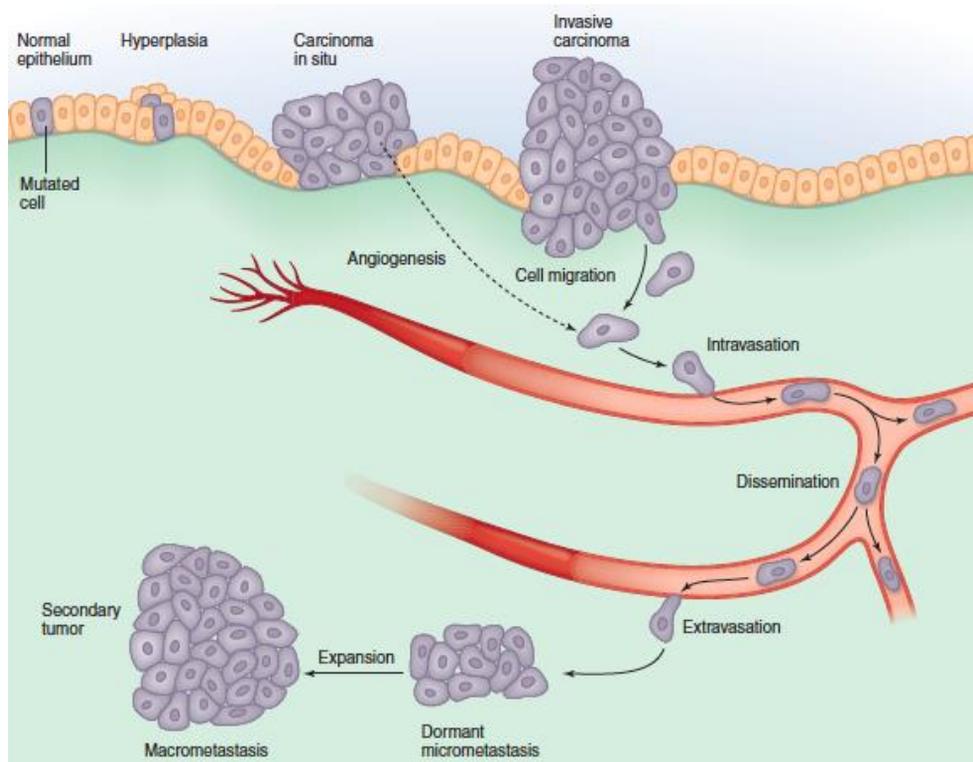


Figure 6 : Les étapes du développement tumoral. La carcinogénèse mammaire comprend les étapes d’initiation, de promotion et de progression. L’initiation se définit par l’apparition d’altérations génétiques ou épigénétiques au sein d’une cellule. La cellule se multiplie pour former un carcinome in situ, c’est l’étape de promotion. Lors de la progression tumorale, les cellules acquièrent des propriétés invasives et migratrices leur permettant de pénétrer dans le tissu conjonctif péri-tumoral et de migrer au niveau d’organes distants, après passage dans la circulation sanguine, afin de former des métastases (D’après Sever and Brugge, 2015).

Cette plasticité cellulaire suggère que le pool de CSC peut s'étendre et être continuellement renouvelé. Elle est donc impliquée de façon majeure dans la progression tumorale, le développement de métastases et la récurrence (Marjanovic *et al.*, 2013).

4. La carcinogenèse mammaire

Le cancer provient d'altérations génétiques et épigénétiques permettant aux cellules d'échapper aux mécanismes contrôlant la prolifération, la survie et la migration. De manière générale, la carcinogenèse est un processus divisé en 3 étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 6).

L'étape d'initiation se caractérise par l'apparition de mutations génétiques ou de modifications épigénétiques au sein de cellules de la glande mammaire. Ces mutations dites somatiques peuvent toucher de nombreux gènes. A partir de l'analyse du génome de tumeurs mammaires, 93 gènes ont été identifiés comme pouvant porter des mutations « driver » (Nik-Zainal *et al.*, 2016). Ce type de mutation confère aux cellules initiées un avantage en terme de survie et de croissance et il est à l'origine de la croissance tumorale (Stratton *et al.*, 2009; Witsch *et al.*, 2010; Sever and Brugge, 2015). Beaucoup de ces altérations génétiques provoquent une dérégulation des voies de signalisation impliquées notamment dans la prolifération, la survie, la différenciation et la mort cellulaire (Feng *et al.*, 2018; Sever and Brugge, 2015). En effet, elles peuvent soit activer des proto-oncogènes (gain de fonction) comme *ERBB2*, *MYC* ou *PIK3CA* stimulant la croissance et la prolifération cellulaire, soit inactiver des gènes suppresseurs de tumeur (perte de fonction) tels que *PTEN* ou *TP53* qui assurent normalement une prolifération et une survie cellulaire contrôlée (Sever and Brugge, 2015; Nik-Zainal *et al.*, 2016).

Au sein des cellules germinales, certains gènes peuvent être la cible d'altérations génétiques prédisposant à un cancer du sein. Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont parmi ceux les plus mutés et représentent la cause la plus fréquente des cancers mammaires dits héréditaires (Feng *et al.*, 2018).

Une fois initiées, les cellules se multiplient localement pour former un carcinome *in situ*, c'est l'étape de promotion. La prolifération des cellules cancéreuses mammaires est stimulée par l'accumulation d'altérations génétiques ce qui engendre l'activation constitutive de voies de signalisation telles que les voies PI3K/AKT et Ras/MAPK impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (Sever and Brugge, 2015). La prolifération est également régulée par des facteurs de croissance comme l'EGF (epidermal growth factor) et l'IGF (insulin-like growth

factor) sécrétés de façon paracrine ou autocrine. Pour maintenir une prolifération chronique, les cellules cancéreuses peuvent sécréter du TGF β (transforming growth factor β) et du PDGF (platelet-derived growth factor) qui vont activer les fibroblastes associés au cancer (CAF) situés dans le microenvironnement tumoral, fibroblastes qui en retour sécrètent notamment de l'EGF et de l'IGF (voie paracrine) (Sever and Brugge, 2015). Elles peuvent aussi sécréter elles-mêmes ces facteurs de croissance auxquels elles sont sensibles (voie autocrine) (Witsch *et al.*, 2010; Hanahan and Weinberg, 2011). Les facteurs de croissance se fixent sur leur récepteur membranaire respectif EGFR (epidermal growth factor receptor) et IGFR (insulin-like growth factor receptor) activant les voies de signalisation PI3K/AKT et Ras/MAPK (Witsch *et al.*, 2010). La voie PI3K/AKT activée constitutivement, par des facteurs de croissance ou par l'amplification de HER2, régule de façon négative l'apoptose permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à ce processus (Ghayad and Cohen, 2010).

La progression tumorale se caractérise par une invasion locale suivie d'une dissémination des cellules cancéreuses dans d'autres tissus distants de la tumeur primaire pour former des tumeurs secondaires, les métastases. Ce processus comprend plusieurs étapes. Tout d'abord l'invasion locale grâce à la dégradation de la membrane basale par les cellules cancéreuses qui pénètrent alors dans le tissu conjonctif péri-tumoral. L'invasion nécessite que les cellules acquièrent des capacités invasives et migratrices, cette reprogrammation correspond à la TEM. La TEM consiste en une transdifférenciation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses au cours de laquelle les cellules épithéliales subissent une perte de la polarité apico-basale, d'adhésion cellulaire (notamment par perte d'expression de la cadhérine E et gain de la cadhérine N) et un réarrangement du cytosquelette leur permettant de s'individualiser et d'acquérir des capacités de motilité et d'invasion caractéristiques des cellules mésenchymateuses (Witsch *et al.*, 2010; Hanahan and Weinberg, 2011; Moyret-Lalle *et al.*, 2016). De plus, ces cellules sécrètent des métalloprotéases matricielles (MMP) permettant de cliver les constituants de la MEC. Certains facteurs de croissance tels que TGF β , PDGF ou FGF (fibroblast growth factor) contrôlent le processus d'invasion (Witsch *et al.*, 2010; Moyret-Lalle *et al.*, 2016). S'ensuit la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme, caractérisée premièrement par une étape d'intravasation lors de laquelle les cellules tumorales traversent la paroi des vaisseaux sanguins et lymphatiques afin de pénétrer dans la circulation puis par l'extravasation qui correspond à la sortie des cellules tumorales de la circulation. Cela permet aux cellules tumorales de coloniser un organe cible distant et de former des métastases (Sever and Brugge, 2015; Moyret-Lalle *et al.*, 2016). Les cancers du sein présentent des sites de

dissémination spécifiques et forment préférentiellement des métastases au niveau des os, des poumons, du foie et du cerveau (Feng *et al.*, 2018). La dissémination des cellules tumorales par le biais de la circulation sanguine est rendue possible grâce au phénomène d'angiogenèse défini par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Cette vascularisation tumorale permet aux cellules de la tumeur, de maintenir un apport en nutriments et en oxygène ainsi que de conserver la capacité d'évacuer le CO₂ et les déchets métaboliques (Hanahan and Weinberg, 2011). L'angiogenèse est notamment régulée par le facteur de transcription HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) et le facteur pro-angiogénique VEGF (vascular endothelial growth factor) (Moyret-Lalle *et al.*, 2016). Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la progression tumorale puisque les cellules composant ce microenvironnement comme les CAF et les macrophages associés à la tumeur (TAM) sécrètent des facteurs de croissance et cytokines nécessaires au processus d'invasion, d'angiogenèse et d'intravasation (Moyret-Lalle *et al.*, 2016). De surcroît, les cellules cancéreuses sont caractérisées par la faculté à promouvoir l'inflammation et la capacité à échapper à la destruction par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011).

5. Classification des tumeurs mammaires

Le cancer du sein est une pathologie complexe et hétérogène aux niveaux clinique, morphologique et moléculaire. Il est donc nécessaire de classer les cancers du sein afin de caractériser au mieux chaque tumeur et proposer aux patientes la thérapie la plus adaptée. Il existe plusieurs classifications.

5.1 Classification histologique

La plupart des cancers du sein se développent à partir de cellules épithéliales de la glande mammaire, ce sont des adénocarcinomes (95% des tumeurs mammaires). Les adénocarcinomes naissent plus fréquemment à partir des cellules des canaux (adénocarcinomes canaux) et plus rarement à partir des cellules des lobules (adénocarcinomes lobulaires) (INCa). La classification histologique des tumeurs mammaires est basée sur la situation d'origine des cellules et l'invasivité des tumeurs, permettant de distinguer trois groupes : les carcinomes non invasifs ou *in situ*, les carcinomes invasifs ou infiltrants et les cancers du sein métastatiques.

Les carcinomes non invasifs correspondent à une prolifération localisée des cellules cancéreuses à l'intérieur des canaux ou des lobules sans franchissement de la membrane basale ni infiltration du tissu avoisinant. Les carcinomes canaux *in situ* sont les plus fréquents,

représentant environ 90% des carcinomes *in situ*. Ce type de tumeur est de bon pronostic, toutefois, sans prise en charge thérapeutique, il peut évoluer vers une forme invasive.

Les carcinomes invasifs sont caractérisés par le franchissement de la membrane basale et la diffusion des cellules cancéreuses dans le tissu environnant. Par la suite, elles peuvent se propager vers les ganglions lymphatiques, le plus souvent vers les ganglions axillaires, et d'autres organes du corps pour former des métastases. Le carcinome canalaire infiltrant est le plus fréquent des cancers du sein, il représente 80% de l'ensemble des tumeurs mammaires (INCa; Feng *et al.*, 2018).

Les cancers du sein métastatiques représentent le stade de cancer du sein le plus avancé où les cellules cancéreuses ont envahi d'autres organes distants de la tumeur primaire. Environ 30% des cancers mammaires diagnostiqués chez des femmes à un stade précoce évoluent vers une forme métastatique (Feng *et al.*, 2018).

5.2 Classification anatomopathologique

Les examens de diagnostic ont pour objectif de déterminer l'étendue de la maladie et son agressivité, le pronostic et la stratégie thérapeutique à mettre en place. Pour cela, d'autres classifications sont utilisées.

La classification TNM (Tumor Nodes Metastasis) de l'Union internationale contre le cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) permet de définir l'étendue de la maladie de par l'évaluation de trois critères : la taille et l'infiltration de la tumeur (T), l'extension ganglionnaire ou non (N) et la présence ou non de métastases (M). Pour chaque critère, une valeur est attribuée en fonction de la gravité et la combinaison des valeurs permet d'obtenir un stade global allant de 0 pour les lésions précancéreuses ou cancer *in situ* à IV pour les cancers du sein les plus avancés.

Le grade histopronostique de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) ou de Elston et Ellis permet d'apprécier le degré d'agressivité des tumeurs reposant sur trois paramètres morphologiques : l'architecture des cellules cancéreuses, la forme du noyau et le nombre de cellules en division. A partir de ces paramètres les tumeurs mammaires sont classées selon trois grades : le grade I correspondant aux tumeurs les moins agressives, le grade III correspondant aux tumeurs les plus agressives, le grade II étant un grade intermédiaire (INCa).

Bien que nécessaires, ces classifications ne permettent pas de prédire l'évolution du cancer du sein. Les caractéristiques moléculaires des tumeurs mammaires sont à prendre en compte afin

d'approfondir la classification et proposer une thérapie optimale ciblant de façon spécifique les tumeurs des patientes.

5.3 Classification moléculaire

L'émergence des techniques d'analyse génomique et transcriptomique a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité moléculaire des cancers du sein et d'établir une classification moléculaire des tumeurs mammaires en fonction de leur profil d'expression génique. Pour la première fois en 2000, à partir de l'étude de l'expression de 8102 gènes chez 42 patientes, Perou et Sorlie proposent une classification moléculaire des tumeurs mammaires (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001). Quelques années plus tard, cette première étude est complétée et les cancers du sein sont divisés en 5 sous-types moléculaires (Sørli *et al.*, 2003). Aujourd'hui, la classification s'est légèrement affinée pour aboutir à l'identification de 6 sous-types moléculaires de cancer du sein : luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like, claudin-low et normal breast-like (Herschkowitz *et al.*, 2007; Prat *et al.*, 2010). Cette classification repose principalement sur l'expression de trois récepteurs : le récepteur des œstrogènes (ER), de la progestérone (PR) et le récepteur HER2.

Les tumeurs appartenant au sous-type luminal A exprimant les récepteurs ER, PR mais pas le récepteur HER2 représentent environ 40% de l'ensemble des tumeurs mammaires. Elles expriment faiblement le marqueur nucléaire de prolifération Ki-67. Ce sont des tumeurs de bas grade caractérisées par une évolution lente et qui présentent le meilleur pronostic (Tang *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2018; Fragomeni *et al.*, 2018).

Le sous type luminal B compte pour 20% des cancers du sein et comprend à la fois des tumeurs exprimant HER2 et des tumeurs ne l'exprimant pas. Comparé au sous-type luminal A, ce type de tumeurs présente un niveau important de Ki-67, évolue plus rapidement avec un pronostic moins favorable.

Les tumeurs dites HER2-enriched sont caractérisées par une forte expression du gène *HER2* et correspondent à environ 15% des cas de cancers du sein. Elles expriment également fortement certains gènes de prolifération leur permettant d'évoluer rapidement et sont des tumeurs agressives de mauvais pronostic.

Les tumeurs mammaires des sous-types basal-like et claudin-low n'expriment ni les récepteurs des œstrogènes et de la progestérone ni le récepteur HER2 ; elles sont ainsi qualifiées de tumeurs triple-négatives. Ces tumeurs diagnostiquées dans 15 à 20% des cas sont les plus agressives avec un fort potentiel métastatique présentant ainsi un pronostic défavorable. Des

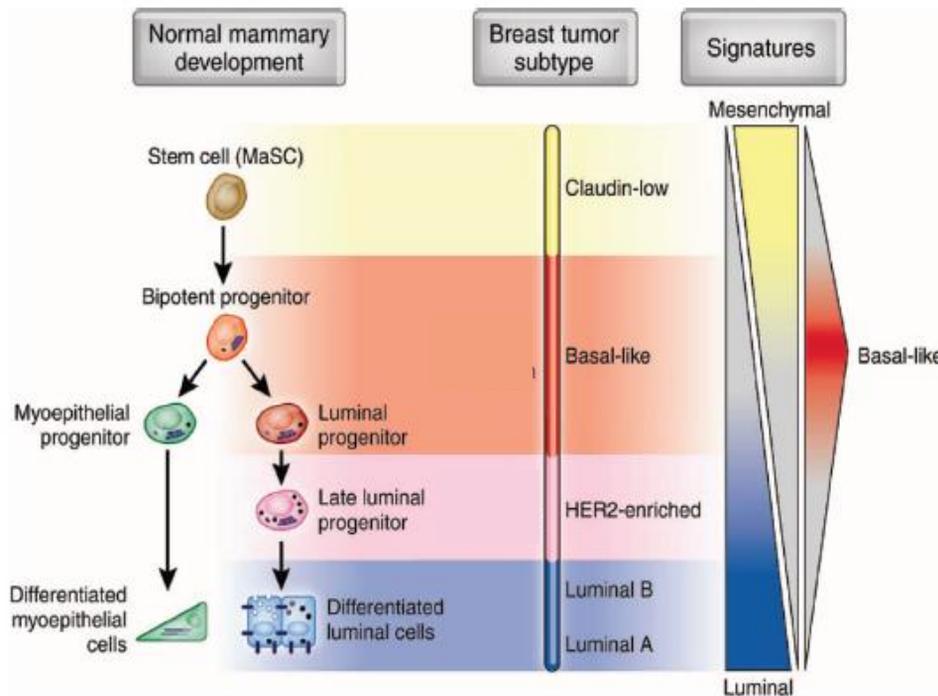


Figure 7 : Sous-types des tumeurs mammaires et leur potentielle origine cellulaire. Les tumeurs mammaires ont été classées selon leur profil d'expression de trois récepteurs: le récepteur des œstrogènes (ER), de la progestérone (PR) et le récepteur HER2. Ces différents sous-types de tumeurs mammaires expriment des marqueurs moléculaires (luminaux, mésenchymateux ou basaux) similaires à certains types cellulaires de la glande mammaire permettant d'établir un lien avec les cellules à l'origine des tumeurs mammaires (adapté de Perou *et al.*, 2010).

mutations au niveau des gènes *BRCA1/2* sont retrouvées chez environ 10% des patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif (Bianchini *et al.*, 2016; Garrido-Castro *et al.*, 2019). Bien que la plupart des tumeurs des sous-types basal-like et claudin-low soient triple-négatives, il n'existe pas de parfaite concordance entre les tumeurs triple-négatives et les tumeurs basal-like et claudin-low. Au-delà de cette définition immunohistochimique, les cancers du sein triple-négatifs forment une catégorie hétérogène de tumeurs tant au niveau morphologique, génétique que clinique (Eroles *et al.*, 2012; Garrido-Castro *et al.*, 2019).

Plus rare, le sous type normal breast-like est moins bien caractérisé et exprimerait des gènes caractéristiques du tissu adipeux. Il présenterait un pronostic intermédiaire. Cependant la réelle existence de ce sous-type est remise en cause puisqu'il pourrait s'agir d'un artefact provenant d'une contamination par du tissu mammaire sain (Eroles *et al.*, 2012).

Les différents sous-types de tumeurs mammaires présentent des similitudes au niveau de leur profil d'expression génique avec certains types cellulaires de la glande mammaire. Ces similitudes ont permis d'établir un lien avec les cellules à l'origine des cancers du sein (Figure 7). Les tumeurs luminal A et B expriment les cytokératines CK8 et CK18, marqueurs de cellules luminales différenciées de l'épithélium mammaire sain (Eroles *et al.*, 2012; Polyak, 2007). Au contraire, les tumeurs basal-like expriment des marqueurs de cellules basales comme les cytokératines CK5 et CK6. CK5 est également un marqueur des progéniteurs (Visvader, 2009). Les tumeurs HER2-enriched n'expriment pas de marqueurs liés au groupe basal-like et exprimeraient faiblement les marqueurs de cellules luminales (Eroles *et al.*, 2012). En ce qui concerne les tumeurs claudin-low, elles expriment faiblement les gènes impliqués dans les jonctions serrées et les adhésions intercellulaires comme les claudines 3,4 et 7 ainsi que la cadhérine E (Herschkowitz *et al.*, 2007). Elles expriment fortement certains marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la cadhérine N (Herschkowitz *et al.*, 2007; Visvader, 2009; Prat and Perou, 2011). De plus ces tumeurs présentent une faible expression de CD24 et une forte expression de CD44, caractéristiques d'un phénotype de cellules souches (Prat and Perou, 2011).

Dans chaque sous-type de tumeurs mammaires seraient retrouvées des cellules exprimant des marqueurs de CSC en proportion variable. Le sous-type claudin-low en présente une forte proportion alors que le sous-type luminal A possède la plus faible proportion (Brooks *et al.*, 2015).

6. *Stratégies thérapeutiques*

Plusieurs traitements sont disponibles pour traiter un cancer du sein et le choix de leur utilisation dépend de certains critères : le type de tumeur, son stade, son grade, sa classification moléculaire et la patiente (état de santé, âge et antécédents). Selon la stratégie thérapeutique choisie, les traitements peuvent être utilisés seuls ou en association afin de renforcer leur efficacité.

6.1 Traitements locorégionaux

❖ La chirurgie

Deux types de chirurgie peuvent être réalisés : la chirurgie conservatrice ou tumorectomie et la chirurgie non conservatrice ou mastectomie. La tumorectomie a pour objectif de retirer la tumeur, lorsque celle-ci est suffisamment petite, ainsi qu'une partie du tissu environnant. Dans certains cas, la mastectomie est privilégiée et consiste à enlever la totalité du sein y compris l'aréole et le mamelon. Parfois il est nécessaire d'ôter un ou plusieurs ganglions lymphatiques axillaires, notamment dans le cas d'une tumeur infiltrante. La chirurgie peut s'accompagner d'une chimiothérapie, d'une radiothérapie ou d'une hormonothérapie soit avant l'opération (traitement néoadjuvant) dans le but de réduire la taille de la tumeur et faciliter l'intervention soit après l'opération (traitement adjuvant) afin de diminuer le risque de récurrence (INCa).

❖ La radiothérapie

La radiothérapie est basée sur l'utilisation de rayonnements ionisants induisant une altération de l'ADN afin de détruire les cellules cancéreuses. Les rayonnements sont dirigés de façon précise sur la zone à traiter de manière à préserver au maximum les tissus sains avoisinants. La radiothérapie adjuvante, appliquée dans le cas de carcinomes *in situ* et infiltrants, permet de détruire les cellules cancéreuses persistantes après chirurgie et diminuer les risques de récurrence. Pour certains cancers du sein métastatiques, la radiothérapie peut être appliquée notamment pour traiter des métastases osseuses ou cérébrales (INCa).

6.2 Traitement systémique : la chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de composés chimiques qui agissent sur les mécanismes de division cellulaire. Ce traitement est dit systémique puisqu'il permet d'altérer les cellules cancéreuses localisées dans l'ensemble du corps. Il existe différents types d'agents de chimiothérapie possédant des mécanismes d'action distincts.

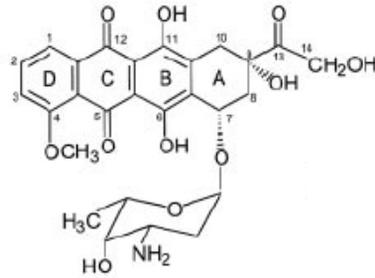


Figure 8 : Structure chimique de la doxorubicine. La doxorubicine est composée d'une fraction aglyconique caractérisée par quatre cycles avec une chaîne latérale terminée par un alcool primaire, et d'un sucre nommé daunosamine lié au cycle A par une liaison glycosidique (d'après Minotti *et al.*, 2004).

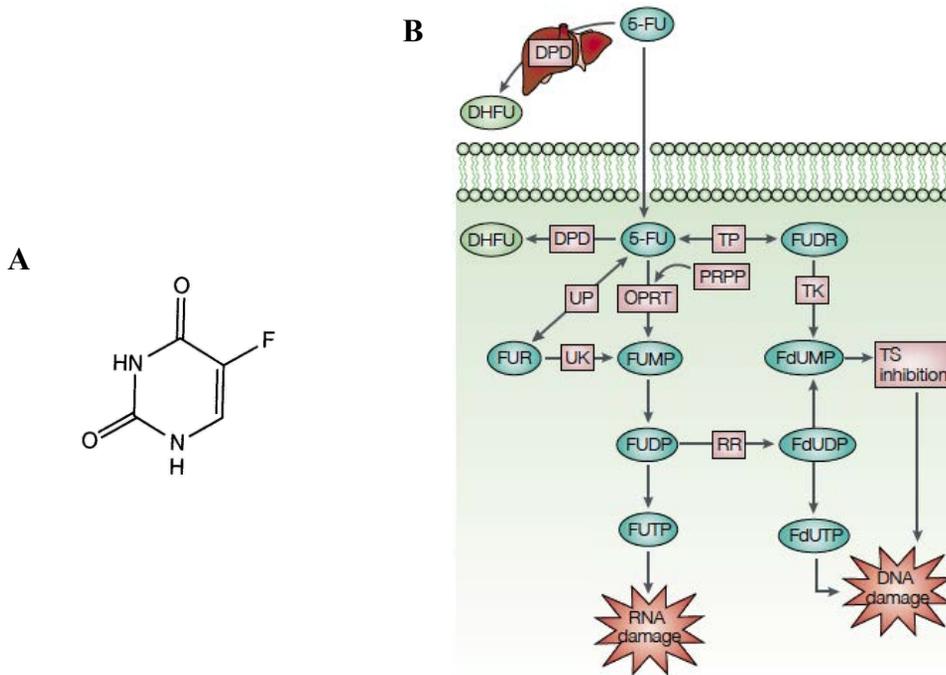


Figure 9: Structure chimique (A) et métabolisme (B) du 5-fluorouracile (5-FU). A. Le 5-FU est un analogue de l'uracile portant un atome de fluor en position C-5 à la place d'un hydrogène. B. Dans le foie, 80% du 5-FU administré est catabolisé en dihydrofluorouracile (DHFU) par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). Le 5-FU est ensuite converti en trois principaux métabolites actifs : fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP), fluorodéoxyuridine triphosphate (FdUTP) et fluorouridine triphosphate (FUTP). La conversion du 5-FU en FdUMP par la thymidine phosphorylase (TP) et la thymidine kinase (TK) inhibe la thymidylate synthase (TS). Le 5-FU est principalement converti par l'orotate phosphoribosyltransférase (OPRT) en fluorouridine monophosphate (FUMP) qui est ensuite phosphorylé en fluorouridine diphosphate (FUDP). FUDP peut soit être converti en un métabolite actif, le FUTP, soit en fluorodéoxyuridine diphosphate (FdUDP) par la ribonucléotide réductase (RR). A son tour, le FdUDP permet de générer le troisième métabolite du 5-FU, le FdUTP (d'après Longley *et al.*, 2003).

❖ Les agents alkylants

Ces composés réagissent avec certains groupements de l'ADN ou des protéines et établissent des liaisons covalentes perturbant les processus de réplication ou de transcription. A titre d'exemple, le cyclophosphamide et le cisplatine qui induisent la formation de pontage de l'ADN sont utilisés dans le traitement du cancer du sein. Cependant ils sont à l'origine de neurotoxicité et néphrotoxicité (Pourquier, 2011).

❖ Les anthracyclines

Les anthracyclines forment une famille d'antibiotiques dont l'activité antitumorale résulte de plusieurs mécanismes d'action. Ces composés peuvent s'intercaler dans l'ADN et bloquer la progression de l'ADN polymérase inhibant ainsi la réplication de l'ADN ou la transcription. Ils inhibent également la topoisomérase II par la formation d'un complexe ternaire anthracycline-ADN-topoisomérase II, dans lequel l'ADN double brin est clivé. La stabilisation de ce complexe de clivage empêche alors la religation de l'ADN (Minotti *et al.*, 2004). Parmi ces composés, la doxorubicine est largement utilisée dans le traitement du cancer du sein et se trouve être un des agents de chimiothérapie les plus efficaces dans le cas de cancer du sein métastatique (Figure 8). La doxorubicine contribue également à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dues à sa métabolisation par certaines enzymes comme la cytochrome P450 réductase et la NADH déshydrogénase mitochondriale. S'ensuivent des dommages au niveau de l'ADN nucléaire et mitochondrial et une peroxydation lipidique conduisant à la mort cellulaire (Minotti *et al.*, 2004). Par ailleurs, elle entraîne un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et perturbe l'homéostasie calcique de la mitochondrie (Meredith and Dass, 2016). Toutefois, la doxorubicine présente des effets secondaires limitant son utilisation dont le plus important est la toxicité cardiaque. L'épirubicine qui correspond à l'épimère de la doxorubicine est quant à elle moins cardiotoxique (Anampa *et al.*, 2015; Meredith and Dass, 2016).

❖ Les anti-métabolites

Ce sont des analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques ainsi que de l'acide folique qui altèrent la synthèse des constituants de l'ADN et empêchent la réplication de l'ADN. Deux d'entre eux sont couramment utilisés dans le traitement du cancer du sein. Le 5-fluorouracile (5-FU) est un analogue de l'uracile contenant un atome de fluor à la place d'un hydrogène en position C-5 (Figure 9A). Il possède deux mécanismes d'action principaux : l'inhibition de l'enzyme thymidylate synthase essentielle au processus de biosynthèse d'ADN, et l'incorporation délétère dans l'ADN et l'ARN (Figure 9B). Le méthotrexate est un

Combinaison	Agents de chimiothérapie
CMF	cyclophosphamide + méthotrexate + 5-fluorouracile
AC	doxorubicine + cyclophosphamide
FEC	5-fluorouracile + épirubicine + cyclophosphamide
CAF (ou FAC)	cyclophosphamide + doxorubicine + 5-fluorouracile
AC-T	doxorubicine + cyclophosphamide suivis de paclitaxel
DC	docétaxel + cyclophosphamide
DAC	docétaxel + doxorubicine + cyclophosphamide
FEC-T	5-fluorouracile + épirubicine + cyclophosphamide, suivis de taxanes

Tableau 2: Protocoles de polychimiothérapie les plus couramment utilisés dans le traitement du cancer du sein (d'après Anampa *et al.*, 2015).

antagoniste de l'acide folique qui bloque la dihydrofolate réductase nécessaire au processus de biosynthèse des bases puriques (Lansiaux, 2011). Malgré leur utilisation fréquente, ces anti-métabolites présentent des toxicités au niveau cardiaque, hématologique et rénal (Lansiaux, 2011; Focaccetti *et al.*, 2015).

❖ Les anti-mitotiques

Ces composés se lient à la tubuline ou aux microtubules et déstabilisent leur dynamique et leur état de polymérisation. Parmi ces agents, les taxanes sont largement utilisés dans le traitement du cancer du sein. Plus particulièrement le paclitaxel et le docétaxel se lient aux microtubules et les stabilisent entraînant un arrêt de la progression des cellules dans la mitose (Dumontet, 2011).

L'association de plusieurs agents de chimiothérapie ayant des modes d'action différents est une pratique clinique couramment utilisée. Ces protocoles de traitement appelés polychimiothérapies permettent d'améliorer l'efficacité et la tolérance des agents utilisés et de contrer la résistance des cellules cancéreuses. Les combinaisons d'agents de chimiothérapie utilisées dans le traitement des cancers du sein sont présentées dans le tableau 2.

En outre, en fonction de leur sous-type moléculaire, les cancers du sein ne présentent pas la même réponse face à la chimiothérapie. Elle profite davantage aux patientes atteintes d'une tumeur mammaire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux qu'aux patientes atteintes d'une tumeur mammaire exprimant ces récepteurs (Maughan *et al.*, 2010). La chimiothérapie représente le traitement de base pour les patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif.

6.3 L'hormonothérapie

Plus de 70% des tumeurs mammaires sont hormonosensibles, ce qui signifie qu'elles expriment les récepteurs hormonaux ER et PR et que leur croissance est stimulée par les œstrogènes et la progestérone, produites naturellement par les ovaires. L'hormonothérapie est un traitement systémique qui a pour objectif de bloquer l'effet stimulant des hormones sur la prolifération des cellules cancéreuses. Ce traitement est donc destiné aux patientes ayant un cancer hormonodépendant localisé ou métastatique. Deux types d'hormonothérapie sont disponibles : le traitement non médicamenteux et le traitement médicamenteux systémique (INCa).

Le traitement non médicamenteux est la plus ancienne thérapie systémique du cancer du sein et consiste en une ablation (ovariectomie) ou une irradiation (par radiothérapie) des ovaires conduisant à la suppression définitive de la synthèse d'œstrogènes par les ovaires. Ce type d'hormonothérapie est destiné aux patientes préménopausées (INCa).

Le traitement médicamenteux est basé sur l'utilisation de molécules dont le rôle est d'empêcher la synthèse des hormones ou leur action sur les cellules cancéreuses. Il en existe trois catégories : les anti-œstrogènes, les analogues de la LH-RH (luteinizing hormone releasing hormone) et les inhibiteurs de l'aromatase. Les anti-œstrogènes sont divisés en SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) dont fait partie le tamoxifène et SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation) auxquels appartient le fulvestrant. Les SERM agissent comme des compétiteurs des œstrogènes en se fixant à leur place sur les récepteurs hormonaux tandis que les SERD dégradent les récepteurs hormonaux. Les agonistes de la LH-RH comme la goséréline ont pour but de bloquer la stimulation des ovaires par l'axe hypothalamo-hypophysaire, conduisant à un arrêt de la production hormonale ovarienne. Les inhibiteurs de l'aromatase ciblent l'aromatase, enzyme responsable de la production d'œstrogènes à partir des androgènes, empêchant alors son action. Cette voie permet notamment la synthèse d'œstrogènes chez les femmes ménopausées, ces inhibiteurs tels que le létrozole et l'anastrozole sont donc adressés aux patientes ménopausées (INCa; Abdulkareem and Zurmi, 2012).

6.4 Les thérapies ciblées

L'amélioration de la caractérisation moléculaire des tumeurs et l'identification de biomarqueurs spécifiques (par exemple l'amplification du gène *HER2*) ont permis de développer des thérapies ciblées. Ces traitements sont utilisés en vue de bloquer spécifiquement certaines protéines et voies de signalisation impliquées dans le développement et la progression tumorale. Il s'agit notamment d'inhibiteurs extracellulaires comme les anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs intracellulaires tels que les inhibiteurs de tyrosine kinase. Ces thérapies ciblées peuvent être utilisées seules, associées entre elles, associées à la chimiothérapie ou à l'hormonothérapie pour des cancers de stade précoce à métastatique. Elles ont permis un net progrès de la prise en charge des patientes porteuses d'un cancer du sein. (INCa, 2016).

Les tumeurs enrichies en HER2 sont agressives, cependant le pronostic des patientes ayant une tumeur surexprimant HER2 a été amélioré grâce au développement de molécules ciblant le récepteur à activité tyrosine kinase HER2. Le trastuzumab, le pertuzumab et T-DM1 (trastuzumab emtansine) sont trois anticorps monoclonaux qui se lient au domaine extracellulaire du récepteur HER2 empêchant son activation. Le lapatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase, qui se fixe sur le domaine tyrosine kinase intracellulaire du récepteur empêchant sa phosphorylation. L'activation des voies de signalisation associées au récepteur HER2 est alors bloquée (INCa, 2016; Gu *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016).

Pour les cas de cancer du sein hormonodépendant avancé/métastatique, deux agents de thérapie ciblée ont récemment été mis sur le marché : l'everolimus et le palbociclib. L'everolimus est un inhibiteur de la protéine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) appartenant à la voie de signalisation PI3K/AKT souvent activée de façon constitutive dans le cancer du sein. Il permet l'inhibition de la synthèse protéique, de la prolifération et de l'angiogenèse (Atkins *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2016). Quant au palbociclib, c'est un inhibiteur sélectif de CDK4/6 (kinases dépendantes des cyclines 4 et 6). Les cyclines forment un complexe avec des CDK spécifiques ayant pour rôle de réguler l'avancée des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. A travers l'inhibition de CDK 4/6, le palbociclib bloque la prolifération des cellules cancéreuses en les empêchant de progresser de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Rocca *et al.*, 2017).

Une autre stratégie consiste à cibler le phénomène d'angiogenèse essentiel à la progression tumorale. En réponse à l'hypoxie, les cellules tumorales sécrètent le facteur de croissance VEGF qui se fixe sur son récepteur VEGFR à la surface des cellules endothéliales, activant une voie de signalisation à l'origine de la formation de nouveaux vaisseaux. L'anticorps monoclonal bevacizumab, capable de cibler et inactiver le VEGF, est utilisé pour les cancers du sein métastatiques HER2 négatifs en association avec les agents de chimiothérapie paclitaxel et capécitabine. Malgré une amélioration notable de la survie sans progression, la survie globale n'est quant à elle pas modifiée (Gu *et al.*, 2016; Aalders *et al.*, 2017).

Enfin, d'autres thérapies ciblées font l'objet d'études cliniques. Des inhibiteurs de PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymérase), dont l'olaparib, sont testés en essais cliniques de phase III dans le cadre du traitement des tumeurs mammaires triple-négatives présentant une mutation au niveau des gènes *BRCA1/2*. Des inhibiteurs de PI3K ou de MEK (MAPK/ERK Kinase) sont également en cours d'étude pour le cancer du sein triple-négatif (Bianchini *et al.*, 2016). Depuis plusieurs années, l'immunothérapie connaît un essor considérable dans la thérapie des cancers. Elle est basée sur une reconnaissance spécifique de la tumeur par les cellules immunitaires grâce à des antigènes de surface exprimés par les cellules cancéreuses, permettant d'activer une réponse immunitaire en vue de détruire les cellules cancéreuses (INCa, 2016). Un exemple notoire est l'inhibition de la voie PD-1/PD-L1 (programmed cell death protein 1 et programmed cell death ligand 1) impliquée dans l'échappement et la tolérance immunitaire. PD-L1 est un ligand exprimé à la surface des cellules tumorales et son récepteur PD-1 est exprimé au niveau des lymphocytes T activés et leur interaction inhibe la réponse immunitaire des lymphocytes T. 20 à 30% des tumeurs mammaires expriment PD-L1, en particulier les tumeurs mammaires triple-

négligentes. Des inhibiteurs de PD-1, nivolumab et pembrolizumab et de PD-L1, atezolizumab et avelumab, sont testés dans le cadre d'essais cliniques pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs (Zitvogel and Kroemer, 2012; Yu *et al.*, 2017).

7. *Limites et résistance aux traitements*

En dépit des nombreuses stratégies thérapeutiques existantes et du développement des thérapies ciblées, des résistances aux traitements sont couramment observées et sont à l'origine de récurrences et du développement de métastases. En effet dans environ 25% des cas les tumeurs mammaires hormonodépendantes présentent des résistances *de novo* ou acquises à l'hormonothérapie, notamment au tamoxifène (Tang *et al.*, 2016). Une résistance aux inhibiteurs des CDK4/6 leur a également été attribuée (D'Souza *et al.*, 2018). De même, les patientes atteintes d'un cancer HER2-enriched présentent souvent une résistance *de novo* ou développent une résistance acquise au trastuzumab (Tang *et al.*, 2016). Pour les cancers du sein triple-négatifs, caractérisés par l'absence des récepteurs ER, PR et HER2, la stratégie thérapeutique est souvent limitée à la chirurgie et la chimiothérapie. Cependant, en plus d'être à l'origine d'effets secondaires importants, les agents de chimiothérapie font l'objet de nombreuses résistances. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la chimiorésistance comme l'augmentation de l'efflux des agents de chimiothérapie, leur inactivation, l'altération de leur cible, l'adaptation de la tumeur ou l'échappement au processus d'apoptose (Butera *et al.*, 2018). De récentes études montrent que la chimiorésistance peut être stimulée par la sécrétion de certains facteurs de manière autocrine. Par exemple les cellules cancéreuses sécrètent de l'IL-18 (interleukine-18), une cytokine immunorégulatrice impliquée dans la croissance tumorale et les métastases, qui contribuerait à la résistance des tumeurs mammaires à la doxorubicine. Par ailleurs les cellules cancéreuses peuvent sécréter des petites vésicules extracellulaires, les exosomes, qui contribuent à la progression tumorale et à la chimiorésistance. Ces vésicules peuvent contenir des protéines, de l'ADN, de l'ARN et des microARN et sont transmises à une autre cellule par fusion membranaire, contrôlant ainsi la communication intercellulaire et le microenvironnement tumoral. Les exosomes peuvent contenir directement des agents de chimiothérapie afin de les éliminer et augmenter ainsi la chimiorésistance. Ils peuvent également transporter la glycoprotéine P impliquée dans le phénomène de résistance multiple aux agents anticancéreux menant à la résistance au docétaxel dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Butera *et al.*, 2018). De plus, il a récemment été montré dans le cancer du sein que la chimiorésistance (doxorubicine et paclitaxel) peut être transmise à des cellules cancéreuses sensibles par des cellules résistantes, notamment des CSC, grâce à la sécrétion

d'exosomes via le transfert du microARN-155. Ce microARN agit comme un oncogène, il est impliqué dans les mécanismes de TEM, de métastase et de résistance aux agents de chimiothérapie (Santos *et al.*, 2018). La résistance aux thérapies anticancéreuses peut donc aussi être attribuée aux CSC. Ainsi, après un traitement de chimiothérapie ou d'hormonothérapie appliqué à des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* ou à des tumeurs mammaires de patientes, un enrichissement en cellules CSC (CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺) est observé (Fillmore and Kuperwasser, 2008; Creighton *et al.*, 2009). La radiothérapie conduit également à l'augmentation de la proportion de CSC mammaires *in vitro* et *in vivo* (Dittmer, 2018). Outre les mécanismes de résistance indiqués dans le tableau 1, l'hypoxie et le pH acide intratumoral ainsi que les thérapies anticancéreuses comme la chimiothérapie et la radiothérapie créent un microenvironnement favorable aux CSC. Cette niche favorise le maintien des CSC et initie la dédifférenciation des cellules cancéreuses en CSC contribuant à l'échec thérapeutique et la récurrence du cancer (Lee and R Hall, 2016). C'est pourquoi des stratégies thérapeutiques visant spécifiquement les CSC sont développées. Des inhibiteurs des voies de signalisation Wnt, Notch et Hedgehog sont actuellement utilisés en essais cliniques de phase précoce notamment dans le cadre du cancer du sein triple-négatif (Brooks *et al.*, 2015; Dittmer, 2018). Rad51, une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN est surexprimée dans les CSC et pourrait être responsable des phénomènes de résistance. Des études précliniques montrent que l'inhibition de Rad51 perturbe la réparation de l'ADN et permettrait d'améliorer la réponse aux traitements anticancéreux (Lee and R Hall, 2016). Une autre stratégie serait d'engendrer la différenciation des CSC afin de diminuer le pool de CSC et d'augmenter la sensibilité aux thérapies conventionnelles. *In vitro*, il a été montré que l'acide rétinoïque tout-trans induit une différenciation des CSC mammaires accompagnée d'une diminution de leur population. De plus il sensibilise ces cellules à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Ginestier *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2016).

II. METABOLISME ENERGETIQUE ET CANCER

1. *Le métabolisme énergétique d'une cellule saine*

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques se déroulant au sein des cellules d'un organisme. Il est constitué de deux mécanismes : le catabolisme et l'anabolisme. Les voies cataboliques décomposent des molécules complexes provenant des aliments en molécules plus simples qui constituent des précurseurs nécessaires à la biosynthèse. Ces voies permettent de libérer de l'énergie sous une forme utilisable par la cellule. Les voies anaboliques

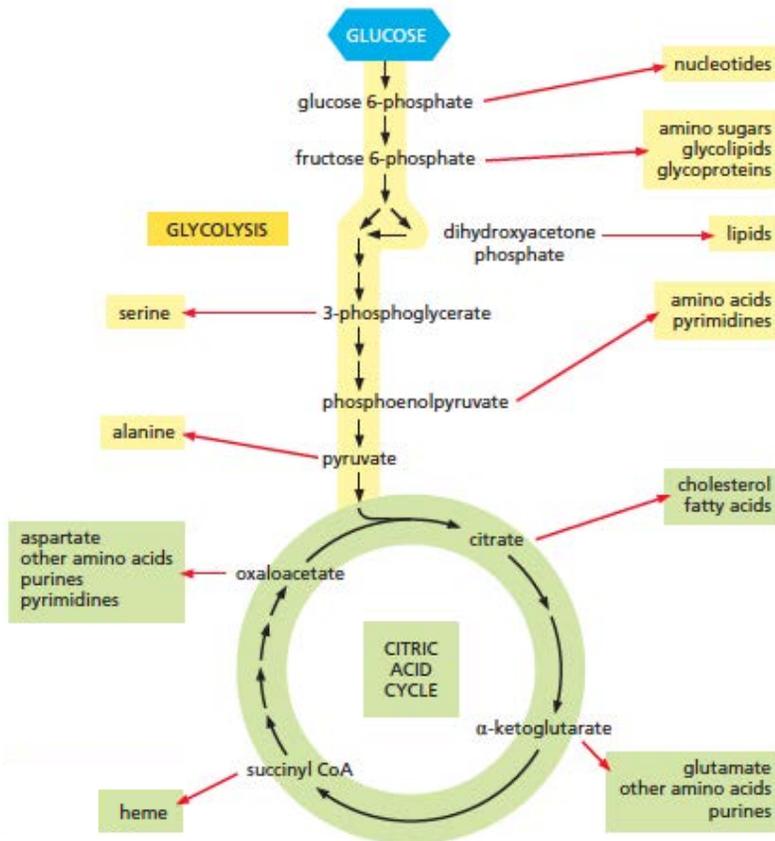


Figure 10 : La glycolyse et le cycle de Krebs fournissent des précurseurs nécessaires à la synthèse de macromolécules essentielles. Les intermédiaires de la glycolyse (jaune) et du cycle de Krebs (vert) servent de précurseurs pour les acides gras, les acides aminés ou les nucléotides. Ces derniers sont utilisés par la cellule lors des réactions anaboliques pour synthétiser des macromolécules essentielles (d'après Alberts, 2015).

utilisent de l'énergie et des molécules simples générées par les voies catalytiques afin d'élaborer des macromolécules complexes constituant la cellule (Campbell, 2012; Alberts, 2015).

Les réactions biochimiques forment un réseau de voies métaboliques interdépendantes. Au centre du réseau se situe le métabolisme énergétique défini par l'ensemble des réactions biochimiques qui permettent de produire de l'énergie. Le métabolisme énergétique est constitué de deux voies cataboliques principales : la glycolyse et le métabolisme mitochondrial comprenant le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. L'énergie est produite sous forme d'ATP (adénosine triphosphate). Cette molécule provient du transfert enzymatique d'un groupement phosphate d'un substrat à une molécule d'ADP (lors de la glycolyse ou du cycle de Krebs). L'ATP peut aussi provenir de la force proton-motrice utilisée pour phosphoryler l'ADP avec un phosphate inorganique à l'aide de réactions d'oxydoréduction, ce mécanisme correspond à la phosphorylation oxydative mitochondriale (Campbell, 2012). Près de 90% de l'ATP est produit par la phosphorylation oxydative, le reste provenant de la glycolyse et du cycle de Krebs. En plus de produire de l'énergie, la glycolyse et le cycle de Krebs fournissent des précurseurs d'acides aminés, nucléotides et acides gras, essentiels à la cellule pour la synthèse de macromolécules (Figure 10).

La majeure partie des substrats du métabolisme énergétique provient de l'alimentation. Les glucides sont transformés en glucose qui est dégradé lors de la glycolyse. Les protéines et les lipides sont également convertis en acides aminés et en glycérol et acide gras respectivement alimentant la glycolyse ou le cycle de Krebs. Certaines macromolécules de stockage comme les lipides mis en réserve dans les cellules adipeuses et le glycogène stocké dans les cellules hépatiques et musculaires peuvent être utilisées comme substrats énergétiques (Campbell, 2012).

1.1 La glycolyse

La glycolyse correspond à la première voie catabolique du processus d'oxydation du glucose. Elle se déroule dans le cytoplasme et peut fonctionner en absence d'oxygène.

1.1.1 Fonctionnement et rendement de la glycolyse

La glycolyse se caractérise par une succession de dix réactions enzymatiques permettant la conversion d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate (Figure 11). La voie glycolytique est divisée en deux phases comprenant chacune cinq étapes : une phase d'investissement énergétique et une phase de retour sur investissement ou de libération d'énergie. La première phase correspond à la dégradation d'une molécule de glucose composée

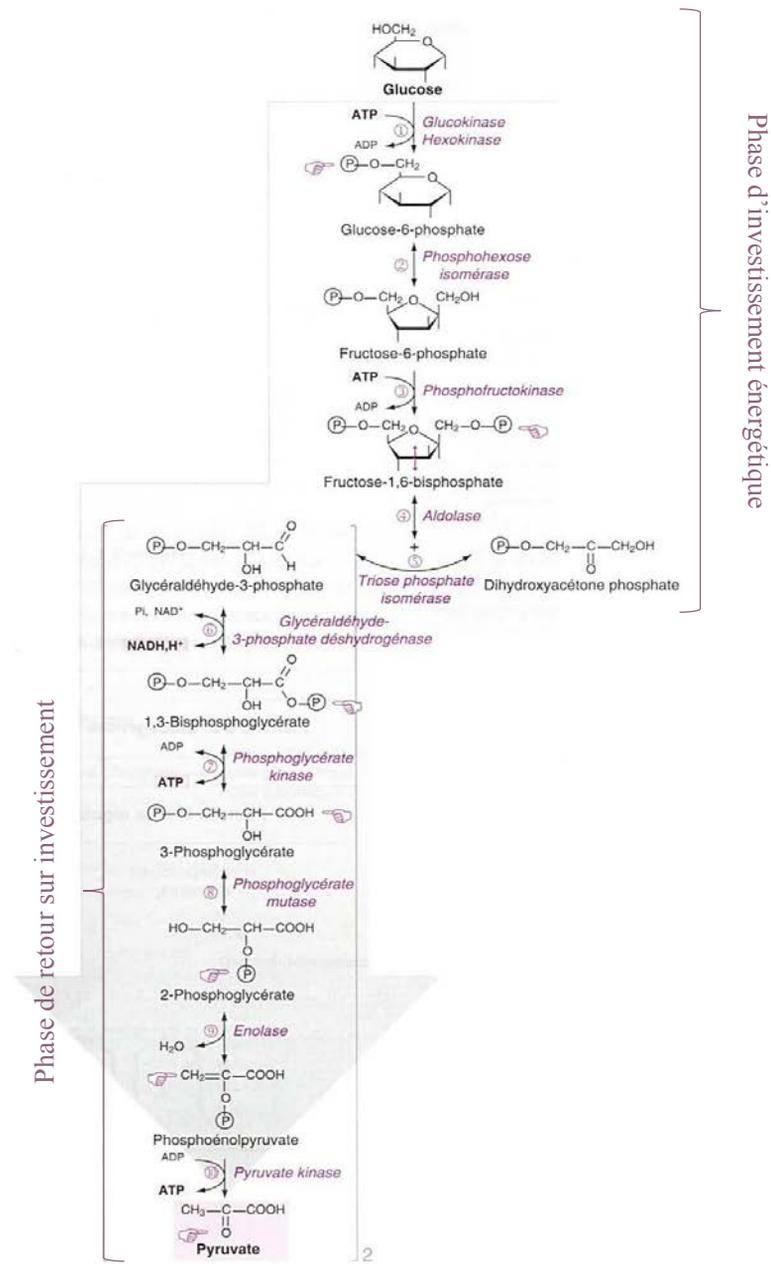


Figure 11 : Les étapes de la glycolyse. La glycolyse est composée de deux phases de cinq étapes chacune: une phase d'investissement énergétique au cours de laquelle de l'ATP est consommé et une phase de retour sur investissement où de l'ATP est produit. Les étapes 4 et 5 permettent de générer deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate. A partir de ces deux molécules, les étapes de la phase de retour sur investissement sont réalisées en double et aboutissent à deux molécules de pyruvate. Les réactions enzymatiques sont numérotées de 1 à 10 et le symbole P représente la modification chimique apportée au cours de chaque étape de la glycolyse. ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; Pi, phosphate inorganique (adapté de Moussard, 2006).

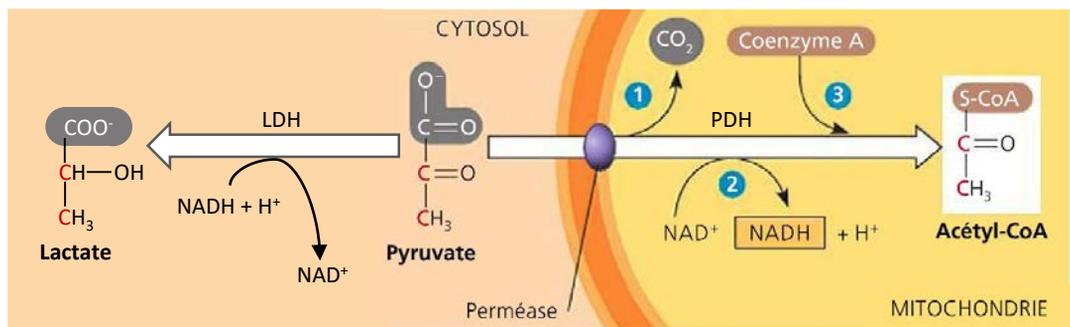


Figure 12 : Le devenir du pyruvate. Une fois produit lors de la glycolyse, le pyruvate a deux destins. En conditions anaérobies, le pyruvate reste dans le cytosol où il est converti lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). Au cours de cette réaction, le pyruvate est réduit par le NADH + H⁺. En conditions aérobies, il pénètre dans la mitochondrie par transport actif grâce à une perméase. Dans la mitochondrie, il est transformé en acétyl-coA par le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase (PDH). Lors de la première étape, le groupement carboxyle (-COO⁻) du pyruvate est éliminé et libéré sous forme de dioxyde de carbone. Dans la deuxième étape, le fragment restant est oxydé et forme un acétate. Les électrons et protons libérés durant ce processus sont transférés au NAD⁺. Au cours de la troisième étape, une coenzyme A se lie à l'acétate pour former l'acétyl-coA. Le groupement acétyle de ce dernier sera ensuite oxydé au cours du cycle de Krebs (adapté de Campbell, 2012).

de 6 atomes de carbone en deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate ayant 3 atomes de carbone (Figure 11) (Moussard, 2006; Campbell, 2012). Au cours de cette phase, les étapes 1 et 2 investissent chacune une molécule d'ATP (Alberts, 2015). Lors de la deuxième phase durant laquelle chaque molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate est transformée en une molécule de pyruvate, deux molécules d'ATP sont produites au cours des étapes 7 et 10. Quatre molécules d'ATP sont ainsi produites à partir des deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate provenant d'une molécule de glucose. Par soustraction des deux molécules d'ATP investies dans la première phase, le bilan net de la glycolyse est de deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose (Moussard, 2006). De plus, l'étape 6 correspond à une réaction d'oxydoréduction au cours de laquelle deux électrons et deux protons sont libérés et transférés au coenzyme NAD^+ produisant alors deux molécules de NADH , H^+ , soit une par molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (Campbell, 2012; Alberts, 2015). Par conséquent, le bilan métabolique de la glycolyse est le suivant :



A l'issue de la glycolyse, le pyruvate sert de substrat à la fermentation lactique en anaérobiose (absence d'oxygène) ou à la génération d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) en aérobie (présence d'oxygène). La présence du coenzyme NAD^+ est essentielle au fonctionnement de la sixième étape glycolytique et au maintien de la glycolyse, il est donc nécessaire de régénérer le NAD^+ par réoxydation du NADH , H^+ .

1.1.2 Devenir du pyruvate et du NADH , H^+

En conditions anaérobies, le pyruvate reste dans le cytoplasme où il subit la fermentation lactique durant laquelle il est converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) (Figure 12). Au cours de cette réaction, la réoxydation du NADH , H^+ permet de régénérer du NAD^+ pouvant de nouveau être utilisé lors de la glycolyse. Le lactate produit est excrété de la cellule et peut être utilisé comme précurseur de la néoglucogenèse (Moussard, 2006).

En conditions aérobies, le pyruvate entre dans la mitochondrie par transport actif afin d'être converti, par une réaction de décarboxylation oxydative, en acétyl-CoA (Figure 12). Cette réaction est catalysée par le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase. La production d'acétyl-CoA est accompagnée de la formation d'une molécule de NADH , H^+ et d'une molécule de CO_2 par molécule de pyruvate (Moussard, 2006; Campbell, 2012). L'oxydation de l'acétyl-coA se poursuivra ensuite par son entrée dans le cycle de Krebs. Par ailleurs, au cours de la

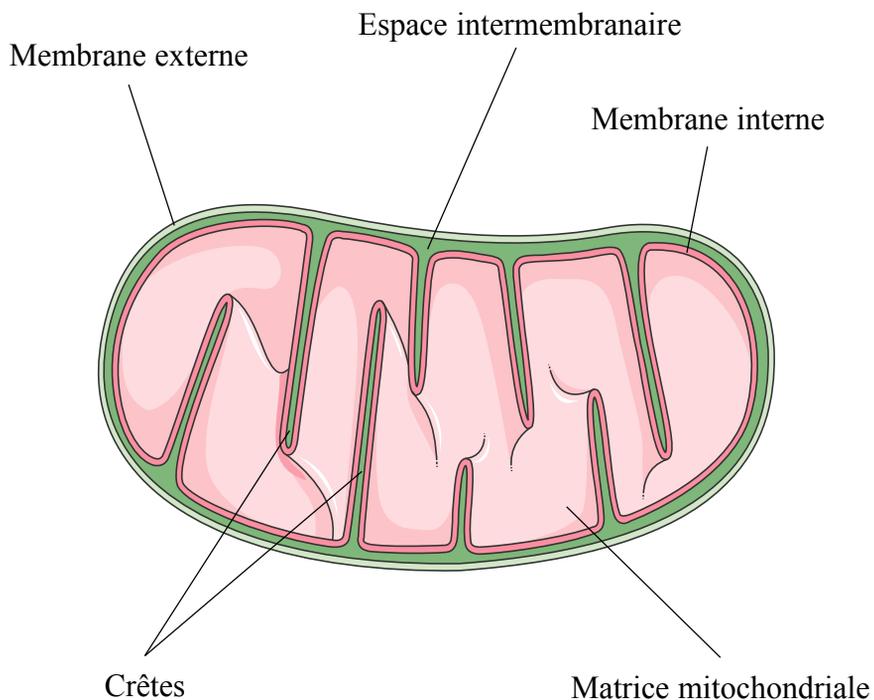


Figure 13 : Structure de la mitochondrie. La mitochondrie comporte deux membranes: une membrane externe qui la sépare du cytoplasme et qui est perméable à de nombreuses molécules et une membrane interne imperméable. Cette dernière délimite deux compartiments, la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire. La membrane interne se replie sur elle-même formant les crêtes.

phosphorylation oxydative le NADH, H⁺ sera réoxydé en NAD⁺ et pourra être réutilisé par la voie glycolytique (Moussard, 2006).

1.1.3 Régulation de la glycolyse

La glycolyse est à l'origine de la formation d'énergie et de précurseurs de biosynthèse. Cette voie métabolique majeure est ainsi finement régulée dans le but d'adapter sa vitesse en fonction des besoins cataboliques et anaboliques de la cellule. Trois sites de contrôle existent dans la glycolyse au niveau d'enzymes catalysant des réactions limitantes ou irréversibles : l'étape 1 catalysée par l'hexokinase, l'étape 3 catalysée par la phosphofructokinase-1 et l'étape 10 catalysée par la pyruvate kinase. Ces étapes sont le plus souvent régulées par un contrôle allostérique grâce à des inhibiteurs et activateurs spécifiques pour chaque enzyme (Moussard, 2006).

1.2 Le métabolisme mitochondrial

1.2.1 Structure de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite limité par deux membranes : la membrane externe et la membrane interne. Elles délimitent deux compartiments distincts, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Figure 13). La mitochondrie a pour fonction principale la respiration cellulaire et la production d'ATP mais elle participe également à d'autres fonctions biologiques telles que la signalisation calcique, la production d'ERO et le processus de mort cellulaire par apoptose.

❖ La membrane externe

La membrane externe est perméable aux ions et aux petites molécules de poids moléculaire allant jusqu'à 5 kDa, grâce à la présence de protéines membranaires appelées porines, telles que les VDAC (voltage-dependent anion channel). De ce fait, l'espace intermembranaire, entre la membrane externe et la membrane interne, possède la même composition chimique que le cytosol. Il n'y a donc pas de gradient électrochimique à travers la membrane externe (Alberts, 2015).

❖ La membrane interne

Contrairement à la membrane externe, la membrane interne est imperméable aux ions et aux petites molécules, le passage de certains ions et métabolites à travers cette membrane nécessite alors des protéines de transport spécifiques. Un gradient électrochimique est mis en place à travers la membrane interne par les complexes de la chaîne respiratoire. Il permet le transport de métabolites et la production d'ATP (Kühlbrandt, 2015). La membrane interne est repliée sur

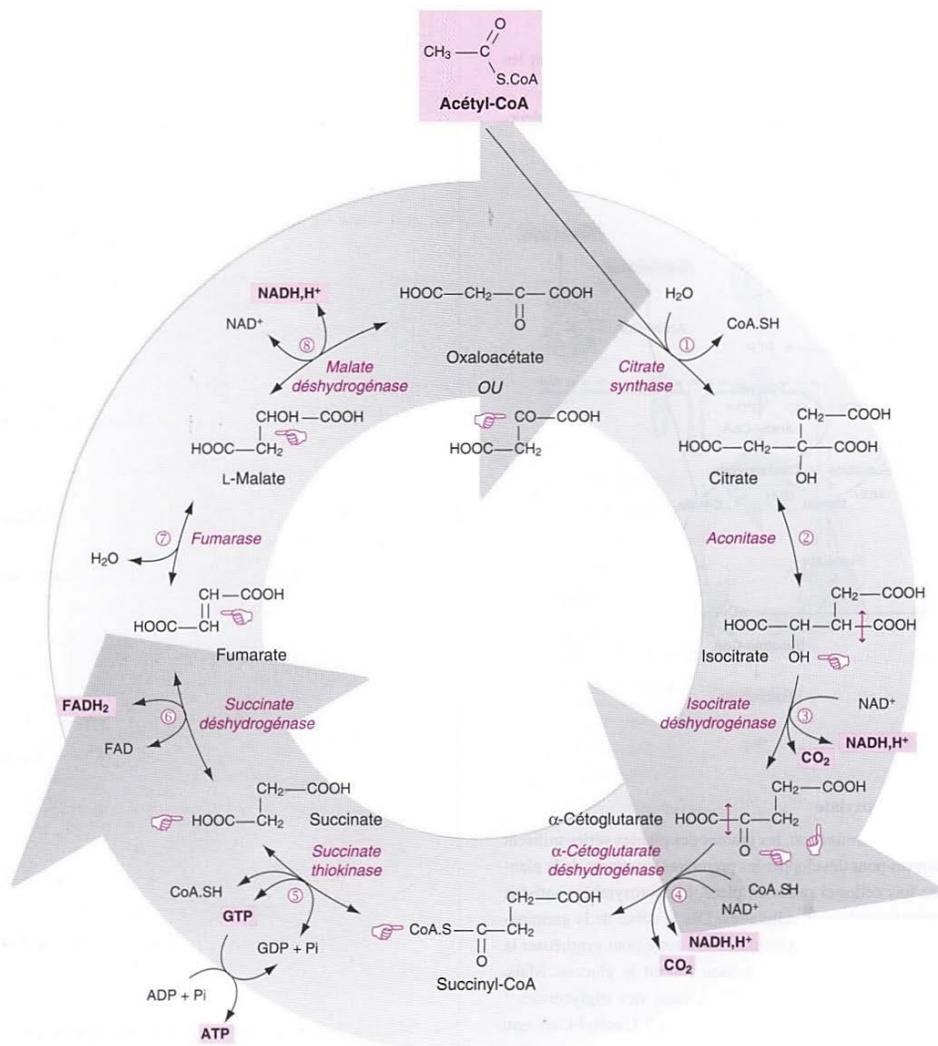


Figure 14 : Le cycle de Krebs. L'acétyl-coA entre dans le cycle de Krebs au cours duquel son groupement acétyle est transféré à une molécule d'oxaloacétate pour former une molécule de citrate. Le citrate est ensuite oxydé tout au long des différentes étapes du cycle de Krebs conduisant à la régénération de l'oxaloacétate associée à la production de 3 molécules de NADH, H⁺, une molécule de FADH₂ et une molécule de GTP. Par la suite, les coenzymes réduits NADH et FADH₂ seront utilisés lors de la phosphorylation oxydative pour la synthèse d'ATP et la molécule de GTP sera convertie en une molécule d'ATP. Les réactions enzymatiques sont numérotées de 1 à 8 et le symbole \rightarrow représente la modification chimique apportée au cours de chaque étape du cycle de Krebs (d'après Moussard, 2006).

elle-même et forme dans la matrice mitochondriale des invaginations appelées crêtes mitochondriales, au niveau desquelles sont insérés les complexes de la chaîne de transport d'électrons (Alberts, 2015).

❖ La matrice mitochondriale

La matrice est délimitée par la membrane interne. Elle contient l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui est circulaire et composé de 16 569 paires de base ainsi que des ribosomes permettant la synthèse de protéines mitochondriales dont certaines enzymes mitochondriales. Le génome mitochondrial contient 37 gènes codant 13 protéines faisant partie des complexes de la chaîne respiratoire. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. La matrice est le lieu où se produisent de nombreuses réactions enzymatiques comme l'oxydation du pyruvate, les réactions du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative (Kühlbrandt, 2015).

1.2.2 Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est également appelé cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques. Après la glycolyse, il correspond à la deuxième voie catabolique du processus d'oxydation lors du métabolisme énergétique. Le cycle de Krebs se déroule dans la matrice mitochondriale. Il se déroule en conditions aérobies et son fonctionnement repose sur l'oxydation de l'acétyl-coA précédemment formé, aboutissant à la libération de CO₂ et d'énergie récupérée par les coenzymes NAD⁺ et FAD (flavine adénine dinucléotide) (Alberts, 2015).

1.2.2.1 Fonctionnement et rendement du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est constitué de huit étapes successives et chacune d'entre elles est catalysée par une enzyme spécifique (Figure 14). La première étape consiste en l'ajout du groupement acétyle, provenant de l'acétyl-coA à une molécule d'oxaloacétate pour former une molécule de citrate. Les étapes suivantes permettent de dégrader le citrate et régénérer de l'oxaloacétate (Campbell, 2012). Ces réactions successives forment un cycle puisque l'oxaloacétate régénéré entre à nouveau dans le cycle de Krebs (Campbell, 2012; Alberts, 2015).

Parmi les huit réactions du cycle de Krebs, quatre sont des réactions d'oxydation libérant des protons et des électrons transférés aux coenzymes NAD⁺ (lors des étapes 3, 4 et 8) et FAD (lors de l'étape 6) ainsi réduits en NADH, H⁺ et FADH₂ respectivement. Au cours d'un cycle de Krebs, trois molécules de NADH, H⁺ et une molécule de FADH₂ sont alors formées, ces coenzymes réduits sont ensuite réoxydés durant la phosphorylation oxydative par la chaîne

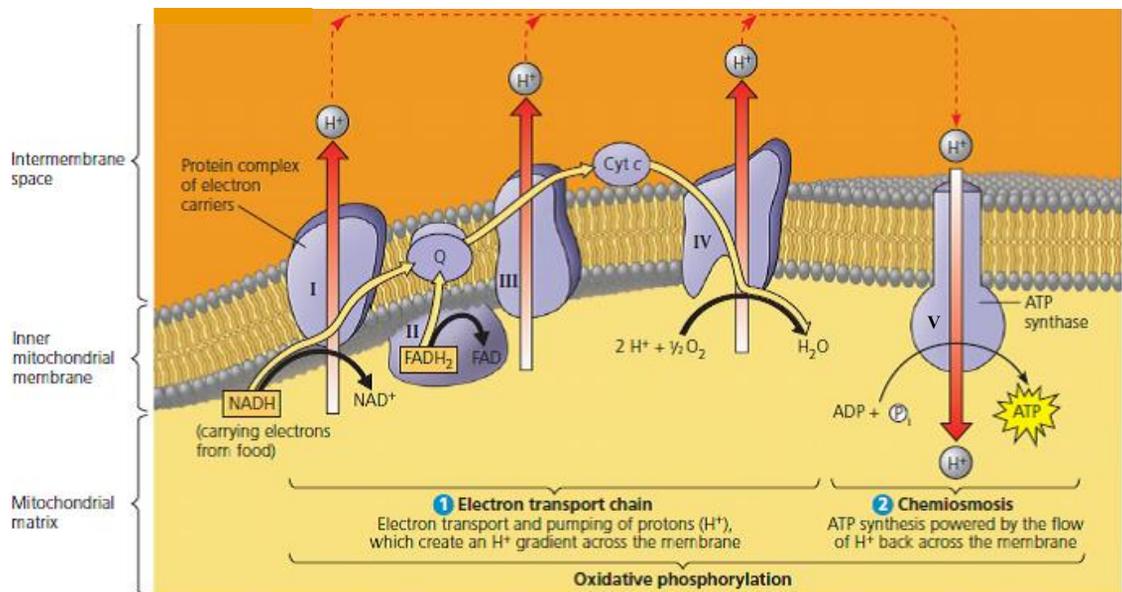
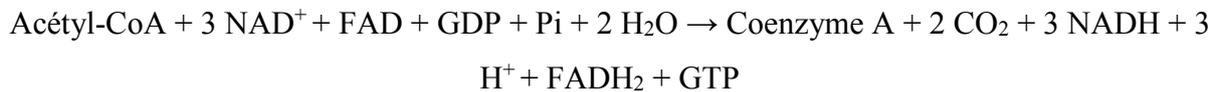


Figure 15 : La chaîne de transport des électrons couplée à la synthèse d'ATP. La chaîne de transport des électrons (1) est composée de quatre complexes fixes enchâssés dans la membrane interne mitochondriale et de deux transporteurs d'électrons mobiles dans la membrane interne. Les électrons apportés par les coenzymes réduits NADH et FADH₂ sont transférés d'un complexe à l'autre grâce aux transporteurs mobiles d'électrons. Ce transfert d'électrons libère de l'énergie qui est utilisée pour le pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire à travers les complexes I, III et IV. Cela permet de générer un gradient électrochimique à travers la membrane interne qui est exploité par l'ATP synthase (ou complexe V) afin de produire de l'ATP à partir d'ADP. Ce mécanisme est appelé chimiosmose (2) et l'ensemble de ces phénomènes correspond à la phosphorylation oxydative (d'après Campbell, 2012).

respiratoire. Ils fournissent ainsi l'énergie nécessaire à la production d'ATP (Moussard, 2006; Campbell, 2012). Une des réactions du cycle de Krebs permet de générer une molécule de GTP (guanosine triphosphate) qui peut servir à la formation d'une molécule d'ATP, la seule produite au cours du cycle de Krebs (Campbell, 2012). Ainsi le cycle de Krebs aboutit au bilan énergétique suivant :



1.2.2.2 Régulation du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs précède la synthèse d'ATP au cours de la phosphorylation oxydative, la vitesse du cycle de Krebs est donc modulée par les besoins en ATP de la cellule. Tout d'abord, la vitesse du cycle de Krebs dépend de la réaction de décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-coA permettant l'entrée d'acétyl-coA (à partir de glucose) dans le cycle de Krebs. L'activité de la pyruvate déshydrogénase qui catalyse cette réaction est elle-même régulée par la disponibilité en coenzyme A et en NAD^+ et par modification covalente de l'enzyme (phosphorylation). L'activité du cycle de Krebs dépend également de la vitesse de trois réactions limitantes du cycle : les réactions 1, 3 et 4 catalysées par les enzymes citrate synthase, isocitrate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase respectivement. Leur activité est régulée par un contrôle allostérique, par la disponibilité de leur substrat ou l'inhibition par leurs produits (Moussard, 2006).

1.2.3 La phosphorylation oxydative

Au cours du métabolisme énergétique, la phosphorylation oxydative représente la dernière étape des mécanismes d'oxydation. Elle permet la synthèse de la majorité de l'ATP nécessaire au fonctionnement cellulaire. Selon la théorie de couplage chimiosmotique formulée par P. Mitchell en 1961, la phosphorylation oxydative est un phénomène permettant la synthèse d'ATP grâce à l'énergie fournie par la chaîne de transport d'électrons (Mitchell, 1961; Campbell, 2012). Les coenzymes réduits NADH , H^+ et FADH_2 sont oxydés au niveau de la chaîne de transport d'électrons. Cela entraîne un transfert d'électrons tout au long de la chaîne respiratoire jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. En même temps, des protons sont acheminés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire générant un gradient électrochimique à travers la membrane interne ou force proton-motrice. Cette dernière est exploitée par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP (Figure 15).

1.2.3.1 La chaîne de transport d'électrons

La chaîne de transport d'électrons ou chaîne respiratoire est composée de quatre complexes fixes enchâssés dans la membrane interne mitochondriale :

- Le complexe I ou NADH déshydrogénase
- Le complexe II ou succinate déshydrogénase
- Le complexe III ou cytochrome c reductase
- Le complexe IV ou cytochrome c oxydase

Chaque complexe est constitué de sous unités protéiques associées à des groupements prosthétiques (cofacteurs essentiels aux fonctions catalytiques des enzymes) (Moussard, 2006). Les électrons sont transmis entre ces complexes par deux transporteurs mobiles d'électrons : le coenzyme Q ou ubiquinone et le cytochrome c (Figure 15). Les électrons sont transférés d'un complexe au suivant dont l'affinité pour les électrons est plus forte (fort potentiel d'oxydoréduction) que celle du complexe précédent (faible potentiel d'oxydoréduction). L'oxygène, accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire, présente l'affinité la plus forte, soit le potentiel d'oxydoréduction le plus élevé (Alberts, 2015).

1.2.3.2 Transport des électrons à travers les complexes de la chaîne respiratoire

❖ Le complexe I

Le NADH, H^+ a plusieurs origines puisqu'il provient de la glycolyse, de la décarboxylation oxydative du pyruvate, du cycle de Krebs ou encore de la β -oxydation des acides gras. Le NADH, H^+ cède deux électrons (et deux protons) au complexe I qui les transfère à l'ubiquinone via ses groupements prosthétiques FMN (flavine mononucléotide) et protéines à centre fer-soufre. Conjointement, quatre protons sont pompés au niveau du complexe I de la matrice vers l'espace intermembranaire (Moussard, 2006; Alberts, 2015).

❖ Le complexe II

Le complexe II est composé de l'enzyme succinate déshydrogénase à coenzyme FAD et de protéines à centre fer-soufre. La succinate déshydrogénase appartient à la fois au cycle de Krebs au cours duquel elle catalyse la sixième réaction (oxydation du succinate en fumarate) produisant du $FADH_2$ et à la chaîne respiratoire, au sein du complexe II. Le complexe II accepte deux électrons (et deux protons) du $FADH_2$ et les transmet via une série de protéines à centre Fer-soufre à l'ubiquinone.

L'ubiquinone est ainsi réduit en ubiquinol par le complexe I ou le complexe II. Il se déplace librement au sein de la membrane interne mitochondriale du complexe I ou II au complexe III grâce à son hydrophobicité et sa petite taille (Moussard, 2006).

❖ Le complexe III

Au niveau du complexe III, l'ubiquinol est oxydé par l'enzyme cytochrome c réductase. Deux électrons provenant de cette oxydation sont transférés par le complexe III au cytochrome c. Les groupements prosthétiques du complexe III assurant le transfert d'électrons sont deux cytochromes b, une protéine à centre Fer-soufre et le cytochrome c₁. Cette réaction est également couplée à une translocation de deux protons dans l'espace intermembranaire (Moussard, 2006; Osellame *et al.*, 2012; Alberts, 2015). Le cytochrome c est une petite protéine soluble qui se déplace sur la face cytosolique de la membrane interne du complexe III au complexe IV à qui elle cède deux électrons.

❖ Le complexe IV

Le complexe IV est composé d'un cytochrome a, d'un cytochrome a₃ et de deux ions cuivre qui font passer les électrons à un atome d'oxygène permettant la formation d'une molécule d'eau (H₂O). Quatre électrons (et quatre protons) sont donc nécessaires pour réduire une molécule d'oxygène (O₂) en deux H₂O. La translocation de quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire accompagne cette dernière étape de transport des électrons (Moussard, 2006; Osellame *et al.*, 2012; Alberts, 2015).

❖ Les supercomplexes

Des études ont montré qu'au sein des crêtes mitochondriales les complexes de la chaîne respiratoire s'assemblent en structures plus importantes, les supercomplexes. Ils sont formés d'une copie du complexe I, d'un dimère du complexe III et un monomère du complexe IV. Le rôle fonctionnel de ces structures n'est pas encore clairement défini, cependant certaines hypothèses ont été émises. Les supercomplexes permettraient notamment d'améliorer l'efficacité de transfert des électrons et de prévenir la génération d'ERO par le complexe I (Acin-Perez and Enriquez, 2014; Kühlbrandt, 2015).

1.2.3.3 Génération d'un gradient de protons

Chaque transfert d'électrons réalisé lors des réactions d'oxydoréduction au sein de la chaîne respiratoire libère de l'énergie. Cette énergie chimique est utilisée pour pomper des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire contre leur gradient de concentration. Les protons sont pompés au niveau des complexes I, III et IV ainsi appelés pompes à protons.

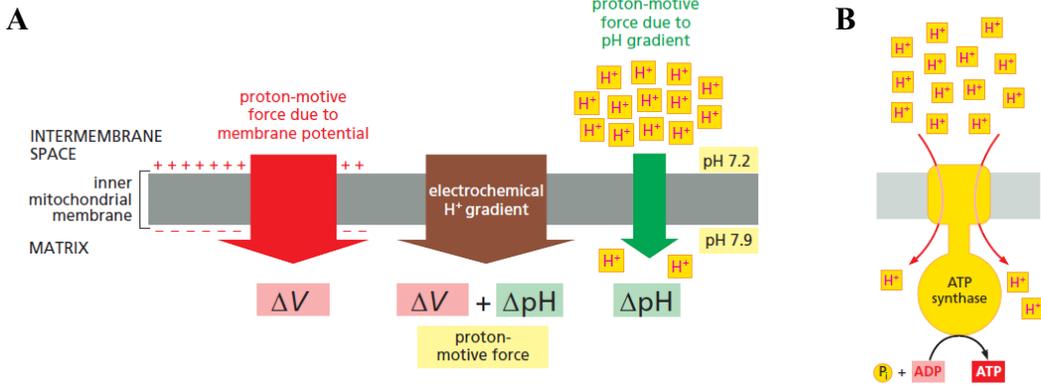


Figure 16 : Le gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale.
 A. Le pompage de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire permet de générer un gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale, mesuré en millivolts (mV). Il est composé d'une force importante due au potentiel de membrane (ΔV) et d'une force plus faible provenant du gradient de pH (ΔpH). La combinaison de ces deux forces génère une force proton-motrice qui renvoie les protons dans la matrice. B. Le retour des protons dans la matrice se fait à travers l'ATP synthase qui utilise le gradient électrochimique pour la synthèse d'ATP (d'après Alberts, 2015).

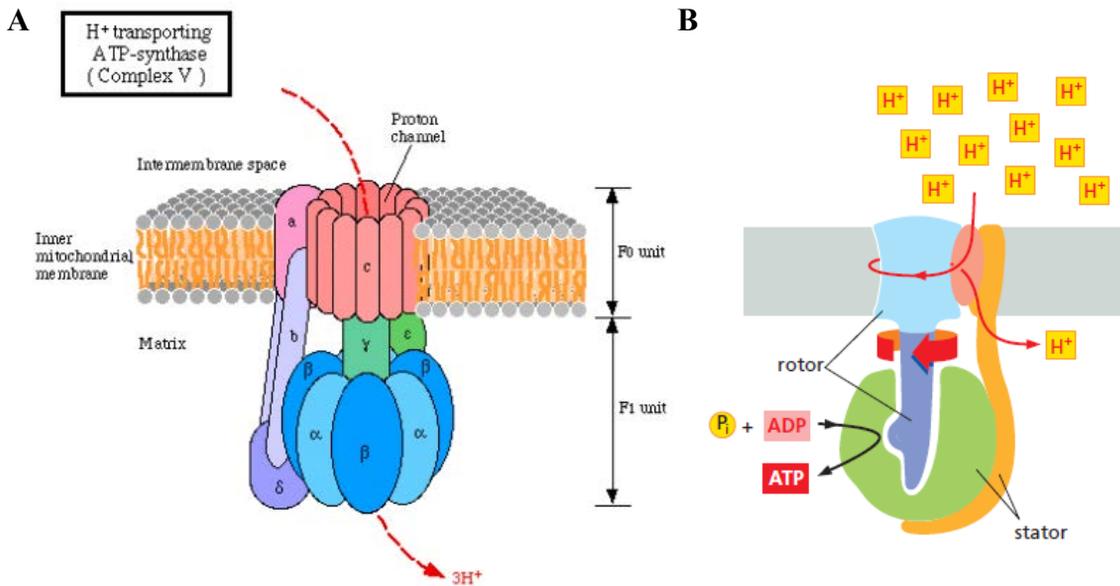


Figure 17 : L'ATP synthase. A. Ce complexe protéique est composé des domaines F_0 et F_1 . Le domaine F_0 est un canal à protons contenant les sous-unités a, b et c. Le domaine F_1 forme la partie soluble de l'ATP synthase comprenant les sous-unités α , β (où se situent les sites catalytiques de l'enzyme), γ , δ et ϵ . B. L'ATP synthase est apparentée à une turbine contenant un rotor mobile constitué des sous-unités c, γ et ϵ et d'un stator fixe constitué des sous-unités a, b, α , β et δ . A et B. Les protons entrent dans un canal de la sous-unité a et se lient aux sous-unités c du rotor. Celui-ci effectue un mouvement de rotation permettant de faire sortir les protons, par un autre canal de la sous-unité a, dans la matrice. La rotation du rotor entraîne une rotation de la sous-unité γ qui induit un changement conformationnel des sites catalytiques. Suite à ces changements, les sites catalytiques produisent de l'ATP à partir d'ADP et de P_i . Le passage de 3 protons est nécessaire à la synthèse d'une molécule d'ATP (d'après Alberts, 2015 et Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

En revanche, le complexe II ne peut pas pomper de protons car l'énergie libérée par les réactions d'oxydoréduction au niveau de ce complexe n'est pas suffisante (Moussard, 2016). Le pompage de protons permet de générer, à travers la membrane interne mitochondriale, un gradient de pH (ΔpH) avec un pH élevé dans la matrice (pH 7,9) et plus faible dans l'espace intermembranaire (avec une valeur de pH proche du cytosol de 7,4) ainsi qu'un potentiel de membrane (ΔV ou $\Delta\Psi\text{m}$) négatif du côté de la matrice et positif du côté de l'espace intermembranaire (Figure 16). Ces deux forces sont à l'origine du gradient de protons ou gradient électrochimique à travers la membrane interne mitochondriale (Alberts, 2015). Ce gradient exerce une force proton-motrice qui renvoie les protons, selon leur gradient de concentration, dans la matrice. Le reflux des protons se fait par le passage au travers de l'ATP synthase, conduisant à la phosphorylation d'ADP en ATP (Figure 16) (Campbell, 2012).

❖ L'ATP synthase

L'ATP synthase, aussi appelée complexe V, représente l'enzyme finale de la phosphorylation oxydative qui catalyse la synthèse d'ATP (Figure 15). Elle fait suite à la chaîne de transport des électrons au niveau des crêtes mitochondriales. L'ATP synthase est un gros complexe protéique de 600 kDa composé de 16 sous-unités, divisé en deux domaines fonctionnels : les domaines F_0 et F_1 (Figure 17A). Le domaine F_0 , enchâssé dans la membrane interne, forme un canal à protons et comprend les sous-unités a, b et c. Les sous-unités c s'associent pour former un anneau et chacune d'entre elles possède un site de liaison aux protons. Le domaine F_1 correspond à la partie soluble de l'ATP synthase sortant dans la matrice mitochondriale. Cinq sous-unités différentes constituent ce domaine : trois sous-unités α , trois sous-unités β ainsi que les sous-unités γ , δ et ϵ . Les sous-unités α et β sont regroupées entre elles sous la forme d'un hexamère et représentent la tête de l'enzyme. Les sites catalytiques de l'enzyme sont localisés au niveau des sous-unités β . L'ATP synthase peut être apparentée à une turbine moléculaire composée d'un rotor mobile composé des sous-unités c, γ et ϵ et d'un stator fixe constitué des sous-unités a, b, α , β et δ (Figure 17B). La sous-unité γ relie l'anneau formé par les sous-unités c du domaine F_0 au stator. Sous l'effet du gradient de concentration les protons pénètrent dans le domaine F_0 et se fixent à leur site de liaison. Le flux de protons génère de l'énergie qui conduit à la rotation du rotor, tout d'abord de l'anneau de sous-unités c, qui permet la sortie des protons dans la matrice mitochondriale. La rotation de cet anneau entraîne la rotation de la sous-unité γ induisant des changements conformationnels des sites catalytiques au niveau des sous-unités β . Ces changements permettent de rapprocher l'ADP et un phosphate inorganique pour

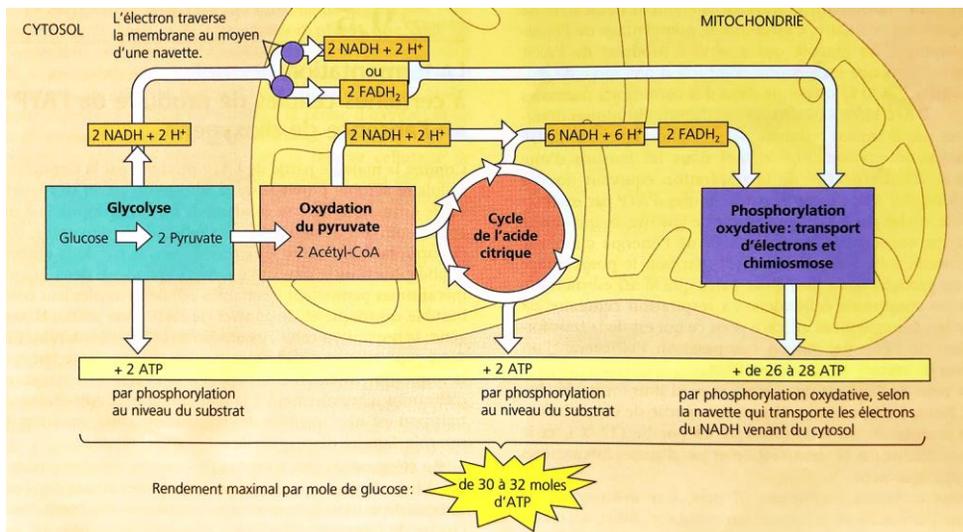


Figure 18: Le rendement en ATP suite à l'oxydation complète d'une molécule de glucose. La glycolyse et l'oxydation du pyruvate en acétyl-coA produisent chacune 2 molécules de NADH, le cycle de Krebs produit 6 molécules de NADH et 2 molécules de FADH_2 . Le NADH et le FADH_2 fournissent assez d'énergie pour la synthèse de 2,5 et 1,5 molécules d'ATP respectivement. Ainsi, en plus des 2 molécules d'ATP synthétisées lors de la glycolyse et le cycle de Krebs respectivement, la phosphorylation oxydative permet la synthèse de 28 molécules d'ATP. Au total, l'oxydation complète d'une molécule de glucose, en conditions aérobies, génère 32 molécules d'ATP (d'après Campbell, 2012).

former de l'ATP et le libérer dans la matrice mitochondriale (Figure 17A et B) (Campbell, 2012; Papa *et al.*, 2012; Alberts, 2015).

Par la suite, l'ATP produit est exporté dans le cytosol grâce à l'ATP/ADP translocase. Cette protéine située sur la membrane interne permet de transporter l'ATP dans l'espace intermembranaire en échange d'ADP cytosolique nécessaire à la synthèse d'ATP. Puis, l'ATP diffuse dans la membrane externe pour rejoindre le cytosol afin d'être utilisé lors de multiples travaux cellulaires (Moussard, 2006; Alberts, 2015).

Dans certaines conditions, l'ATP synthase peut fonctionner dans le sens inverse et avoir une activité ATPase hydrolysant l'ATP afin de générer un gradient électrochimique (Papa *et al.*, 2012).

Des études ont montré que les complexes d'ATP synthase ne sont pas disposés de façon aléatoire dans la membrane interne mais qu'ils sont organisés sous forme de dimères. Une telle disposition est nécessaire pour la formation des crêtes et leur stabilité (Alberts, 2015). Les dimères d'ATP synthase sont alignés à la pointe des crêtes mitochondriales entourés par les complexes de la chaîne respiratoire disposés le long des crêtes. Cette organisation améliore la diffusion des protons, apportés par les complexes de la chaîne respiratoire dans l'espace intermembranaire, vers ces dimères et leur utilisation par l'ATP synthase permettant de répondre efficacement à la demande énergétique des cellules (Alberts, 2015; Hahn *et al.*, 2016).

1.2.3.4 Rendement énergétique de la phosphorylation oxydative

Au total, la synthèse d'une molécule d'ATP par l'ATP synthase nécessite l'utilisation de 4 protons : le passage de trois protons dans le domaine F_0 est nécessaire pour produire une molécule d'ATP et un proton est réquisitionné pour le transport de l'ATP hors de la mitochondrie (Moussard, 2006). Sachant qu'avec une molécule de NADH, 10 protons sont pompés à travers la membrane interne, l'énergie générée par le NADH permet de synthétiser 2,5 molécules ATP. Cependant une molécule de $FADH_2$ génère assez d'énergie pour la synthèse de 1,5 molécules ATP. 2 molécules de NADH sont produites au cours de la glycolyse ainsi que par l'oxydation du pyruvate en acétyl-coA et 6 molécules de NADH et 2 molécules de $FADH_2$ sont générées lors du cycle de Krebs (Figure 18). Ainsi, le métabolisme oxydatif du glucose aboutit à l'obtention de 10 molécules de NADH et 2 molécules de $FADH_2$ utilisées lors de la phosphorylation oxydative pour synthétiser 28 molécules d'ATP. La glycolyse et le cycle de Krebs permettent la synthèse de 4 molécules d'ATP, par conséquent en aérobose, l'oxydation complète d'une molécule de glucose permet de générer 32 molécules d'ATP.

Tandis que seulement 2 molécules d'ATP sont produites en conditions anaérobies (Campbell, 2012).

1.2.3.5 Régulation de la phosphorylation oxydative

Le stockage d'ATP n'existe pas, c'est pourquoi une régulation fine de la phosphorylation oxydative est nécessaire pour répondre rapidement aux besoins énergétiques de la cellule. La phosphorylation oxydative est principalement régulée de deux manières : une régulation du taux de synthèse de l'ATP et une régulation de l'efficacité de couplage entre la consommation d'oxygène et la phosphorylation de l'ADP. La phosphorylation oxydative peut aussi être régulée par des processus plus généraux au niveau cellulaire.

1.2.3.5.1 Régulation du taux de synthèse d'ATP

Le taux de synthèse d'ATP est contrôlé par un mécanisme de rétrocontrôle qu'on appelle « contrôle respiratoire » qui permet d'adapter l'intensité de respiration à l'intensité d'utilisation de l'ATP. Ce mécanisme peut s'expliquer par la théorie chimiosmotique. L'entrée d'ADP dans la matrice mitochondriale stimule l'activité de l'ATP synthase qui va pomper des protons dans l'espace intermembranaire induisant une baisse du gradient électrochimique. La diminution du gradient stimule à son tour l'activité des pompes à protons de la chaîne respiratoire et donc la respiration. Un deuxième mécanisme de contrôle respiratoire est mis en jeu lorsque le ratio ATP/ADP mitochondrial est trop élevé. Dans ce cas, l'ATP est capable d'inhiber de façon allostérique la cytochrome c oxydase (Kadenbach, 2003).

1.2.3.5.2 Régulation de l'efficacité de couplage

L'efficacité de couplage est définie par la quantité de phosphate inorganique incorporé dans l'ATP par molécule d'oxygène consommé, correspondant au rapport P/O (Kadenbach, 2003). Le découplage indique les processus qui diminuent le rapport P/O. Ce paramètre varie soit par modification de l'efficacité de pompage de protons (découplage intrinsèque) soit par modification du gradient électrochimique (découplage extrinsèque).

❖ Découplage intrinsèque

Le découplage intrinsèque a lieu au sein des complexes de la chaîne respiratoire. Il concerne une variation de la stœchiométrie H^+/e^- et de la stœchiométrie H^+/ATP .

- Stœchiométrie H^+/e^-

Au sein de la chaîne respiratoire, le « patinage » des pompes à protons se traduit par une diminution du nombre de protons pompés pour un même nombre d'électrons transférés par la chaîne respiratoire. Il en résulte une diminution de la stœchiométrie H^+/e^- et donc du rapport

P/O. Ce découplage entre le transfert d'électrons et le pompage de protons, se déroulant au niveau de la cytochrome c oxydase, conduit à une augmentation de la consommation d'oxygène afin de maintenir le gradient de protons. Lorsque le potentiel de membrane est élevé, ce phénomène de « patinage » au niveau de la cytochrome c oxydase pourrait prévenir la production d'ERO (Kadenbach, 2003).

- Stœchiométrie H⁺/ATP

Un découplage au niveau de l'ATP synthase conduit à une diminution de la quantité d'ATP produite pour un flux de proton donné. Une augmentation de stœchiométrie H⁺/ATP est donc observée. Cependant, l'existence de ce phénomène *in vivo* est contesté.

❖ Découplage extrinsèque

Le découplage extrinsèque se traduit par une augmentation de la perméabilité aux protons et aux cations de la membrane interne mitochondriale. Par conséquent, une partie des protons retourne dans la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase. Ils ne participent donc pas à la synthèse d'ATP. Il en résulte une chute du gradient électrochimique. Ainsi, la consommation d'oxygène augmente pour maintenir le gradient électrochimique et compenser la fuite de protons. La fuite de protons peut être basale ou inductible.

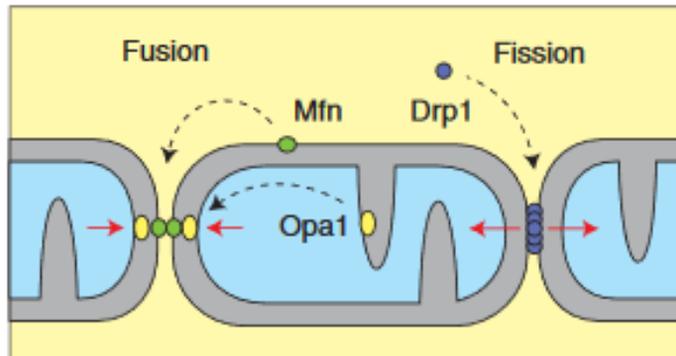
La fuite de protons basale est uniquement liée aux propriétés physicochimiques de la membrane interne et n'est pas régulée.

La membrane interne mitochondriale contient des protéines particulières qui catalysent la fuite de protons inductible. Les protéines découplantes UCP (uncoupling protein) transportent les protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale et diminuent le gradient électrochimique (Jastroch *et al.*, 2010). La famille des UCP comprend 5 isoformes. UCP1 est présente dans le tissu adipeux brun où elle est impliquée dans la thermogénèse. UCP2 est exprimée de façon ubiquitaire alors qu'UCP3 est principalement exprimée dans le muscle squelettique et le cœur. UCP4 et 5 sont majoritairement exprimées au niveau du cerveau (Kadenbach, 2003). Les fonctions des UCP ne sont pas clairement définies cependant Brand et son équipe ont suggéré que ces protéines ont un rôle protecteur face à la production d'ERO et les dommages associés (Brand *et al.*, 2004). Outre les UCP, l'ATP/ADP translocase serait également impliquée dans le découplage extrinsèque induit par les acides gras.

1.2.3.5.3 La biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale implique la formation et la division des mitochondries déjà formées. Elle est déclenchée par des stress environnementaux (exercice, restriction calorique et

A



B

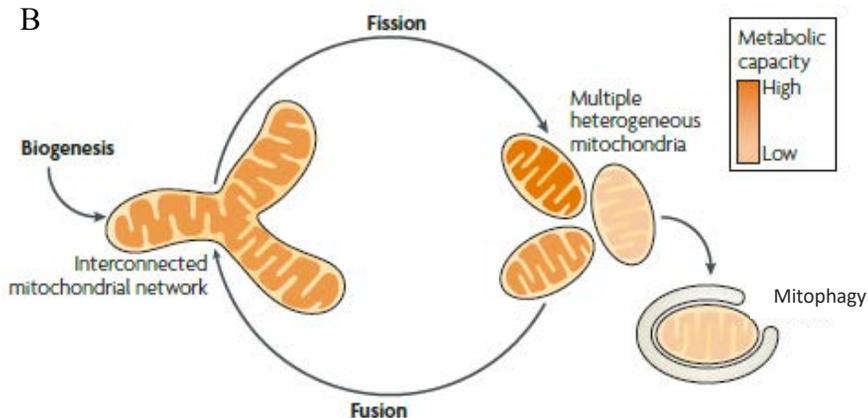


Figure 19 : Dynamique mitochondriale. Les mitochondries sont des organites dynamiques capables de phénomènes de fusion et de fission coordonnés par des protéines spécifiques. A. Lors de la fusion, les mitofusines (Mfn) permettent la fusion des membranes externes alors qu'Opa1 est impliqué dans la fusion des membranes internes. La fission est quant à elle contrôlée par Drp1 (dynamin related protein 1). B. Le cycle de vie d'une mitochondrie débute par la croissance et la division de mitochondries déjà existantes (biogenèse) et se termine par la dégradation via le processus de mitophagie lorsque la mitochondrie est endommagée. Entre les deux, la mitochondrie évolue en fonction des besoins de la cellule et des conditions physiologiques. La fusion mitochondriale permet la formation d'un réseau mitochondrial interconnecté, augmentant l'activité respiratoire pour répondre à une demande énergétique. La fission permet de répartir les mitochondries notamment après un excédent métabolique (d'après Van der Blieck *et al.*, 2013 et Westermann, 2010).

stress oxydant), la division cellulaire ou la différenciation. La biogenèse mitochondriale nécessite la coordination de l'expression de nombreux gènes provenant de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial. Les protéines codées par le génome nucléaire sont synthétisées dans le cytosol et doivent être importées dans les mitochondries grâce à des translocases situées au niveau de la membrane externe mitochondriale, les TOM (translocase of the outer mitochondrial membrane), et des translocases situées au niveau de la membrane interne, les TIM (translocase of the inner mitochondrial membrane). De nombreux facteurs régulent la biogenèse mitochondriale dont le co-activateur transcriptionnel PGC1- α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α) occupant une place centrale dans la régulation de ce processus. PGC1- α est un régulateur du métabolisme mitochondrial, il stimule l'expression de gènes mitochondriaux codant des enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (Lin *et al.*, 2005).

1.2.3.5.4 Dynamique mitochondriale et phosphorylation oxydative

Les mitochondries sont des structures dynamiques pouvant switcher d'un état sous forme de réseau allongé et interconnecté à un état fragmenté par des événements de fusion et fission mitochondriales (Figure 19). Cette dynamique permet aux mitochondries de s'adapter aux conditions physiologiques et à la demande énergétique des cellules. Les mitochondries peuvent également réorganiser leur structure interne en modifiant la forme des crêtes mitochondriales. La morphologie et la dynamique mitochondriales sont régies par une famille de protéines, les protéines impliquées dans la morphologie mitochondriale (mitochondrial-shaping proteins) (Cogliati *et al.*, 2016; Wai and Langer, 2016). La fusion mitochondriale correspond à un assemblage de mitochondries orchestrée par des GTPases appartenant à la famille des dynamines, les Mfn1 et 2 (mitofusine 1 et 2) pour la fusion des membranes externes et Opa 1 (optic atrophy 1) pour la fusion des membranes internes (Wai and Langer, 2016). Opa 1 présente également un rôle fondamental dans l'architecture et le remodelage des crêtes mitochondriales (Cogliati *et al.*, 2016). La fusion mitochondriale s'établit lors d'une pénurie métabolique, elle permet d'augmenter l'activité respiratoire afin de répondre à la demande énergétique. Le processus de fission, au cours duquel une mitochondrie est séparée en deux, est réalisé grâce à une GTPase appartenant à la famille des dynamines, Drp1 (dynamine related protein 1). La fission permet de répartir les mitochondries au cours de la division cellulaire, il survient aussi lors d'un dysfonctionnement cellulaire, en cas d'apoptose ou après un excédent métabolique induisant une diminution de l'activité respiratoire pour éviter le gaspillage d'énergie (Schrepfer and Scorrano, 2016). Le processus de fission contribue également à l'élimination des

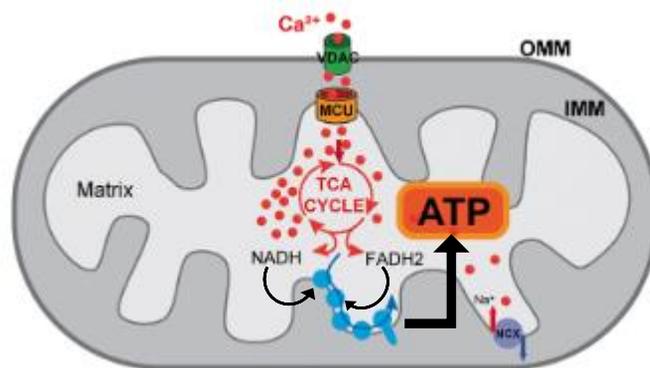


Figure 20 : La signalisation calcique joue un rôle dans le métabolisme mitochondrial. L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique induit l'entrée de Ca²⁺ dans la matrice mitochondriale. Le Ca²⁺ passe à travers la membrane mitochondriale externe via les canaux VDAC (Voltage-dependent anion channel) puis par les canaux MCU (mitochondrial Ca²⁺ uniporter) pour passer la membrane mitochondriale interne. Dans la matrice mitochondriale, le Ca²⁺ active des enzymes du cycle de Krebs stimulant son fonctionnement. Ainsi une quantité plus importante de NADH est transférée à la chaîne respiratoire augmentant son activité ainsi que la synthèse d'ATP. IMM, inner mitochondrial membrane; OMM, outer mitochondrial membrane (adapté de Mammucari *et al.*, 2018).

mitochondries endommagées grâce à un mécanisme de dégradation autophagique spécifique, la mitophagie. Cela permet de conserver une activité respiratoire optimale (Osellame *et al.*, 2012). Par ailleurs, les protéines impliquées dans la morphologie mitochondriale jouent un rôle dans la régulation du métabolisme mitochondrial. Dans différents modèles cellulaires il a été montré que la déplétion de Mfn2 entraîne une diminution de la consommation d'oxygène et du potentiel de membrane mitochondrial ainsi qu'une sous-régulation de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (Schrepfer and Scorrano, 2016). La forme des crêtes mitochondriales, régulée par Opa1, joue un rôle important dans l'assemblage et la stabilité des supercomplexes contrôlant ainsi l'efficacité de la chaîne respiratoire (Cogliati *et al.*, 2013).

1.2.4 Implication de la mitochondrie dans d'autres processus cellulaires

1.2.4.1 La signalisation calcique

La mitochondrie communique de façon permanente avec le cytosol dans le but de préserver une homéostasie énergétique garantissant un apport suffisant en énergie par la phosphorylation oxydative. En ce sens, la signalisation calcique joue un rôle important dans la communication entre ces deux compartiments. L'ion calcium (Ca^{2+}) est un second messager pilotant des processus cellulaires tels que la sécrétion, la contraction musculaire, la migration ou encore la prolifération cellulaire qui nécessitent un apport énergétique.

Une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) permet d'activer des transporteurs mitochondriaux liant le Ca^{2+} tel que le transporteur aspartate/glutamate (ARALAR) situé sur la membrane mitochondriale interne. Ce transporteur transfère du NADH du cytosol vers la matrice mitochondriale pour alimenter la chaîne respiratoire et produire de l'ATP. La hausse de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induit également l'entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale selon son gradient de potentiel électrochimique. Les canaux VDAC (voltage-dependent activated channels) permettent le passage du Ca^{2+} à travers la membrane mitochondriale externe puis les canaux MCU (mitochondrial calcium uniporter) facilitent le passage au travers de la membrane mitochondriale interne (Figure 20). L'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie provoque une hausse la concentration de Ca^{2+} mitochondriale ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) qui active certaines enzymes du cycle de Krebs et l'ATP synthase. L'ensemble de ces mécanismes permet d'apporter davantage de substrats à la chaîne respiratoire augmentant ainsi son activité et la synthèse d'ATP (Osellame *et al.*, 2012; Bhosale *et al.*, 2015). De plus la mitochondrie agit comme un tampon de Ca^{2+} intracellulaire puisque l'accumulation de Ca^{2+} au sein de la mitochondrie entraîne une diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ permettant de réguler la signalisation calcique (Bhosale *et al.*, 2015).

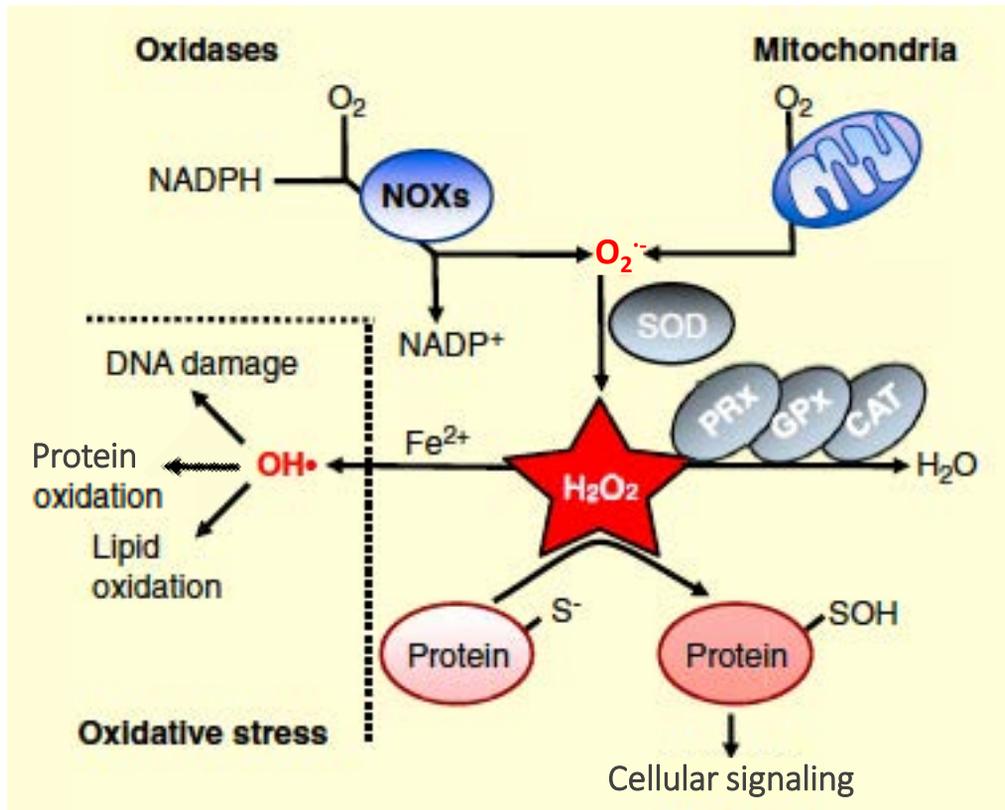


Figure 21 : Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et système antioxydant. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est produit par une fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire capables de réagir avec l'oxygène ou par l'oxydation du NADPH par l'enzyme NOX (NADPH oxydase). L' $O_2^{\cdot-}$ est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). Des enzymes antioxydantes, comme la peroxyrédoxine (Prx), la glutathion peroxydase (Gpx) et la catalase (Cat), prennent en charge l' H_2O_2 et le transforment en H_2O . Les ERO ont des effets délétères ou bénéfiques dans les cellules. L'ion $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 peuvent subir la réaction de Fenton et être à l'origine du radical hydroxyle ($OH\cdot$). Ce dernier est un radical très réactif qui provoque des dommages oxydatifs au niveau des lipides, des protéines et de l'ADN conduisant à un stress oxydant. Les ERO ont également un rôle physiologique en stimulant des voies de signalisation cellulaires (adapté de Schieber and Chandel, 2014).

1.2.4.2 Production d'ERO

Les ERO sont des espèces chimiques réactives intracellulaires dérivées de l' O_2 . Cette famille de composés comprend des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Moussard, 2006; Glasauer and Chandel, 2013).

La mitochondrie représente la source majeure d'ERO. La génération d'ERO provient principalement de la phosphorylation oxydative mais les ERO peuvent également être produits par l' α -cétoglutarate déshydrogénase appartenant au cycle de Krebs et la monoamine oxydase, enzyme localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006a). Outre la mitochondrie, de nombreuses enzymes peuvent réduire l' O_2 en $O_2^{\bullet-}$ notamment la NADPH oxydase (NOX) située sur la membrane plasmique et d'autres membranes cellulaires comme celle du réticulum endoplasmique (RE) (Figure 21).

Au cours de la phosphorylation oxydative, des électrons peuvent « fuiter » et quitter la chaîne respiratoire au niveau du complexe I majoritairement et des complexes II et III. Ils ont la possibilité de réagir avec une molécule d' O_2 qui subit alors une réduction incomplète par un électron à l'origine de la formation d' $O_2^{\bullet-}$ dans la matrice mitochondriale (Figure 21). Ce radical possède un électron célibataire sur sa couche périphérique, le rendant instable et réactif. L' $O_2^{\bullet-}$ est rapidement pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme antioxydante, qui le convertit en H_2O_2 (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006a). En présence d'ions Fe^{2+} ou Cu^+ , H_2O_2 est converti par la réaction de Fenton en un radical très réactif, l' OH^{\bullet} (Moussard, 2006 ; Schieber and Chandel, 2014).

La génération d'ERO dépend du fonctionnement de la phosphorylation oxydative. Un défaut d'activité ou d'assemblage du complexe I de la chaîne respiratoire résulte en une augmentation de la production d' $O_2^{\bullet-}$, une surexpression de SOD et donc en une augmentation d' H_2O_2 (Papa *et al.*, 2012). D'autre part, lorsque l'ATP synthase est peu active, la présence d'un fort $\Delta\Psi_m$ et d'un ratio $NADH/NAD^+$ élevé contribuerait à la formation d'ERO (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006a). Une importante accumulation de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale semble également être à l'origine de la production d'ERO.

En fonction de leur quantité dans la cellule, les ERO peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères pour la cellule. Une production excessive d'ERO est néfaste pour la cellule puisqu'ils oxydent de manière incontrôlée et irréversible certains constituants cellulaires : les protéines, les lipides et l'ADN conduisant à un stress oxydant et à des dommages cellulaires (Brand *et al.*,

2004). En revanche la production d'une quantité modérée d'ERO présente un rôle physiologique par la stimulation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la régulation de l'adaptation métabolique et de l'immunité innée et adaptative (Sena and Chandel, 2012; Glasauer and Chandel, 2013). En effet, H₂O₂ induit l'oxydation des groupements thiols des cystéines conduisant à un changement allostérique des protéines et à l'altération de leur fonction au sein d'une voie de signalisation. Dans ce contexte, certaines phosphatases comme PTEN se retrouvent oxydées par H₂O₂, il en résulte une inhibition de leur activité déphosphorylante et donc une activation des voies de signalisation PI3K/AKT et Ras/MAPK (Schieber and Chandel, 2014).

Les ERO jouent également un rôle important dans les fonctions des cellules souches. Au sein des cellules souches hématopoïétiques, un faible niveau d'ERO est requis pour activer les voies de prolifération. En revanche, un niveau élevé d'ERO altère leur fonction d'autorenouvellement (Schieber and Chandel, 2014).

Au vu des fonctions physiologiques importantes auxquelles participent les ERO, leur quantité doit être finement régulée. Pour cela, un système antioxydant est présent dans le but de neutraliser les ERO et protéger les cellules de dommages à l'ADN. Le système antioxydant est composé d'antioxydants et d'enzymes antioxydantes. Les antioxydants tels que le glutathion et les vitamines A, C et E ont pour but de piéger les radicaux libres. Quant à la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) et la peroxyredoxine, ce sont des enzymes antioxydantes qui transforment l'H₂O₂ en H₂O (Sena and Chandel, 2012).

La balance entre la production et l'élimination d'ERO est essentielle et le déséquilibre, notamment lorsque des ERO échappent au système antioxydant, peut être délétère. Des niveaux élevés d'ERO sans élimination par le système antioxydant sont impliqués dans certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le diabète et le cancer (Glasauer and Chandel, 2013). Ces niveaux élevés d'ERO stimulent également l'expression de pro-oxydants impliqués dans le déclenchement de l'apoptose.

1.2.4.3 L'apoptose

La mitochondrie est impliquée dans un processus physiologique majeur, la mort cellulaire programmée par apoptose. Ce processus correspond à une séquence d'événements moléculaires conduisant à la destruction d'une cellule endommagée ou infectée. Les cellules qui entrent en apoptose subissent des changements morphologiques caractéristiques : rétrécissement cellulaire, désorganisation du cytosquelette, désassemblage de l'enveloppe nucléaire,

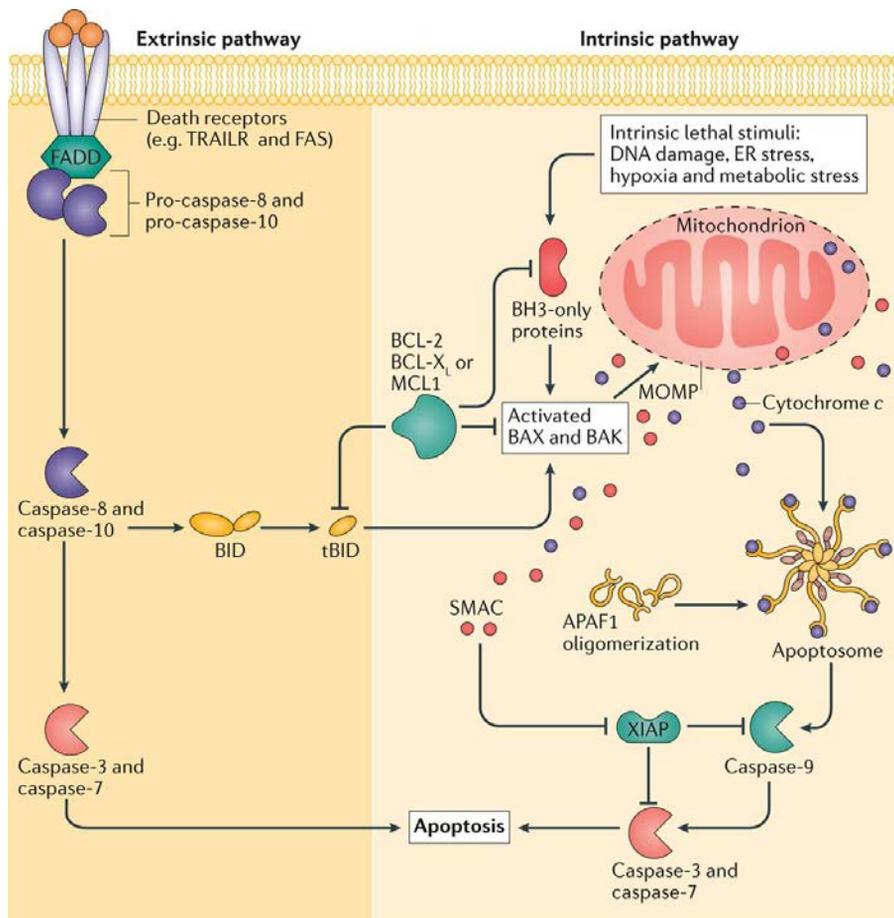


Figure 22 : Déclenchement de l'apoptose par les voies extrinsèque et intrinsèque. Dans la voie extrinsèque, suite à la fixation de leur ligand extracellulaire, les récepteurs de mort sont activés. Ils recrutent ainsi des protéines adaptatrices comme FADD (Fas-associated protein with death domain) qui se lie aux pro-caspases initiatrices 8 et 10 permettant de les activer. Les caspases initiatrices activent ensuite les caspases effectrices 3 et 7 menant à l'apoptose. Les caspases initiatrices de la voie extrinsèque peuvent induire la voie intrinsèque par clivage de la protéine pro-apoptotique Bid en tBid. La voie intrinsèque est déclenchée par un stress cellulaire qui induit une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) via l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Ces protéines forment des pores au niveau de la membrane externe ce qui permet la libération de nombreuses protéines dans le cytoplasme comme le cytochrome c et Smac/DIABLO. Le cytochrome c se lie à Apaf-1 pour former l'apoptosome qui active la caspase initiatrice 9. Celle-ci active ensuite les caspases effectrices 3 et 7 induisant l'apoptose. Le déclenchement d'apoptose peut être inhibé soit par l'action de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL) soit par l'inhibition des caspases par XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (d'après Ichim and Tait, 2016).

condensation de la chromatine et bourgeonnement de la membrane plasmique. Ces évènements conduisent à la fragmentation des cellules en corps apoptotiques phagocytés ensuite par les cellules voisines (Alberts, 2015). L'apoptose est un mécanisme physiologique impliqué dans l'homéostasie tissulaire et le développement de l'organisme. Si l'apoptose est dérégulée, elle peut être à l'origine de certaines pathologies comme les maladies neurodégénératives ou certains types de cancer (Elmore, 2007).

Lors de l'apoptose, les changements morphologiques sont induits par des protéases intracellulaires appelées caspases. Elles possèdent une cystéine dans leur site actif et clivent spécifiquement des protéines au niveau d'un acide aspartique (Alberts, 2015). Ces protéases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, les procaspases, puis activées lors du déclenchement de l'apoptose. Les caspases intervenant dans l'apoptose sont divisées en deux catégories : les caspases initiatrices qui regroupent les caspases 2, 8, 9 et 10 et les caspases effectrices comprenant les caspases 3, 6 et 7. Les caspases initiatrices s'associent sous forme de dimères conduisant à leur activation. Par clivage, elles activent ensuite les caspases effectrices, qui à leur tour clivent des protéines cibles. Les caspases effectrices activent des endonucléases dégradant le matériel nucléaire ainsi que des protéases dégradant des protéines nucléaires et cytoplasmiques. Plus de cent protéines sont la cible des caspases effectrices comme les lamines nucléaires, les protéines composant le cytosquelette ou des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telle que PARP (Elmore, 2007; Alberts, 2015). Cette suite d'évènements de clivage correspond à la cascade protéolytique ou cascade de caspases dont le déclenchement est orchestré par deux mécanismes distincts : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

La voie extrinsèque implique la fixation d'une protéine signal extracellulaire sur un récepteur de mort à la surface cellulaire (Figure 22). Les récepteurs de mort sont des protéines transmembranaires contenant : un domaine de liaison au ligand extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine de mort intracellulaire. Ils appartiennent à la famille des récepteurs du TNF (tumor necrosis factor) qui inclue les récepteurs et leurs ligands correspondants TNFR/TNF, FasR/Fas et TRAIL-R/TRAIL (Elmore, 2007). Une fois le récepteur activé par fixation de son ligand, le domaine de mort intracellulaire recrute une protéine adaptatrice comme FADD (Fas-associated protein with death domain) ou TRADD (TNFR1-associated death domain). A son tour, la protéine adaptatrice se lie aux pro-caspases initiatrices 8/10 formant ainsi un complexe appelé DISC (death-inducing signaling complex).

La formation de ce complexe permet l'activation des caspases initiateuses initiant la cascade protéolytique (Elmore, 2007).

La voie extrinsèque peut être inhibée, notamment par la protéine c-Flip. En s'associant à la caspase 8 au sein du complexe DISC, c-Flip rend le complexe inefficace pour activer la caspase (Elmore, 2007).

La voie intrinsèque est quant à elle dépendante de la mitochondrie (Figure 22). En réponse à un stress cellulaire comme un stress du RE ou des dommages à l'ADN, les cellules empruntent cette voie pour activer leur programme apoptotique. Ce processus débute par la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe aboutissant à la libération dans le cytoplasme de protéines de l'espace intermembranaire comme Smac/DIABLO, l'endonucléase G, AIF (apoptosis-inducing factor) ou encore le cytochrome c capable d'activer la cascade de caspases. Une fois libéré dans le cytoplasme, le cytochrome c se lie à la protéine adaptatrice Apaf-1 (apoptotic protein activating factor-1) pour former un complexe nommé apoptosome. Ce complexe recrute la pro-caspase initiateuse 9 et l'active. La caspase 9 active ensuite les caspases effectrices. L'endonucléase G et AIF migrent dans le noyau et provoquent la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. Quant à la protéine Smac/DIABLO, elle inhibe les protéines IAP (inhibitor of apoptosis proteins), telle que XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), qui ont pour fonction d'inactiver les caspases (Alberts, 2015; Abate *et al.*, 2019).

La perméabilité de la membrane mitochondriale externe est régulée par des protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Les membres de cette famille possèdent au moins un domaine BH (Bcl2 homology). Cette famille est divisée en deux groupes :

- Les protéines anti-apoptotiques empêchant l'activation de la voie intrinsèque. Elles possèdent quatre domaines BH et incluent les protéines Bcl-2 et Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large)
- Les protéines pro-apoptotiques activant la voie intrinsèque, subdivisées en deux catégories. Les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax sont composées de trois domaines BH. Les protéines pro-apoptotiques telles que Bad, Bid et Bim sont dotées d'un seul domaine BH3.

Lors d'un stimulus apoptotique, les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax sont activées et s'agrègent pour former un pore au niveau de la membrane mitochondriale externe à l'origine de sa perméabilisation. Parallèlement, Bid déclenche le remodelage des crêtes mitochondriales

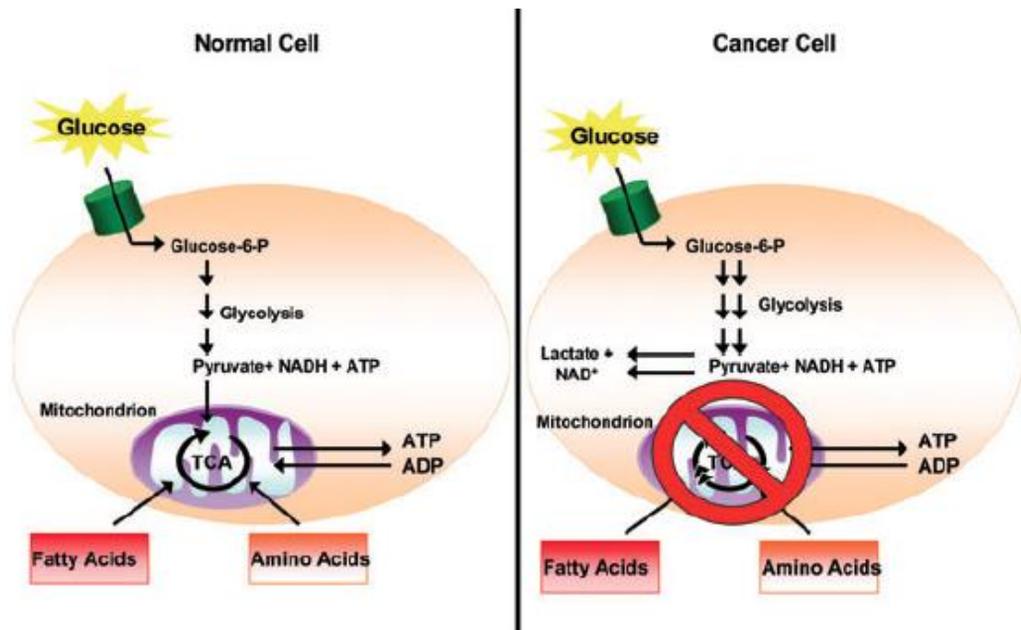


Figure 23 : L'hypothèse d'Otto Warburg. Les cellules normales utilisent majoritairement la phosphorylation oxydative pour leur production énergétique. Selon la théorie de l'effet Warburg, contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses présentent une phosphorylation oxydative déficiente. Elles reposent alors sur une activité glycolytique élevée pour produire l'ATP nécessaire à la prolifération des cellules cancéreuses, même en présence d'oxygène (d'après Weinberg and Chandel, 2009).

contribuant également au relargage du cytochrome c (Abate *et al.*, 2019). Les protéines pro-apoptotiques à un seul domaine BH3 inhibent l'activité des protéines anti-apoptotiques. Lorsque l'apoptose n'est pas nécessaire, celles-ci se lient aux protéines pro-apoptotiques afin d'empêcher leur oligomérisation.

Les ERO sont impliqués dans le processus d'apoptose. Des dommages à l'ADN peuvent induire une augmentation du niveau d'ERO qui déstabilisent la membrane mitochondriale externe et modifient sa perméabilité. D'autre part, il existe aussi un mécanisme d'apoptose indépendant des caspases et l'augmentation de la production d'ERO suite à un dommage mitochondrial, pourrait en être le facteur principal (Hongmei, 2012).

2. Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses

La reprogrammation du métabolisme énergétique est une caractéristique majeure des cellules cancéreuses afin de soutenir la croissance et la division cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Dès lors il est intéressant d'exploiter cette caractéristique afin de développer une nouvelle stratégie thérapeutique.

2.1 L'effet Warburg

Dans les années 1920, l'équipe d'Otto Warburg a montré pour la première fois qu'en condition aérobie la production de lactate et le taux de consommation de glucose des tissus cancéreux sont plus élevés que dans les tissus sains (Warburg, 1956). Ils émettent alors l'hypothèse qu'au sein des cellules cancéreuses, les mitochondries sont défectueuses et présentent un défaut de phosphorylation oxydative. Les cellules ont alors recours à la glycolyse pour compenser la production d'ATP, même en présence d'oxygène (Figure 23). Ce phénomène appelé effet Warburg a par la suite été observé dans différents types de tumeurs : colorectales, mammaires, pulmonaires ou encore dans les glioblastomes (Potter *et al.*, 2016; Warburg, 1956).

En clinique, cette caractéristique métabolique est exploitée par la tomographie à émission de positons couplée à un scanner (TEP Scan). Cette technique d'imagerie repose sur l'injection dans la circulation sanguine d'un traceur radioactif comme le FDG (2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose). Cet analogue du glucose non métabolisable et marqué radioactivement permet de visualiser les tissus tumoraux dans lesquels il s'accumule contrairement aux tissus sains. La technique de TEP scan est utilisée pour le diagnostic et le suivi de la progression de certains cancers comme le cancer du poumon ou le cancer colorectal (Gambhir, 2002).

Dans les cellules cancéreuses, la stimulation de la glycolyse dépend de l'augmentation de la transcription des gènes codant les transporteurs de glucose, particulièrement les transporteurs de glucose GLUT1 et 3, et les enzymes glycolytiques, comme l'hexokinase 1 et 2 (HK 1 et 2) et la phosphofructokinase 1 et 2 (Gatenby and Gillies, 2004; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007, 2014). La surexpression des GLUT permet d'augmenter l'import du glucose dans le cytoplasme. L'isoforme GLUT1 est la plus exprimée dans la plupart des cancers tels que les cancers du sein, colorectaux et de la prostate. Dans certains cas, sa surexpression est associée à une agressivité tumorale et à un faible taux de survie (San-Millán and Brooks, 2016). L'isoforme GLUT3 est exprimée dans des tumeurs pulmonaires, gastriques et ovariennes alors qu'elle n'est normalement pas présente dans le tissu sain (Wood and Trayhurn, 2003; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). L'hexokinase 2 est l'isoforme prédominante dans les cellules cancéreuses contrairement aux tissus sains où elle ne prédomine que dans les cellules adipeuses et les muscles squelettiques malgré une faible activité (Pedersen *et al.*, 2002). Cette enzyme est capable de se lier aux VDAC situés sur la membrane mitochondriale externe. Elle a donc un accès direct à l'ATP synthétisé dans la mitochondrie pouvant être utilisé pour le fonctionnement glycolytique. De plus, la fixation de l'hexokinase 2 aux VDAC empêche leur interaction avec la protéine pro-apoptotique Bax et pourrait ainsi empêcher le déclenchement de l'apoptose. L'hexokinase 2, surexprimée dans des cancers de mauvais pronostic, offre donc un double avantage aux cellules cancéreuses (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; Porporato *et al.*, 2011). Une autre enzyme glycolytique qui réduit le pyruvate en lactate, la LDH-A, est également surexprimée dans de nombreux types de cancer (DeBerardinis *et al.*, 2008; San-Millán and Brooks, 2016). La pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) est une enzyme qui inhibe la PDH, enzyme à l'origine de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA qui alimente le cycle de Krebs qui fournit des coenzymes réduits à la phosphorylation oxydative. Souvent, dans les cellules cancéreuses, l'expression du gène de la PDK1 est stimulée, ce qui entraîne une diminution de l'apport en acétyl-CoA au cycle de Krebs impactant ainsi le fonctionnement de la phosphorylation oxydative et favorisant la déviation du pyruvate vers la production de lactate (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Weinberg and Chandel, 2009; San-Millán and Brooks, 2016).

2.2 Importance de la glycolyse aérobie pour les cellules cancéreuses

Puisque la glycolyse est énergétiquement contre-intuitive avec une production d'ATP environ 16 fois moins efficace que par la phosphorylation oxydative, quels avantages présente la stimulation glycolytique pour les cellules cancéreuses ? Ce phénomène a fait l'objet d'un nombre considérable d'études et plusieurs hypothèses ont vu le jour. A l'origine, Warburg a

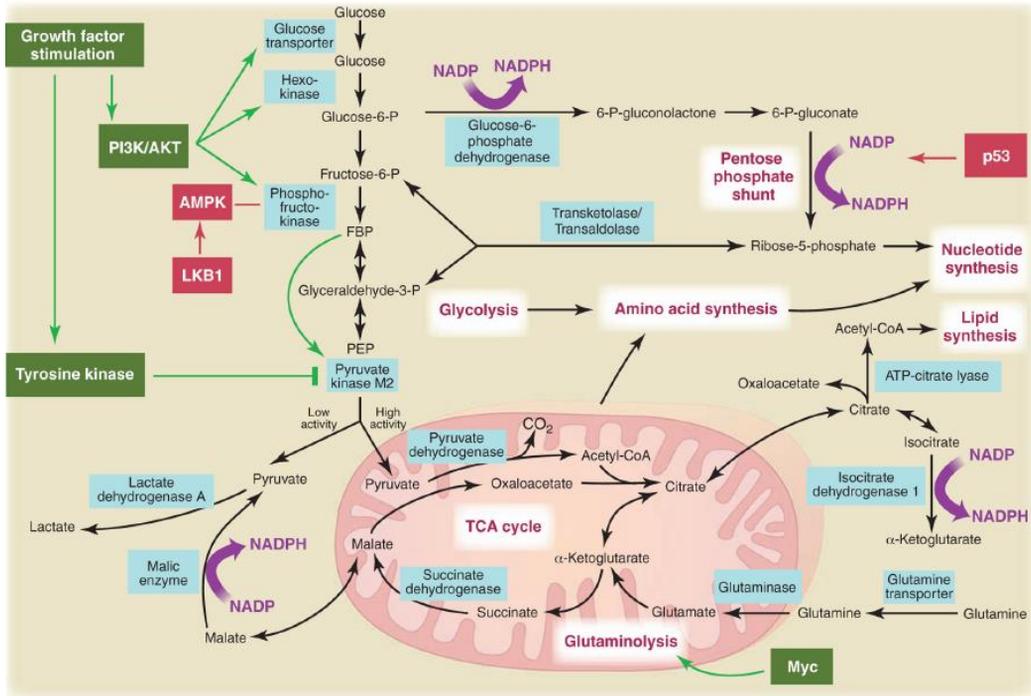


Figure 24 : Contribution de la glycolyse et du métabolisme mitochondrial pour la prolifération des cellules cancéreuses. Les intermédiaires métaboliques issus de la glycolyse et du cycle de Krebs servent de précurseurs aux processus de biosynthèse de macromolécules et participent également à la synthèse de NADPH, cofacteur possédant un rôle antioxydant. Le métabolisme de la glutamine alimente le cycle de Krebs. L'interconnexion de ces différentes voies a pour but de maintenir la biosynthèse et l'homéostasie redox des cellules cancéreuses nécessaires à leur croissance et leur prolifération. Les voies métaboliques sont contrôlées par plusieurs oncogènes (vert) et gènes suppresseurs de tumeur (rouge). LKB1, liver kinase B1 (d'après Vander Heiden *et al.*, 2009).

avancé l'idée que la glycolyse était stimulée en réponse à un défaut de fonctionnement mitochondrial dans les cellules cancéreuses (Warburg, 1956). Son hypothèse a rapidement été contestée par les travaux de Weinhouse suggérant que les mitochondries au sein des tissus cancéreux ne sont pas défectueuses et qu'elles ont la capacité de réaliser la phosphorylation oxydative aussi efficacement que dans les tissus sains (Weinhouse *et al.*, 1956; Frezza and Gottlieb, 2009). Cependant des travaux ont montré que certaines tumeurs présentent un défaut respiratoire pouvant être lié à une sous régulation des gènes de la phosphorylation oxydative (tumeurs du cerveau, du côlon et du pancréas) ou à une anomalie morphologique des mitochondries (Seyfried, 2012; Hu *et al.*, 2013). Dans les gliomes, ce défaut de fonctionnement mitochondrial pourrait être à l'origine du shift énergétique de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse (Seyfried, 2012). Néanmoins, même dans les tumeurs qui dépendent fortement de la glycolyse, la phosphorylation oxydative n'est pas complètement inactive (Cairns *et al.*, 2011). La stimulation de l'activité glycolytique ne peut donc pas être expliquée uniquement par un défaut respiratoire.

Une autre hypothèse repose sur la production d'ATP. Le glucose est apporté par la circulation sanguine de façon constante, il représente donc le nutriment extracellulaire le plus important auquel les cellules sont exposées pour produire de l'ATP (DeBerardinis *et al.*, 2008; Vander Heiden *et al.*, 2009). Même si le rendement en ATP est moindre par rapport à la phosphorylation oxydative, la glycolyse produit de l'ATP plus rapidement ce qui représente un avantage pour la prolifération rapide des cellules cancéreuses. Notamment, si le flux glycolytique est assez puissant, le pourcentage d'ATP produit peut surpasser celui de la phosphorylation oxydative (Warburg, 1956). Malgré une activité glycolytique accrue, elle ne semble contribuer que partiellement à la production d'ATP en association avec la phosphorylation oxydative et ce, à un degré différent selon les études et les lignées cellulaires allant de 10 à 70% (Zu and Guppy, 2004; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). En effet, à partir de la compilation de données de la littérature, une équipe a déterminé la contribution de la glycolyse à la génération d'ATP dans les cellules cancéreuses (en mesurant la production de lactate et la consommation d'oxygène) : seulement 17% de la production totale d'ATP des cellules cancéreuses proviennent de la glycolyse (Zu and Guppy, 2004).

Au-delà de la production d'ATP, la glycolyse aérobie est essentielle pour les cellules cancéreuses afin de répondre aux besoins de biomasse nécessaire à leur prolifération rapide et à leur réplication. La glycolyse est source de précurseurs pour les processus de biosynthèse (Figure 24). Les intermédiaires métaboliques issus de la glycolyse peuvent être dirigés vers les

voies anaboliques afin de servir de substrats pour la formation de macromolécules, tels que les acides aminés, les lipides et les nucléotides, essentielles à la multiplication des cellules cancéreuses (Vander Heiden *et al.*, 2009). Ce mécanisme est également décrit dans les tissus embryonnaires dans lesquels les cellules présentent également une division rapide (Hanahan and Weinberg, 2011). Outre l'apport en substrats pour la synthèse des composants cellulaires, la déviation des intermédiaires glycolytiques participe également au maintien de la balance redox (Figure 24). En effet le glucose-6-phosphate généré au cours de la première étape de la glycolyse, entre dans la voie des pentoses phosphates au cours de laquelle il permet de synthétiser du ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse de nucléotides et du cofacteur NADPH. Ce cofacteur possède un rôle antioxydant puisqu'il transmet son pouvoir réducteur au glutathion et à la thioredoxine, deux antioxydants capables de piéger les ERO produits lors de la prolifération rapide des cellules cancéreuses. Le NADPH participe également à la synthèse des acides gras, il a donc une double importance pour les cellules cancéreuses : défense contre les dommages induits par les ERO et biosynthèse de macromolécules (DeBerardinis *et al.*, 2008; Cairns *et al.*, 2011).

L'isoforme PKM2 (pyruvate kinase type M2), enzyme qui catalyse la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate, est souvent exprimée dans les cellules tumorales dans lesquelles elle est capable de réguler le flux glycolytique selon son activité. A l'état actif, PKM2 favorise la production d'ATP glycolytique alors qu'à l'état inactif cela réduit le flux glycolytique inhibant ainsi la production d'ATP. Cependant, en induisant le ralentissement de la glycolyse, il offre un avantage aux cellules cancéreuses car il contribue au détournement des intermédiaires métaboliques vers les voies de biosynthèse (Cairns *et al.*, 2011; Danhier *et al.*, 2017).

La glycolyse contribuerait également à la progression tumorale. La migration des cellules cancéreuses vers un site métastatique nécessite que les cellules soient capables de motilité, processus dirigé par un réarrangement du cytosquelette. Une étude, portant sur des modèles *in vitro* de cancer de la prostate et de cancer du sein, a montré que le remodelage du cytosquelette et la motilité cellulaire nécessitent une activité glycolytique élevée (Shiraishi *et al.*, 2015). De plus, même en présence d'oxygène, la glycolyse permettrait aux cellules de répondre rapidement à de fortes demandes énergétiques principalement pour l'activité de transport à travers la membrane qui est nécessaire à la croissance, la division et la migration cellulaire (Epstein *et al.*, 2014). La glycolyse joue donc un rôle déterminant dans la migration des cellules cancéreuses et semble être associée à des phénotypes agressifs (Shiraishi *et al.*, 2015).

L'oxydation du pyruvate qui se déroule dans la mitochondrie a une activité limitée par rapport au flux glycolytique élevé. Il est donc nécessaire que les cellules cancéreuses emploient un système permettant d'éviter l'accumulation de pyruvate dans le cytoplasme. Pour cela, la LDH-A convertit rapidement le pyruvate en lactate (DeBerardinis *et al.*, 2008). En effet, l'effet Warburg se caractérise par une production importante de lactate qui une fois synthétisé est excrété hors de la cellule. Quel est alors l'intérêt de produire une quantité importante de lactate pour les cellules cancéreuses ? Tout d'abord la production de lactate est accompagnée de la régénération du coenzyme NAD^+ indispensable au fonctionnement de la glycolyse. Ainsi le lactate permet de maintenir une forte activité glycolytique et participe à la régulation de l'équilibre NADH/NAD^+ (Liberti and Locasale, 2016; San-Millán and Brooks, 2016). Une fois excrété, le lactate induit une diminution du pH extracellulaire (pHe) menant à l'acidification du microenvironnement tumoral. Alors que dans ces conditions d'acidose, les cellules normales sont incapables de survivre et meurent par nécrose ou apoptose, les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter. Elles maintiennent le pH intracellulaire (pHi) grâce à l'activation de systèmes de régulation du pHi, tels que des pompes ioniques et des transporteurs membranaires (Gatenby and Gillies, 2004; Chiche *et al.*, 2010). L'acidification du microenvironnement semble favoriser le détachement, la migration ainsi que l'invasion des cellules cancéreuses, qui orchestrent la progression métastatique (Payen *et al.*, 2016). Bien que les mécanismes ne soient pas clairement définis, le lactate influence le remodelage de la matrice extracellulaire et participe à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses (San-Millán and Brooks, 2016). Il pourrait, via l'acidification du pH extracellulaire, activer les MMP et les cathepsines, enzymes protéolytiques à l'origine de la dégradation de la matrice extracellulaire (Kroemer and Pouyssegur, 2008). Le lactate serait donc impliqué dans le processus métastatique. Le lactate est également impliqué dans d'autres étapes essentielles de la carcinogénèse. Il participe au processus d'angiogénèse, notamment en stimulant l'expression du facteur VEGF. Il contribue à l'échappement de la tumeur au système immunitaire en inactivant les fonctions des lymphocytes T et des cellules NK (natural killer) et en bloquant la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Hirschhaeuser *et al.*, 2011; San-Millán and Brooks, 2016). En raison des nombreux avantages qu'il confère aux cellules cancéreuses, le lactate est considéré comme un acteur majeur dans le cancer, notamment en lien avec l'agressivité tumorale. Un fort taux de lactate, en partie dû à la surexpression de certaines isoenzymes de la LDH comme la LDH-5, contribuerait à la résistance des cellules cancéreuses à la radiothérapie (Sattler *et al.*, 2010; Koukourakis *et al.*, 2014). La capacité antioxydante du lactate pourrait être à l'origine de la radiorésistance

(Hirschhaeuser *et al.*, 2011). De plus, dans différents types de cancer, une forte corrélation a été établie entre un niveau élevé de lactate et le développement de métastases ainsi qu'une faible probabilité de survie des patients (Walenta and Mueller-Klieser, 2004).

La dépendance des cellules cancéreuses vis-à-vis de la glycolyse est également accentuée en condition hypoxique. Lors du développement tumoral précoce, les cellules cancéreuses sont dans un environnement non vascularisé et doivent alors mettre en place un mécanisme d'adaptation à l'hypoxie (Gatenby and Gillies, 2004). En condition hypoxique, le facteur de transcription HIF-1 est stabilisé et activé. Ce dernier facilite l'activité glycolytique en stimulant l'expression des gènes codant les enzymes de la glycolyse comme les hexokinases, les transporteurs de glucose et de lactate ainsi que la LDHA (DeBerardinis *et al.*, 2008; Kroemer and Pouyssegur, 2008; Danhier *et al.*, 2017). HIF-1 induit également l'expression de PDK1 inhibant la PDH afin d'inhiber le métabolisme mitochondrial (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Cairns *et al.*, 2011).

Ainsi, la glycolyse aérobie accompagnée d'une importante production de lactate représente un avantage considérable pour la croissance, la prolifération et la dissémination des cellules cancéreuses. Toutefois, ce processus ne suffit pas à lui seul pour satisfaire l'ensemble des besoins énergétiques et biosynthétiques des cellules cancéreuses. Une seconde voie métabolique est mise en jeu : le métabolisme mitochondrial.

2.3 Importance du métabolisme mitochondrial dans les cellules cancéreuses

De nombreuses données de la littérature portant sur le taux de respiration des cellules cancéreuses indiquent qu'elles possèdent des mitochondries très actives et fonctionnelles (Moreno-Sánchez *et al.*, 2014). Pour la production d'ATP, certains types de cellules cancéreuses ont un métabolisme énergétique qui dépend principalement de la phosphorylation oxydative (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007, 2014). Outre la production d'ATP, les mitochondries ont également un rôle anabolique puisqu'elles contribuent fortement aux mécanismes de biosynthèse des cellules cancéreuses (Marchetti *et al.*, 2015). Le cycle de Krebs fournit des précurseurs pour la synthèse des macromolécules essentielles telles que les acides aminés, les lipides et les nucléotides (Figure 24). Les intermédiaires du cycle de Krebs sont ainsi utilisés comme substrats des voies de biosynthèse. Par exemple, le citrate est exporté dans le cytoplasme où il est requis pour la synthèse de lipides alors que l'oxaloacétate et l' α -cétoglutarate sont utilisés pour la synthèse d'acides aminés et de nucléotides (DeBerardinis *et al.*, 2008; Weinberg and Chandel, 2009). De plus, la conversion du malate provenant du cycle

de Krebs en pyruvate par l'enzyme malique permet de synthétiser du NADPH, cofacteur essentiel aux cellules cancéreuses (Figure 24) (Vander Heiden *et al.*, 2009). Afin de ne pas interrompre l'activité du cycle de Krebs et maintenir un fonctionnement mitochondrial optimal, il est nécessaire de reformer les intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs qui sont utilisés comme substrats pour la biosynthèse. Pour cela, plusieurs voies métaboliques extérieures au cycle de Krebs, appelées voies anaplerotiques, sont mises en jeu afin d'apporter une source de carbone (DeBerardinis *et al.*, 2008; Danhier *et al.*, 2017). La voie la plus simple dépend de l'enzyme pyruvate carboxylase. Cette enzyme utilise directement le pyruvate provenant de la glycolyse pour reformer de l'oxaloacétate (DeBerardinis *et al.*, 2008). Cependant le pyruvate à lui seul n'est pas suffisant car seule une faible quantité de pyruvate est disponible pour le métabolisme mitochondrial, le flux glycolytique étant redirigé vers la production rapide de lactate (Marchetti *et al.*, 2015). D'autres sources de carbone alternatives sont alors utilisées : les acides gras et les acides aminés, particulièrement la glutamine qui représente l'acide aminé le plus important chez les mammifères (DeBerardinis *et al.*, 2007, 2008). La glutamine est convertie par la glutaminase en glutamate qui à son tour est transformé en α -cétoglutarate alimentant le cycle de Krebs (Weinberg and Chandel, 2009). Le métabolisme de la glutamine fournit également des coenzymes réduits tel que le NADH utilisé lors de la phosphorylation oxydative pour la synthèse d'ATP (Moreno-Sánchez *et al.*, 2014). De nombreux types de cancer comme les glioblastomes ou les leucémies dépendent du métabolisme de la glutamine pour leur croissance et leur prolifération (Marchetti *et al.*, 2015). La glutamine constitue donc une source majeure de carbone et d'azote pour la biosynthèse des cellules cancéreuses (DeBerardinis *et al.*, 2007; Danhier *et al.*, 2017). Le catabolisme de la glutamine qui alimente le cycle de Krebs est requis pour la croissance indépendante de l'ancrage des cellules cancéreuses du côlon (Weinberg *et al.*, 2010). L'autophagie peut aussi être une source importante de glutamine pour le fonctionnement mitochondrial. Des tumeurs pulmonaires déficientes en *Atg7*, gène essentiel au processus d'autophagie, présentent un défaut de respiration ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial qui est à l'origine d'une baisse de la survie cellulaire. Un apport exogène de glutamine permet de rétablir la survie des cellules cancéreuses (Strohecker *et al.*, 2013). Il est à noter que lorsque ces différents substrats sont indisponibles, les cellules cancéreuses peuvent utiliser le lactate comme autre source de carbone (Marchetti *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les mitochondries gouvernent la production d'ERO impliqués dans la signalisation cellulaire. Ces ERO participent pleinement au développement tumoral. Par l'oxydation de résidus cystéine de certaines phosphatases comme PTEN, les ERO inhibent leur activité. Ils

participent ainsi au processus de survie des cellules cancéreuses (Kumari *et al.*, 2018). Ces ERO sont également impliqués dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses par régulation de voies de signalisation telles que les voies Ras/MAPK et PI3K/AKT (Weinberg *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2018). Une forte activité mitochondriale est couplée à une production élevée d'ERO qui activent les protéines tyrosine kinases Src et Pyk2 impliquées dans les processus de migration et métastases (Porporato *et al.*, 2014).

De surcroît, des études montrent que le métabolisme des cellules cancéreuses invasives et métastatiques repose fortement sur la phosphorylation oxydative, qui est régulée par PGC1- α . Lorsque l'expression de ce gène est inhibée, la respiration mitochondriale est impactée et les cellules perdent leur capacité invasive et migratrice ainsi que leur capacité à former des métastases (LeBleu *et al.*, 2014). L'activité mitochondriale semble être fortement corrélée au potentiel invasif des cellules cancéreuses (LeBleu *et al.*, 2014; Porporato *et al.*, 2014). Ainsi, le métabolisme mitochondrial occupe une place importante dans la carcinogenèse et joue un rôle dans le processus métastatique.

Les modifications du métabolisme énergétique d'une cellule cancéreuse sont bien plus complexes que ne le suggérait Warburg il y a 90 ans. En plus de la production d'énergie, le métabolisme énergétique permet de fournir l'ensemble des intermédiaires de biosynthèse et de maintenir un état redox cellulaire adéquat indispensables à la croissance, prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses. Le métabolisme énergétique des tumeurs doit être considéré comme étant hétérogène : toutes les tumeurs n'ont pas le même phénotype métabolique et au sein d'une même tumeur les cellules cancéreuses se distinguent par leur phénotype métabolique. Des facteurs intrinsèques (tissu d'origine et profil génétique des tumeurs) et extrinsèques (microenvironnement dynamique) imposent une flexibilité métabolique aux cellules cancéreuses et sont à l'origine de l'hétérogénéité tumorale (Boroughs and DeBerardinis, 2015; Moreno-Sánchez *et al.*, 2014). Certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur sont des acteurs clés de la régulation du métabolisme énergétique des cellules dans la mesure où ils régulent directement les enzymes métaboliques (Figure 24). L'altération de ces gènes (activation des oncogènes et inactivation des gènes suppresseurs de tumeur) est impliquée dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses (Dang, 2012). Par exemple, Myc et PI3K/AKT stimulent la glycolyse par activation des enzymes glycolytiques et des transporteurs de glucose. Myc est aussi impliqué dans la stimulation de la glutaminolyse. En revanche p53 inhibe la glycolyse et induit une augmentation du métabolisme mitochondrial et de la phosphorylation oxydative (Weinberg and Chandel, 2009; Cairns *et al.*, 2011; Wallace,

2012). Aussi, le microenvironnement influence le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses. Ces dernières ont un phénotype métabolique différent selon l'accès aux nutriments et à l'oxygène conduisant à une hétérogénéité métabolique intratumorale.

2.4 Hétérogénéité intratumorale et symbiose métabolique

Les cellules cancéreuses situées à proximité de vaisseaux sanguins sont dans un environnement normoxique. La présence d'oxygène et de nutriments leur permet d'une part de réaliser la phosphorylation oxydative et d'autre part d'alimenter les voies anaboliques pour la prolifération (Moreno-Sánchez *et al.*, 2014; DeBerardinis and Chandel, 2016). Ailleurs dans la tumeur, d'autres cellules cancéreuses se retrouvent à distance des vaisseaux sanguins et sont dans un environnement hypoxique où la biodisponibilité des nutriments et l'accès à l'oxygène est restreinte. Dans ce cas, ces cellules subissent un switch de la phosphorylation oxydative vers un métabolisme davantage glycolytique accompagné de la production de lactate (Moreno-Sánchez *et al.*, 2014). En effet, l'oxygène est peu soluble dans le plasma comparé au glucose, les cellules situées à distance des vaisseaux sanguins ont encore un accès au glucose (Strickaert *et al.*, 2017). Cependant, en cas de privation en glucose, les cellules adaptent leur métabolisme afin d'exploiter d'autres nutriments présents dans l'environnement comme la glutamine, les lipides ou les acides aminés afin de maintenir le fonctionnement mitochondrial (maintien du cycle de Krebs et production d'ATP) (DeBerardinis and Chandel, 2016; Danhier *et al.*, 2017). Si la privation en nutriments persiste, un processus d'autophagie se met en place pour recycler des constituants cellulaires et maintenir la survie des cellules cancéreuses (Danhier *et al.*, 2017). Des études *in vitro*, dans lesquelles les cellules cancéreuses sont cultivées en trois dimensions sous forme de sphéroïdes, ont montré que les sphéroïdes à un stade précoce qui ne sont pas en conditions hypoxiques présentent un flux glycolytique et un flux mitochondrial élevés où la phosphorylation oxydative contribue majoritairement à la génération d'ATP. En revanche, les sphéroïdes matures possèdent un cœur hypoxique. Dans ces conditions, HIF-1 est activé et induit un remodelage métabolique qui consiste en une baisse de la phosphorylation oxydative et une augmentation de l'activité glycolytique, qui contribue davantage à la production d'ATP (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2008, 2010). Ainsi, afin de maintenir la survie et la prolifération, les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme énergétique en fonction des contraintes imposées par le microenvironnement. Cette hétérogénéité intratumorale permet des échanges métaboliques entre les cellules cancéreuses. Ce phénomène est appelé symbiose métabolique (Danhier *et al.*, 2017). En effet, de nombreuses études ont montré qu'au sein d'une tumeur il existe une collaboration métabolique entre les cellules dites « glycolytiques » et les cellules

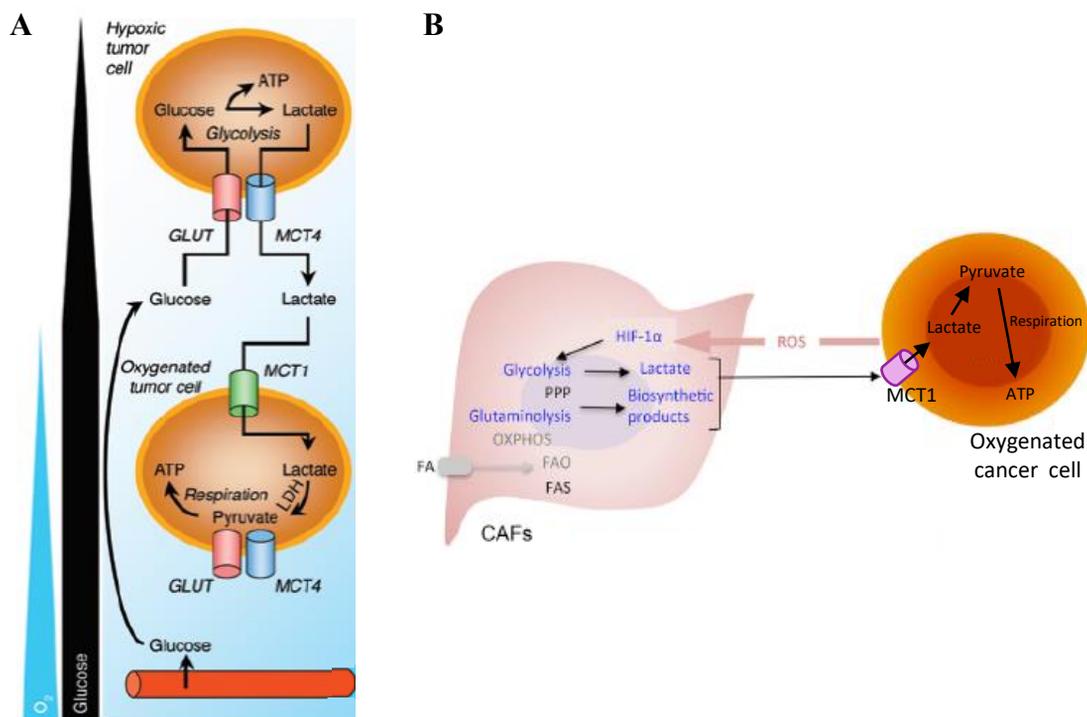


Figure 25 : La symbiose métabolique et l'effet Warburg inverse. Au sein d'une tumeur, les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme énergétique en fonction de leur environnement. Elles sont capables d'échanges métaboliques entre elles (A, symbiose métabolique) mais aussi avec les cellules stromales (B, effet Warburg inverse). A. Les cellules cancéreuses hypoxiques, situées à distance des vaisseaux sanguins, consomment du glucose et réalisent la glycolyse accompagnée d'une production de lactate. Les cellules cancéreuses oxydatives, proches des vaisseaux sanguins, importent et utilisent ce lactate pour produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative. B. Les cellules cancéreuses oxydatives stimulent la glycolyse des fibroblastes associés au cancer (CAF) via la production d'ERO. Les CAF produisent ainsi du lactate qui est utilisé en retour par les cellules cancéreuses oxydatives. ROS, reactive oxygen species (adapté de Sonveaux *et al.*, 2008 et Biswas, 2015).

dites « mitochondriales » (Figure 25). Dans les zones hypoxiques, généralement au centre de la tumeur, les cellules cancéreuses consomment principalement du glucose pour réaliser la glycolyse accompagnée de la production de lactate. Ce dernier est exploité par les cellules cancéreuses contenues dans les zones oxygénées de la tumeur, en périphérie, comme source d'énergie. Ces cellules cancéreuses dites « mitochondriales » importent le lactate grâce au transporteur de lactate MCT1 (monocarboxylate transporter 1), il est ensuite oxydé par la LDH-B en pyruvate associé à la production de NADH qui permettent d'alimenter le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (Nakajima and Van Houten, 2013; Sonveaux *et al.*, 2008). Par conséquent, le glucose reste disponible pour les cellules « glycolytiques » leur permettant de survivre à distance des vaisseaux sanguins (Schulze and Harris, 2012). Cette coopération métabolique se déroule également entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales et porte le nom d'« effet Warburg inverse » (Figure 25). Par exemple, suite à un stress métabolique induit par les cellules cancéreuses, les cellules stromales voisines comme les fibroblastes CAF (cancer associated fibroblasts) subissent une reprogrammation métabolique qui impactent leur fonction pro ou antitumorale (Pavlidis *et al.*, 2009; Biswas, 2015). En effet, les cellules cancéreuses produisent et libèrent une quantité importante d'ERO capables de stimuler la glycolyse dans les CAF. En retour, ces derniers fournissent des nutriments (lactate, pyruvate et corps cétoniques) aux cellules cancéreuses « mitochondriales » qui les importent via le transporteur MCT1 et les utilisent pour la production d'ATP via la phosphorylation oxydative (Whitaker-Menezes *et al.*, 2011; Strickaert *et al.*, 2017). Ces travaux démontrent l'importance de la relation entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement pour leur prolifération, faisant des cellules stromales une potentielle cible thérapeutique.

2.5 Métabolisme énergétique des cellules souches cancéreuses

Comme décrit précédemment, dans les tumeurs est retrouvée une petite population de CSC. Ces cellules présentent un métabolisme énergétique parfois différent des cellules cancéreuses du reste de la tumeur. Tout d'abord, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les CSC sont davantage « glycolytiques » que les cellules cancéreuses différenciées provenant de la même tumeur (Vlashi and Pajonk, 2015; Snyder *et al.*, 2018). Cette dépendance vis-à-vis de la glycolyse pour la production d'ATP a été démontré dans différents types tumoraux comme les tumeurs pulmonaires, mammaires, colorectales ou encore les glioblastomes (Zhou *et al.*, 2011; Ciavardelli *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2018). Par rapport à leurs homologues différenciées, les CSC affichent une augmentation de l'activité glycolytique ainsi qu'une production de lactate probablement associée à une diminution du métabolisme mitochondrial. Par conséquent une

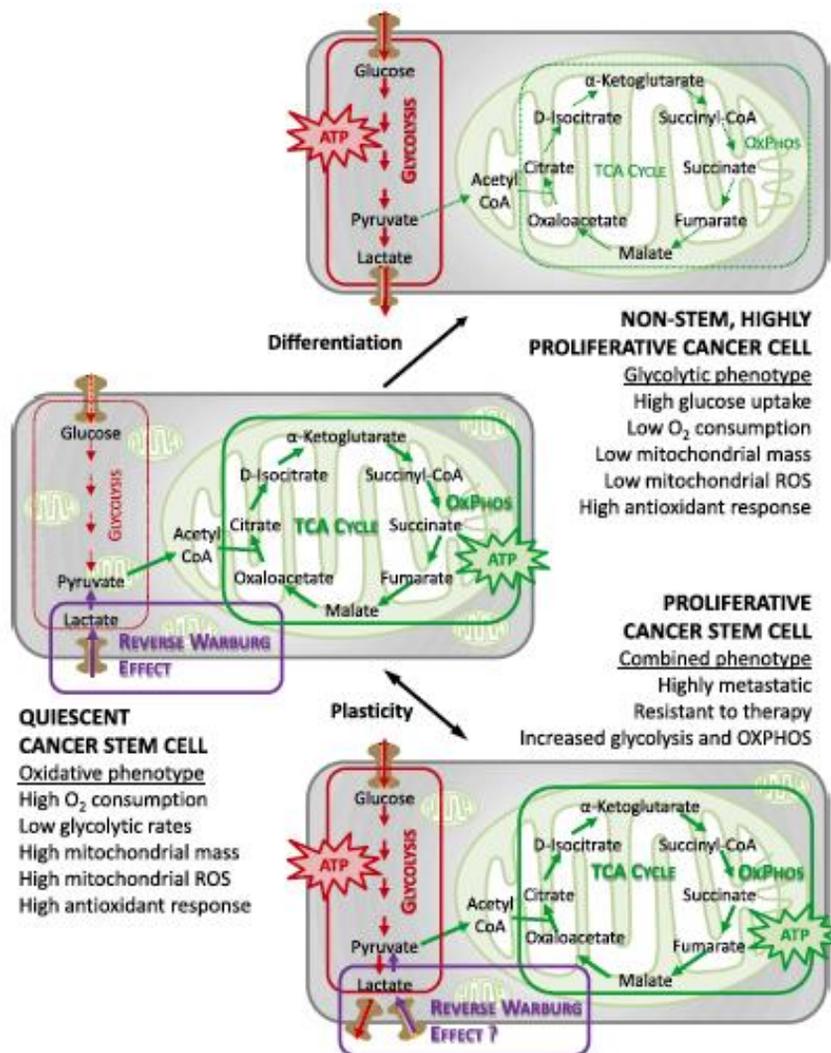


Figure 26 : Le métabolisme des CSC. Les CSC présentent une plasticité métabolique leur permettant d'adapter leur métabolisme en fonction de l'environnement mais également en fonction de leur activité. Les CSC quiescentes reposent plutôt sur la phosphorylation oxydative pour la production d'ATP. Lorsqu'elles deviennent plus actives, les CSC peuvent acquérir un phénotype métabolique intermédiaire dépendant à la fois de la phosphorylation oxydative et à la fois de la glycolyse. Elles seraient ainsi plus résistantes aux thérapies (d'après Peiris-Pagès *et al.*, 2016).

baisse du niveau d'ERO est observée. Ce phénotype permet aux CSC de préserver leur propriété souche et contribuerait à leur capacité à résister aux traitements (Peiris-Pagès *et al.*, 2016; Sancho *et al.*, 2016; Snyder *et al.*, 2018).

En parallèle, d'autres études *in vitro* ou portant sur des CSC isolées de patients ont révélé que les CSC reposent aussi sur la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie (Snyder *et al.*, 2018). Ainsi, des CSC de glioblastomes ou des CSC leucémiques dérivées de patients reposent sur la phosphorylation oxydative pour la production d'ATP alors que les cellules cancéreuses différenciées dépendent de la glycolyse (Vlashi *et al.*, 2011; Lagadinou *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans les cellules cancéreuses mammaires cultivées sous forme de mammosphères et enrichies en CSC, certaines protéines liées à la mitochondrie sont surexprimées par rapport aux cellules cultivées en monocouches, comme les protéines impliquées dans la β -oxydation des acides gras, la phosphorylation oxydative, la biogenèse mitochondriale et la production d'ERO (Lamb *et al.*, 2014). Par conséquent, les CSC présentent un métabolisme mitochondrial élevé qui se traduit par une augmentation de la consommation d'oxygène, accompagnée d'une forte production d'ERO par rapport aux autres cellules cancéreuses de la tumeur (Lagadinou *et al.*, 2013; Vlashi *et al.*, 2014; De Luca *et al.*, 2015; Lamb *et al.*, 2015). Les ERO produits par l'augmentation de la phosphorylation oxydative induisent l'accumulation de HIF-1 dans les CSC mammaires qui leur confèrerait une chimiorésistance (Lee *et al.*, 2017). Cependant malgré une forte production d'ERO, les CSC possèdent un système antioxydant efficace permettant de garder un niveau d'ERO relativement bas et de minimiser les dommages mitochondriaux. Ce système permet aux CSC de préserver leur phénotype souche et leur pouvoir tumorigène ainsi que de contribuer à la résistance aux traitements (Sancho *et al.*, 2016; Loureiro *et al.*, 2017; Snyder *et al.*, 2018). L'augmentation de la masse mitochondriale est également impliquée dans le métabolisme mitochondrial élevé. En effet, la biogenèse mitochondriale régulée par PGC1- α est également impliquée dans le maintien de la capacité d'autorenouvellement des CSC mammaires et leur chimiorésistance (De Luca *et al.*, 2015). Pour la production d'ATP, les CSC dépendraient également de la glutamine et de la β -oxydation des acides gras qui leur confèrent ainsi un avantage pour la survie, la capacité d'autorenouvellement et la résistance aux traitements (Loureiro *et al.*, 2017; Skoda *et al.*, 2019). Ainsi, la mitochondrie joue un rôle essentiel dans le fonctionnement des CSC.

Les différences métaboliques des CSC observées dans la littérature traduisent une hétérogénéité métabolique des CSC, notamment intratumorale, dont les causes sont multifactorielles. L'une des explications repose sur la plasticité métabolique (Figure 26). Les CSC pourraient adapter

Cible	Agents	Effets	Stade de développement
Glycolyse			
GLUT1	WZB117; 2-DG; STF-31; ARN interférent	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques
HK2	2-DG; 3-bromopyruvate (3-BrPA); lonidamine	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> EC 2-DG et 3-bromopyruvate arrêté Lonidamine en EC de phase II	Etudes pré-cliniques et études cliniques (EC)
PFK2	PFK158	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques
PKM2	TLN-232; ARN interférent	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> EC de phase II	Etudes pré-cliniques et études cliniques (EC)
LDHA	FX11; galloflavine; ARN interférent	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques
Sécrétion de lactate			
MCT4	AZ93; ARN interférent	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques
Incorporation de lactate			
MCT1	AZD3965; CHC; ARN interférent	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> AZD3965 est étudié en EC de phase I	Etudes pré-cliniques et EC

Tableau 3 : Exemples d'agents ciblant la glycolyse et le lactate. Ce tableau présente de manière non exhaustive différents composés capables d'inhiber la glycolyse ou le lactate. PFK2, phosphofructokinase-2 (à partir de Kroemer *et al.*, 2008; Vander Heiden, 2011; Tran *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2013; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017).

leur métabolisme en switchant rapidement de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative en fonction de l'environnement tumoral (Peiris-Pagès *et al.*, 2016). Ainsi les CSC présentent un phénotype métabolique particulier selon qu'elles sont localisées dans une zone oxygénée ou hypoxique de la tumeur ou encore au niveau d'un site métastatique (Snyder *et al.*, 2018). Par exemple, dans la niche métastatique, les CSC augmentent leur utilisation de catabolites extracellulaires comme le lactate, les corps cétoniques ou la glutamine pour permettre le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (Snyder *et al.*, 2018). L'état quiescent ou prolifératif des CSC contribue également aux différences métaboliques observées (Peiris-Pagès *et al.*, 2016). Le métabolisme des CSC représente donc un processus complexe qui nécessite des études approfondies.

2.6 Le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses et son implication en thérapie

La glycolyse aérobie et le métabolisme mitochondrial participent activement au développement tumoral et au maintien des propriétés des CSC. C'est pourquoi, cibler le métabolisme énergétique est une stratégie thérapeutique intéressante. Dans ce contexte, de nombreux composés ciblant ce métabolisme ont vu le jour. Tout d'abord, suite à l'hypothèse de Warburg, les études précliniques ont porté sur l'inhibition de la glycolyse aérobie. Dans le tableau 3 sont présentés des agents ciblant différents acteurs de la glycolyse comme le transporteur de glucose GLUT1 et des enzymes glycolytiques exprimées dans les cellules cancéreuses telles que l'hexokinase 2 et PKM2. Actuellement certains agents inhibant la glycolyse sont étudiés au niveau préclinique et d'autres, ayant déjà montré des résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo*, sont évalués en essais cliniques. Par exemple, le 2-désoxyglucose (2-DG) est évalué au niveau clinique lors d'essais de phase I/II dans différents types de cancer (Vander Heiden, 2011). Cet analogue synthétique du glucose dont le groupement hydroxyle au niveau du carbone-2 a été remplacé par un atome d'hydrogène est un inhibiteur de la glycolyse (Tran *et al.*, 2016). D'une part il bloque l'entrée de glucose par le biais des transporteurs GLUT et d'autre part il inhibe les enzymes responsables des deux premières étapes de la glycolyse : l'hexokinase et la phosphoglucoisomérase. S'ensuit une diminution de la production d'ATP. Cependant il interfère également avec d'autres processus cellulaires. En effet, le 2-DG est un analogue du mannose et perturbe le processus de N-glycosylation des protéines qui se déroule dans le RE induisant un stress du RE (Tran *et al.*, 2016; Berthe *et al.*, 2018). L'inhibition de la glycolyse et la perturbation de la N-glycosylation des protéines contribuent l'une et l'autre à l'activité anticancéreuse du 2-DG dans les cellules cancéreuses mammaires (Berthe *et al.*, 2018). Le lactate ayant un rôle prépondérant dans le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses, il

Cible	Agents	Effets	Stade de développement
Cycle de Krebs			
PDK1	Dichloroacétate (DCA)	DCA testé en EC de phase I EC de phase II arrêté en raison de toxicité	utilisé dans le traitement de l'acidose lactique
PDH et α -cétoglutarate déshydrogénase	CPI-613	Testé en EC de phase I, II et III	Etudes pré-cliniques et EC
Isocitrate déshydrogénase	AG-120; AG-221; AG-881; ARN interférent	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques
Phosphorylation oxydative			
Complexe I	Metformine, phenformine, IACS-010759, BAY 87-2243	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> Metformine testé en EC de phase II et de phase III en cours IACS-010759 testé en EC de phase I	Etudes pré-cliniques et EC
Complexe III	trioxyde d'arsenic	Utilisé dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques	Etudes pré-cliniques et EC
Potentiel de membrane mitochondrial	MKT-077	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> Testé en EC de phase I	EC
Glutaminolyse			
Glutaminase	CB-839; BPTES; RNAi	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques et EC
Stress oxydant			
ERO, glutathion	Vitamine C; NAC; quercétine; diméthylfumarate	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques
B-oxydation des acides gras			
CPT1	Etomoxir; perhexiline; ARN interférent	Effets anticancéreux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Etudes pré-cliniques Perhexiline utilisé dans le traitement de l'angine de poitrine

Tableau 4 : Exemples d'agents ciblant le métabolisme mitochondrial. Ce tableau présente de manière non exhaustive plusieurs composés capables d'inhiber certains acteurs appartenant à différentes voies du métabolisme mitochondrial. BPTES, bis-2 (5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide 3; CPT1, Carnitine palmitoyltransferase 1; NAC, N-acetylcysteine; PDH, Pyruvate déshydrogénase (à partir de Vander Heiden, 2011; Schöckel *et al.*, 2015; Martinez- Outschoorn *et al.*, 2017, Molina *et al.*, 2018).

représente une cible thérapeutique considérable. En ce sens, des composés bloquant la production de lactate en ciblant la LDH-A ou sa prise en charge en inhibant les transporteurs MCT ont été développés (Tableau 3). A titre d'exemple, l' α -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC) est un inhibiteur de MCT1 qui a montré une activité anticancéreuse *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs types de tumeurs (Sonveaux *et al.*, 2008; Diers *et al.*, 2012; Miranda-Gonçalves *et al.*, 2013).

D'autres composés ciblant le métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses ont vu le jour. Ces composés, dont une partie est présentée dans le tableau 4, appartiennent à la famille des mitocans. Parmi ces agents, sont retrouvés des composés ciblant le cycle de Krebs, la chaîne de transport des électrons, les protéines appartenant à la famille Bcl-2 mais aussi l'ADNmt (Ralph *et al.*, 2006; Neuzil *et al.*, 2013). Certains mitocans altèrent le fonctionnement de la phosphorylation oxydative et induisent la production d'ERO (Marchetti *et al.*, 2015). A terme, par différents mécanismes d'action, les mitocans induisent l'apoptose des cellules cancéreuses par l'activation de la voie intrinsèque (Ralph 2006). Des inhibiteurs de constituants des voies anaplerotiques comme le métabolisme de la glutamine et la β -oxydation des acides gras sont aussi étudiés (Tableau 4) (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017). Actuellement, un seul agent ciblant le métabolisme mitochondrial, le trioxyde d'arsenic, est approuvé en clinique pour le traitement de la leucémie promyélocytaire aigüe (Lo-Coco *et al.*, 2013). Son mode d'action repose notamment sur l'inhibition du complexe III de la chaîne respiratoire perturbant ainsi le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017). Un autre agent faisant l'objet de nombreuses études cliniques dans le cadre de la thérapie anticancéreuse semble tout à fait prometteur : la metformine. Il s'agit d'un agent antidiabétique utilisé dans le traitement du diabète de type II. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire et l'activation du senseur énergétique AMPK (AMP-activated protein kinase) ; la metformine inhibe ainsi la prolifération cellulaire (Loubière *et al.*, 2013). De façon intéressante, une étude a montré qu'en plus de cibler les cellules cancéreuses, la metformine agit directement sur les lymphocytes T CD8⁺ infiltrant la tumeur. Elle augmenterait leur recrutement au niveau de la tumeur, les protégerait de l'apoptose et permettrait de restaurer leur fonction. Ainsi cibler les cellules du microenvironnement tumoral pourrait participer l'effet anticancéreux de la metformine (Eikawa *et al.*, 2015). Des études ont également montré que la metformine a la capacité de cibler sélectivement les CSC *in vitro* et *in vivo* (Hirsch *et al.*, 2009; Iliopoulos *et al.*, 2011). Ces résultats sont très intéressants puisque les CSC sont potentiellement à l'origine des résistances aux traitements anticancéreux et des récurrences de la maladie.

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 (<i>in vitro</i>), leukemia (<i>in vitro</i>)
		WZB117	Cisplatin/paclitaxel	Lung cancer (<i>in vitro</i>), breast cancer (<i>in vitro</i>)
	GLUT4	Ritonavir	Doxorubicin	Multiple myeloma (<i>in vitro</i>)
		HK	2-DG	ABT-737/ABT-263
	3-BrPA		Trastuzumab	Breast cancer (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>)
			Prednisolone	Leukemia (<i>in vitro</i>)
			Daunorubicin	Leukemia (<i>in vitro</i>)
			Doxorubicin	Multiple myeloma (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>)
	LND		Oxaliplatin/5-FU	Colon cancer (<i>in vitro</i>)
			Prednisolone	Leukemia (<i>in vitro</i>)
PKM2	shRNA	ABT-737	Leukemia (<i>in vitro</i>), lymphoma (<i>in vitro</i>)	
		Prednisolone	Leukemia (<i>in vitro</i>)	
LDHA		Cisplatin	Lung cancer (<i>in vivo</i>)	
		Docetaxel	Lung cancer (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>)	
		FK866	Lymphoma (<i>in vivo</i>)	
		Paclitaxel	Breast cancer (<i>in vitro</i>)	
		Oxamate	Trastuzumab	Breast cancer (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>)

Tableau 5 : Combinaisons d’agents ciblant la glycolyse et d’agents anticancéreux. Le tableau présente plusieurs combinaisons de composés ciblant la glycolyse et d’agents anticancéreux testées *in vitro* et *in vivo* dans différents types de cancer (d’après Zhao *et al.*, 2013).

Certaines études suggèrent que les modifications du métabolisme énergétique observées dans les cellules cancéreuses peuvent être associées à la résistance aux traitements anticancéreux. En effet une activité glycolytique accrue permet d'augmenter le niveau d'ATP et de NADPH. L'ATP est capable d'activer les transporteurs ABC (ATP binding cassette) ayant une activité d'efflux des agents de chimiothérapie hors des cellules. Quant au NADPH, il participe à la chimiorésistance via son rôle antioxydant. Il permet de maintenir les systèmes antioxydants afin de limiter l'induction d'un stress oxydant par les agents de chimiothérapie. L'export du lactate provoque une acidification extracellulaire qui modifie le ratio de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule entraînant une diminution du transport passif des agents anticancéreux (Zhao *et al.*, 2013). De la même manière, le métabolisme mitochondrial, notamment la phosphorylation oxydative, semble être impliqué dans les phénomènes de résistance. Par exemple, la phosphorylation oxydative est associée à la résistance acquise ou *de novo* aux inhibiteurs de kinases oncogéniques comme les inhibiteurs de MAPK (Marchetti *et al.*, 2015). Ainsi, cibler le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses pourrait améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses et la combinaison des deux peut être une stratégie thérapeutique prometteuse pour surpasser ces phénomènes de résistance (Zhao *et al.*, 2013). Différentes combinaisons de composés ciblant la glycolyse et d'agents de chimiothérapie étudiées *in vitro* et *in vivo* sont présentées dans le tableau 5. Les agents ciblant le métabolisme mitochondrial ont également été étudiés en association avec des agents de chimiothérapie. Par exemple, la metformine potentialise les effets anticancéreux du paclitaxel, de la doxorubicine et du tamoxifène dans les cellules cancéreuses du sein et du poumon (Berstein *et al.*, 2011; Iliopoulos *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014). Dans des modèles *in vivo*, l'utilisation de metformine combinée à ces différents agents de chimiothérapie diminue de façon significative la croissance tumorale par rapport aux agents de chimiothérapie utilisés seuls (Hirsch *et al.*, 2009; Iliopoulos *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014). Un autre composé, le dichloroacétate (DCA) inhibe la PDK1 ce qui permet de lever l'inhibition de la PDH entraînant un switch métabolique de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative (Zhao *et al.*, 2013). Le DCA potentialise l'action du tamoxifène dans des cellules cancéreuses mammaires par diminution de l'expression de l'EGFR et permet de resensibiliser les cellules résistantes au tamoxifène (Woo *et al.*, 2016).

Une autre stratégie thérapeutique est décrite dans la littérature : le double blocage du métabolisme énergétique par la combinaison de composés ciblant les deux voies majeures du métabolisme énergétique. L'utilisation combinée du DCA et de la metformine induit de façon

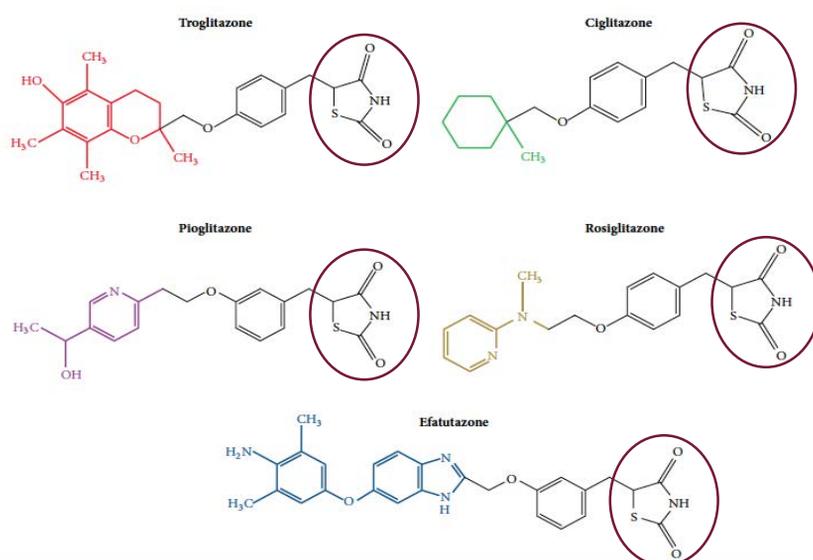


Figure 27 : Structure chimique de différentes thiazolidinediones (TZD). Les TZD sont caractérisées par la présence d'un cycle thiazolidine-2,4-dione (cercle rouge foncé). Cet hétérocycle comprend un atome de soufre (S), un atome d'azote (N) et deux groupes carbonyle (ou cétones). Les TZD diffèrent par la substitution au niveau du carbone 5 (partie en couleurs). Par exemple, la troglitazone possède un groupement chromane (partie rouge) (adapté de Fröhlich and Wahl, 2015).

synergique l'apoptose des cellules cancéreuses ovariennes et la diminution de la croissance de tumeurs xéno greffées (Li and Shao, 2016). L'association du 2-DG et de la metformine inhibe également la croissance de tumeurs mammaires xéno greffées et la formation de métastases (Cheong *et al.*, 2011). Ainsi ce double blocage pourrait être intéressant pour cibler les CSC, ayant un profil métabolique hétérogène.

L'ensemble de ces données indiquent que le ciblage du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses peut être considéré comme une stratégie thérapeutique prometteuse. Cependant, à l'heure actuelle, seul le trioxyde d'arsenic est autorisé dans le traitement d'un type de cancer particulier, la leucémie promyélocytaire aigüe. Dans ce contexte, les thiazolidinediones pourraient être de nouveaux candidats intéressants.

III. LES THIAZOLIDINEDIONES

1. *Présentation générale*

Les thiazolidinediones (TZD) forment une famille de composés synthétiques ayant en commun un cycle thiazolidine-2,4-dione (TZD). Cette famille comprend notamment la ciglitazone (CGZ), la rosiglitazone (RGZ), la pioglitazone (PGZ) ou encore la troglitazone (TGZ) (Figure 27). Ces composés sont des agents antidiabétiques oraux ayant été utilisés dans le traitement du diabète de type II (Day, 1999). Le premier composé synthétisé est la ciglitazone. Cette TZD augmente la sensibilité à l'insuline chez des rongeurs obèses et/ou diabétiques (Fujita *et al.*, 1983). A partir de la CGZ, un deuxième composé a été développé : la TGZ. Elle possède, en plus du cycle TZD, un groupement chromane provenant de l' α -tocophérol (vitamine E) (Figure 27). Elle présente des propriétés insulino-sensibilisante et antioxydante (Dubois, 2019). En 1997, la TGZ fut la première TZD introduite en utilisation clinique suivie par la RGZ et la PGZ en 1999 (Dubois, 2019). Cependant, ces 3 TZD présentent des effets secondaires importants et ont été retirées du marché français dans les années 2000. La TGZ et la RGZ affichent respectivement une toxicité hépatique et cardiaque chez certains patients alors que la PGZ augmenterait le risque de développer un cancer de la vessie (Lewis *et al.*, 2011; Grillier-Vuissoz *et al.*, 2012).

Les TZD sont des agonistes synthétiques du récepteur nucléaire PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ), un facteur de transcription activé par un ligand. Certains acides gras insaturés et eicosanoïdes comme la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 sont des agonistes naturels de PPAR γ (Rosen and Spiegelman, 2001). Les récepteurs PPAR, comprenant trois isoformes (α , β/δ et γ), appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux

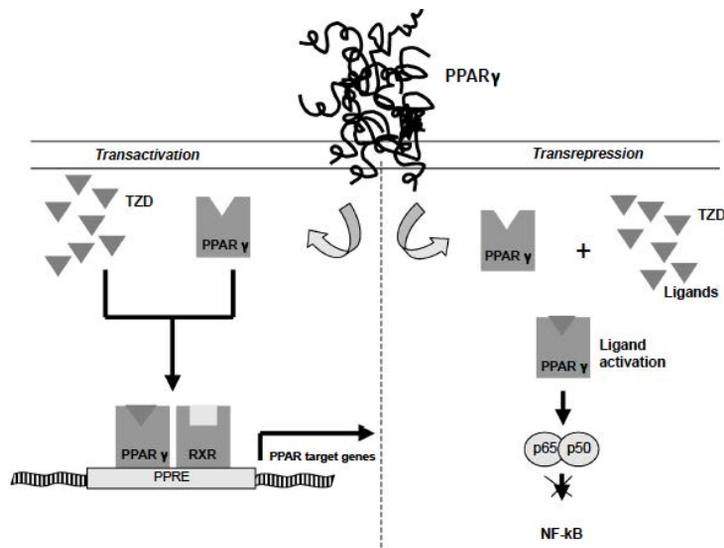


Figure 28 : Activation du récepteur PPAR γ . Le récepteur PPAR γ est un facteur de transcription activé par un ligand comme les TZD. PPAR γ peut réguler l'expression des gènes selon deux mécanismes: la transactivation et la transrépression. Dans le cas de la transactivation, PPAR γ forme un hétérodimère avec le récepteur RXR (retinoid X receptor). Cet hétérodimère entre dans le noyau et se fixe sur des éléments de réponse de PPAR γ appelés PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) situés sur des gènes cibles, permettant leur transcription. Dans le cas de la transrépression, PPAR γ réprime la transcription de gènes cibles en bloquant l'action de certains facteurs de transcription comme NF- κ B (nuclear factor-kappa B) (d'après Chiarelli and Di Marzio, 2008).

nucléaires (Gervois and Fruchart, 2003). La fixation d'un ligand (comme les TZD) sur PPAR γ permet l'activation du récepteur, suivie par son hétérodimérisation avec le récepteur RXR (retinoid X receptor) (Figure 28). Le dimère PPAR γ -RXR ainsi formé entre dans le noyau où il se fixe à un élément de réponse spécifique de PPAR γ appelé PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) situé au niveau de séquences activatrices en amont du promoteur de gènes cibles (Gervois and Fruchart, 2003; Tontonoz and Spiegelman, 2008). PPAR γ module l'expression de gènes impliqués dans l'adipogenèse, le métabolisme des lipides et du glucose (Ahmadian *et al.*, 2013). Il participe à l'homéostasie énergétique ainsi qu'à la différenciation cellulaire. Il intervient également dans des processus physiopathologiques tels que l'inflammation, l'athérosclérose, le diabète de type 2 et le cancer (Gervois and Fruchart, 2003). L'expression des différentes isoformes de PPAR est tissu-spécifique. PPAR γ est exprimé dans le foie, le muscle squelettique et le sein mais il est principalement exprimé dans le tissu adipeux. Deux isoformes de PPAR γ existent : PPAR γ_1 et PPAR γ_2 . Ce dernier contient 30 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale par rapport à PPAR γ_1 . Alors que beaucoup de tissus expriment faiblement PPAR γ_1 , PPAR γ_2 est fortement exprimé dans le tissu adipeux (Rosen and Spiegelman, 2001).

2. *Activité antidiabétique des TZD*

Le diabète de type 2 ou insulino-résistant est un trouble du métabolisme caractérisé par un taux élevé de glucose dans le sang (hyperglycémie) dû à une résistance à l'insuline au niveau des muscles squelettiques et du foie. Le glucose ne pénètre plus dans les cellules de l'organisme et s'accumule dans la circulation sanguine. La résistance à l'insuline est notamment la conséquence de l'augmentation d'acides gras libres dans la circulation et de l'accumulation inappropriée de lipides dans le foie et les muscles squelettiques (Tontonoz and Spiegelman, 2008). L'effet antidiabétique des TZD dépend du récepteur PPAR γ et se traduit par une diminution de la résistance à l'insuline au niveau du foie, des muscles squelettiques et du tissu adipeux. PPAR γ intervient dans la différenciation adipocytaire (Day, 1999; Ahmadian *et al.*, 2013). Les TZD contribuent au développement du tissu adipeux et favorisent la captation et le stockage des lipides dans les adipocytes (Gervois and Fruchart, 2003). De plus, les TZD induisent une augmentation du nombre de petits adipocytes ainsi qu'une activation d'enzymes du métabolisme lipidique comme la LPL (lipoprotéine lipase), la FATP (fatty acid transport protein) et l'ACS (acyl-coA synthase) contribuant également à ce phénomène (Day, 1999; Ahmadian *et al.*, 2013; Dubois, 2019). Ainsi, les TZD diminuent le taux d'acides gras libres circulants qui ne sont plus pris en charge par le foie et les muscles squelettiques (Tontonoz and

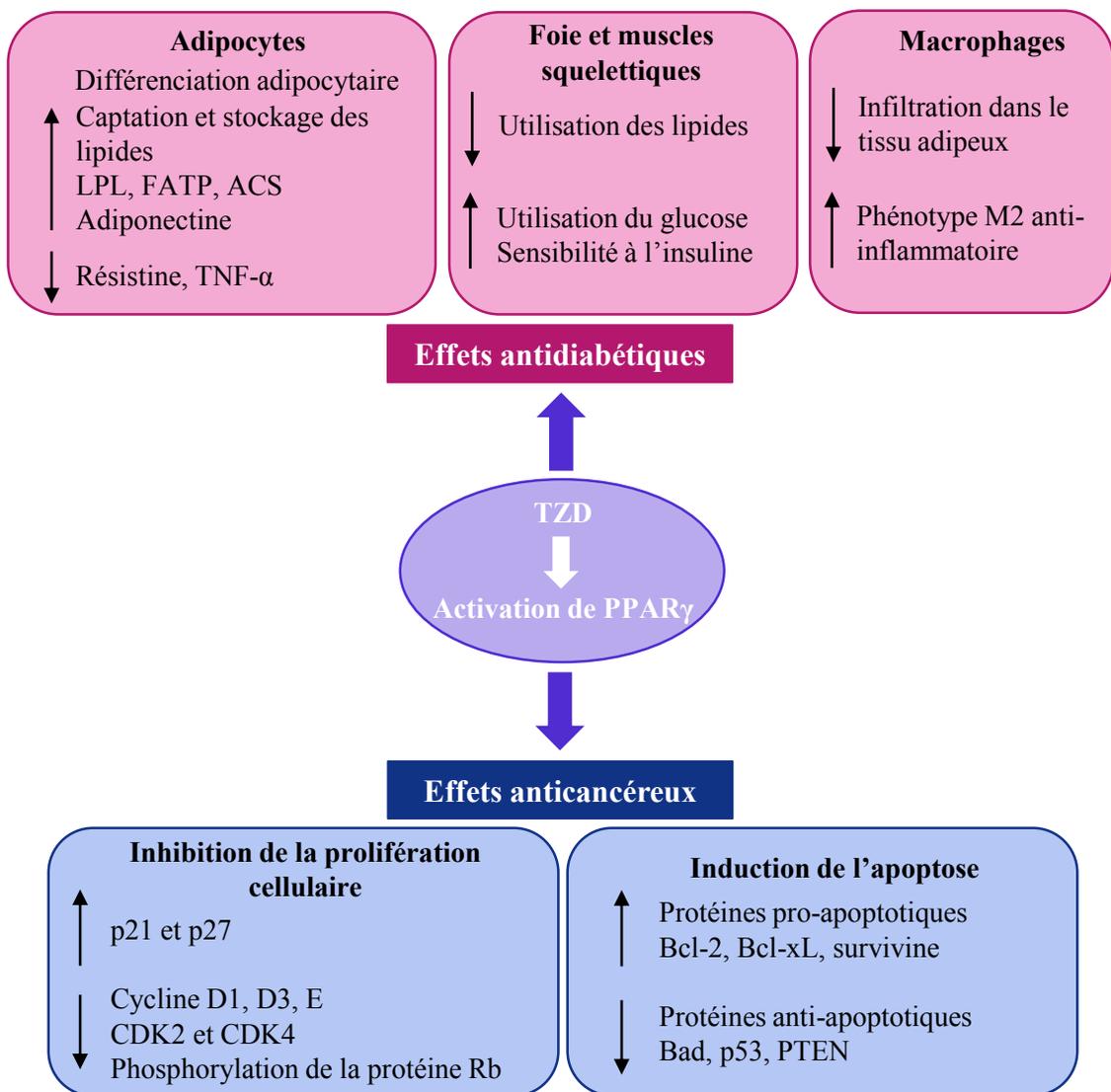


Figure 29 : Mécanismes impliqués dans les principaux effets antidiabétiques anticancéreux des TZD. L'activation de PPAR γ par les TZD entraîne des effets antidiabétiques. Les TZD contribuent à l'utilisation des lipides par le tissu adipeux ainsi que l'augmentation de l'utilisation de glucose par les muscles squelettiques et le foie améliorant leur sensibilité à l'insuline. Les TZD ont également une action anticancéreuse, ils inhibent la prolifération des cellules cancéreuses par diminution de l'expression des acteurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire comme les cyclines et CDK (cyclin-dependent kinase) et par diminution de la phosphorylation de la protéine Rb. Ils stimulent l'expression de p21 et p27, inhibiteurs des CDK. Les TZD déclenchent aussi l'apoptose des cellules cancéreuses en favorisant l'expression des protéines pro-apoptotiques et en inhibant l'expression des protéines anti-apoptotiques. LPL, lipoprotéine lipase; FATP, fatty acid transport protein; ACS, acyl-coA synthase (d'après Blanquicett *et al.*, 2008 Tontonoz and Spiegelman, 2008; Ahmadian *et al.*, 2013; Joshi and Ramaa, 2014).

Spiegelman, 2008). Il y a donc une augmentation de la consommation de glucose par ces tissus qui améliore la sensibilité à l'insuline (Day, 1999; Gervois and Fruchart, 2003; Chiarelli and Di Marzio, 2008; Ahmadian *et al.*, 2013; Dubois, 2019). Les TZD agissent également sur le métabolisme du glucose en augmentant l'expression du transporteur GLUT4 au niveau du tissu adipeux (Dubois, 2019).

Outre les effets hypolipémiant et hypoglycémiant des TZD, ils modifient aussi l'expression de facteurs sécrétés par les adipocytes, les adipokines. Les TZD induisent une diminution de la production et de la libération d'adipokines impliquées dans la résistance à l'insuline tels que la résistine et le TNF- α (tumor necrosis factor α), alors qu'elles provoquent une augmentation du niveau d'adiponectine améliorant la sensibilité à l'insuline (Rosen and Spiegelman, 2001; Chiarelli and Di Marzio, 2008; Tontonoz and Spiegelman, 2008).

En cas d'obésité, des macrophages de type M1, produisant des médiateurs inflammatoires tels que l'IL6 (interleukine-6) et le TNF- α contribuant ainsi à la résistance à l'insuline, s'infiltrent dans les tissus adipeux. L'activation de PPAR γ par les TZD a également un effet anti-inflammatoire puisqu'elle permet la diminution de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux et entraîne un changement de phénotype M1 vers un phénotype M2 ayant des propriétés anti-inflammatoires (Tontonoz and Spiegelman, 2008).

3. *Activité anticancéreuse des TZD*

PPAR γ joue un rôle majeur dans la différenciation des adipocytes de tissus sains. Des recherches ont été menées afin de déterminer si ce phénomène était aussi retrouvé au niveau des tissus tumoraux, pouvant mettre en lumière une nouvelle application thérapeutique des TZD. Ainsi, l'équipe de Spiegelman a montré que la PGZ est capable d'induire la différenciation de cellules de liposarcomes humains *in vitro* (Tontonoz *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que les TZD pourraient avoir un effet anticancéreux et être utilisées en thérapie anticancéreuse. Une autre étude a ensuite montré que la TGZ inhibe la croissance de cellules cancéreuses mammaires dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Elstner *et al.*, 1998). Suite à ces résultats pionniers, de nombreuses études ont démontré l'effet anticancéreux des TZD *in vitro* et *in vivo* dans de multiples types de cancer. L'action anticancéreuse des TZD implique l'inhibition de la prolifération, de la migration et de l'angiogenèse mais également l'induction de la différenciation cellulaire et de l'apoptose (Figure 29) (Koeffler, 2003; Blanquicett *et al.*, 2008; Joshi and Ramaa, 2014). De surcroît, la réalisation de méta-analyses d'essais cliniques suggère que l'utilisation de TZD chez des patients atteints de diabète de type II est associée à

une diminution du risque de développer un cancer colorectal, pulmonaire, mammaire ou intestinal selon le composé utilisé (Govindarajan *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013; Monami *et al.*, 2014). Des essais cliniques ont ensuite démarré sur différents types de cancer. Le premier essai clinique portant sur 3 patients atteints d'un liposarcome a confirmé l'induction de la différenciation adipocytaire par la TGZ (Demetri *et al.*, 1999). Dans un essai clinique de phase II incluant 22 patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, seulement 3 patientes ont montré une stabilisation de la maladie après un traitement avec la TGZ (Burstein *et al.*, 2003). Dans les liposarcomes ou dans les cancers de la thyroïde, la RGZ étudiée en phase II, n'a montré aucune réponse clinique significative (Debrock *et al.*, 2003; Kebebew *et al.*, 2006, 2009). Enfin, l'efatutazone, une des TZD de troisième génération récemment synthétisée a également été évaluée lors d'essais cliniques. Dans une étude de phase II réalisée chez 84 patients ayant un cancer du côlon métastatique, ce composé a permis une amélioration de la survie sans progression (Boucher *et al.*, 2014). Globalement, la plupart des études cliniques réalisées ne mettent en évidence que des effets anticancéreux relativement faibles pour les TZD.

Toutefois, les TZD ont montré des effets intéressants en thérapie combinatoire. En effet, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, ils améliorent l'efficacité de nombreux agents anticancéreux (Fröhlich and Wahl, 2015). Par exemple, la TGZ potentialise l'inhibition de croissance induite par le cisplatine et le paclitaxel dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules. De plus, la combinaison de TGZ ou de PGZ avec le cisplatine inhibe la croissance tumorale dans des modèles de souris xéno greffées de manière plus efficace que les composés utilisés seuls (Reddy *et al.*, 2008). Le traitement TGZ + cisplatine améliore significativement la survie de souris transplantées avec des cellules de mésothéliome pleural malin (Hamaguchi *et al.*, 2010). La combinaison de la TGZ avec le trastuzumab ou le tamoxifène inhibe la croissance de cellules cancéreuses mammaires de façon significative (Yang *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2008). Également dans les cellules cancéreuses mammaires, la RGZ et la CGZ augmentent l'efficacité de la doxorubicine (Arif *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'effet cytotoxique de la gemcitabine sur des cellules cancéreuses pancréatiques s'accroît lorsque ce composé est utilisé en combinaison avec la PGZ ou la RGZ. *In vivo*, la combinaison de la gemcitabine avec la PGZ inhibe la croissance tumorale plus efficacement que lorsqu'elle est utilisée seule (Koga, 2011). En plus d'améliorer l'efficacité des agents anticancéreux, les TZD sont aussi capables de réduire la résistance et la toxicité de certains composés. Dans un modèle de cancer de poumon résistant aux sels de platine, l'association de carboplatine avec la RGZ réduit de façon synergique la croissance tumorale *in vivo* (Girnun *et al.*, 2008). En plus de potentialiser l'inhibition de la croissance

Stade	Nombre de patients	Type de tumeur	TZD	Agent anticancéreux	Effets	Référence
Phase I	14	Cancer du sein hormonodépendant métastatique	RGZ	Exemestane et metformine	4 patients présentant une stabilisation de la maladie	Esteva 2013
Phase II	6	Angiosarcome (5) Hémangio-endothéliome (1)	PGZ	Rofecoxib et trofosfamide	3 patients avec une progression de la maladie dont le patient avec hémangioendothéliome 1 patients avec une rémission partielle 2 patients avec une rémission complète	Vogt 2003
Phase II	15	Gliome de haut grade	PGZ	Rofecoxib et capecitabine ou temozolomide	Stabilisation de la maladie chez 4 patients	Hau 2007
Phase II	40	Mélanome métastatique (19) Sarcome des tissus mous (21)	PGZ	Rofecoxib et trofosfamide	Stabilisation de la maladie chez 2 patients avec mélanome et 3 patients avec sarcome Rémission partielle chez 1 patient avec mélanome et 1 patient avec sarcome Rémission complète chez 1 patient avec mélanome et 3 patients avec sarcome	Reichle 2004
Phase II	45	Carcinome rénal métastatique	PGZ	Etoricoxib, interféron- α et capecitabine	11 patients avec une progression de la maladie 18 patients avec stabilisation de la maladie 12 patients avec une rémission partielle 4 patients avec une rémission complète	Walter 2012
	3	Leucémie myéloïde chronique	PGZ	Imatinib	Réponse moléculaire complète chez tous les patients	Prost 2015
Phase II	24	Leucémie myéloïde chronique	PGZ	Imatinib	56% des patients ont une réponse moléculaire contre 23% des patients ayant seulement reçu l'imatinib	Rousselot 2016
Phase II	38	Carcinome hépatocellulaire	PGZ	Rofecoxib et capecitabine	8 patients avec une progression de la maladie Stabilisation de la maladie chez 28 patients 2 patients avec une rémission partielle	Walter 2017
Phase I	15	Cancer de la thyroïde anaplasique	EFA	Paclitaxel	Réponse partielle chez 1 patient Stabilisation de la maladie chez 7 patients	Smallridge 2013
Phase I	14	Cancer du colon métastatique	EFA	FOLFIRI	8 patients avec stabilisation de la maladie	Komatsu 2014

Tableau 6 : Etudes cliniques réalisées en utilisant des TZD en combinaison avec des agents anticancéreux dans différents types de cancer. EFA, efatutazone; FOLFIRI, 5-fluorouracile, levo-leucovorine et irinotecan.

tumorale induite par le cisplatine dans un modèle *in vivo* de cancer du sein, la RGZ permet de réduire la néphrotoxicité de ce composé (Tikoo *et al.*, 2009). Plusieurs essais cliniques impliquant principalement la PGZ et l'efatutazone ont été mis en place dans le cadre des thérapies combinatoires (Tableau 6). Ainsi, Prost *et al.* ont montré que la PGZ est capable de cibler la population de CSC de leucémie myéloïde chronique. Via l'activation de PPAR γ , la PGZ induit une diminution de l'expression de STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) aboutissant à l'inhibition de ses cibles, HIF2 α et CITED2, impliquées dans la quiescence et le caractère souche des cellules souches leucémiques. De cette façon, ces CSC deviennent sensibles à l'effet de l'imatinib (Prost *et al.*, 2015).

4. Découverte de mécanismes anticancéreux PPAR γ -indépendants

De nombreuses études suggèrent que les effets anticancéreux des TZD ne sont pas seulement liés à l'activation du récepteur PPAR γ mais seraient également le résultat d'évènements PPAR γ -indépendants. Tout d'abord, l'activité anticancéreuse des TZD n'est corrélée ni à leur puissance d'activation de PPAR γ ni au niveau d'expression de PPAR γ dans les cellules. La TGZ et la CGZ induisent l'apoptose des cellules cancéreuses plus efficacement que la RGZ et la PGZ, qui sont les plus puissants agonistes de PPAR γ (Wei *et al.*, 2010). Les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP exprimant faiblement PPAR γ sont plus sensibles aux effets anticancéreux de la TGZ par rapport à leurs homologues, les cellules PC-3, qui expriment fortement PPAR γ (Shiau *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été observés entre les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7 ayant un niveau d'expression de PPAR γ différent (Huang *et al.*, 2005). Ces résultats ont été confirmés grâce à l'utilisation d'antagonistes de PPAR γ et de petits ARN interférents inhibant PPAR γ (Lecomte *et al.*, 2008). De plus, afin d'améliorer la distinction entre les effets PPAR γ -dépendants et -indépendants, des analogues inactifs de TZD ont été synthétisés (Shiau *et al.*, 2005). La Δ 2-TGZ, Δ 2-CGZ, Δ 2-RGZ et Δ 2-PGZ sont les dérivés respectifs de la TGZ, CGZ, RGZ et PGZ (Figure 30). Ils possèdent une double liaison adjacente au cycle TZD qui rigidifie leur structure chimique empêchant leur fixation à PPAR γ et son activation. En dépit de leur incapacité à activer PPAR γ , ces dérivés conservent une activité anticancéreuse (Huang *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2007; Lecomte *et al.*, 2008; Colin *et al.*, 2010; Berthe *et al.*, 2016). En outre, il a été montré que la Δ 2-TGZ et la Δ 2-CGZ inhibent la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques LNCaP et PC-3 plus efficacement que leur composé parent (Shiau *et al.*, 2005).

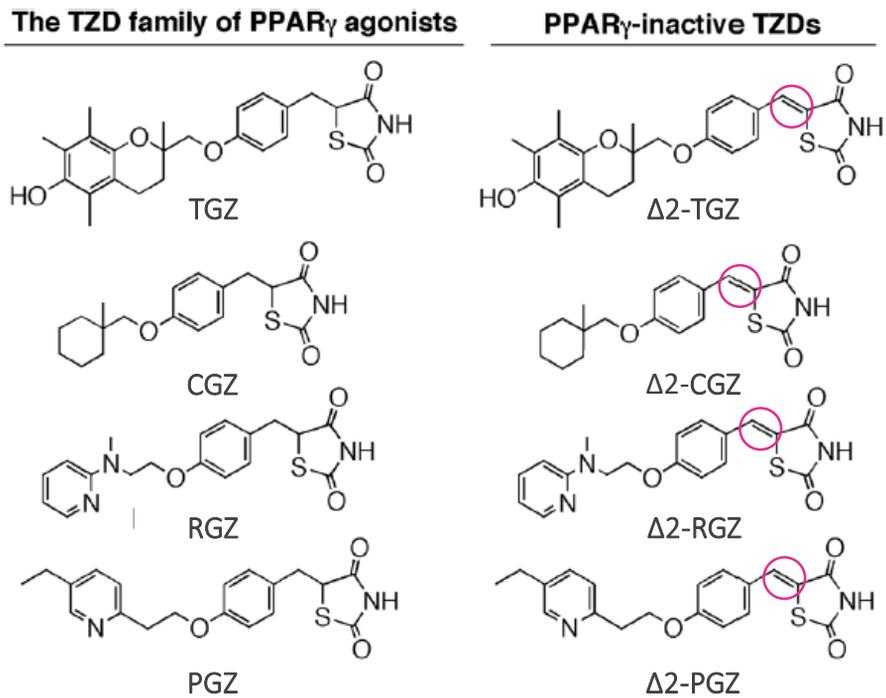


Figure 30 : Structure chimique des TZD et leur dérivé Δ 2. Les dérivés Δ 2 possèdent une double liaison (insaturation) (cercle rose) adjacente au cycle thiazolidine-2,4-dione qui leur confère une rigidité empêchant l'activation du récepteur PPAR γ (adapté de Weng *et al.*, 2006).

De nombreuses études ont mis en évidence différents mécanismes impliqués dans les effets anticancéreux PPAR γ -indépendants des TZD dont l'apoptose, l'autophagie, l'activation de différentes voies de signalisation, le stress du réticulum endoplasmique ou encore la dégradation protéasomale de différentes protéines (Grillier-Vuissoz *et al.*, 2012).

4.1 Activité proapoptotique

L'induction de l'apoptose par les TZD est en partie indépendante de l'activation de PPAR γ . La TGZ induit le clivage des caspases 8, 9 et 3 accompagné du clivage de PARP dans les cellules cancéreuses de vessie RT4 et T24 de façon PPAR γ -indépendante (Plissonnier *et al.*, 2010). Ces événements sont dus à l'activation par la TGZ des voies intrinsèque (augmentation de l'expression de Bax et diminution de l'expression de Bid) et extrinsèque (augmentation de l'expression des récepteurs de mort DR4 et DR5 ainsi que de leur ligand TRAIL) (Plissonnier 2010). Dans les cellules cancéreuses pancréatiques Mia Paca-2, la TGZ induit l'apoptose via la voie intrinsèque : elle conduit à une diminution de l'expression de Bcl-2 et au clivage de la caspase 3 indépendamment de PPAR γ (Fujita *et al.*, 2017).

La $\Delta 2$ -TGZ induit l'apoptose des cellules cancéreuses pancréatiques PC-3 tout comme la TGZ, cependant elle induit le relargage de cytochrome c et une fragmentation de l'ADN de manière plus efficace que le composé parent. L'induction de l'apoptose est due à l'inhibition de l'interaction des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et BclX_L avec la protéine pro-apoptotique Bak suivie de l'activation de la caspase 9 (Shiau *et al.*, 2005). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, la $\Delta 2$ -TGZ entraîne un dysfonctionnement mitochondrial (perturbation du potentiel de membrane mitochondriale) ainsi que l'activation de la caspase 7 et le clivage de PARP, à l'origine du processus apoptotique (Colin-Cassin *et al.*, 2015).

4.2 Production d'ERO

Certaines études ont souligné l'implication des TZD dans la production d'ERO dans des cellules cancéreuses et des cellules saines. La RGZ et la CGZ induisent une rapide augmentation de la production d'ERO dans des astrocytes primaires et des cellules de gliomes. Cette hausse du taux d'ERO participerait à la cytotoxicité des deux TZD (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004). Tout comme la RGZ et la CGZ, la TGZ induit la production d'ERO dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 via l'activation du gène *POX* (proline oxydase) pouvant induire l'apoptose suite à la génération d'ERO (Pandhare *et al.*, 2006). La TGZ est également à

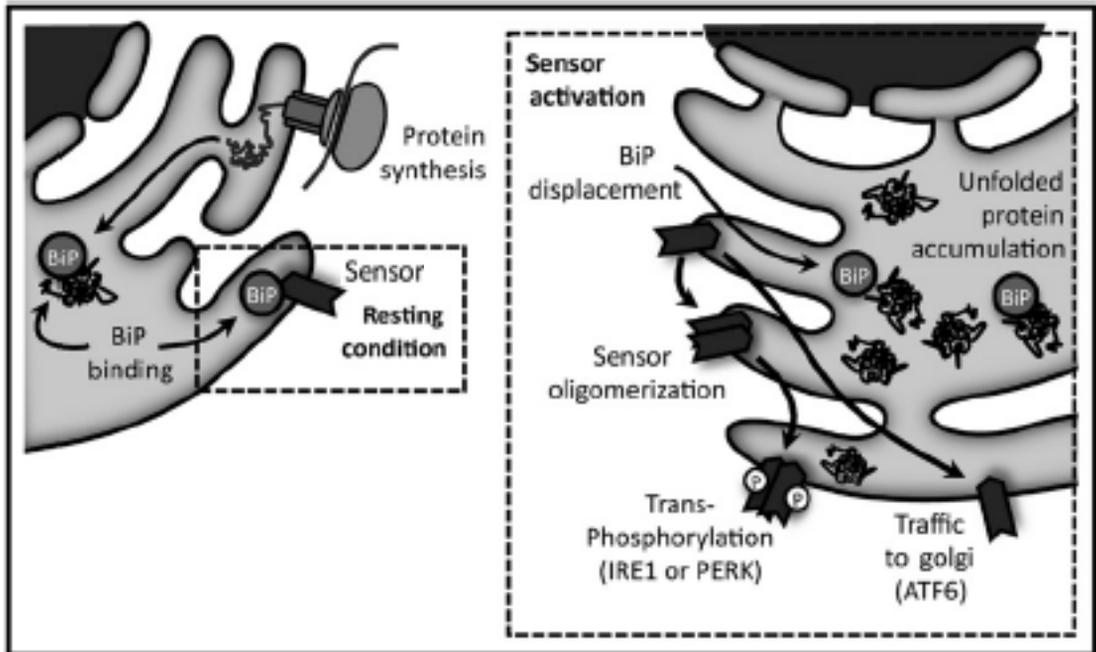


Figure 31 : Induction de la réponse UPR à la suite d'un stress du réticulum endoplasmique (RE). En conditions normales (resting condition), les récepteurs transmembranaires « senseurs » (sensor) IRE1 α , ATF6 et PERK sont associés à la protéine chaperonne BiP. Suite à un stress du RE (sensor activation, encadré pointillé), BiP se dissocie de chaque senseur et se fixe sur les protéines mal repliées s'étant agrégées dans la lumière du RE. IRE1 α , ATF6 et PERK, alors libres, sont activés et 3 voies de signalisation sont induites menant à la mise en place de la réponse UPR (adapté de Bravo *et al.*, 2013).

l'origine de l'accumulation d'ERO qui participe à l'inhibition de croissance des cellules cancéreuses pulmonaires A549 (Wang *et al.*, 2010).

4.3 Stress du RE

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 repliées dans la lumière du RE (Bravo *et al.*, 2013). Afin de rétablir l'homéostasie du RE, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) se met en place (Figure 31). La protéine chaperonne BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein), aussi nommée GRP78 (Glucose-Regulated Protein, 78 kDa), est constitutivement associée à trois senseurs situés dans la membrane du RE : IRE1 α (inositol requiring enzyme 1 α), PERK (pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase) et ATF6 (activating transcription factor 6). En cas d'accumulation de protéines mal repliées, BiP se dissocie de chaque senseur et se fixe sur ces protéines mal repliées, menant à l'activation des 3 partenaires transmembranaires. Cela va notamment amplifier l'expression de la protéine chaperonne BiP. Si le stress se prolonge, la réponse UPR peut évoluer vers une signalisation pro-apoptotique (Bravo *et al.*, 2013). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, la $\Delta 2$ -TGZ induit un stress du RE en activant les acteurs de la réponse UPR tels que BiP, PERK et CHOP (Colin-Cassin *et al.*, 2015; Berthe *et al.*, 2016). Ce dernier est un facteur de transcription pro-apoptotique activé en cas d'apoptose induite par le stress du RE. Toutefois dans cette étude, le stress du RE induit par la $\Delta 2$ -TGZ n'est pas à l'origine de l'apoptose observée dans ces cellules puisque l'utilisation d'un ARN interférant inhibant l'expression de CHOP n'altère pas l'activation de l'apoptose par la $\Delta 2$ -TGZ (Colin-Cassin *et al.*, 2015). STG28 (dérivé de la $\Delta 2$ -TGZ) et OSU-CG12 (dérivé de la $\Delta 2$ -CGZ) induisent aussi un stress du RE dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, plus efficacement que la TGZ et la CGZ respectivement (Wei *et al.*, 2010).

5. **Modification du métabolisme énergétique par les TZD**

5.1 Restriction énergétique et dérivés de la $\Delta 2$ -CGZ

Des études ont montré que des dérivés de la $\Delta 2$ -CGZ agissent comme des ERMA (energy restriction mimetic agents) à l'instar du 2-DG et du resveratrol. En effet, ils sont capables d'imiter une privation de glucose et induisent des réponses cellulaires caractéristiques d'une restriction énergétique.

Le composé OSU-CG12 perturbe également le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses de prostate LNCaP, comme le 2-DG et le resveratrol. Il diminue l'activité glycolytique : il induit une diminution de l'entrée de glucose dans les cellules et une baisse de la production de NADH et de lactate. Il entraîne une diminution de l'expression de deux enzymes glycolytiques, l'hexokinase 2 et la phosphofructokinase 1 (Wei *et al.*, 2010). Cependant, l'ajout de glucose dans le milieu de culture des cellules les protège des effets antiprolifératifs de ce composé. Par ailleurs, l'OSU-CG12 est à l'origine de différents événements caractéristiques d'une privation en glucose qui peuvent aboutir à des phénomènes d'apoptose ou d'autophagie : il induit l'expression de Sirt1 (silent information regulator 1/sirtuin 1), l'activation de l'AMPK et un stress du RE. L'expression transitoire de Sirt1 favorisée par OSU-CG12 joue un rôle clé dans l'apoptose. L'activation de Sirt1 permet d'augmenter le taux de β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein) qui induit la dégradation protéasomale de la cycline D1, impliquée dans le cycle cellulaire, et du facteur de transcription Sp1 (Wei *et al.*, 2009, 2010). Ce dernier régule l'expression d'histones désacétylases et d'histones déméthylases et sa diminution entraîne l'activation épigénétique du gène suppresseur de tumeur *KLF6* impliqué dans l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses de prostate LNCaP (Chen *et al.*, 2011). Lorsque AMPK est activée, elle réprime la voie de signalisation mTOR. Dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, l'activation d'AMPK induite par l'OSU-CG12 est accompagnée d'une diminution de la phosphorylation de mTOR et de son effecteur p70S6K conduisant à l'induction du processus d'autophagie (Wei *et al.*, 2010).

D'autres dérivés de la Δ 2-CGZ, l'OSU-53 et l'OSU-CG5, induisent également une réponse cellulaire caractéristique d'une restriction énergétique dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et les cellules cancéreuses coliques HCT116 respectivement (Lee *et al.*, 2011; Arafa *et al.*, 2014). Ces deux composés ont la capacité d'activer l'AMPK, ce qui est associé à une inhibition des voies de signalisation Akt et mTOR. L'OSU-CG5 diminue aussi l'entrée de glucose dans les cellules et induit un stress du RE, menant à l'induction d'apoptose (Arafa *et al.*, 2014). L'OSU-53 modifie le métabolisme énergétique puisqu'il induit l'expression de régulateurs clés de la biogenèse mitochondriale tels que PGC1- α , Tfam et NRF1. Il présente des potentialités antiprolifératives *in vitro* et *in vivo* dépendantes de l'activation d'AMPK. Par ailleurs, il induit l'apoptose ainsi que l'autophagie des cellules cancéreuses mammaires. Cependant, l'initiation de l'autophagie est un mécanisme protecteur des cellules face à l'activité antiproliférative de l'OSU-53. En effet, l'utilisation de la chloroquine, un inhibiteur de

l'autophagie, augmente l'activité anticancéreuse de l'OSU-53 dans les cellules cancéreuses mammaires dans un modèle de souris xéno greffées (Lee *et al.*, 2011). En revanche ce composé n'impacte pas la viabilité des cellules mammaires non cancéreuses MCF-10A.

Le composé parent, la CGZ, impacte également le métabolisme énergétique. Elle induit l'activation d'AMPK dans des cellules cancéreuses ovariennes (Shin *et al.*, 2014). De plus, elle induit la mort de ces cellules via un blocage de l'entrée de glucose dû à l'inhibition de l'expression du transporteur GLUT-1 (Shin *et al.*, 2014). La diminution de l'expression de Sp1 et de la β -caténine peut être à l'origine de cette inhibition puisque GLUT-1 est un de leurs gènes cibles.

5.2 Atteinte mitochondriale par les TZD : un rôle dans l'effet antidiabétique ?

Les études caractérisant l'induction d'une restriction énergétique par les dérivés de la $\Delta 2$ -CGZ n'ont pas porté sur le fonctionnement mitochondrial des cellules. Pourtant, des effets rapides et directs des TZD sur les mitochondries ont été rapportés (Feinstein *et al.*, 2005).

L'équipe de Fürnsinn et Waldhäusl a étudié l'effet des ligands de PPAR γ sur le métabolisme du glucose dans le muscle squelettique. Ils ont démontré que la TGZ, mais également la PGZ, induisent une rapide inhibition de l'oxydation du glucose dans les mitochondries des cellules de muscles squelettiques de rat. Cet événement est associé à une augmentation de l'activité glycolytique qui se traduit par une hausse du transport de glucose et de la production de lactate (Fürnsinn *et al.*, 1997; Fürnsinn *et al.*, 2000; Brunmair *et al.*, 2001). L'augmentation du métabolisme du glucose par les TZD a également été observée dans d'autres types cellulaires tels que les astrocytes de rongeurs (Dello Russo *et al.*, 2003; Spagnolo *et al.*, 2007). Les effets des TZD sont très rapides (à partir de 60 à 90 minutes), ils ne peuvent dépendre de la transcription des gènes. De plus, la TGZ présente une meilleure efficacité que la PGZ et la RGZ alors qu'elle est un plus faible agoniste de PPAR γ (Brunmair *et al.*, 2001; Dello Russo *et al.*, 2003). Ainsi, ces données sous-entendent que l'action des TZD sur le métabolisme du glucose est probablement PPAR γ -indépendante.

La stimulation de l'activité glycolytique par les ligands de PPAR γ peut être la conséquence d'une altération du fonctionnement mitochondrial. En effet, Dello Russo *et al.* ont montré que la TGZ et la PGZ induisent une baisse de la respiration dans les mitochondries isolées de cerveau de rat et une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale (Dello Russo *et al.*, 2003). Dans des astrocytes primaires de rat, la CGZ et la PGZ induisent une augmentation de la production d'ERO directement impliquée dans la cytotoxicité de la CGZ (Pérez-Ortiz *et al.*,

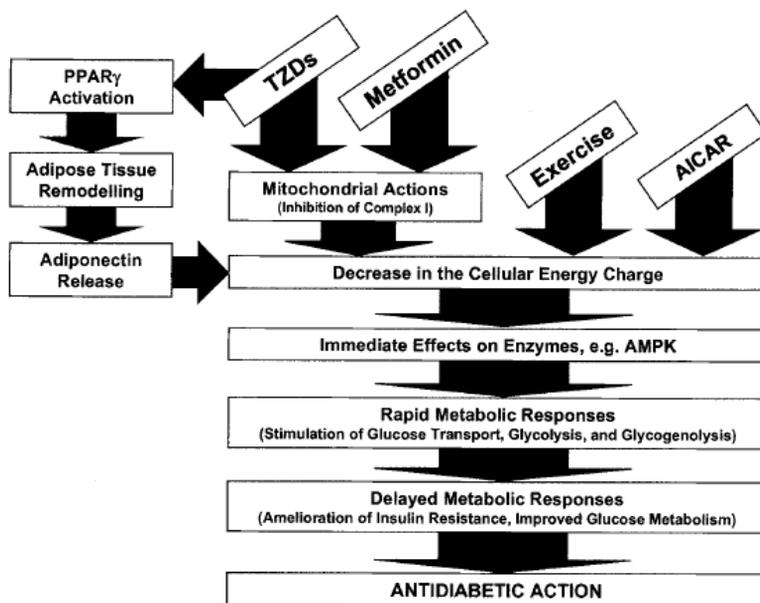


Figure 32 : Potentiel rôle de l'inhibition mitochondriale dans l'action antidiabétique de la metformine et des TZD. Brunmair émet l'hypothèse que l'exercice, la metformine et les TZD diminuent la charge énergétique des cellules par une augmentation de la consommation d'ATP (exercice), via la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux (TZD) ou par altération de la respiration via l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire (TZD et metformine). Ces mêmes effets sont induits par AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside) qui mime une hausse d'AMP cellulaire. Les modifications de la charge énergétique sont connues pour affecter certaines enzymes telle que l'AMPK qui pourrait contribuer aux réponses métaboliques à l'origine de l'action antidiabétique des composés (d'après Brunmair *et al.*, 2004).

2007). Puis Brunmair *et al.* ont montré que la TGZ, la PGZ et la RGZ induisent une baisse d'activité du complexe I de la chaîne respiratoire dans les muscles squelettiques et le foie de rat ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative (Brunmair *et al.*, 2004). Les auteurs observent également une diminution de l'oxydation du glucose et une stimulation de la glycolyse anaérobie avec une augmentation du transport de glucose et de la production de lactate. La metformine, dont le mécanisme d'action repose en partie sur l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire, induit des effets similaires aux TZD. Suite à ces observations, Brunmair émet alors l'hypothèse que l'altération de la respiration mitochondriale due à l'inhibition du complexe I pourrait être impliquée dans l'action antidiabétique de ces composés (Figure 32). En effet, il suggère que le dysfonctionnement mitochondrial entraîne une diminution du niveau d'ATP conduisant à l'augmentation du ratio AMP/ATP à l'origine de l'activation de l'AMPK. L'activation de ce senseur énergétique par les TZD résulte soit de l'augmentation du ratio AMP/ATP soit de l'adiponectine (Fryer *et al.*, 2002; Nawrocki *et al.*, 2006). Une fois activée, l'AMPK contribuerait au déclenchement de réponses métaboliques appartenant à l'action antidiabétique de la metformine et des TZD. Cette hypothèse est confirmée par plusieurs études qui montrent que les ligands de PPAR γ conduisent à l'activation d'AMPK dans les tissus hépatiques, adipeux et musculaires qui permet d'améliorer le métabolisme du glucose en augmentant l'entrée de glucose dans les cellules (Konrad *et al.*, 2005; LeBrasseur *et al.*, 2006; Nawrocki *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2006).

Des études ont mis en évidence d'autres cibles potentielles des TZD. La PGZ et la RGZ diminuent l'activité du complexe I mais également du complexe III dans des mitochondries isolées de foie de rat et de souris (Sanz *et al.*, 2011; García-Ruiz *et al.*, 2013). Cette inhibition est associée à une baisse de la respiration mitochondriale et de la production d'ERO (Sanz *et al.*, 2011). L'activité des complexes I, II+III, IV et V des mitochondries isolées de cœur bovin chute après l'apport de TGZ et de CGZ (Nadanaciva *et al.*, 2007). De surcroît, dans les cellules HepaRG, TGZ, PGZ et RGZ dégradent la fonction respiratoire mitochondriale : ils induisent une réduction de l'activité des complexes I, III et IV accompagnée d'une baisse de la consommation d'oxygène, d'une augmentation de la production d'ERO et d'une baisse du niveau d'ATP. Ils altèrent également l'ultrastructure mitochondriale (Hu *et al.*, 2015). Parmi ces 3 TZD, la TGZ présente la plus forte efficacité.

Afin de mieux définir le mécanisme d'action des TZD, une équipe a cherché quels pourraient être les sites de fixation de ces composés. Grâce à une expérience de cross-linking, une protéine mitochondriale à laquelle se fixe la PGZ, appelée mitoNEET a été identifiée (Colca *et al.*, 2004).

C'est une protéine à centre fer-soufre localisée dans la membrane externe mitochondriale qui possède un rôle dans la régulation de la fonction mitochondriale et l'homéostasie des lipides (Wiley *et al.*, 2007; Kusminski *et al.*, 2012). Toutefois, suite à des études supplémentaires, ces résultats ont été reconsidérés puisqu'en 2013, Colca *et al.* ont montré que la PGZ est capable de se fixer aux membranes mitochondriales isolées de foie de souris dont le gène codant la protéine mitoNEET a été invalidé (Colca *et al.*, 2013a). Dans cette étude, les auteurs ont identifié une autre cible des TZD : un complexe protéique nommé mTOT (mitochondrial target of thiazolidinediones) situé au niveau de la membrane interne mitochondriale. Ce complexe est composé des deux protéines MPC1 et MPC2 (mitochondrial pyruvate carrier 1 et 2) qui ont pour fonction de transporter le pyruvate à travers la membrane mitochondriale interne (McCommis and Finck, 2015). MPC2 est la protéine à laquelle se lie spécifiquement les dérivés de PGZ (Colca *et al.*, 2013a). Un de ces dérivés, MSDC-060 a été étudié dans un essai clinique de phase II. Il entraîne une diminution du taux de glucose sanguin chez des patients atteints de diabète de type II, de façon similaire à la PGZ, en présentant moins d'effets secondaires (Colca *et al.*, 2013b). Divakaruni et son équipe ont également montré que la TGZ et la RGZ inhibent l'activité de mTOT dans les cellules musculaires, compromettant le transport du pyruvate dans la mitochondrie. Cette inhibition conduit à la diminution de la respiration mitochondriale, à l'activation d'AMPK et à l'augmentation de l'entrée de glucose dans les cellules. Les effets inhibiteurs des TZD disparaissent en cas d'ajout de méthyl pyruvate, qui traverse librement la membrane mitochondriale sans emprunter le MPC (Divakaruni *et al.*, 2013). Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle la TGZ et la RGZ sont des inhibiteurs spécifiques de MPC. Ce dernier semble donc être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du diabète de type II.

5.3 Atteinte mitochondriale par les TZD dans les cellules cancéreuses

Plusieurs travaux suggèrent que les effets anticancéreux des TZD sont associés à une atteinte du fonctionnement mitochondrial suggérant que la mitochondrie peut être considérée comme une cible potentielle des TZD dans leur action anticancéreuse (Moon *et al.*, 2016). En effet, dans les cellules de gliomes de rat C6, la RGZ, la CGZ et la PGZ induisent une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire probablement à l'origine de la dépolarisation mitochondriale, de la diminution du pH mitochondrial et de la production d'ERO observées dans ces cellules. Accompagnée d'une diminution du taux de glutathion, la production d'ERO est impliquée dans la diminution de la survie des cellules C6 (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004, 2007). La RGZ altère la respiration mitochondriale en inhibant également l'activité du complexe I dans

les cellules leucémiques HL60 (Scatena *et al.*, 2004). De même, la PGZ diminue la consommation d'oxygène ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate LNCap et PC3 cultivées sous forme de sphéroïdes (Gottfried *et al.*, 2011). Cependant, la PGZ n'altère pas la consommation d'oxygène de cellules non cancéreuses (monocytes primaires). Quant à la TZG, elle réduit considérablement le taux de consommation d'oxygène des cellules cancéreuses coliques HCT116 et des cellules cancéreuses mammaires T47D, preuve d'une inhibition de la respiration mitochondriale. A ce blocage s'ajoutent une augmentation de la production d'ERO et une chute du potentiel de membrane mitochondrial (Moon *et al.*, 2016). Dans d'autres types de cellules cancéreuses mammaires, LCC-9 et MDA-MB-231, ce composé conduit à une augmentation de la production d'ERO ainsi qu'à une augmentation de l'expression de PGC-1 α (Skildum *et al.*, 2011).

D'autre part, en plus de la respiration mitochondriale, les TZD impactent également le métabolisme de la glutamine. Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, la TGZ stimule la consommation de glutamine (glutaminolyse) (Friday *et al.*, 2011). En revanche, dans les cellules cancéreuses pulmonaires (H460) et cervicales (HeLa 229), Reynolds *et al.* ont observé l'effet inverse : une diminution de la glutaminolyse. Dans ces cellules, la TGZ réduit l'entrée de glutamine et inhibe son incorporation dans le cycle de Krebs. S'ensuivent une baisse du niveau d'ATP, une augmentation de la production d'ERO et *in fine* une chute du nombre de cellules. L'effet de la TGZ, indépendant de l'activation de PPAR γ , est dû à la dégradation par le protéasome de l'oncoprotéine c-myc qui participe à la régulation de la glutaminolyse (Reynolds and Clem, 2015).

Comme dans les cellules normales, les TZD stimulent la glycolyse des cellules cancéreuses, ce qui correspond certainement à une réponse adaptative afin de compenser la perturbation de l'activité mitochondriale. D'après certaines études, les TZD induiraient un shift de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse. Suite à l'inhibition du complexe I par la RGZ, une augmentation de la glycolyse, caractérisée par une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate, est observée dans les cellules leucémiques HL60 (Scatena *et al.*, 2004). Ces mêmes effets sont observés avec la TGZ dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, MDA-MB-231 et T47D en réponse à l'altération mitochondriale (Friday *et al.*, 2011; Moon *et al.*, 2016). La TGZ n'entraîne aucune modification d'expression de GLUT1 dans les cellules T47D. En revanche, l'inhibition des voies de signalisation MAPK et de l'AMPK abolit l'effet de la TGZ sur la consommation de glucose indiquant l'implication de ces voies dans la stimulation de la glycolyse induite par la TGZ (Moon *et al.*, 2016). Gottfried

et al. ont également montré que la PGZ induit une augmentation de la production de lactate et une acidification du milieu de culture des cellules cancéreuses prostatiques PC3 (Gottfried *et al.*, 2011). Une étude portant sur des cellules gliales tumorales et des astrocytes de souris montre que suite à une diminution du potentiel de membrane, la TGZ stimule l'activité glycolytique (augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate) de manière plus importante dans les cellules cancéreuses que dans les astrocytes (Spagnolo *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que les astrocytes ont une forte capacité à résister aux effets de la TGZ par rapport aux cellules cancéreuses.

A la suite de cette hypothèse de compensation métabolique, Moon *et al.* ont suggéré que de combiner les TZD avec des agents inhibant la glycolyse permettrait d'augmenter leur action anticancéreuse (Moon *et al.*, 2016). La suppression de glucose dans le milieu de culture des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 affecte la capacité de la TGZ à augmenter la production de lactate (Friday *et al.*, 2011). De même, la diminution de la concentration de glucose dans le milieu de culture améliore la capacité de la TGZ à diminuer le nombre de cellules cancéreuses mammaires T47D et coliques HCT116 (Moon *et al.*, 2016). La combinaison de la PGZ avec l'inhibiteur de la glycolyse 2-DG inhibe de façon significative la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC3 cultivées sous forme de sphéroïdes et entraîne également la désintégration de ces sphéroïdes (Gottfried *et al.*, 2011). Une autre étude a aussi démontré un effet synergique de la combinaison de la TGZ avec la metformine sur la diminution du nombre de cellules cancéreuses pulmonaires (H460) et cervicales (HeLa 229) (Reynolds and Clem, 2015).

Ces données démontrent l'intérêt de cibler le métabolisme énergétique dans une stratégie thérapeutique et suggèrent une potentielle utilisation des TZD en thérapie combinatoire.

6. Toxicité et nouveaux dérivés

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des effets de dérivés de TGZ, ainsi les propos détaillés dans la suite de cet exposé porteront majoritairement sur la TGZ et ses dérivés.

6.1 Mécanismes impliqués dans la toxicité de la TGZ

Lors d'essais cliniques aux États-Unis, parmi 2510 patients recevant la TGZ, 18 d'entre eux ont présenté des lésions hépatocellulaires (Watkins and Whitcomb, 1998). Suite à l'administration de TGZ, deux patients diabétiques ont également développé une hépatotoxicité sévère (Gitlin, 1998). La TGZ est ainsi associée à une hépatotoxicité idiosyncratique et imprévisible qui n'est liée ni au temps d'administration ni à la dose utilisée. De surcroît, ces lésions ne peuvent être

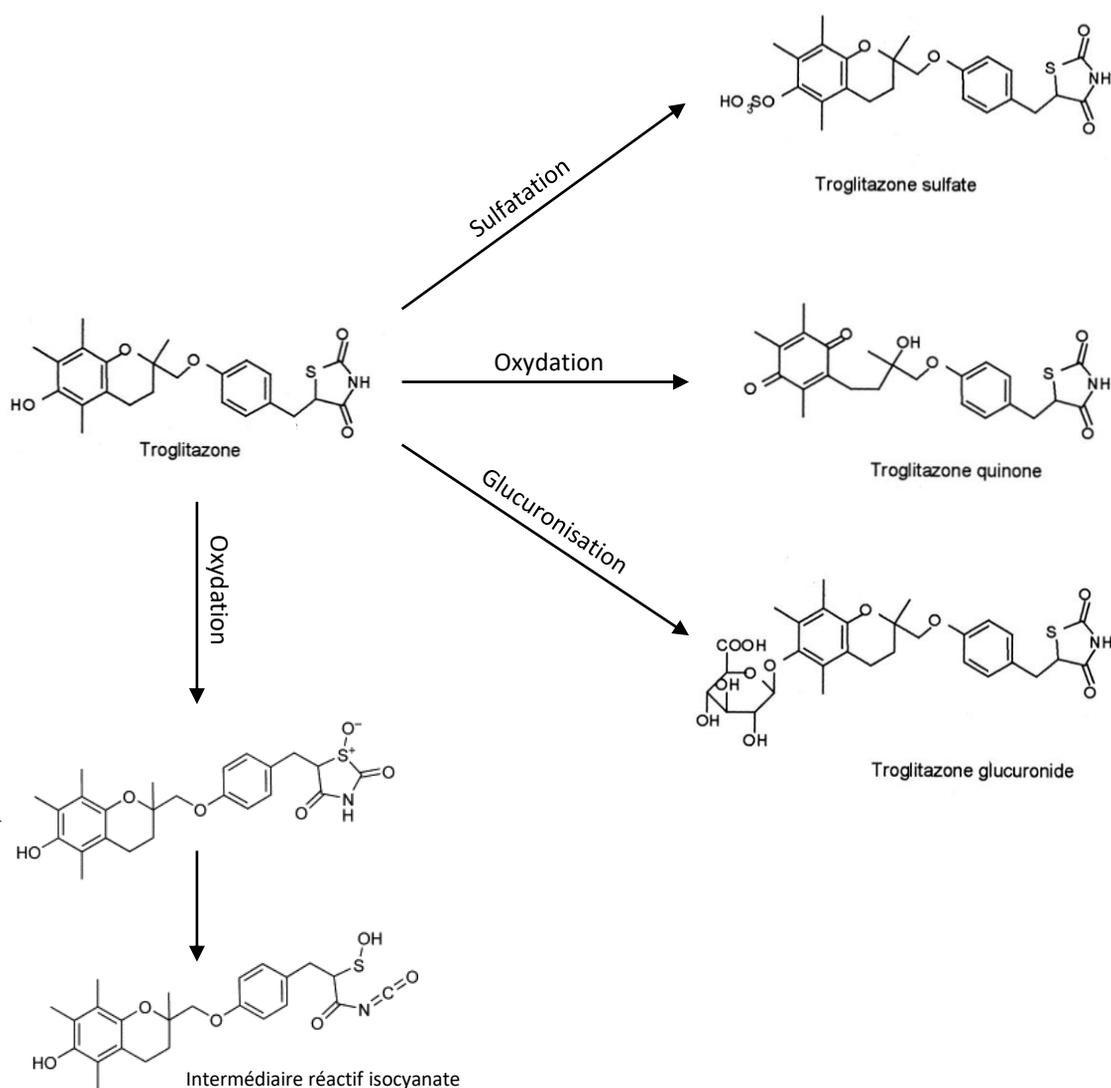


Figure 33 : Métabolisme de la TGZ. La TGZ est métabolisée par 3 voies: la sulfatation à l'origine de la troglitazone sulfate, l'oxydation produisant la troglitazone quinone et la glucuronisation qui conduit à la troglitazone glucuronide. Ces métabolites sont stables. L'atome de soufre au niveau du cycle thiazolidine-2,4-dione peut subir une oxydation qui aboutit à la formation d'un intermédiaire réactif de type isocyanate (modifié d'après He *et al.*, 2004).

reproduites dans les modèles animaux (Chojkier, 2005). Suite à ces observations, en 2000 la TGZ a été retirée du marché mondial. Cependant, de nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer les mécanismes impliqués dans la toxicité hépatique induite par la TGZ. Plusieurs mécanismes ont été rapportés.

Certains ont proposé qu'une atteinte mitochondriale peut correspondre à l'une des causes de la toxicité de la TGZ. Des études réalisées sur des lignées cellulaires hépatiques (HepG2 ou HepaRG) et sur des hépatocytes humains ont mis en évidence des altérations mitochondriales pouvant être impliquées dans l'effet toxique de la TGZ : une chute du potentiel de membrane mitochondriale, un dysfonctionnement de la respiration mitochondriale, une augmentation de la production d'ERO ou des dommages de l'ADN mitochondrial (Bova *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2008; Rachek *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2015). Liao *et al.* ont également montré que la dégradation de PGC-1 α induite par la TGZ est impliquée dans l'altération de la fonction mitochondriale et la toxicité de ce composé dans les cellules HepG2 (Liao *et al.*, 2010). En revanche, ces effets ne sont pas observés avec la RGZ et la PGZ (Rachek *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2010). Ces deux puissants agonistes de PPAR γ sont donc moins hépatotoxiques que la TGZ. De plus, l'utilisation de l'antagoniste de PPAR γ GW9662 ne modifie pas l'action de la TGZ sur les hépatocytes (Rachek *et al.*, 2009). Ces données suggèrent que la toxicité de la TGZ est indépendante de l'activation de PPAR γ .

D'autres travaux traitent de la toxicité des métabolites de la TGZ. Chez l'Homme, la TGZ est métabolisée de trois manières : la sulfatation catalysée par l'enzyme phénol sulfotransférase, la conjugaison d'un acide glucuronique (glucuronisation) catalysée par l'UDP-glucuronyltransférase1A1 (UGT1A1) et l'oxydation catalysée par les cytochromes P450 CYP2C8 et CYP3A4 (Yokoi, 2010). Ces réactions permettent de former respectivement la TGZ sulfate, la TGZ glucuronide et la TGZ quinone (Figure 33). Bien que ces métabolites soient relativement stables, la TGZ peut être à l'origine de la production de métabolites réactifs pouvant jouer un rôle dans la toxicité hépatique.

La TGZ sulfate est le principal métabolite comptant pour 70% des métabolites de TGZ retrouvé dans le plasma humain. Ce métabolite peut avoir des effets toxiques puisque chez le rat, il est capable d'inhiber les pompes d'export de sels biliaires Bsep (bile salt export pump) situées au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes (Funk, 2001; Funk *et al.*, 2001). Cette inhibition perturbe l'évacuation des sels biliaires et facilite leur accumulation dans le foie. Ces effets mènent à une cholestase intrahépatique, notamment chez l'Homme, qui peut contribuer

à la toxicité hépatique de la TGZ (Funk *et al.*, 2001). Des signes évidents de cholestase ont été décrits chez des patients présentant une toxicité hépatique due à la TGZ (Gitlin, 1998). De plus, Saha *et al.* ont montré que la TGZ sulfate présente un effet toxique direct sur les hépatocytes humains THLE-2 (Saha *et al.*, 2010a).

Des études font également référence à la toxicité de métabolites réactifs formés suite à l'oxydation de la TGZ par CYP2C8 et CYP3A4 au niveau du groupe hydroxyle en position 6 du groupement chromane ou au niveau du cycle TZD (Mazerbourg *et al.*, 2016). Tout d'abord, la TGZ quinone peut être métabolisée en intermédiaires quinones hautement électrophiles, ce qui résulte en une hépatotoxicité et une immunotoxicité importantes (Yamamoto *et al.*, 2001; Yokoi, 2010). L'atome de soufre au niveau du cycle TZD peut aussi être oxydé par CYP3A4 et former un intermédiaire réactif isocyanate réagissant avec le GSH (Figure 33). Une déplétion en GSH peut être impliquée dans la toxicité de la TGZ (Saha *et al.*, 2010a; Yokoi, 2010). Saha *et al.* ont également étudié le rôle de l'atome de soufre au niveau du cycle TZD dans la toxicité de la TGZ. Pour cela, ils ont synthétisé un dérivé de la TGZ, la trosuccinimide (TSN), dans lequel l'atome de soufre a été remplacé par un groupement méthylène. Le cycle TZD a été remplacé par un cycle pyrrolidine-2,5-dione ; la TSN est donc une pyrrolidinedione. Dans les hépatocytes humains THLE-2, ils ont montré que la TSN ne produit pas de métabolites réactifs par rapport à la TGZ et ce composé apparaît beaucoup moins toxique que le composé parent. De plus, il induit une déplétion de GSH moins importante que la TGZ. Ces résultats témoignent de l'implication de l'atome de soufre du cycle TZD dans la toxicité de la TGZ par la formation de métabolites réactifs (Saha *et al.*, 2010b).

Certains ont tenté d'expliquer la variabilité de l'hépatotoxicité chez les patients. Il a été montré que la TGZ induit CYP3A dans les hépatocytes de rats et humains ce qui augmente la formation de métabolites de type quinone. Dans un rôle de détoxification, le GSH réagit avec les quinones et cette conjugaison du GSH est catalysée par l'action de la glutathion S-transférase (GST). Dans un groupe de patients traités avec la TGZ, Watanabe *et al.* ont montré une corrélation entre une augmentation anormale d'enzymes hépatiques (alanine aminotransférase et aspartate aminotransférase) et le génotype double nul des isoformes GSTM1 et GSTT1 (conduisant à une accumulation de quinones) (Watanabe *et al.*, 2003). Ainsi la différence de capacité de détoxification interindividuelle pourrait contribuer à la susceptibilité de toxicité hépatique due à la TGZ (Yokoi, 2010; Mazerbourg *et al.*, 2016).

6.2 Vers de nouveaux dérivés de la TGZ

Le repositionnement de médicament (drug repositioning) est une stratégie actuelle visant à identifier de nouveaux mécanismes d'action de composés déjà mis sur le marché en vue de les utiliser pour d'autres indications/applications thérapeutiques que celles établies initialement. Au vu des travaux réalisés sur la TGZ, cette dernière s'est inscrite dans la démarche de repositionnement des composés : passer d'antidiabétique à anticancéreux. Cependant le développement de la TGZ en tant qu'agent anticancéreux a été freiné en raison de sa toxicité hépatique. Dans le but de pallier ces effets secondaires, des modifications de la structure chimique de la TGZ ont été réalisées afin d'améliorer l'efficacité anticancéreuse et de réduire la toxicité hépatique. Dans ce contexte, plusieurs équipes ont étudié les relations structure-activité et ont modulé la structure de la TGZ en éliminant les sites réactifs pouvant induire la formation de métabolites réactifs toxiques.

Salamone *et al.* ont comparé l'activité de la TGZ, de la Δ^2 -TGZ et de leurs dérivés sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 ainsi que sur des hépatocytes humains en culture primaire (Salamone *et al.*, 2012). Ils ont déterminé l'influence de la double liaison (insaturation) adjacente au cycle TZD ainsi que du groupe hydroxyle situé en position 6 du groupement chromane et la nature des substituants pouvant remplacer le groupe hydroxyle. La présence de l'insaturation (Δ^2 -TGZ et dérivés) améliore légèrement l'activité anticancéreuse dans les cellules MCF-7 et améliore la survie des hépatocytes par rapport aux composés saturés (TGZ et dérivés). De plus, le remplacement du groupe hydroxyle par un atome d'hydrogène ou un substituant non polaire améliore l'activité anticancéreuse des composés dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 et diminue également la toxicité envers les hépatocytes par rapport à la Δ^2 -TGZ (Salamone *et al.*, 2012). Par la suite, cette même équipe a approfondi les travaux en supprimant le groupe hydroxyle (désoxygénation) du groupement chromane et en liant la Δ^2 -TGZ ainsi désoxygénée à une chaîne alkyle linéaire et non polaire via une liaison stable carbone-carbone (Bordessa *et al.*, 2014). Utilisés à la même concentration, les dérivés désoxygénés de Δ^2 -TGZ diminuent fortement la viabilité des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 par rapport à la Δ^2 -TGZ. Ces dérivés désoxygénés présentent également une toxicité envers les hépatocytes humains bien plus faible que la Δ^2 -TGZ. L'absence de l'atome d'oxygène en position 6 du groupement chromane pourrait prévenir la formation d'intermédiaires de type quinone toxiques impliqués dans la toxicité hépatique (Salamone *et al.*, 2012; Bordessa *et al.*, 2014). Parmi ces dérivés désoxygénés de la Δ^2 -TGZ, le composé 18 qui présente une forte activité cancéreuse et une des plus faibles toxicités sur les

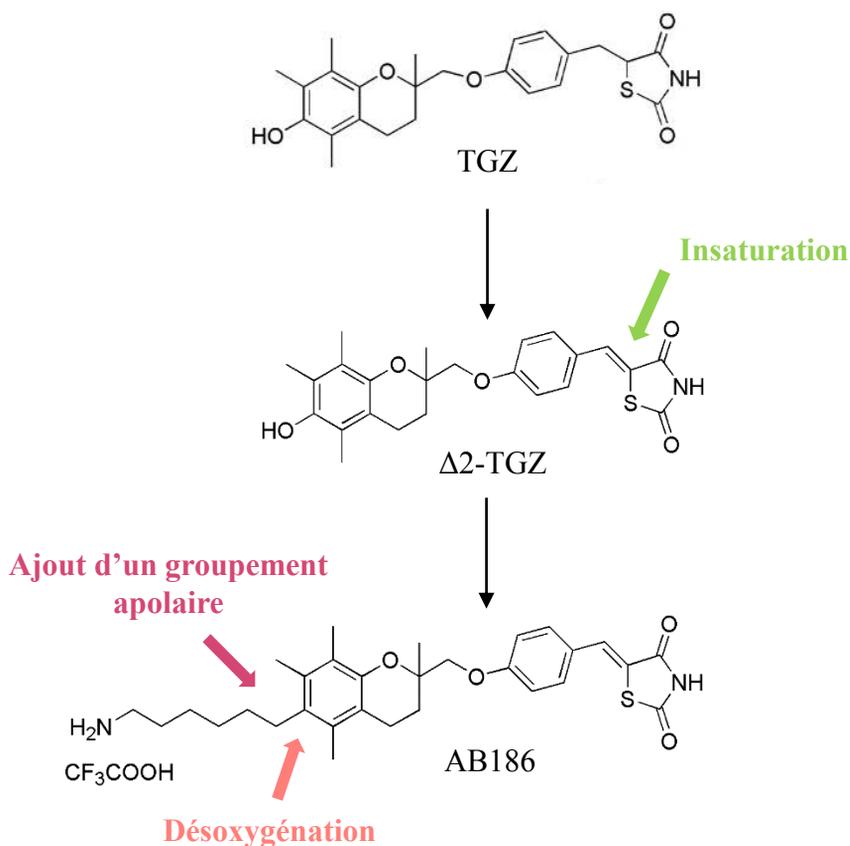


Figure 34 : Evolution de la structure chimique de la TGZ au dérivé de la Δ^2 -TGZ, AB186. La Δ^2 -TGZ est un dérivé de la TGZ possédant une insaturation adjacente au cycle thiazolidine-2,4-dione. Deux modifications ont été apportées à la Δ^2 -TGZ afin d'aboutir au composé AB186 : une désoxygénation en position 6 du groupement chromane et l'ajout d'une chaîne alkyle apolaire (modifié d'après Bordessa *et al.*, 2014).

hépatocytes humains (de l'ordre de 20%) a été breveté en 2013 (brevet WO2013110796) et nommé AB186 (Figure 34).

Saha *et al.* ont adopté une autre stratégie afin de réduire la toxicité hépatique : supprimer l'atome de soufre du cycle TZD (Saha *et al.*, 2010b). Des résultats similaires observés avec la TSN sont obtenus avec la PSN et la RSN, dérivés pyrrolidinediones de la PGZ et la RGZ respectivement : pas de production de métabolites réactifs, une toxicité et une déplétion du GSH moins importantes que les composés parents dans les hépatocytes THLE-2 (Saha *et al.*, 2012). Comme leur composé parent, la TSN et la RSN présentent une activité anticancéreuse dans les cellules cancéreuses hépatiques Huh-7. Cependant TSN est le seul composé à induire l'apoptose de ces cellules et à inhiber les marqueurs tumoraux du foie (Saha *et al.*, 2012).

Bordessa *et al.* se sont également intéressés à une autre approche de modification de la structure de la TGZ qui est de permuter la $\Delta 2$ -TGZ en reliant directement le groupement chromane à l'atome d'azote du cycle TZD. Un des dérivés permutés de la $\Delta 2$ -TGZ présente une forte activité anticancéreuse et aucune toxicité dans les hépatocytes humains (Bordessa *et al.*, 2014).

Ces données mettent en avant l'intérêt de modifier la structure chimique de la TGZ et plus généralement des TZD afin d'aboutir à de nouveaux dérivés présentant une meilleure activité anticancéreuse et une toxicité moindre pouvant mener à une nouvelle utilisation thérapeutique de ces composés.

CONTEXTE ET OBJECTIFS

De nombreuses options thérapeutiques sont disponibles pour les cancers du sein luminaux, HER2 et normal like (hormonothérapie et thérapie ciblée). Par contre, seule la chimiothérapie est utilisée pour les cancers du sein triple-négatifs. Par ailleurs, quels que soient les sous-types de cancer du sein, il existe de nombreux cas d'absence de réponse et des phénomènes de résistance aux traitements. Des études ont montré que dans certains cas les phénomènes de résistance peuvent être dus à la présence de cellules souches cancéreuses au sein des tumeurs. Il s'avère donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. A ce titre il apparaît intéressant de cibler le métabolisme énergétique qui est souvent modifié dans les cellules cancéreuses et les CSC. Dans ce contexte, les TZD pourraient constituer des candidats potentiels. En effet, ces composés présentent une action anticancéreuse et certaines études proposent que cela soit associé à une altération du métabolisme énergétique. Notre laboratoire s'intéresse à la TGZ dont certains dérivés montrent des effets anticancéreux accrus sur les cellules cancéreuses mammaires et une toxicité réduite envers les hépatocytes humains. En collaboration avec une équipe de chimistes de l'université de Lorraine (Laboratoire L2CM, UMR 7053), des dérivés désoufrés de la TGZ ont été synthétisés récemment.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les effets de la TGZ et de quelques-uns de ses dérivés désoufrés dans quatre lignées cancéreuses mammaires. L'effet anti-cancéreux du dérivé EP13 qui s'est révélé le plus actif a ensuite été caractérisé en utilisant la lignée cancéreuse mammaire triple-négative MDA-MB-231 et la lignée hormonodépendante MCF-7. Le deuxième objectif a été d'étudier l'action d'EP13 sur le métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231 et MCF-7.

Dans une troisième partie, nous avons déterminé si EP13 avait la capacité de potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie dans les cellules MDA-MB-231.

Enfin la dernière partie a porté sur la mise en place d'une culture cellulaire en trois dimensions, plus proche de la situation *in vivo*, et susceptible de présenter un enrichissement en CSC, afin d'étudier l'impact d'EP13 sur les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 cultivées sous forme de mammosphères.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. MOLECULES UTILISEES

Tous les composés dérivés de TGZ sont synthétisés par Michel Boisbrun et son équipe (UMR 7053 CNRS-UL L2CM équipe Molécules et Systèmes Bioactifs) selon la procédure expérimentale décrite par Salamone *et al.*, 2012 et Dupommier *et al.*, 2019 **soumis**. Les composés sont ensuite mis en solution dans le solvant DMSO (Diméthyl sulfoxyde, Sigma-Aldrich) à une molarité de 50 mM, et de 25mM pour les composés DD221 et DD222. Le 2-déoxyglucose (2-DG, Sigma-Aldrich) et la metformine (Metformine hydrochloride, Sigma-Aldrich) sont mis en solution dans de l'eau ultra-pure stérile, tandis que la staurosporine (Sigma-Aldrich) est dissoute directement dans le milieu de culture. Pour ce qui est des agents de chimiothérapie, le 5-fluorouracile (Sigma-Aldrich) est dissous dans du DMSO et la doxorubicine (Chlorhydrate de doxorubicine, TEVA) est mise en solution dans de l'eau ultra-pure stérile.

II. CULTURE CELLULAIRE

1. *Lignées cellulaires*

Durant ce travail, quatre lignées cellulaires cancéreuses mammaires ont été utilisées : MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 et Hs578T. Ces lignées ont été obtenues de l'organisation ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Etats-Unis).

La lignée cancéreuse mammaire MCF-7 a été établie à partir d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire survenu chez une femme âgée de 69 ans. Les MCF-7 font partie du sous-type Luminal A et sont hormodépendantes puisqu'elles expriment le récepteur des œstrogènes et de la progestérone. En revanche elles n'expriment pas le récepteur HER2.

La lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 provient d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire survenu chez une femme âgée de 51 ans. Ces cellules sont hormono-indépendantes n'exprimant ni le récepteur alpha des œstrogènes, ni le récepteur de la progestérone, ni HER2. Elles sont donc dites triples-négatives et appartiennent au sous type claudin-low.

La lignée cancéreuse mammaire Hs578T a été établie à partir d'un carcinome mammaire survenu chez une femme âgée de 74 ans. Les cellules Hs578T font également partie des tumeurs triples négatives de sous-type claudin-low.

La lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-453 dérive d'une effusion péricardique d'une femme âgée de 48 ans atteinte d'un carcinome métastatique mammaire. Ces cellules appartiennent au sous-type HER car elles expriment HER2 mais pas le récepteur des œstrogènes et de la progestérone (Holliday and Speirs, 2011).

2. Conditions de culture

Les lignées MCF-7 et Hs578T sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) et les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-453 dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, Sigma-Aldrich). Ces deux milieux contenant du rouge phénol sont supplémentés avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma-Aldrich) et 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich). De plus le milieu DMEM a été additionné de 10 µg/mL d'insuline pour les cellules Hs578T. Les cellules croissent en monocouche dans des flacons de 75 cm² placés dans un incubateur à 37°C en atmosphère contenant 5% de CO₂, avec 90% d'humidité. Les cellules sont repiquées 2 fois par semaine.

3. Ensemencement et conditions de traitement

L'ensemencement s'effectue à partir de cellules arrivées à 80% de confluence. Après élimination du milieu de culture, les cellules sont rincées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline; 5 mL) 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). Puis, 8 mL de milieu de culture contenant 10% de SVF et 2 mM de L-glutamine sont ajoutés afin d'arrêter l'action de la trypsine. Les cellules sont comptées grâce à une cellule de Neubauer. Le nombre de cellulesensemencées sera précisé pour chaque protocole. 24h après l'ensemencement, les cellules sont traitées avec les différents composés, aux concentrations et temps mentionnés ultérieurement, dans leur milieu respectif avec 10% de SVF et 2 mM de L-glutamine. Les solutions intermédiaires des dérivés de TGZ sont préparées à partir de la solution mère à 50 mM. La solution mère est diluée au 1/2 dans de l'éthanol absolu (Sigma-Aldrich) afin d'obtenir une solution intermédiaire à 25mM qui est ensuite diluée dans du milieu de culture pour chaque concentration attendue. Les cellules témoins sont mises en présence de DMSO, solvant dans lequel sont repris les composés. Pour chaque expérience, le DMSO est toujours appliqué à un pourcentage équivalent à la concentration maximale du composé utilisé.

III. NUMERATION CELLULAIRE PAR LE TEST DE COLORATION NUCLEAIRE AU CRISTAL VIOLET

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de $1,5 \times 10^4$ cellules par puits pour les lignées MCF-7, MDA-MB-231 et Hs578T et de 2×10^4 cellules par puits pour la lignée MDA-MB-453. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement, les cellules sont rincées avec du PBS puis elles sont fixées et colorées durant 20 minutes avec une solution de cristal violet (0,2% de cristal violet (Sigma-Aldrich), 2% d'éthanol) préalablement filtrée afin d'éliminer les précipités du colorant. Les puits sont rincés à l'eau distillée pour retirer le colorant en excès. Les puits sont séchés puis le colorant retenu est dissous dans 100 μ L d'acide acétique 10%. L'intensité de coloration des puits, corrélée au nombre de cellules, est déterminée par absorbance à 595 nm avec un lecteur de plaque (VICTOR™ X3 multilabel plate reader, PerkinElmer). La concentration des composés menant à une diminution de 50% du nombre de cellules (IC_{50}) par rapport au lot témoin est déterminée graphiquement.

IV. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sont ensemencées dans des puits de 6 cm de diamètre à raison de 8×10^5 cellules par puits dans 4 mL de milieu de culture. Les traitements sont réalisés comme décrit précédemment. A la fin du traitement, le milieu de culture contenant les cellules non adhérentes est collecté. Les cellules adhérentes sont rincées avec du PBS, trypsinisées et resuspendues dans le milieu de culture. Les cellules non adhérentes et adhérentes sont rassemblées puis comptées en utilisant un compteur de cellules automatique (TC20™ Automated Cell Counter, Bio-Rad). 1×10^6 cellules sont centrifugées à 500 g pendant 5 minutes à température ambiante puis le culot est rincé avec du PBS. Les cellules sont ensuite suspendues dans 600 μ L de PBS. 1,4 mL d'éthanol 100% froid sont ajoutés pendant que les cellules sont agitées afin de perméabiliser et fixer les cellules. 5×10^5 cellules sont ensuite centrifugées à 800 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot est suspendu dans 500 μ L de solution de marquage de l'ADN contenant 200 μ g de RNase A (Invitrogen) et 2 μ g d'iodure de propidium (IP, Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific). Les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à l'obscurité à température ambiante. Enfin, le contenu cellulaire en ADN est déterminé par cytométrie en flux (BD FACSCalibur™ flow cytometer, BD Biosciences). Les données sont traitées grâce au logiciel CellQuest™ Pro (BD Biosciences). 20 000 événements sont analysés et le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire est déterminé.

V. ANALYSE DE LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE

1. *Détection de mort cellulaire par apoptose par cytométrie en flux*

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sontensemencées dans des puits de 6 cm de diamètre à raison de 8×10^5 cellules par puits dans 4 mL de milieu de culture. Les traitements sont réalisés comme décrit précédemment. A la fin du traitement, le milieu de culture contenant les cellules non adhérentes est collecté. Les cellules adhérentes sont rincées avec du PBS, trypsinisées et resuspendues dans le milieu de culture. Les cellules non adhérentes et adhérentes sont centrifugées à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées avec du PBS puis comptées grâce à un compteur de cellules automatique (TC20™ Automated Cell Counter, Bio-Rad). 1×10^6 cellules sont centrifugées à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante puis les cellules sont additionnées d'une solution de fixation (binding buffer: 0,1 M Hepes pH 7,4; 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂; pH 7,4) afin de faciliter la fixation de l'annexine V aux phosphatidylsérines. Les cellules sont ensuite mises en contact avec 2,5 µL d'annexine V couplée au FITC (BD Biosciences) et 2µg d'iodure de propidium (Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) puis incubées à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. La fixation de l'annexine V est inhibée par l'ajout de la solution de fixation. 10 000 événements sont analysés et le pourcentage de cellules marquées à l'annexine V et/ou à l'iodure de propidium est déterminé par cytométrie en flux (BD FACSCalibur™ flow cytometer, BD Biosciences). Les données sont traitées grâce au logiciel CellQuest™ Pro (BD Biosciences).

2. *Mesure de l'activité des caspases 3/7*

Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 sontensemencées dans des plaques blanches 96 puits à fond transparent à raison de $1,5 \times 10^4$ cellules par puits. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement et après 10 minutes d'incubation de la plaque à température ambiante, 100 µL de réactif du kit Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) sont additionnés au milieu de culture des cellules. La plaque est mélangée pendant 30 secondes puis incubée 1 heure à température ambiante à l'obscurité. Enfin, la luminescence est mesurée par un lecteur de plaque (VICTOR™ X3 multilabel plate reader, PerkinElmer).

VI. IMMUNOBLOT

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sontensemencées dans des puits de 6 cm de diamètre à raison de 8×10^5 cellules par puits dans 4 mL de milieu de culture. Les traitements sont réalisés comme décrit précédemment.

Anticorps primaire	Espèces	Origine	Dilution
Anti-BiP	Lapin	US Biological	1:1000
Anti-tubuline	Lapin	GeneTex	1:1000
Anticorps secondaire	Espèces	Origine	Dilution
Anti-IgG de souris	Chèvre	Santa Cruz Biotechnology	1:10 000

Tableau 7 : Présentation des anticorps utilisés.

1. Extraction protéique

A l'issue des traitements, les cellules adhérentes sont décollées à l'aide d'un grattoir dans le milieu de culture contenant les cellules non adhérentes. Toutes les cellules sont collectées par centrifugation à 200 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est rincé avec 1 mL de PBS puis resuspendu dans 20 µL de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7, 4,5 mM EDTA, 1% Triton X-100) additionné d'inhibiteurs de protéases (cOmplete™ Mini, Roche, Sigma-Aldrich) et d'inhibiteurs de phosphatases (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, Calbiochem, Millipore) durant 30 minutes. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 200 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant correspondant à l'extrait protéique est récupéré et un dosage protéique est réalisé grâce à la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) en utilisant une gamme étalon de BSA et par mesure de l'absorbance à 595 nm avec un lecteur de plaque (VICTOR™ X3 multilabel plate reader, PerkinElmer).

2. Electrophorèse et transfert sur membrane

30 µg d'extraits protéiques sont mélangés avec du tampon de Laemmli 5x (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,25 M DTT, 25% Glycérol, 0,1% Bleu de bromophénol), chauffés 5 minutes à 95°C et séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La migration s'effectue pendant 2 à 3 heures à 120V dans du tampon de migration (24,7 mM Tris, 191 mM glycine, 1% SDS, pH 8). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham, GE Healthcare Life science) en milieu liquide dans du tampon de transfert 1x (Tris 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM, méthanol 20%) pendant la nuit à 12V. Suite au transfert, la membrane est colorée au rouge ponceau (acide trichloroacétique 6%, ponceau S 0,4%) afin de vérifier la qualité du transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose.

3. Détection immunologique

La membrane est saturée pendant une heure sous agitation, à température ambiante, dans du tampon TNT (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, Tween 20 0,1%) contenant 5% de lait écrémé en poudre. La membrane est alors incubée avec un anticorps primaire (Tableau 7) pendant la nuit à 4°C sous agitation ou pendant 2 à 3 heures sous agitation à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes avec du tampon TNT, la membrane est incubée pendant 1 heure sous agitation, à température ambiante, en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Tableau 7). Après 3 lavages avec du tampon TNT, l'activité de la peroxydase

Paramètre bioénergétique	Formule
Respiration non mitochondriale	Mesure de taux minimum après injection de roténone + antimycine A
Respiration basale	Dernière mesure de taux avant la première injection – Respiration non mitochondriale
Respiration liée à la production d'ATP	Dernière mesure de taux avant l'injection d'oligomycine – mesure de taux minimum après l'injection d'oligomycine
Efficacité de couplage	Respiration liée à la production d'ATP / Respiration basale x100
Respiration maximale	Mesure de taux maximum après injection de FCCP – Respiration non mitochondriale
Capacité de réserve respiratoire	Respiration maximale – Respiration basale

Tableau 8 : Formules utilisées pour déterminer les paramètres bioénergétiques.

est révélée par une réaction chimioluminescente (Kit Clarity™ Western ECL Substrate detection reagent, Bio-Rad) observée en temps réel avec l'appareil ChemiDoc Touch (Bio-Rad). Dans le cas d'une détection immunologique de plusieurs protéines ayant un poids moléculaire proche, les anticorps sont décrochés après la révélation au ChemiDoc en incubant la membrane dans une solution de « stripping » (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffet, Thermo Scientific) durant 10 minutes à température ambiante. L'intensité du signal est ensuite quantifiée grâce au logiciel Image Lab (BioRad). Les taux relatifs de protéines d'intérêt sont normalisés par rapport à la protéine de référence, la β -tubuline.

VII. ÉTUDE DU METABOLISME ENERGETIQUE DES CELLULES

1. *Dosage du NAD⁺ et du NADH*

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de $1,5 \times 10^4$ cellules par puits. Les traitements sont effectués comme décrit précédemment. A la fin du traitement, les quantités intracellulaires de NAD⁺ et NADH sont déterminées en utilisant le kit NAD/NADH-Glo™ Assay (Promega), basé sur de la chimioluminescence (luciférase). Les étapes du protocole sont celles décrites par le fabricant. Le milieu de culture des cellules est tout d'abord retiré et remplacé par du PBS, additionné d'une solution basique (190 mM NaOH) contenant 1% de DTAB (dodecyltrimethyl ammonium bromide) afin de lyser les cellules. Le lysat cellulaire est ensuite séparé en deux échantillons équivalents (1 et 2) afin de doser séparément le NAD⁺ et le NADH. Le premier échantillon est incubé dans de l'acide chlorhydrique 0,4 N dans le but de neutraliser le NADH et quantifier le NAD⁺, le deuxième échantillon est incubé dans des conditions basiques pour neutraliser le NAD⁺ et quantifier le NADH. Les échantillons 1 et 2 sont ensuite chauffés pendant 15 min à 60°C. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, l'échantillon 1 reçoit 0,5 M de Tris afin de neutraliser l'acide chlorhydrique, tandis que l'échantillon 2 est additionné de tampon Tris-HCl. Les deux échantillons sont ensuite incubés pendant 1 heure à température ambiante avec le réactif de détection préparé extemporanément, contenant de la proluciférine. Corrélée à la quantité de NAD⁺ et NADH dans les échantillons 1 et 2 respectivement, la luminescence émise est finalement mesurée grâce à un lecteur de plaque (VICTOR™ X3, PerkinElmer).

2. *Évaluation du taux de consommation d'oxygène*

Les cellules MDA-MB-231, MCF-7 et Hs578T sontensemencées dans des plaques 24 puits (Seahorse XF24 V7 microplates) à raison de $2,5 \times 10^4$ cellules/puits. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement,

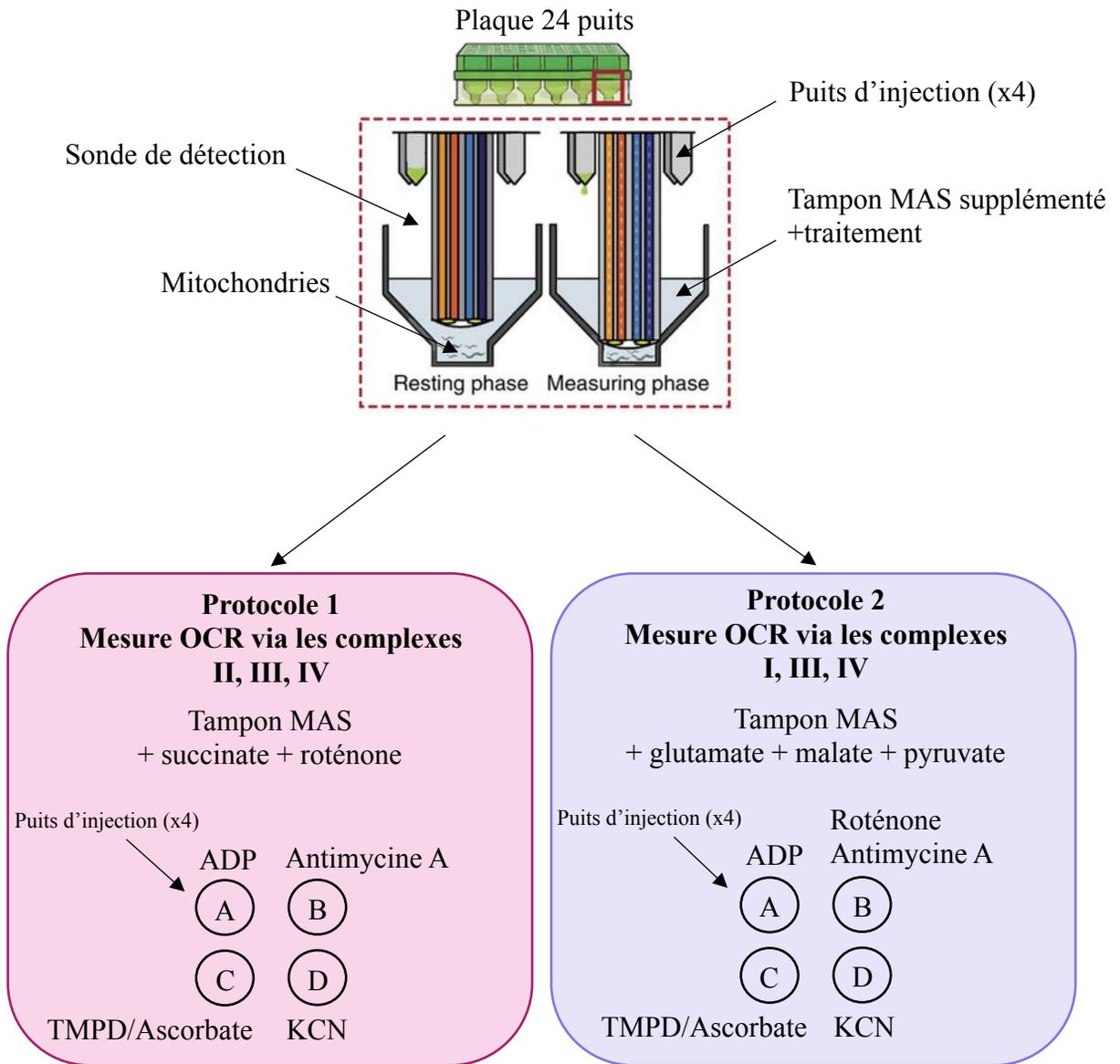


Figure 35 : Protocoles de mesure du taux de consommation d'oxygène de mitochondries isolées. Les mitochondries isolées de foie de souris sont placées dans une plaque 24 puits puis traitées avec un composé dérivé de TGZ dans du tampon MAS (mitochondrial assay solution) supplémenté en fonction du protocole utilisé. Le protocole 1 permet de mesurer le taux de consommation d'oxygène (OCR) par les complexes II, III et IV. Le tampon de MAS est additionné de succinate (substrat du complexe II) et de roténone (inhibiteur du complexe I). Dans chaque puits sont ajoutés de l'ADP permettant le fonctionnement de la chaîne respiratoire, de l'antimycine A (inhibiteur du complexe III), du TMPD/ascorbate pour le fonctionnement du complexe IV puis du KCN qui bloque le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Le protocole 2 permet de mesurer l'OCR par les complexes I, III et IV. Le tampon de MAS est additionné de glutamate, de malate et de pyruvate dont l'oxydation fournit du NADH, substrat du complexe I. Dans chaque puits sont ajoutés de l'ADP permettant le fonctionnement de la chaîne respiratoire, de l'antimycine A (inhibiteur du complexe III) et de la roténone (inhibiteur du complexe I), du TMPD/ascorbate pour le fonctionnement du complexe IV puis du KCN qui bloque le fonctionnement de la chaîne respiratoire. OCR, oxygen consumption rate.

le milieu de culture est retiré et remplacé par du milieu DMEM (D5030, Sigma-Aldrich) contenant 2 mM de L-glutamine, 10 mM de D-glucose et 1 mM de pyruvate. Les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C puis les inhibiteurs suivants sont ajoutés dans chaque puits : 1 µM d'oligomycine, 0,25 et 0,5 µM de FCCP (p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone), 1 µM de roténone + 1 µM d'antimycine A. La mesure du taux de consommation d'oxygène (OCR) des cellules est réalisée grâce à un instrument de mesure en temps réel (Seahorse XFe24 analyzer, Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). Les paramètres bioénergétiques sont calculés grâce aux formules présentées dans le tableau 8.

3. Extraction de mitochondries et mesure du taux de consommation d'oxygène

L'extraction de mitochondries est réalisée à partir de foie de souris. Le foie de souris est placé dans une solution tampon IBc (isolation buffer; 10 mM Tris/MOPS ; 1 mM EGTA/Tris ; 200 mM sucrose ; pH 7,4) préparée extemporanément. Le foie est dilacéré au scalpel puis broyé à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE. Le broyat est centrifugé à 600 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot contenant les mitochondries est récupéré et resuspendu dans 1 mL de solution tampon IBc. Les deux opérations de centrifugation sont répétées une deuxième fois. Le dosage des mitochondries est réalisé grâce au kit DC protein assay (BioRad) en utilisant une gamme étalon de BSA et par mesure de l'absorbance à 690 nm avec un lecteur de plaque. 10 µg de mitochondries sont repris dans 50 µL de tampon MAS (mitochondrial assay solution: 70 mM sucrose ; 220 mM manitol ; 10 mM KH₂PO₄ ; 5 mM MgCl₂ ; 2 mM HEPES ; 1 mM EGTA ; BSA Fatty acid free 0,2% ; pH 7,4) préparé extemporanément. 50 µL de cette solution sont placés dans chacun des puits d'une plaque 24 puits (Seahorse XF24 V7 microplates). La plaque est centrifugée à 2000 g pendant 20 minutes à 4°C puis les mitochondries sont incubées pendant 10 minutes avec EP13 dans 450 µL de tampon MAS à 37°C, complété selon le protocole utilisé (Figure 35). Pour le protocole 1, les mitochondries sont mises en présence d'un tampon MAS additionné de 10 mM de succinate et 2 µM de roténone. Pour le protocole 2, les mitochondries sont mises en présence d'un tampon MAS additionné de 10 mM de pyruvate, 10 mM de glutamate et 10 mM de malate. La plaque est incubée pendant 10 minutes à 37°C puis selon protocole, des activateurs/inhibiteurs sont ajoutés dans chaque puits. Pour le protocole 1, sont ajoutés 5 mM d'ADP, 4 µM d'antimycine A, 10 mM d'ascorbate + 100 µM de TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) et 2 mM de KCN. Pour le protocole 2, sont ajoutés 5 mM d'ADP, 3,2 µM d'oligomycine + 4 µM d'antimycine A, 10 mM d'ascorbate + 100 µM de TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) et 2 mM de KCN. La mesure

du taux de consommation d'oxygène (OCR) des cellules est réalisée grâce à un instrument de mesure en temps réel (Seahorse XFe24 analyzer, Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA).

4. Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sontensemencées dans des puits de 6 cm de diamètre à raison de 8×10^5 cellules et $6,5 \times 10^5$ cellules, respectivement, par puits dans 4 mL de milieu de culture. Les traitements sont réalisés comme décrit précédemment. A la fin du traitement, les cellules sont incubées en présence de $5\mu\text{M}$ de la sonde MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 minutes à l'obscurité à 37°C puis rincées avec du PBS, trypsinisées et resuspendues dans le milieu de culture. Un comptage cellulaire est réalisé grâce à un compteur de cellules automatique (TC20™ Automated Cell Counter, Bio-Rad). Les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes à température ambiante et resuspendues dans du milieu de culture à une concentration de 1×10^6 cellules/mL. 10 000 événements sont analysés et l'intensité de fluorescence proportionnelle à la production d'anion superoxyde est déterminée à l'aide d'un cytomètre en flux (BD FACSCalibur™ flow cytometer, BD Biosciences). Les données sont traitées grâce au logiciel CellQuest™ Pro (BD Biosciences).

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

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sontensemencées à $1,5 \times 10^4$ cellules par puits dans des plaques 96 puits. Les cellules sont traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement, le milieu de culture des cellules est collecté et sa concentration en glucose et en lactate est mesurée grâce à un instrument de mesure automatique (YSI 2950 Biochemistry Analyzer, YSI Life Sciences) par Frédéric Bost (Inserm U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, équipe « physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'obésité et du diabète »). Afin de déterminer la concentration basale en glucose et en lactate dans le milieu de culture, des échantillons contenant du milieu de culture, non incubé avec des cellules, sont inclus dans l'analyse. Pour chaque condition de traitement, la consommation de glucose est mesurée en soustrayant la concentration en glucose des échantillons à la concentration de glucose basale dans le milieu de culture. Quant à la production de lactate, elle est calculée en retirant la concentration basale en lactate dans le milieu de culture à la concentration en lactate mesurée pour chaque condition de traitement. Parallèlement, le nombre de cellules est déterminé grâce à une coloration de l'ADN au cristal violet. Les concentrations sont normalisées par rapport au

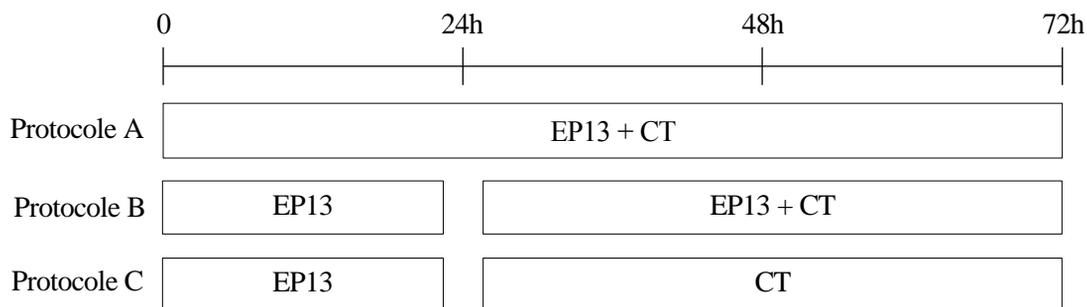


Figure 36 : Protocoles utilisés pour les tests de combinaison avec les agents de chimiothérapie. Le protocole A est un traitement simultané d'une durée de 72 heures avec EP13 et les agents de chimiothérapie. Les protocoles B et C sont des protocoles séquentiels correspondant à un prétraitement des cellules avec EP13 durant 24 heures suivi pendant 48 heures soit d'un co-traitement, soit d'un traitement avec les agents de chimiothérapie. Chaque protocole est réalisé avec une gamme d'agents de chimiothérapie (CT: doxorubicine ou 5-FU) combinée à une concentration fixe d'EP13 (1 ou 3 μ M).

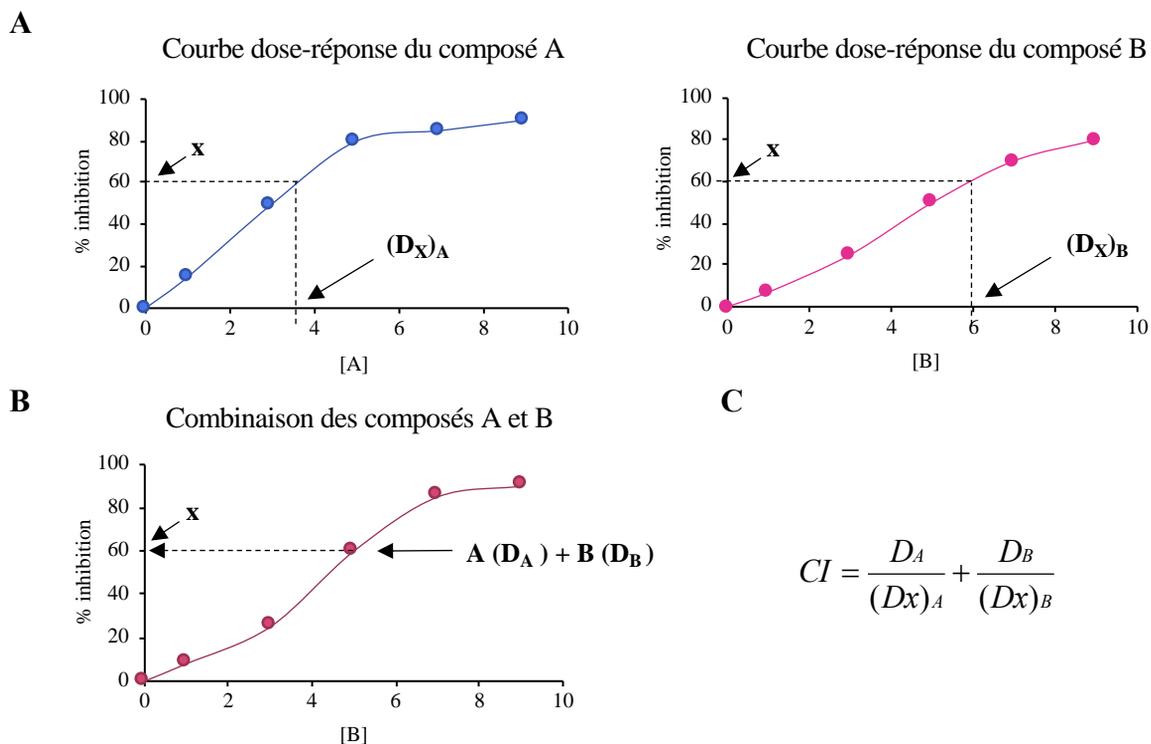


Figure 37 : Représentation graphique des paramètres calculés par le logiciel CompuSyn pour déterminer l'indice de combinaison (CI). Les courbes dose-réponse des composés A et B utilisés seuls (A) sont générées par le logiciel CompuSyn, à partir des données de pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire obtenues par le test de coloration de l'ADN au cristal violet. B. Le graphique représente la courbe dose-réponse des composés utilisés en combinaison avec une dose fixe de A et des doses croissantes de B. Sur cette courbe, D_A et D_B correspondent aux concentrations des composés A et B qui en combinaison, conduisent à un pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire de x %. $(D_x)_A$ et $(D_x)_B$ sont les concentrations de composés A et B utilisés seuls qui donnent un effet inhibiteur de x %. Ces valeurs permettent de calculer le CI d'après la formule présentée en figure C.

nombre de cellules, permettant ainsi d'obtenir une consommation de glucose et une production de lactate par cellule.

6. Dosage d'ATP

Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 sontensemencées dans des plaques blanches 96 puits à fond transparent à raison de $1,5 \times 10^4$ cellules par puits. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées comme décrit précédemment. A la fin du traitement, le milieu de culture des cellules est enlevé et remplacé par 50 μ L de milieu de culture et 50 μ L de substrat luminescent du kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. Enfin, la luminescence est mesurée par un lecteur de plaque (VICTOR™ X3 multilabel plate reader, PerkinElmer).

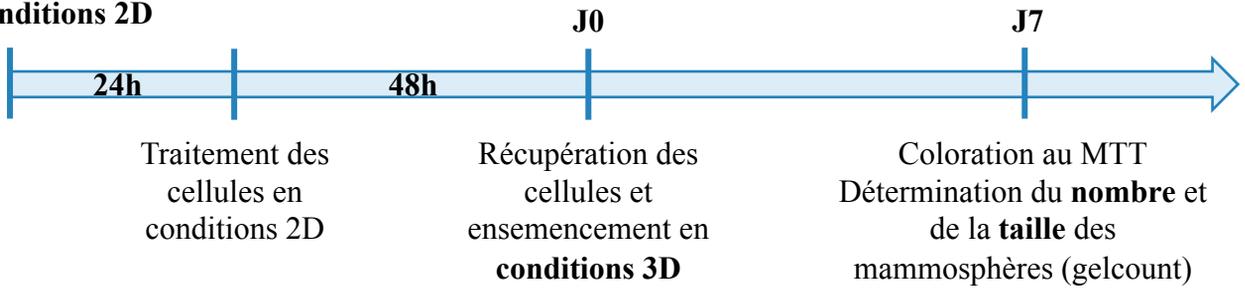
VIII. DETERMINATION DE L'INDICE DE COMBINAISON (CI) PAR LA METHODE DE CHOU-TALALAY

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de $1,5 \times 10^4$ cellules par puits. 24 heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées comme décrit précédemment avec deux composés utilisés seuls ou en combinaison. Les composés utilisés seuls sont appliqués à des concentrations croissantes. Pour la combinaison d'EP13 et 2-DG, les composés sont appliqués à des concentrations croissantes. Pour les combinaisons d'EP13 avec les agents de chimiothérapie, EP13 est utilisé à une concentration fixe et les agents de chimiothérapie sont appliqués à des concentrations croissantes selon les protocoles décrits en figure 36. A la fin du traitement, le nombre de cellules est déterminé par coloration de l'ADN au cristal violet pour chaque condition de traitement. A partir de ces données, le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire est déterminé pour chaque concentration de composé utilisé seul. Ces données sont analysées dans logiciel CompuSyn (CompuSyn Version 1.0 par Ting Chao Chou et Nick Martin, 2004). Pour chaque composé, est générée une courbe dose-réponse qui dans notre cas est une sigmoïde ($m > 1$) (Figure 37 A). Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire associé à chaque combinaison de concentration de composés est également analysé par le logiciel. L'indice de combinaison est alors calculé grâce à la formule suivante :

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

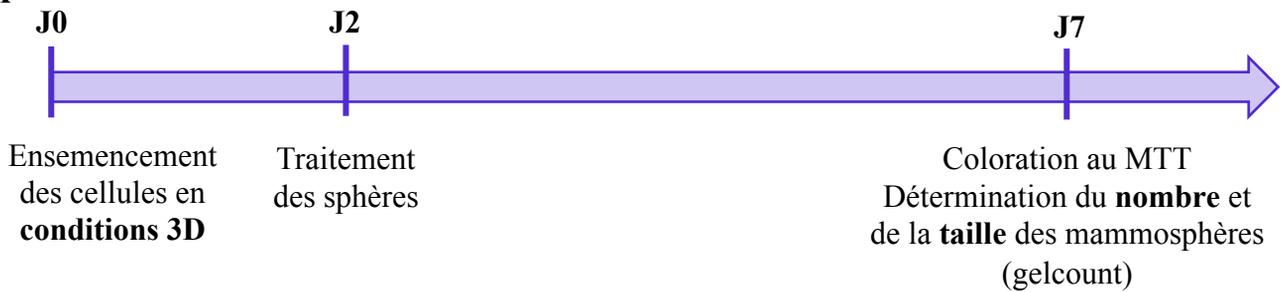
Protocole 1: Capacité à former des mammosphères

Ensemencement
des cellules en
conditions 2D



Protocole 2: Capacité à affecter les mammosphères déjà formées

A



B

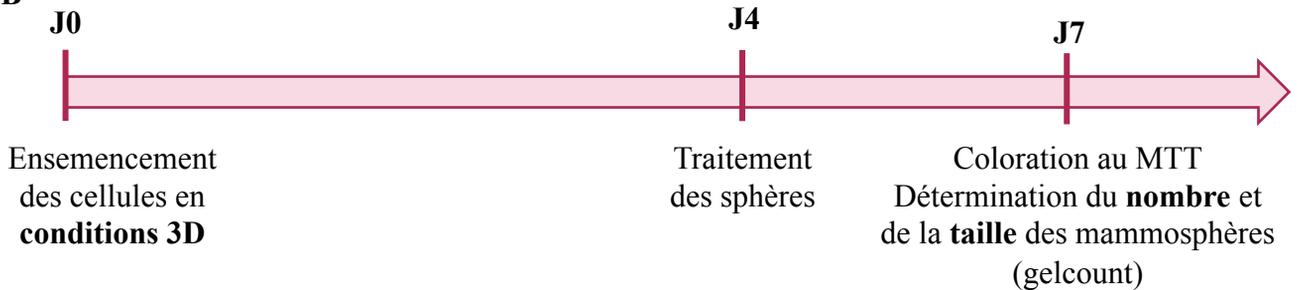


Figure 38 : Protocoles utilisés pour déterminer l'impact d'EP13 sur les mammosphères.

D_A et D_B sont les concentrations des composés A et B qui en combinaison conduisent à un pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire de x % (Figure 37B). $(D_x)_A$ est la concentration du composé A utilisé seul qui donne un effet inhibiteur de x %. Cette valeur est obtenue à partir de la courbe dose-réponse du composé A. $(D_x)_B$ est la concentration du composé B utilisé seul qui donne un effet inhibiteur de x %. Cette valeur est obtenue à partir de la courbe dose-réponse du composé B (Figure 37A). Un CI supérieur à 1,1 correspond à de l'antagonisme, un CI compris entre 0,9 et 1,1 à de l'additivité et un CI inférieur à 0,9 à du synergisme.

IX. CULTURE TRIDIMENSIONNELLE DES CELLULES

1. *Protocoles de traitement*

Deux protocoles de traitement ont été utilisés pour déterminer l'impact des composés sur les mammosphères (Figure 38).

Protocole 1 : Impact sur la capacité des cellules à former des mammosphères

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sontensemencées dans des puits de 6 cm de diamètre à raison de 8×10^5 et $6,5 \times 10^5$ cellules par puits respectivement, dans 4 mL de milieu. Les traitements sont réalisés comme décrit précédemment. A la fin du traitement, les cellules sont rincées avec du PBS, trypsinisées, resuspendues dans du milieu de culture. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de numération Neubauer puis centrifugées 2 minutes à 580g. Un rinçage avec du PBS est réalisé puis les cellules sont resuspendues à une concentration de 1×10^5 cellules/mL dans du milieu DMEM/F12 sans rouge phénol (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) supplémenté de 2% de supplément B-27 (B-27TM Supplement (50X), GibcoTM, Thermo Fisher Scientific) et 20 ng/mL d'EGF. Les cellules sont dissociées une à une par pipetage et utilisation d'une seringue et aiguille 26G. Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits de très faible adhérence (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich) à raison de 2×10^4 cellules par puits dans 3 mL de milieu. 1 mL de milieu est ajouté 4 jours après l'ensemencement.

Protocole 2 : Capacité des composés à affecter les mammosphères

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sontensemencées dans des plaques 6 puits de très faible adhérence (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich) à raison de 2×10^4 cellules par puits dans 3 mL de milieu. Les traitements sont réalisés après 2 (Protocole 2A, Figure 38) ou 4 (Protocole 2B, Figure 38) jours d'ensemencement dans le milieu de culture.

2. Détermination du nombre et de la taille des mammosphères

Après 7 jours de culture, les mammosphères formées sont colorées avec 0,2 mg/mL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Invitrogen™) et incubées à 37°C pendant 30 minutes à l'obscurité. Les mammosphères sont ensuite rincées avec du PBS et fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 20 minutes puis à nouveau rincées avec du PBS. L'analyse du nombre et de la taille des mammosphères est réalisée par un compteur de colonies (Gelcount™, Oxford Optronics).

Le pourcentage d'efficacité de formation des mammosphères (MFE, mammosphere forming efficiency) est calculé grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de mammosphères par puits}}{\text{Nombre de cellules par puits}} \times 100$$

X. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont issus d'au moins trois expériences indépendantes et sont représentés par la valeur moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Graphpad Prism. Pour la comparaison de deux groupes, un test *t* de Student avec une correction de Welch a été utilisé. Pour une comparaison multiple, un test ANOVA à deux facteurs avec méthode de Tukey est utilisée. La valeur de *p* est calculée pour chaque comparaison et les résultats sont considérés statistiquement significatifs lorsque *p* est inférieur à 0,05. La significativité statistique est représentée par *, *p*<0,05, **, *p*<0,01, ***, *p*<0,001.

RÉSULTATS

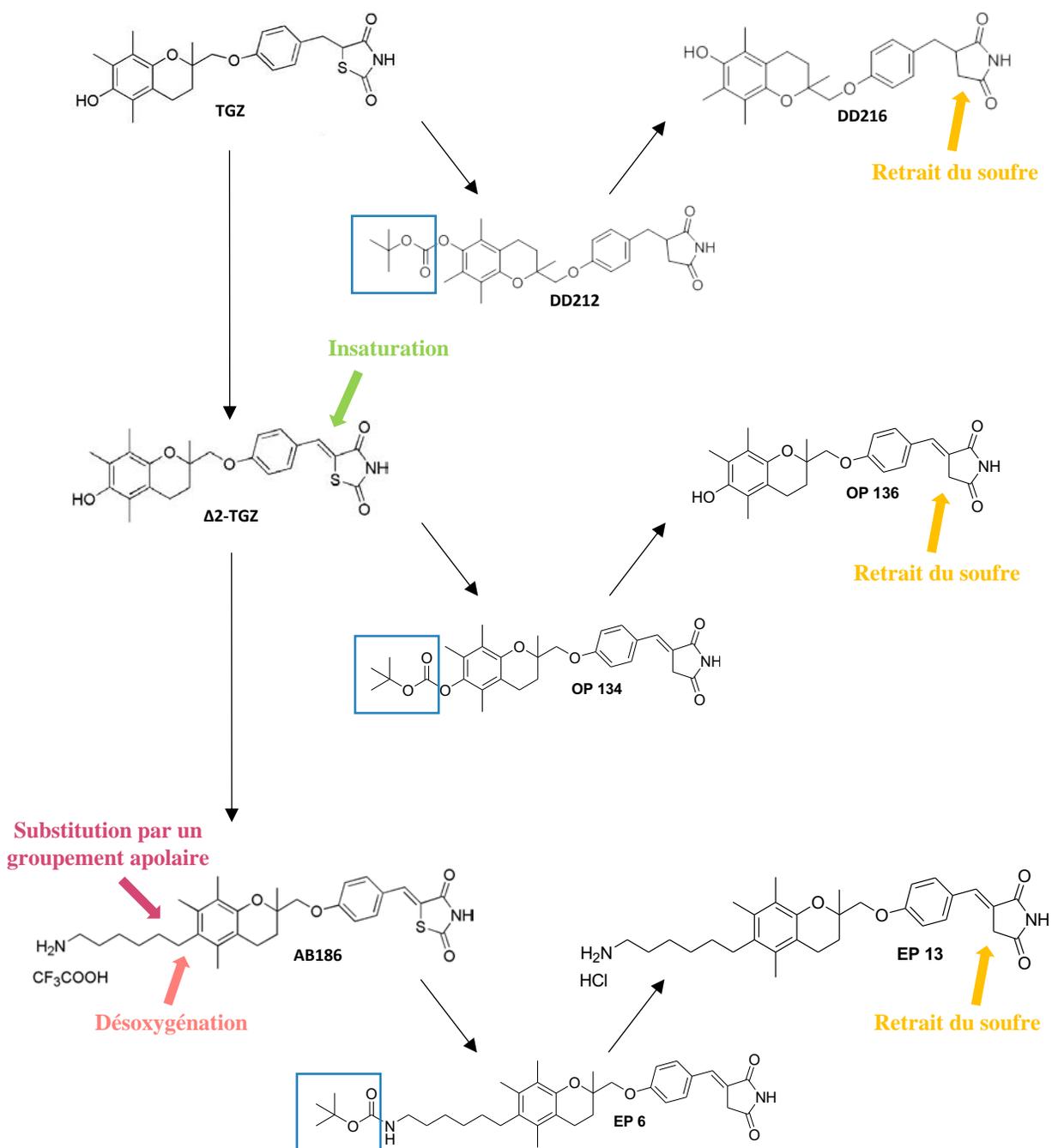


Figure 39 : Structure chimique de la TGZ, de la Δ^2 -TGZ, d'AB186 et de leurs dérivés désoufrés. A partir des 3 TZD (TGZ, Δ^2 -TGZ et AB186) ont été synthétisés respectivement les dérivés désoufrés DD216, OP136 et EP13 et leur intermédiaire de synthèse respectifs DD212, OP134 et EP6 porteurs d'un groupement protecteur boc (carrés bleus). Ces dérivés désoufrés sont des pyrrolidinediones.

I. ÉTUDES DES EFFETS DE LA TGZ ET DES DÉRIVÉS DÉSOUFRÉS SUR LES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Ces résultats font l'objet d'un article soumis dans la revue *European Journal of Medicinal Chemistry*, intitulé « New desulfured troglitazone derivatives: improved synthesis and biological evaluation » dont je suis co-premier auteur¹.

Dorian Dupommier^{a,1}, Claire Muller^{b,1}, Corinne Comoy^a, Sabine Mazerbourg^b, Andrea Bordessa^a, Eline Piquard^a, Manon Pawlak^a, Flavian Piquard^a, Elia De Fays^b, Stéphanie Grandemange^b, Stéphane Flament^b, Michel Boisbrun^a

1. Comparaison des activités antiprolifératives de TZD soufrés et désoufrés

Au cours des dernières années, notre équipe au laboratoire CRAN et les collègues du L2CM ont envisagé différentes modifications de la structure de la TGZ afin de réduire sa toxicité hépatique et d'améliorer l'efficacité anti-cancéreuse. Le premier composé synthétisé fut la Δ 2-TGZ, portant une insaturation adjacente au cycle TZD, qui conserve une activité anticancéreuse PPAR γ -indépendante (Figure 39). AB186 est un dérivé de la Δ 2-TGZ qui présente une désoxygénation au niveau du cycle chromane et l'ajout d'une chaîne alkyle linéaire apolaire (Figure 39). TGZ, Δ 2-TGZ puis AB186 présentent une toxicité sur cellules hépatiques de plus en plus faible et une activité anticancéreuse accrue. AB186 a fait l'objet d'un brevet (Brevet PCT WO 2013/110796 A1) et d'un début de valorisation financée par la SATT Grand Est. Par ailleurs, Saha *et al.* ont montré que la suppression de l'atome de soufre du cycle TZD résultait en une toxicité moindre et une activité anticancéreuse augmentée des TZD (Saha *et al.*, 2010b, 2012). Ainsi, dans le cadre de ma thèse et de la poursuite des études de relation structure/activité, chacun de ces trois composés (TGZ, Δ 2-TGZ et AB186) a fait l'objet d'un dérivé désoufré : DD216, OP136 et EP13 respectivement (Figure 39). Ces composés ne sont plus des TZD mais des pyrrolidinediones. Au cours de la synthèse des dérivés DD216, OP136 et EP13, des intermédiaires de synthèse désoufrés possédant un groupement Boc (groupement protecteur de la fonction amine utilisé lors de la synthèse chimique) sont produits et nous les avons également évalués : DD212, OP134 et EP6 respectivement (Figure 39).

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'activité anti-proliférative de la TGZ, de la Δ 2TGZ, d'AB186 ainsi que de leurs dérivés désoufrés dans quatre lignées cancéreuses mammaires : les lignées triple-négatives MDA-MB-231 et Hs578T, la lignée HER2⁺ MDA-MB-453 et la lignée de type luminal A hormonodépendante MCF-7. Les cellules ont été traitées pendant 48h avec des concentrations croissantes de chaque composé. Le nombre de cellules a été déterminé par une coloration des noyaux au cristal violet puis la concentration nécessaire pour diminuer de 50 % le nombre de cellules (IC₅₀) a été définie. Tous les composés induisent

Composé	IC ₅₀ ^a ± ESM ^b			
	MCF-7 ^c	MDA-MB-231 ^d	MDA-MB-453 ^d	Hs578T ^d
TGZ	74,3 ± 3,9	45,5 ± 3,7	67,1 ± 6,1	> 100
DD216	35,9 ± 3,1	61,2 ± 2,9	35,8 ± 4,1	72,6 ± 6,8
DD212	15,8 ± 3,9	28,0 ± 2,0	13,6 ± 2,0	38,2 ± 3,4
Δ2-TGZ	57,0 ± 4,4	56,5 ± 3,3	58,3 ± 4,1	> 100
OP136	13,2 ± 1,3	32,4 ± 3,3	13,2 ± 1,0	38,9 ± 2,2
OP134	6,7 ± 0,6	20,6 ± 1,0	3,9 ± 0,4	30,8 ± 1,3
EP13	5,8 ± 0,4	5,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1	8,8 ± 0,6
EP6	4,0 ± 0,2	5,4 ± 0,7	1,04 ± 0,2	6,4 ± 0,8

Tableau 9 : Activité anti-proliférative des dérivés de la TGZ sur différentes lignées cancéreuses mammaires. Les cellules MDA-MB-231 sont traitées durant 48 h avec une gamme de concentrations des différents composés. Le nombre de cellules est déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. Les données représentent les moyennes ± l'écart standard à la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. a, Concentration (μM) requise pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses de 50 %; b, écart standard à la moyenne; c, lignée cancéreuse mammaire hormonodépendante; d, lignée cancéreuse mammaire hormono-indépendante.

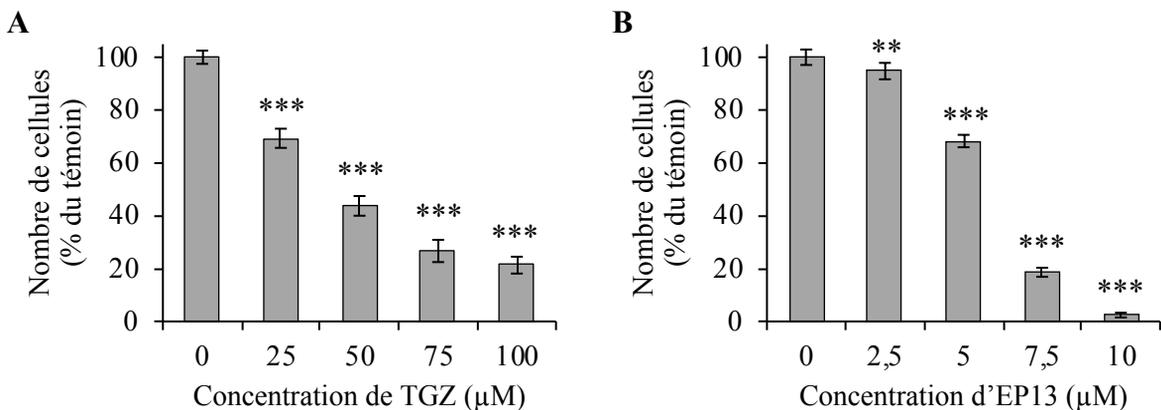


Figure 40 : EP13 diminue le nombre de cellules MDA-MB-231 plus efficacement que la TGZ. Les cellules MDA-MB-231 sont traitées durant 48 h avec une gamme de concentrations des composés TGZ (A) et EP13 (B). La culture des cellules en présence de DMSO (0,09 % pour TGZ et 0,012 % pour EP13) permet d'obtenir le nombre de cellules ramené à 100 %. Le nombre de cellules est déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. Les données représentent les moyennes ± l'écart standard à la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Les différences significatives des cellules traitées par rapport aux cellules témoins sont indiquées (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

une diminution du nombre de cellules dans les quatre lignées cancéreuses mammaires avec une efficacité différente en fonction de la lignée cellulaire et du composé (Tableau 9). Dans la lignée Hs578T, ils présentent tous des IC_{50} plus élevées que dans les trois autres lignées, et plus particulièrement la TGZ et la $\Delta 2$ -TGZ qui possèdent des IC_{50} supérieures à 100 μM . Dans les quatre lignées cancéreuses mammaires, les dérivés désoufrés présentent des IC_{50} plus faibles que les composés parents et affichent donc une activité antiproliférative plus élevée. Ce n'est toutefois pas le cas pour la TGZ qui possède une meilleure IC_{50} (45,5 μM) que DD216 (61,2 μM) dans la lignée MDA-MB-231. Les intermédiaires de synthèse comportant un groupement Boc sont encore plus efficaces puisqu'ils présentent des IC_{50} plus faibles que leur composé parent dans les quatre lignées cancéreuses mammaires. Cependant, ces composés sont moins solubles, leur potentielle utilisation ultérieure *in vivo* est donc exclue. Parmi tous ces composés, EP13 présente la meilleure IC_{50} dans toutes les lignées présentées. La figure 40 est représentative de la réponse dose-dépendante des cellules MDA-MB-231 aux composés TGZ et EP13. EP13 diminue le nombre de cellules MDA-MB-231 bien plus efficacement que la TGZ (Figure 40). Par conséquent, EP13 étant le composé le plus efficace, nous avons décidé de mieux caractériser son effet anticancéreux dans la lignée MDA-MB-231. Pour la suite des expériences, EP13 est utilisé à une concentration équivalant à son IC_{50} qui est de 6 μM dans les cellules MDA-MB-231.

2. Caractérisation des effets d'EP13

2.1 Étude du cycle cellulaire

Afin de déterminer quels sont les mécanismes impliqués dans la diminution du nombre de cellules, nous avons étudié la répartition des cellules MDA-MB-231 dans les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Les cellules ont été traitées pendant 48 et 72 heures avec 45 μM de TGZ et 6 μM d'EP13. Par rapport aux cellules témoins traitées avec du DMSO, la TGZ induit une augmentation significative de la proportion de cellules dans la phase G0/G1 après 48 heures ($85,2 \pm 0,3$ % contre $62,6 \pm 0,5$ %) et 72 heures ($80,04 \pm 3,8$ % contre $62 \pm 2,7$ %) de traitement (Figure 41A). Cette hausse s'accompagne d'une diminution significative du pourcentage de cellules dans la phase S et dans la phase G2/M après 48 heures ($2,3 \pm 0,2$ % contre $15,7 \pm 0,4$ % et $10,4 \pm 0,6$ % contre $20,5 \pm 0,6$ %) et 72 heures ($1,9 \pm 0,1$ % contre $13,1 \pm 1,2$ % et $12,2 \pm 0,8$ % contre $19,5 \pm 0,5$ %) de traitement (Figure 41A). Le pourcentage de cellules dans le compartiment sub-G1 est faible et ne varie pas significativement après traitement à la TGZ. Quant à EP13, il induit une augmentation de la proportion de cellules dans le compartiment sub-G1 par rapport aux cellules témoins traitées avec du DMSO aux deux

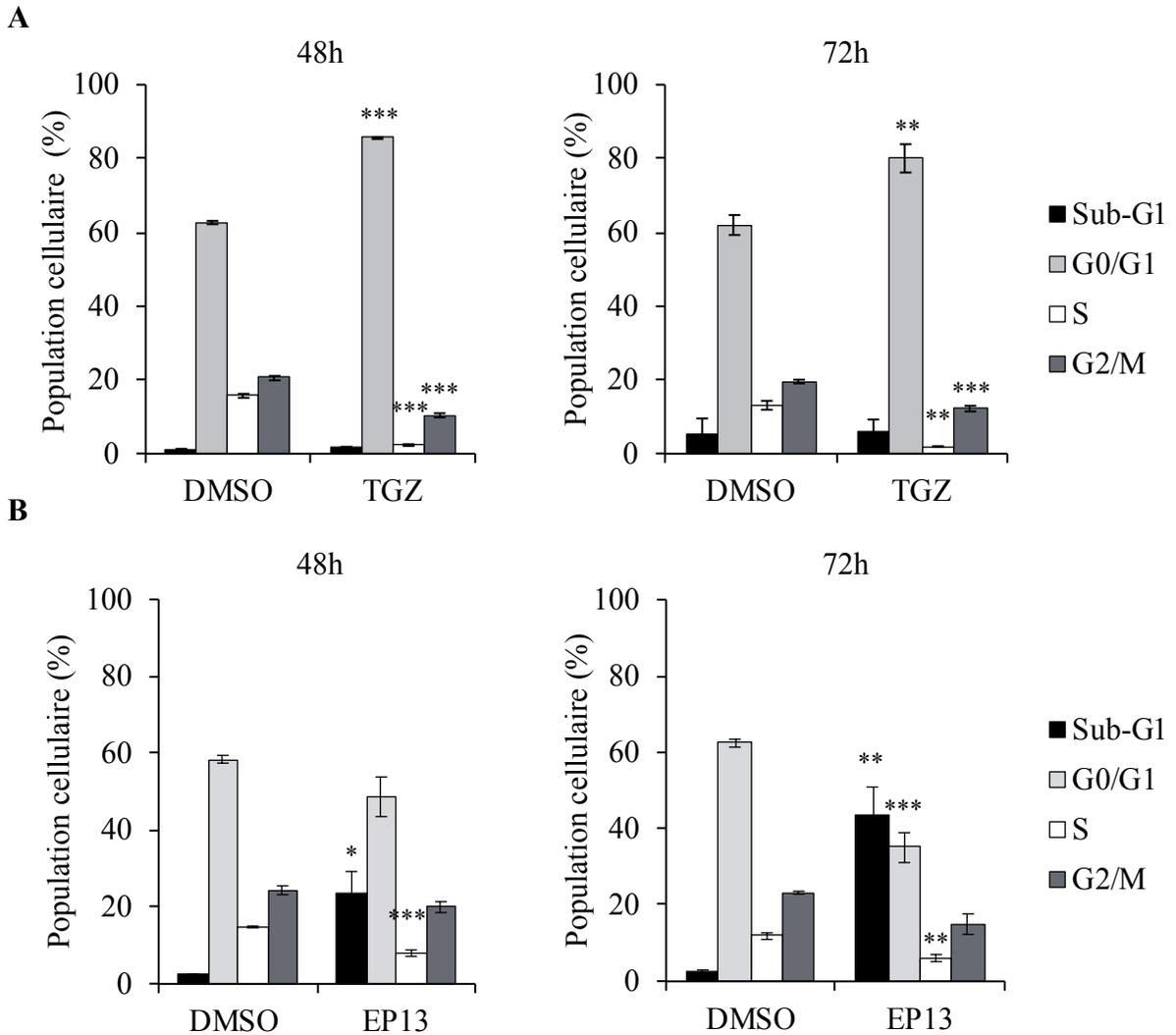


Figure 41 : La TGZ induit un arrêt du cycle cellulaire alors qu'EP13 augmente la proportion des cellules MDA-MB-231 en sub-G1. Les cellules MDA-MB-231 sont traitées au temps indiqués avec 45 μ M de TGZ, 6 μ M d'EP13 ou du DMSO (0,09 % pour TGZ et 0,012 % pour EP13) pour les cellules témoins. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les données représentées correspondent à la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre cellules traitées et cellules témoins sont indiquées (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

temps de traitement soit $23,4 \pm 5,8$ % contre $2,4 \pm 0,1$ % à 48 heures et $43,9 \pm 7$ % contre $2,5 \pm 0,4$ % à 72 heures (Figure 41B). À 48 heures, cela s'accompagne d'une baisse de la proportion de cellules dans la phase S ($8 \pm 0,8$ % contre $14,8 \pm 0,2$ %). En revanche les pourcentages de cellules en phase G0/G1 et en phase G2/M ne sont pas significativement différents entre les cellules témoins et les cellules traitées avec EP13. À 72 heures, la forte augmentation de la proportion de cellules dans le compartiment sub-G1 s'accompagne d'une baisse de la proportion de cellules dans la phase G0/G1 ($35 \pm 3,9$ % contre $62, \pm 1,04$ %) ainsi que dans la phase S ($6,1 \pm 0,9$ % contre $11,9 \pm 0,9$ %), alors que le pourcentage de cellules en phase G2/M ne sont pas significativement différents entre les cellules témoins et les cellules traitées avec EP13 (Figure 41B). La TGZ conduit donc à un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 alors qu'EP13 induit une augmentation du nombre de cellules dans le compartiment sub-G1, ce qui pourrait être signe d'apoptose.

2.2 Étude de la mort cellulaire par apoptose

Au vu des résultats précédents, nous avons voulu déterminer si EP13 ($6 \mu\text{M}$) induit l'apoptose des cellules MDA-MB-231 en mesurant d'une part l'activité des caspases 3 et 7 par luminescence et d'autre part, le pourcentage de cellules marquées à l'Annexine V par cytométrie en flux après 48 et 72 heures de traitement. EP13 induit une augmentation significative de l'activité des caspases 3 et 7 (Figure 42A) ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules marquées à l'Annexine V par rapport aux cellules témoins traitées avec du DMSO ($23,8 \pm 4,3$ % contre $10,4 \pm 1,3$ % à 48 heures et $37,4 \pm 4,3$ % contre $10,2 \pm 0,9$ % à 72 heures de traitement) (Figure 42B et C). Ces résultats confirment qu'EP13 induit l'apoptose des cellules MDA-MB-231.

De la même manière que dans les cellules MDA-MB-231, nous avons caractérisé les effets d'EP13 dans la lignée cancéreuse mammaire hormono-dépendante MCF-7 en étudiant le cycle cellulaire et la mort cellulaire par apoptose après 48 et 72 heures de traitement. EP13 induit une très faible augmentation du pourcentage de cellules dans la phase G2/M du cycle cellulaire accompagnée d'une diminution de la phase S après 72 heures de traitement. Nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage de cellules dans le compartiment sub-G1 ni d'augmentation de l'activité caspase 3/7. Après 72 heures de traitement, EP13 induit une augmentation significative du pourcentage de cellules marquées à l'Annexine V (données non montrées). Les résultats obtenus sont incohérents et ne sont donc pas concluants.

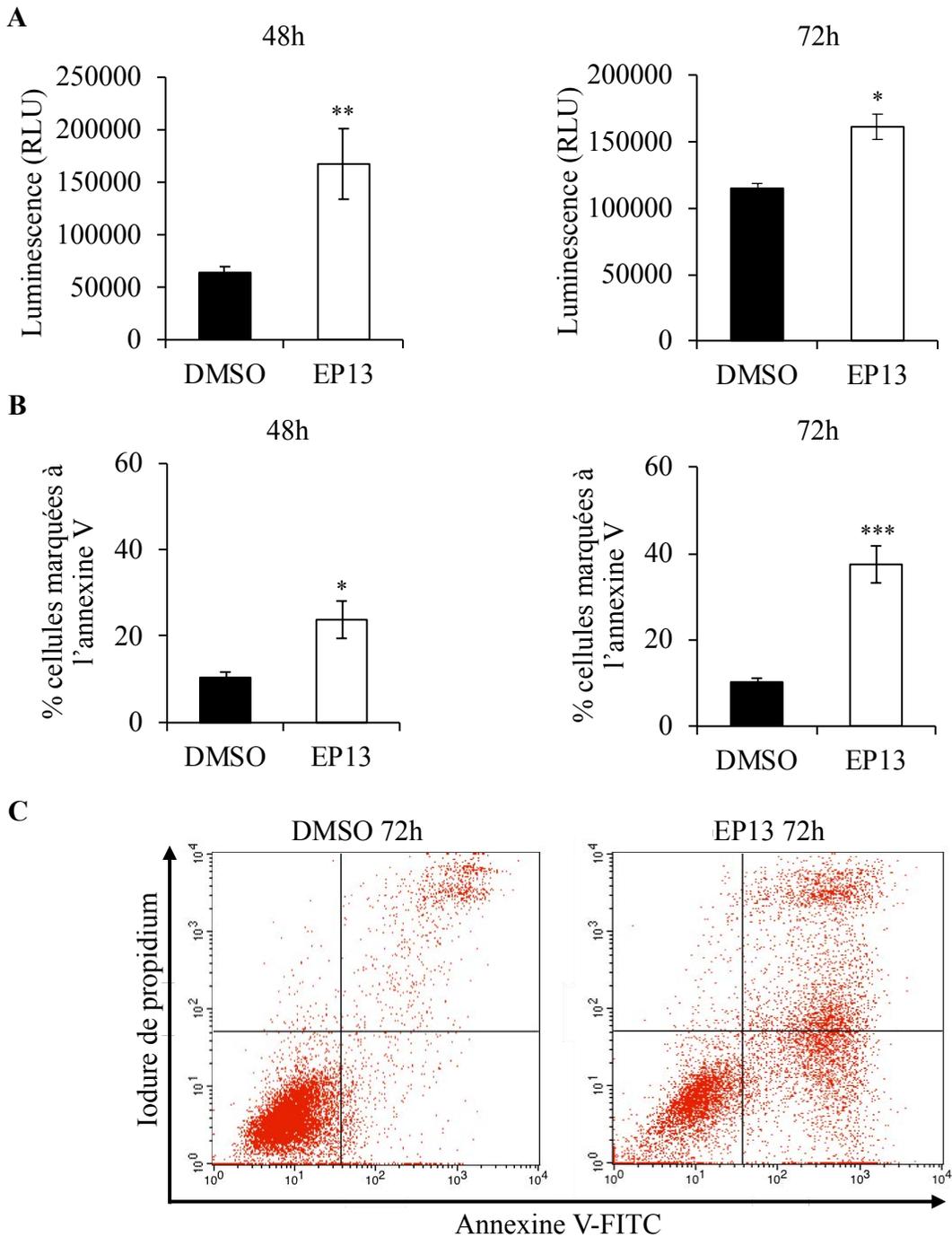


Figure 42 : EP13 induit l'apoptose des cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées durant 48 et 72 h avec 6 μM d'EP13 ou avec du DMSO (0,012 %) pour les cellules témoins. A. L'activité caspase 3/7 a été mesurée par luminescence grâce au kit Caspase-Glo[®] 3/7. B. Les cellules sont double-marquées avec de l'iodure de propidium et de l'annexine V. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux et les histogrammes représentent le pourcentage de cellules apoptotiques. C. Les dot-plot représentent les cellules apoptotiques localisées dans les quadrants inférieurs et supérieurs droits à 72 h. Les données représentées correspondent à la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre cellules traitées et cellules témoins sont indiquées (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Nous avons voulu déterminer si l'apoptose observée avec le dérivé EP13 pouvait résulter d'un stress du RE. Précédemment, il a été montré au laboratoire que la $\Delta 2$ -TGZ induit un stress du RE dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7. Cependant celui-ci n'induit pas le déclenchement de l'apoptose (Colin-Cassin *et al.*, 2015; Berthe *et al.*, 2016). Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié par western blot la protéine chaperonne BiP, acteur clé de la réponse UPR activée lors d'un stress du RE, dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF7. Contrairement à la $\Delta 2$ -TGZ, EP13 n'augmente pas l'expression de BiP après 48 et 72 heures de traitement (données non montrées).

3. Conclusion

Nous avons réalisé une étude de relations structure-activité de la TGZ et de plusieurs dérivés désoufrés. Tout d'abord, ces composés possèdent tous une activité anticancéreuse puisqu'ils diminuent le nombre de cellules dans les quatre lignées cancéreuses mammaires utilisées. De manière générale, la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-453 appartenant au sous type HER2⁺ est la plus sensible alors que la lignée Hs578T est la moins sensible. Cette lignée cancéreuse mammaire fait partie du sous-type moléculaire triple-négatif comme la lignée MDA-MB-231. Cette dernière est cependant beaucoup plus sensible à ces composés. Il semble que ces composés présentent une activité anticancéreuse indépendante du sous-type de cancer mammaire. Nous avons montré que les dérivés désoufrés possèdent une IC₅₀ très inférieure à leurs composés parents, et présentent donc une meilleure activité anticancéreuse. Ainsi, l'absence de soufre au niveau du cycle TZD permet d'améliorer l'activité anticancéreuse des composés dans les quatre lignées cancéreuses mammaires.

La TGZ induit un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1, comme cela a été démontré au laboratoire avec la $\Delta 2$ -TGZ (Berthe *et al.*, 2016). En revanche, EP13 provoque l'apoptose des cellules MDA-MB-231. Contrairement à EP13, les dérivés désoufrés DD216 et OP136 n'induisent pas l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (données non montrées).

II. ETUDE DE L'ACTION DES TZD SUR LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

Comme mentionné dans le paragraphe III.5.3 de l'introduction, l'action anticancéreuse des TZD peut être associée à une perturbation du métabolisme énergétique. Les TZD peuvent inhiber l'activité glycolytique ou altérer le fonctionnement mitochondrial (Wei *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2016). Aussi, dans la deuxième partie de mon travail de thèse, l'objectif a été d'étudier l'effet des TZD sur le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires.

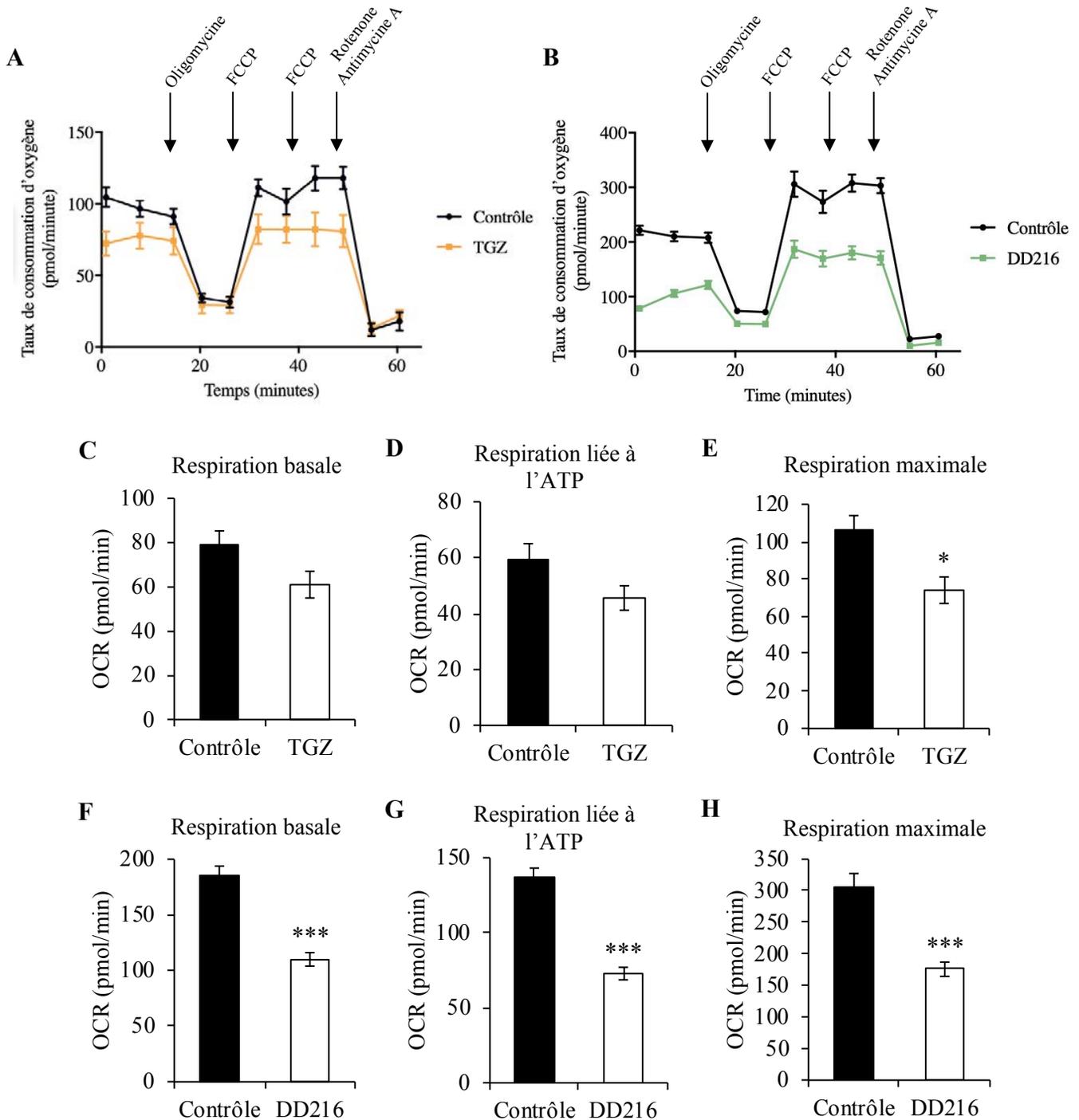


Figure 43 : La TGZ et DD216 altèrent la respiration mitochondriale des cellules MCF-7. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 4 h avec 74 μM de TGZ (A, C, D et E) et 36 μM de DD216 (B, F, G et H). Le taux de consommation d'oxygène (A et B) est mesuré en utilisant l'instrument Seahorse XFe24. Les paramètres bioénergétiques sont obtenus par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur d'ATP synthase ; 1 μM) pour dériver la respiration liée à l'ATP, d'un agent découplant FCCP (0,25 et 0,5 μM) pour la respiration maximale puis d'antimycine A (1 μM) et de roténone (1 μM) afin de bloquer la respiration mitochondriale. C et F. La respiration basale est obtenue par soustraction de la respiration non mitochondriale (après ajout d'antimycine A et de roténone) à la respiration moyenne. D et G. La respiration liée à l'ATP est obtenue par l'ajout d'oligomycine. E et H. La respiration maximale est obtenue par l'ajout de FCCP. OCR, oxygen consumption rate. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

1. Effet de l'absence du soufre sur la respiration mitochondriale

Nous avons montré que l'absence de soufre au niveau du cycle TZD améliore l'efficacité anticancéreuse des dérivés de la TGZ. Dans un premier temps, nous avons donc voulu déterminer si ces composés altèrent la respiration mitochondriale des cellules cancéreuses mammaires. Dans un deuxième temps, dans la poursuite de l'étude de la relation structure-activité, nous avons évalué si l'absence de soufre au niveau du cycle TZD modifie l'impact des TZD sur la respiration mitochondriale. Pour cela nous avons comparé l'effet de la TGZ et de la Δ 2-TGZ avec leur composé désoufré respectif DD216 et OP136 sur le taux de consommation d'oxygène des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 après 4 heures de traitement grâce à un instrument de mesure en temps réel (Seahorse XFe24 analyzer, Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). Ce travail a été réalisé avec l'aide de Jérôme Kluza au cours d'un séjour de 6 semaines au sein de l'UMR 837 Inserm (Equipe 4) à Lille. Les figures 43A et 43B représentent le profil de consommation d'oxygène des cellules MCF-7 dans les conditions témoins (courbe noire, cercles) et lors d'un traitement avec la TGZ (74 μ M) (courbe orange, carrés) et DD216 (36 μ M) (courbe verte, carrés). Des inhibiteurs sont ajoutés à différents moments de l'expérience afin de déterminer les paramètres bioénergétiques. Dans les cellules MCF-7, la TGZ semble induire une légère diminution de la respiration basale (Figure 43A et 43C). Nous avons ensuite mesuré la respiration liée à la production d'ATP suite à l'ajout d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase (Figure 43A et 43D). Lors d'une activité respiratoire normale, l'oxydation des substrats est couplée à la synthèse d'ATP (Kadenbach, 2003). C'est pourquoi, suite à une inhibition de l'ATP synthase, la phosphorylation oxydative est ralentie et la consommation d'oxygène est réduite. La TGZ réduit faiblement la respiration liée à la production d'ATP (Figure 43A et 43D). Cependant la diminution de la respiration basale et de celle liée à l'ATP ne sont pas significatives. La respiration maximale a également été mesurée après addition de FCCP (p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone) (Figure 43A et 43E). Le FCCP provoque une fuite de protons à travers la membrane mitochondriale interne conduisant à une accélération de l'activité de la chaîne respiratoire dont le but est de rétablir le gradient de protons. Il en résulte une augmentation de la consommation d'oxygène (Kadenbach, 2003). La TGZ induit une diminution significative de la respiration maximale (Figure 43A et 43E). Par conséquent les cellules traitées avec la TGZ ne parviennent pas à accélérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire ; elles présentent donc une capacité de réserve respiratoire plus faible que les cellules témoins (données non montrées). Comparé à la TGZ, DD216 induit une diminution significative de la respiration basale (Figure 43B et 43F) et de la

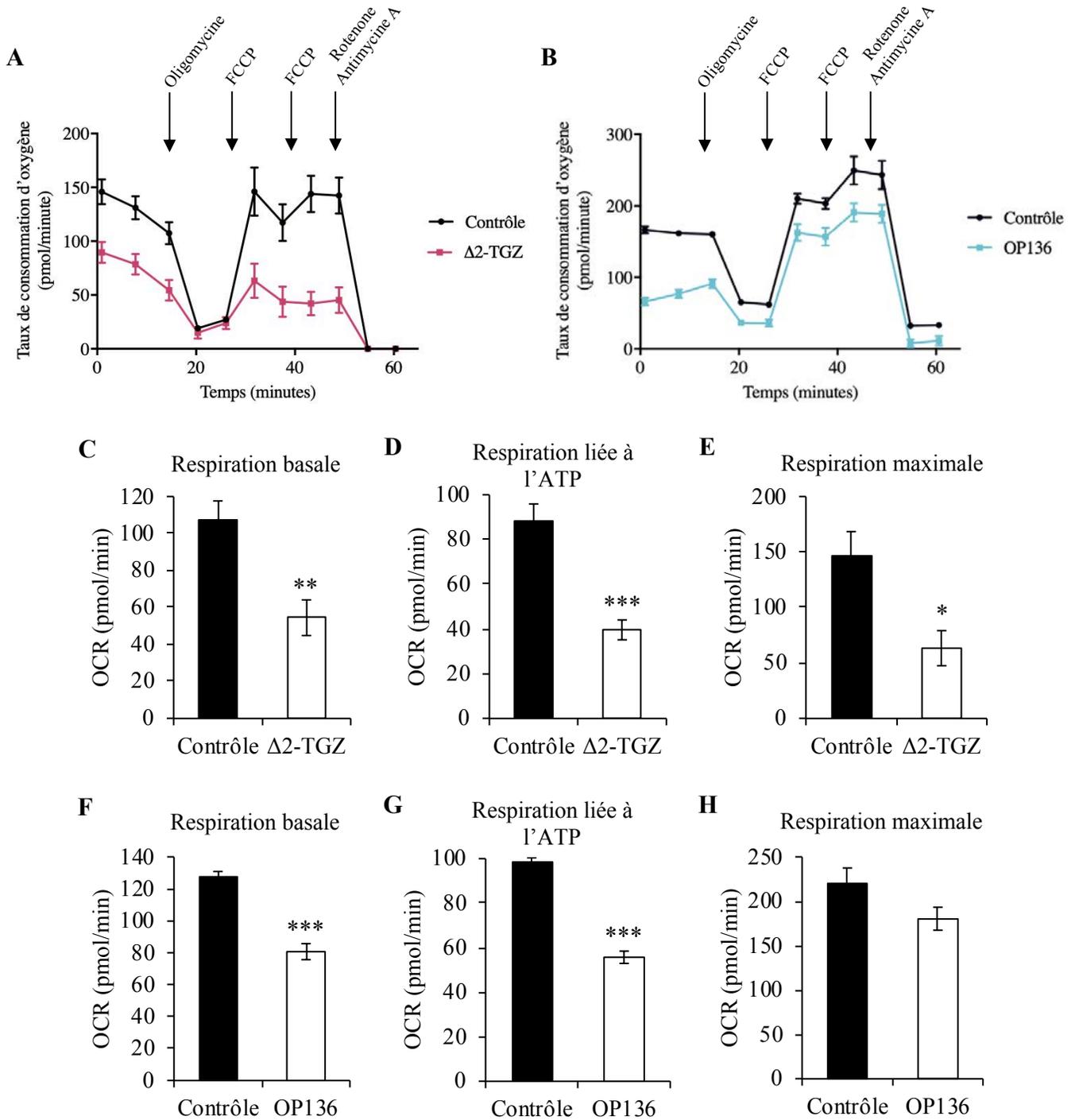


Figure 44 : La $\Delta 2$ -TGZ et OP136 altèrent la respiration mitochondriale des cellules MCF-7. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 4 h avec 60 μ M de $\Delta 2$ -TGZ (A, C, D et E) et 13 μ M d'OP136 (B, F, G et H). Le taux de consommation d'oxygène (A et B) est mesuré en utilisant l'instrument Seahorse XFe24. Les paramètres bioénergétiques sont obtenus par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur d'ATP synthase; 1 μ M) pour dériver la respiration liée à l'ATP, d'un agent découplant FCCP (0,25 et 0,5 μ M) pour la respiration maximale puis d'antimycine A (1 μ M) et de roténone (1 μ M) afin de bloquer la respiration mitochondriale. C et F. La respiration basale est obtenue par soustraction de la respiration non mitochondriale (après ajout d'antimycine A et de roténone) à la respiration moyenne. D et G. La respiration liée à l'ATP est obtenue par l'ajout d'oligomycine. E et H. La respiration maximale est obtenue par l'ajout de FCCP. OCR, oxygen consumption rate. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

respiration liée à l'ATP (Figure 43B et 43G) suite à l'ajout d'oligomycine. Ainsi, en réponse à l'inhibition de l'ATP synthase, les cellules MCF-7 présentent une diminution de la consommation d'oxygène moins importante que celle observée dans les cellules témoins, suggérant un découplage mitochondrial, entre la respiration et la production d'ATP. En effet, les cellules traitées avec DD216 affichent une efficacité de couplage réduite ce qui confirme que DD216 provoque un découplage mitochondrial (données non montrées). Ce composé induit également une diminution significative de la respiration maximale après addition de FCCP (Figure 43B et 43H). Ainsi les cellules traitées avec DD216 affichent une capacité de réserve respiratoire plus faible que les cellules témoins (données non montrées). Au vu de ces résultats, DD216 semble altérer la respiration mitochondriale de manière plus importante que son composé parent, la TGZ.

Les figures 44A et 44B représentent le profil de consommation d'oxygène des cellules MCF-7 dans les conditions témoins (courbe noire, cercles) et lors d'un traitement avec $\Delta 2$ -TGZ (60 μ M) (courbe rose, carrés) et OP136 (13 μ M) (courbe bleue, carrés). Des inhibiteurs sont ajoutés à différents moments de l'expérience afin de déterminer les paramètres bioénergétiques. La $\Delta 2$ -TGZ induit une forte diminution de la respiration basale (Figure 44A et 44C) et de la respiration liée à l'ATP (Figure 44A et 44D) suite à l'ajout d'oligomycine. Ainsi, en réponse à l'inhibition de l'ATP synthase, les cellules MCF-7 présentent une faible diminution de la consommation d'oxygène par rapport aux cellules témoins, cependant l'efficacité de couplage n'est pas modifiée (données non montrées). La $\Delta 2$ -TGZ induit également une diminution significative de la respiration maximale suite à l'addition de FCCP (Figure 44A et 44E). Toutefois, la capacité de réserve respiratoire n'est pas significativement différente entre les deux conditions de traitement (données non montrées). Ce résultat est probablement dû à la faible différence entre la respiration maximale et la respiration basale en condition témoin (Figure 44A). De la même manière, OP136 provoque une diminution de la respiration basale (Figure 44B et 44F) et de la respiration liée à l'ATP (Figure 44B et 44G). Cette dernière est accompagnée d'une baisse de l'efficacité de couplage (données non montrées), traduisant un découplage mitochondrial induit par OP136. A la différence de son composé parent, il n'induit qu'une faible diminution de la respiration maximale de manière non significative (Figure 44B et 44H). Au vu de ces résultats, OP136 n'altère pas davantage la respiration mitochondriale que son composé parent, la $\Delta 2$ -TGZ. L'absence de soufre ne semble pas augmenter l'altération de la respiration mitochondriale habituellement observée avec la TGZ et la $\Delta 2$ -TGZ.

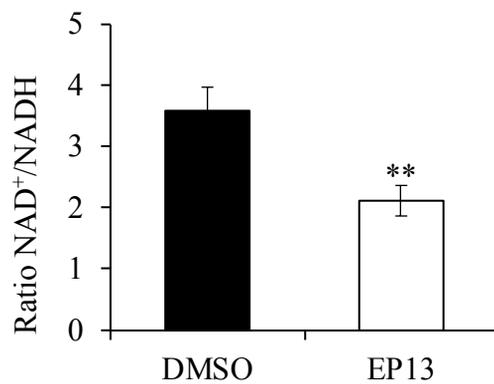


Figure 45 : EP13 induit une diminution du ratio NAD⁺/NADH. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 h avec 6 μ M d'EP13. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012 %). A la fin du traitement, les cellules ont été lysées et les quantités de NAD⁺ et NADH ont été déterminées grâce au kit NAD/NADH-Glo™ Assay (Promega). Le ratio NAD⁺/NADH a ensuite été calculé pour chaque condition. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes, réalisées chacune en quadruplicat. **, $p < 0,01$.

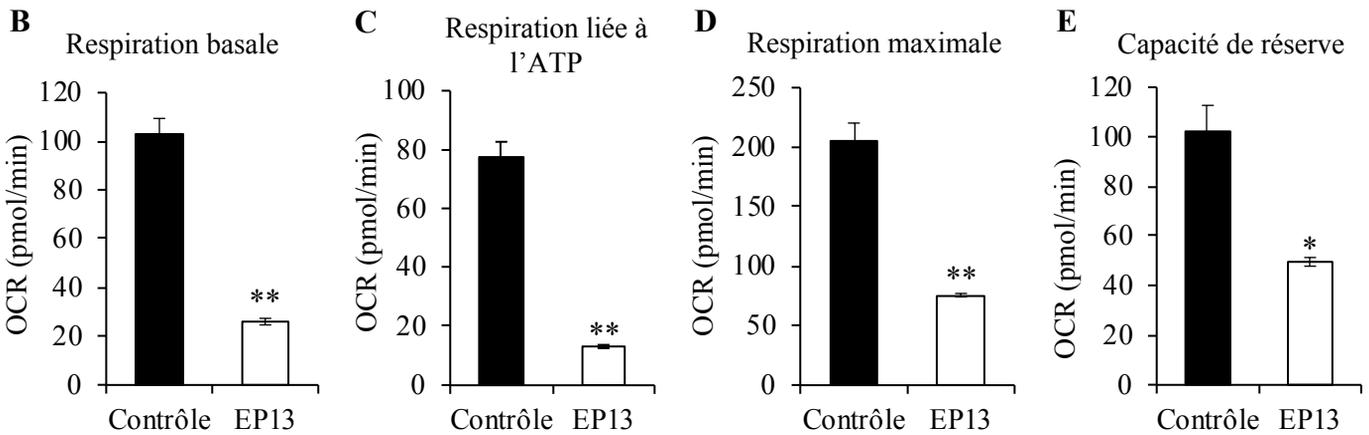
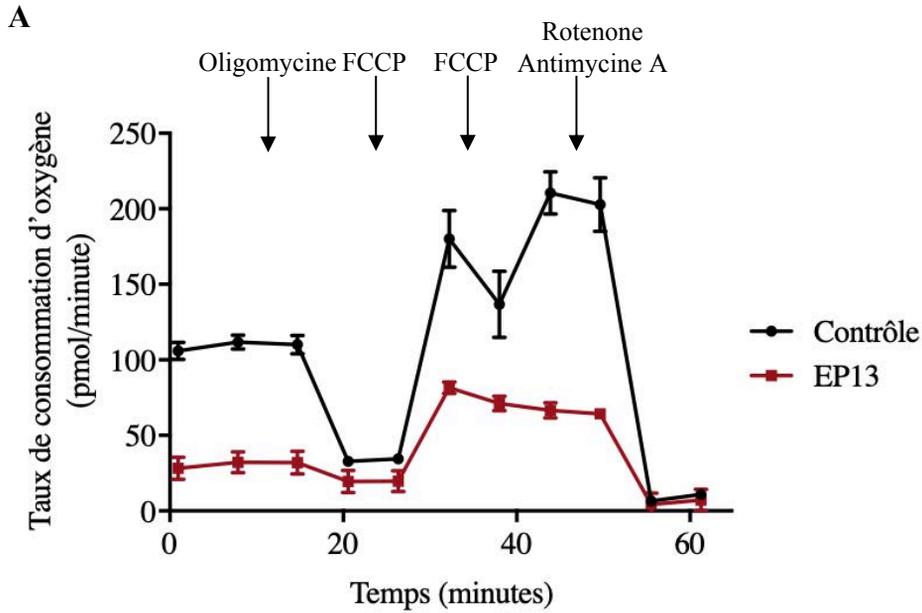


Figure 46 : EP13 altère la respiration mitochondriale des cellules MDA-MB-231.

Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 4 h avec 6 μM d'EP13. Le taux de consommation d'oxygène (A) est mesuré en utilisant l'instrument Seahorse XFe24. Les paramètres bioénergétiques sont obtenus par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur d'ATP synthase; 1 μM) pour dériver la respiration liée à l'ATP, d'un agent découplant FCCP (0,25 et 0,5 μM) pour la respiration maximale puis d'antimycine A (1 μM) et de roténone (1 μM) afin de bloquer la respiration mitochondriale. B. La respiration basale est obtenue par soustraction de la respiration non mitochondriale (après ajout d'antimycine A et de roténone) à la respiration moyenne. C. La respiration liée à l'ATP est obtenue par l'ajout d'oligomycine. D. La respiration maximale est obtenue par l'ajout de FCCP. E. La capacité de réserve est déterminée en soustrayant la respiration basale à la respiration maximale. OCR, oxygen consumption rate. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

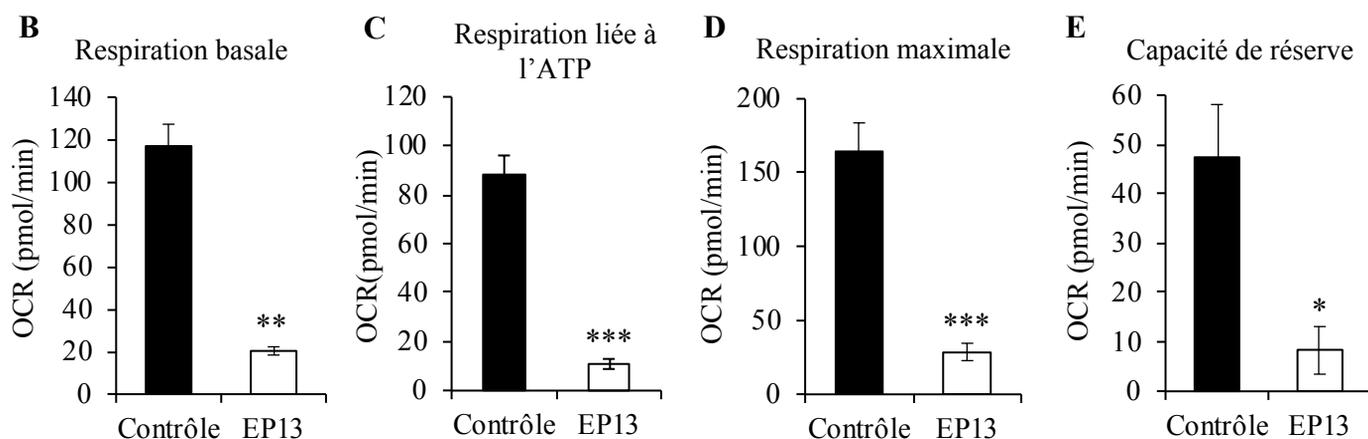
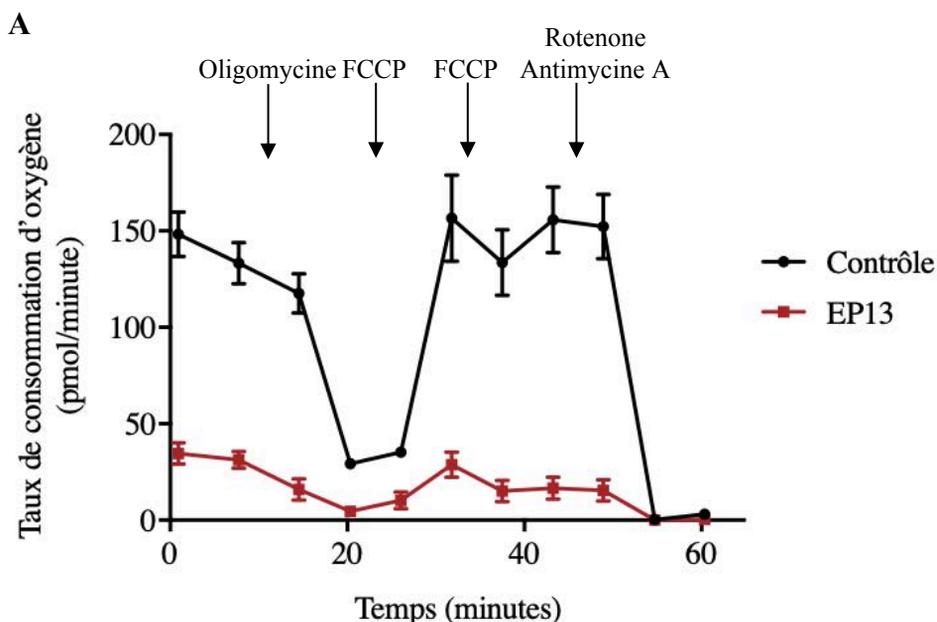


Figure 47 : EP13 altère la respiration mitochondriale des cellules MCF-7. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 4 h avec 6 μ M d'EP13. Le taux de consommation d'oxygène (A) est mesuré en utilisant l'instrument Seahorse XFe24. Les paramètres bioénergétiques sont obtenus par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur d'ATP synthase; 1 μ M) pour dériver la respiration liée à l'ATP, d'un agent découplant FCCP (0,25 et 0,5 μ M) pour la respiration maximale puis d'antimycine A (1 μ M) et de roténone (1 μ M) afin de bloquer la respiration mitochondriale. B. La respiration basale est obtenue par soustraction de la respiration non mitochondriale (après ajout d'antimycine A et de roténone) à la respiration moyenne. C. La respiration liée à l'ATP est obtenue par l'ajout d'oligomycine. D. La respiration maximale est obtenue par l'ajout de FCCP. E. La capacité de réserve est déterminée en soustrayant la respiration basale à la respiration maximale. OCR, oxygen consumption rate. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

2. Etude de l'action d'EP13 sur le métabolisme énergétique

Nous avons choisi d'étudier de manière plus approfondie l'action d'EP13, composé le plus efficace, sur le métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231, Hs578T et MCF-7.

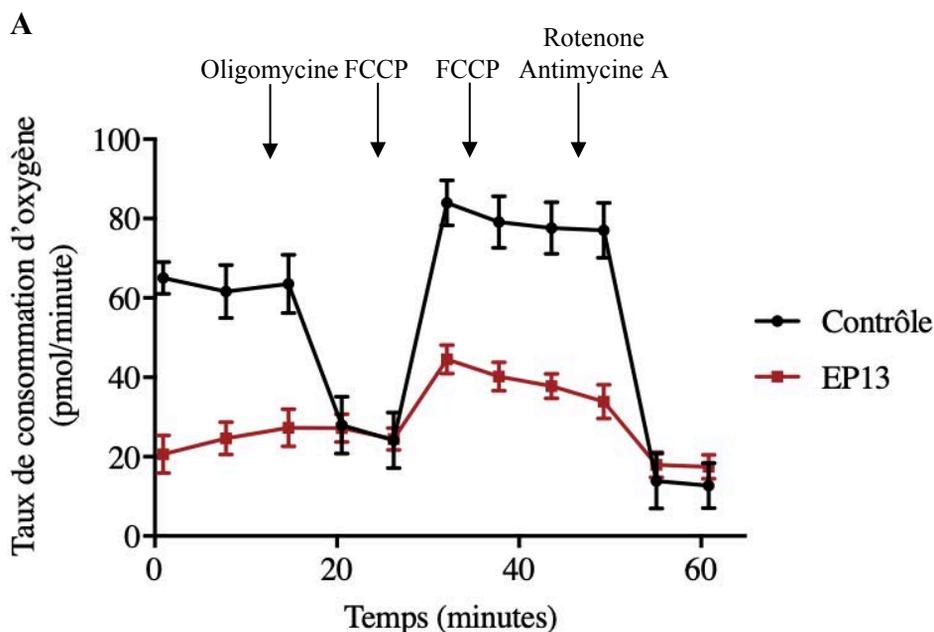
2.1 Impact sur le métabolisme énergétique de manière générale

Des fluctuations du ratio NAD^+/NADH peuvent être observées lorsque le métabolisme énergétique d'une cellule est déstabilisé. Nous avons donc démarré par l'étude de ce ratio dans les cellules MDA-MB-231. Après 24 heures de traitement, EP13 (6 μM) induit une diminution du ratio NAD^+/NADH (Figure 45). EP13 perturbe donc le métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231. Cette perturbation peut découler d'une action sur la glycolyse et/ou d'une action sur le fonctionnement mitochondrial, les deux voies principales du métabolisme énergétique. Nous avons donc étudié l'effet d'EP13 sur ces deux voies.

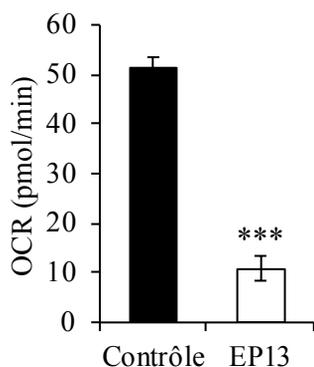
2.2 Impact sur le fonctionnement mitochondrial

2.2.1 Mesure de la consommation d'oxygène et des paramètres bioénergétiques

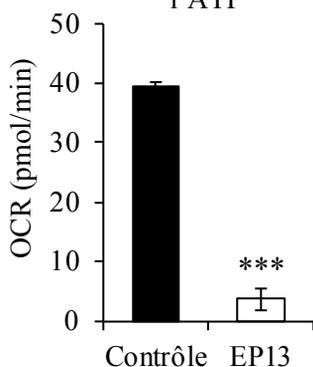
Afin d'évaluer l'impact d'EP13 sur le fonctionnement mitochondrial, nous avons d'abord étudié son effet sur le taux de consommation d'oxygène des cellules MDA-MB-231, MCF-7 et Hs578T après un traitement de 4 heures grâce au Seahorse XFe24 analyzer. Les figures 46A, 47A et 48A représentent le profil de consommation d'oxygène des cellules MDA-MB-231, MCF-7 et Hs578T respectivement dans les conditions témoins (courbe noire, cercles) et les conditions de traitement avec EP13 (6 μM pour les lignées MDA-MB-231 et MCF-7 et 9 μM pour la lignée Hs578T) (courbe rouge, carrés). Des inhibiteurs sont ajoutés à différents moments de l'expérience afin de déterminer les paramètres bioénergétiques. Dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7, EP13 induit une forte diminution de la respiration basale (figure 46A et B et 47A et B) de 4 et 5 fois respectivement par rapport aux conditions témoins. Suite à l'inhibition de l'ATP synthase par ajout d'oligomycine, EP13 diminue fortement la respiration liée à la production d'ATP (Figure 46C et 47C). Dans les cellules MDA-MB-231, ce mécanisme résulte d'une efficacité de couplage réduite (données non montrées). EP13 induit donc un découplage entre la respiration et la production d'ATP dans les cellules MDA-MB-231. En revanche dans les cellules MCF-7, l'efficacité de couplage n'est pas modifiée (données non montrées). EP13 conduit également à une importante diminution de la respiration maximale (après addition de FCCP) (figures 46D et 47D). Par conséquent les cellules traitées avec EP13 présentent une capacité de réserve respiratoire plus faible que les cellules témoins (Figure 46E et 47E). L'ensemble de ces résultats indique qu'EP13 inhibe la respiration mitochondriale des



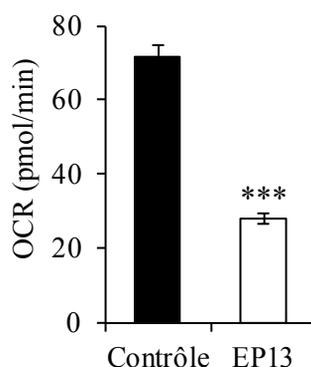
B Respiration basale



C Respiration liée à l'ATP



D Respiration maximale



E Capacité de réserve

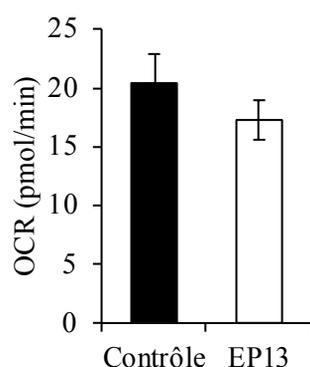


Figure 48 : EP13 altère la respiration mitochondriale des cellules Hs-578T. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 4 h avec 9 μM d'EP13. Le taux de consommation d'oxygène (A) est mesuré en utilisant l'instrument Seahorse XFe24. Les paramètres bioénergétiques sont obtenus par l'ajout d'oligomycine (inhibiteur d'ATP synthase; 1 μM) pour dériver la respiration liée à l'ATP, d'un agent découplant FCCP (0,25 et 0,5 μM) pour la respiration maximale puis d'antimycine A (1 μM) et de roténone (1 μM) afin de bloquer la respiration mitochondriale. B. La respiration basale est obtenue par soustraction de la respiration non mitochondriale (après ajout d'antimycine A et de roténone) à la respiration moyenne. C. La respiration liée à l'ATP est obtenue par l'ajout d'oligomycine. D. La respiration maximale est obtenue par l'ajout de FCCP. E. La capacité de réserve est déterminée en soustrayant la respiration basale à la respiration maximale. OCR, oxygen consumption rate. ***, $p < 0,001$.

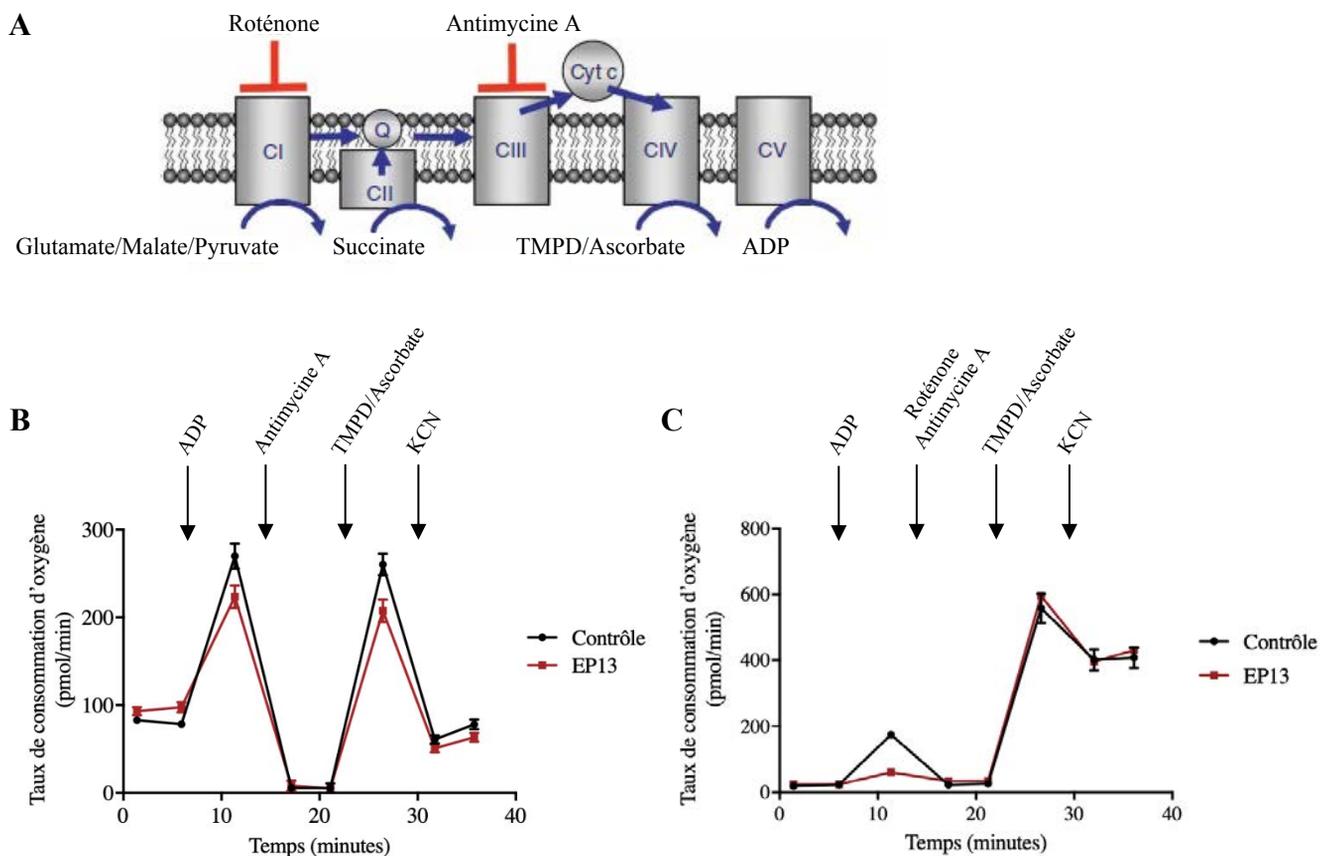


Figure 49 : EP13 semble bloquer le complexe I de la chaîne respiratoire de mitochondries isolées. A. Représentation schématique du mode d'action de chaque activateur/inhibiteur utilisé. Les mitochondries isolées de foie de souris sont incubées pendant 10 minutes avec 6 μM d'EP13 et différents activateurs/inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire selon deux protocoles. Le taux de consommation d'oxygène (OCR) par les différents complexes de la chaîne respiratoire est mesuré en utilisant l'instrument Seahorse XFe24. B. Le protocole 1 permet de mesurer l'OCR par les complexes II, III et IV. Les mitochondries sont incubées avec du succinate (substrat du complexe II) et de la roténone (inhibiteur du complexe I). Puis sont ajoutés de l'ADP permettant le fonctionnement de la chaîne respiratoire, de l'antimycine A (inhibiteur du complexe III), du TMPD/ascorbate pour le fonctionnement du complexe IV puis du KCN qui bloque le fonctionnement de la chaîne respiratoire. C. Le protocole 2 permet de mesurer l'OCR par les complexes I, III et IV. Les mitochondries sont incubées avec du glutamate, du malate et du pyruvate dont l'oxydation fournit du NADH, substrat du complexe I. Puis sont ajoutés de l'ADP permettant le fonctionnement de la chaîne respiratoire, de l'antimycine A (inhibiteur du complexe III) et de la roténone (inhibiteur du complexe I), du TMPD/ascorbate pour le fonctionnement du complexe IV puis du KCN qui bloque le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Les données présentées sont issues d'une seule expérience. OCR, oxygen consumption rate; KCN, cyanure de potassium; TMPD, N,N,N',N'-tetraméthyl-p-phenylenediamine.

cellules MDA-MB-231 et MCF-7. L'effet d'EP13 sur la respiration mitochondriale a également été étudié dans une deuxième lignée cancéreuse mammaire triple-négative, la lignée Hs578T. EP13 induit une diminution importante de la respiration basale (Figure 48A et B), de 5 fois par rapport aux conditions témoins, et de la respiration liée à l'ATP (Figure 48A et C) associée à une baisse de l'efficacité de couplage (données non montrées). Comme dans les cellules MDA-MB-231, EP13 est à l'origine d'un découplage mitochondrial dans les cellules Hs578T. La respiration maximale des cellules Hs578T traitées avec EP13 est également largement réduite par rapport aux cellules témoins (Figure 48D). Cependant aucune différence significative de la capacité de réserve respiratoire n'est observée entre les deux conditions de traitement (Figure 48E). De manière similaire, EP13 altère le fonctionnement de la chaîne respiratoire des 3 lignées cancéreuses mammaires utilisées, il semble donc que son mode d'action est conservé dans les différentes lignées cellulaires. De plus, EP13 altère la respiration mitochondriale des cellules MCF-7 de manière plus efficace que les autres composés désoufrés DD216 et OP136.

2.2.2 *Mesure de la consommation d'oxygène de mitochondries isolées*

Afin de déterminer si EP13 cible directement l'activité de l'un des complexes de la chaîne respiratoire, nous avons mesuré le taux de consommation d'oxygène de mitochondries isolées de foie de souris, qui ont été incubées avec 6 μ M d'EP13, selon deux protocoles détaillés dans la figure 35. Des activateurs et des inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire sont ajoutés lors de l'expérience afin de mesurer le taux de consommation d'oxygène par ces différents complexes (Figure 49A). Selon le protocole 1, nous avons étudié spécifiquement la consommation d'oxygène liée au complexe II (Figure 49B). Les mitochondries sont incubées avec de la roténone inhibant le complexe I et du succinate qui fournit du FADH₂ au complexe II permettant son activité. L'ADP permet le fonctionnement de la chaîne respiratoire. La consommation d'oxygène des mitochondries liée au complexe II est très légèrement diminuée lorsque les mitochondries sont traitées avec EP13 par rapport aux conditions contrôles. L'ajout d'antimycine A qui inhibe le complexe III induit une forte diminution de la respiration des mitochondries traitées avec EP13 ou non. L'ascorbate donne des électrons au cytochrome c grâce au TMPD ce qui entraîne le fonctionnement du complexe IV. Ainsi, la respiration mitochondriale augmente dans les deux conditions testées, de manière légèrement moins importante suite au traitement avec EP13 (Figure 49B). Selon le protocole II, nous avons étudié spécifiquement la consommation d'oxygène liée au complexe I (Figure 49C). Les mitochondries sont incubées avec du glutamate, du malate et du pyruvate qui, suite à leur oxydation, fournissent du NADH au complexe I permettant son activité. L'ADP permet le

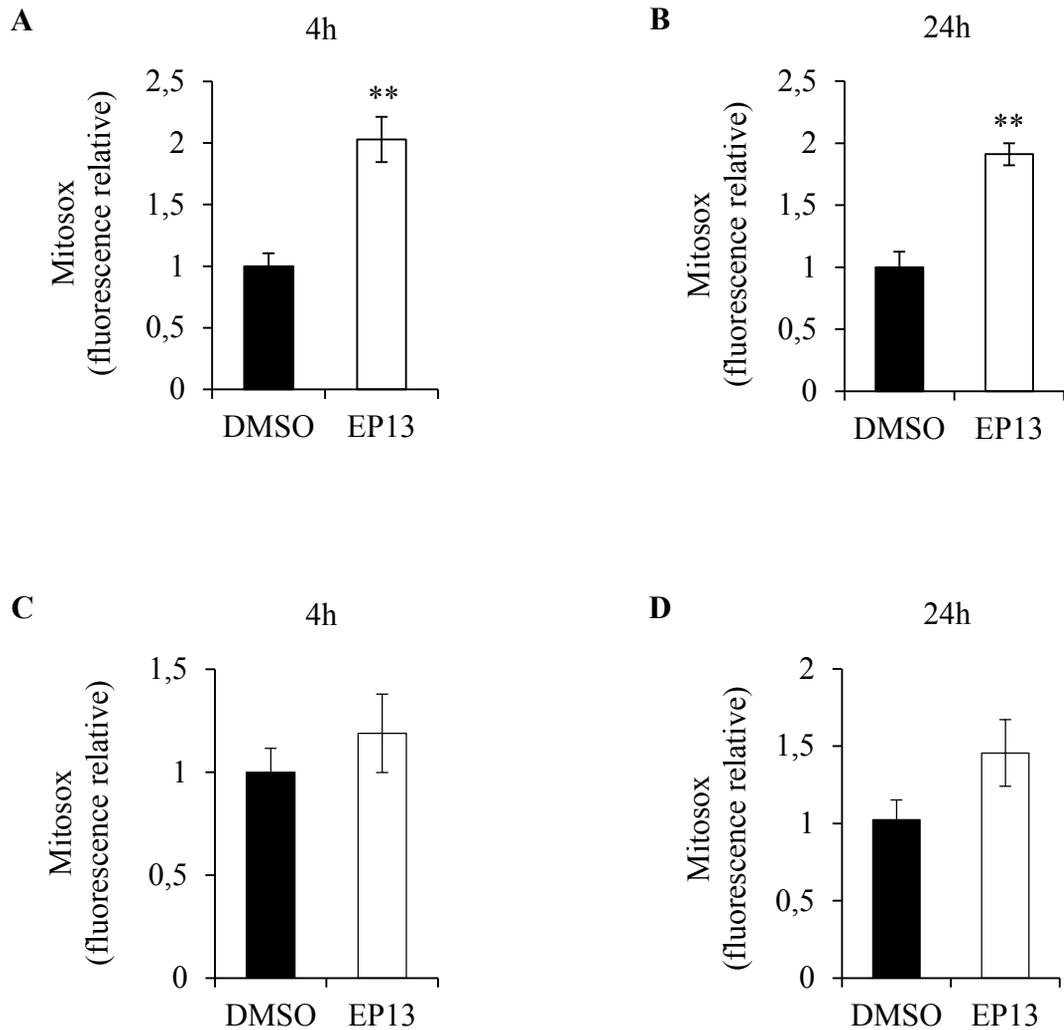


Figure 50 : EP13 induit une augmentation de la production d'ERO dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 (A et B) et MCF-7 (C et D) ont été traitées pendant 4 et 24 h avec 6 μ M d'EP13. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012 %). A la fin du traitement, les cellules ont été incubées en présence de 5 μ M de la sonde MitoSOX™ Red puis analysées par cytométrie en flux. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes. **, p<0,01.

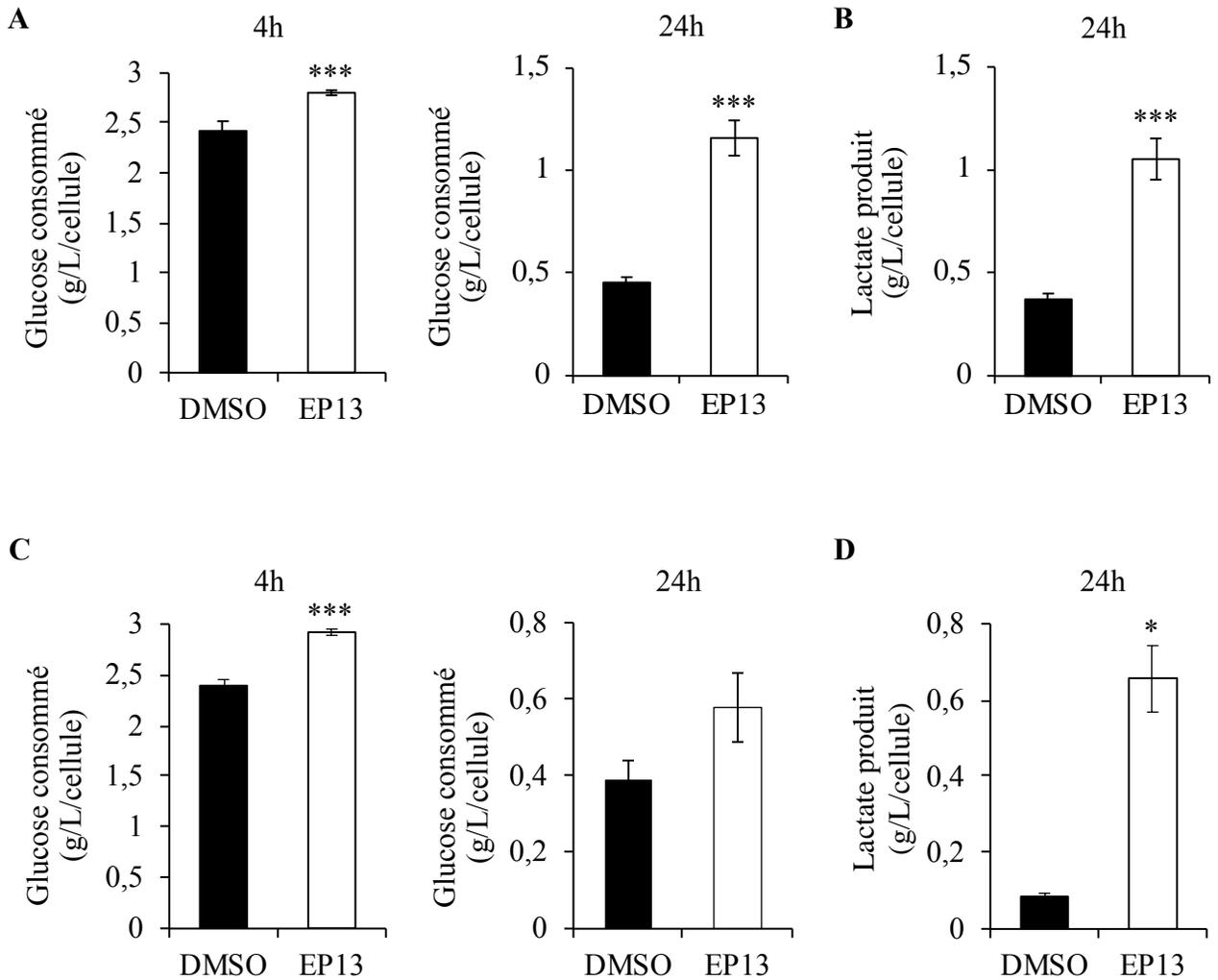


Figure 51 : EP13 induit une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate par les cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Les cellules MDA-MB-231 (A et B) et MCF-7 (C et D) ont été traitées avec EP13 (6 μM) pendant 4 et 24 h. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012 %). Les concentrations (g/L) de glucose (A,C) et de lactate (B,D) ont été mesurées dans le milieu de culture. Les concentrations ont été normalisées par rapport au nombre de cellules. Les données représentent les moyennes ± l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en duplicat, excepté pour la mesure de la consommation de glucose à 24h des cellules MCF-7 (n=2). *, p<0,5; ***, p<0,001.

fonctionnement de la chaîne respiratoire. La consommation d'oxygène des mitochondries liée au complexe I est inhibée lorsque les mitochondries sont traitées avec EP13 par rapport aux conditions contrôles. L'ajout de roténone qui inhibe le complexe I et d'antimycine A qui bloque le complexe III induit une forte diminution de la respiration dans les conditions contrôles mais pas dans les conditions de traitement avec EP13 puisque la respiration est déjà inhibée. L'ajout de TMPD/ascorbate induit une augmentation de la respiration mitochondriale dans les deux conditions testées (Figure 49C). Même en présence de substrat du complexe I, la respiration des mitochondries isolées est inhibée lorsqu'elles sont traitées avec EP13. Ces résultats préliminaires indiquent qu'EP13 semble bloquer le complexe I de la chaîne respiratoire.

2.2.3 Mesure de la production d'ERO

Par la suite, nous avons mesuré la production d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie puisqu'elle est directement liée au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Nous avons mesuré plus spécifiquement l'anion superoxyde par cytométrie en flux grâce au réactif MitoSox™ Red (ThermoFisher). Dès 4 heures, EP13 (6 μ M) induit une augmentation de la production d'ERO dans les cellules MDA-MB-231, qui est presque deux fois plus importante que dans les cellules témoins traitées avec du DMSO (Figure 50A). Cette hausse de la production d'ERO est maintenue après 24 heures de traitement avec EP13 (Figure 50B). En revanche, malgré une tendance à l'augmentation, les cellules MCF-7 traitées avec EP13 ne produisent pas significativement plus d'ERO que les cellules dans les conditions témoins après 4 et 24 heures (Figure 50C et D).

2.3 Impact sur la glycolyse

Parallèlement au fonctionnement mitochondrial, nous avons examiné l'effet d'EP13 sur l'activité glycolytique de façon indirecte en mesurant la consommation de glucose et la production de lactate des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7. Pour cela, après 4 et 24 heures de traitement avec 6 μ M d'EP13, les concentrations en glucose et en lactate dans le milieu de culture des cellules ont été mesurées avec un analyseur biochimique (YSI 2950 Biochemistry Analyzer) grâce à une collaboration avec Frédéric Bost (INSERM U1065, Université de Nice). En parallèle, le nombre de cellules a été déterminé par une coloration des noyaux au cristal violet afin de calculer une consommation de glucose et une production de lactate par cellule. Après 4 heures de traitement, EP13 induit une légère augmentation de la consommation de glucose des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (Figure 51A et C). La concentration en lactate ne varie pas entre le milieu de culture sans cellules et le milieu de culture en présence des cellules, ce qui signifie que les cellules ne produisent pas de lactate

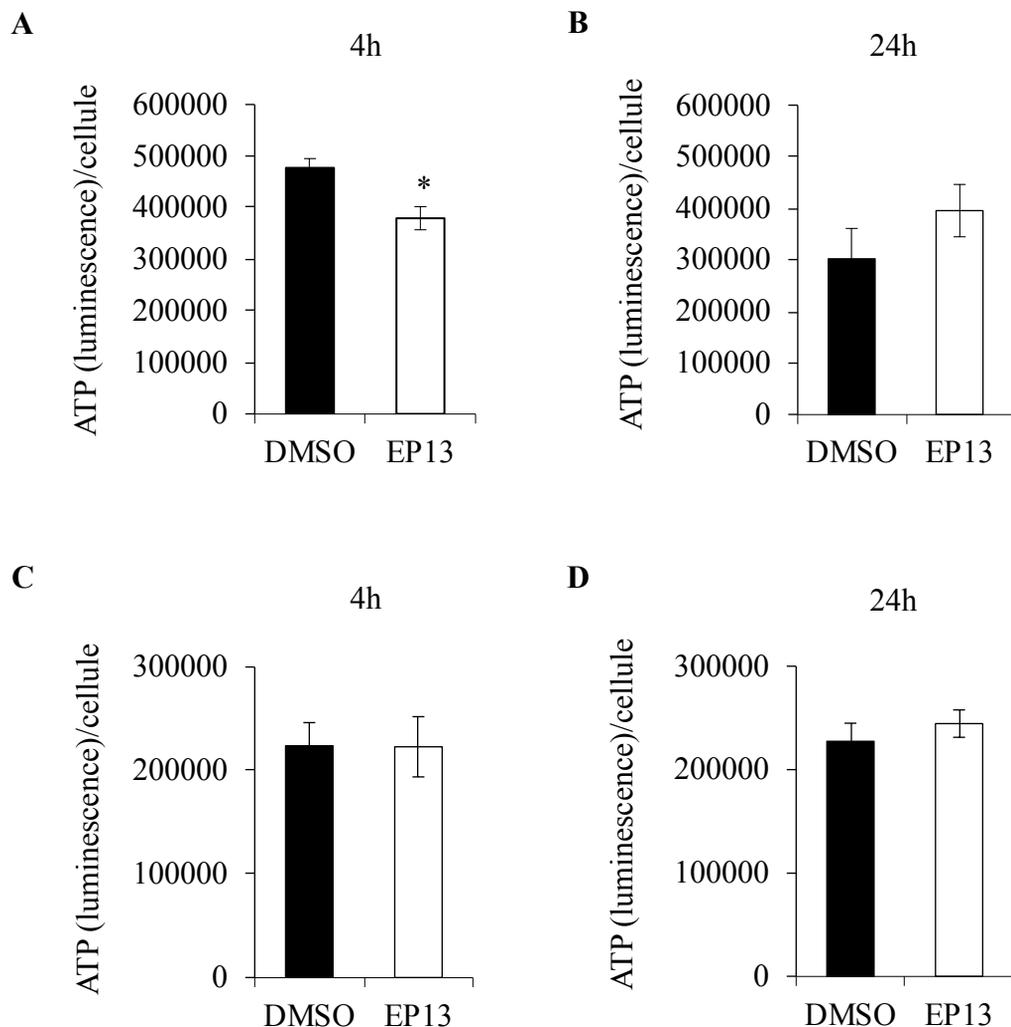


Figure 52 : Effet d'EP13 sur la quantité d'ATP. Les cellules MDA-MB-231 (A et B) et MCF-7 (C et D) ont été traitées avec EP13 (6 μ M) pendant 4 et 24 h. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012%). La quantité d'ATP intracellulaire a été mesurée par luminescence grâce au kit CellTiter-Glo[®] puis normalisée par rapport au nombre de cellules. Les données représentent les moyennes \pm l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. *, $p < 0,5$.

aussi bien dans les conditions témoins (cellules traitées avec du DMSO) que lors d'un traitement avec EP13 (données non montrées) ou bien que la quantité de lactate accumulée est trop faible pour être détectée. En revanche après 24 heures de traitement avec EP13, la consommation de glucose et la production de lactate augmentent de 2,4 fois et 2,7 fois respectivement dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 51A et B). Dans les cellules MCF-7, la consommation de glucose semble augmenter (n=2) et la production de lactate augmente significativement de 7 fois après 24 heures de traitement avec EP13 (Figure 51C et D).

EP13 induit donc une accélération de la glycolyse des cellules MDA-MB-231 et potentiellement des cellules MCF-7. Ce mécanisme pourrait compenser le blocage de la phosphorylation oxydative afin de maintenir un niveau d'énergie suffisant dans les cellules.

2.4 L'augmentation de la glycolyse correspond-elle à un mécanisme de compensation métabolique ?

2.4.1 Dosage de l'ATP intracellulaire

Afin de déterminer si la perte d'énergie due à une atteinte de la respiration mitochondriale peut être restaurée par une augmentation de l'activité glycolytique, nous avons évalué la production d'ATP des cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Pour cela les cellules ont été traitées pendant 4 et 24 heures avec 6 μ M d'EP13 puis la quantité d'ATP intracellulaire a été mesurée par chimioluminescence (Kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega). En parallèle le nombre de cellules a été déterminé par un marquage des noyaux au cristal violet afin d'établir la quantité d'ATP normalisée par rapport au nombre de cellules. Dans les cellules MDA-MB-231 traitées avec EP13 durant 4 heures, la quantité d'ATP diminue par rapport aux cellules témoins traitées avec du DMSO (Figure 52A). Par contre la quantité d'ATP ne varie pas par rapport aux cellules témoins après 24 heures de traitement avec EP13 (Figure 52B). *A contrario*, après 4 ou 24 heures de traitement des cellules MCF-7 avec EP13 la quantité d'ATP n'est pas modifiée comparé aux conditions témoins (Figure 52C et D). EP13 induit rapidement une diminution de la production d'ATP des cellules MDA-MB-231 qui est complètement restaurée par la suite alors qu'il ne semble pas impacter la production d'ATP dans la lignée MCF-7.

2.4.2 Effet de la combinaison d'EP13 et du 2-desoxyglucose

Dans le but de démontrer que l'atteinte du fonctionnement mitochondrial est compensée par la glycolyse, nous avons réalisé une combinaison de traitement avec EP13 et un inhibiteur de la glycolyse, le 2-desoxyglucose (2-DG). Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées durant 72 heures avec EP13 ou du 2-DG seuls à des concentrations croissantes ou avec les deux composés

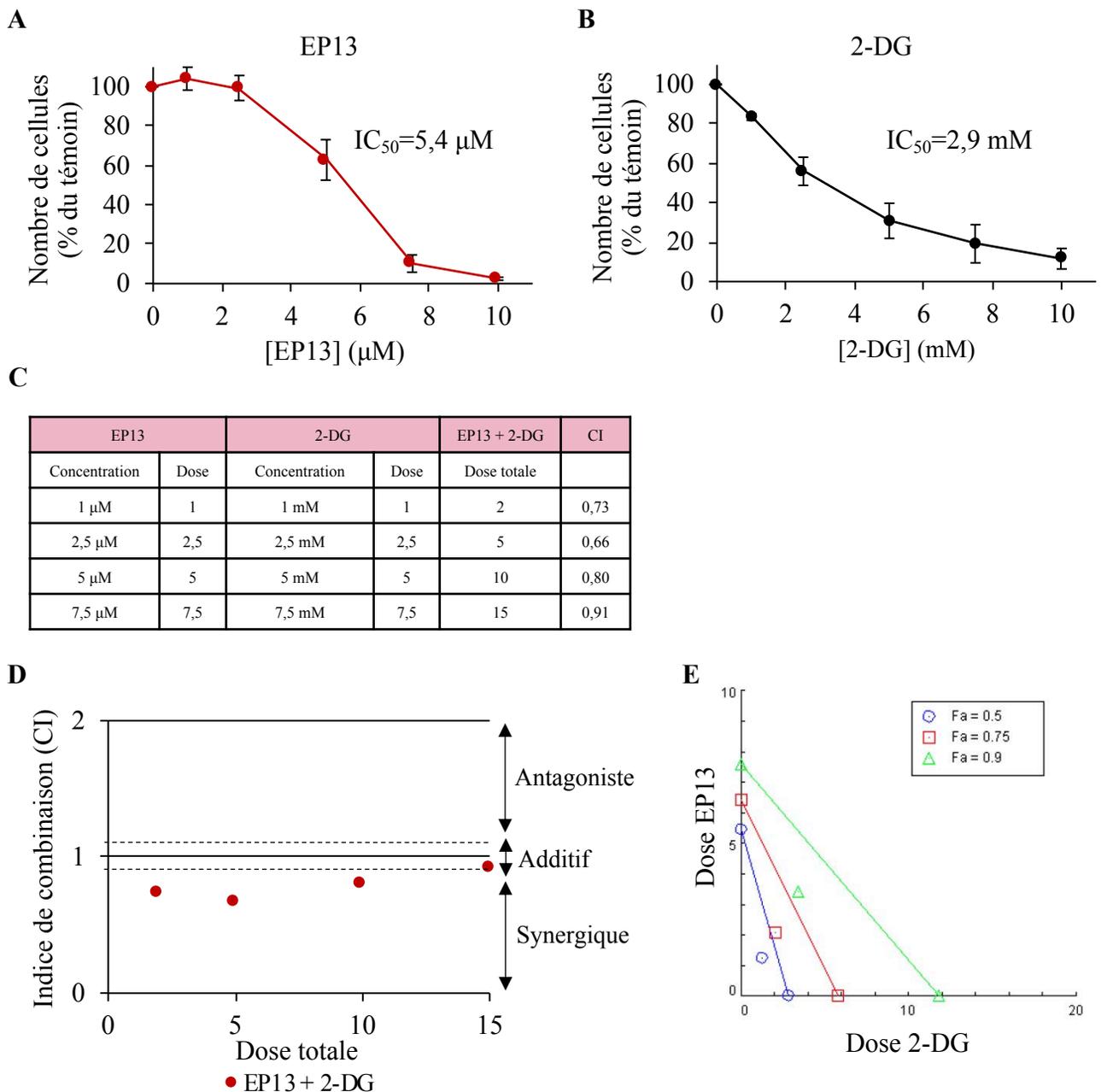


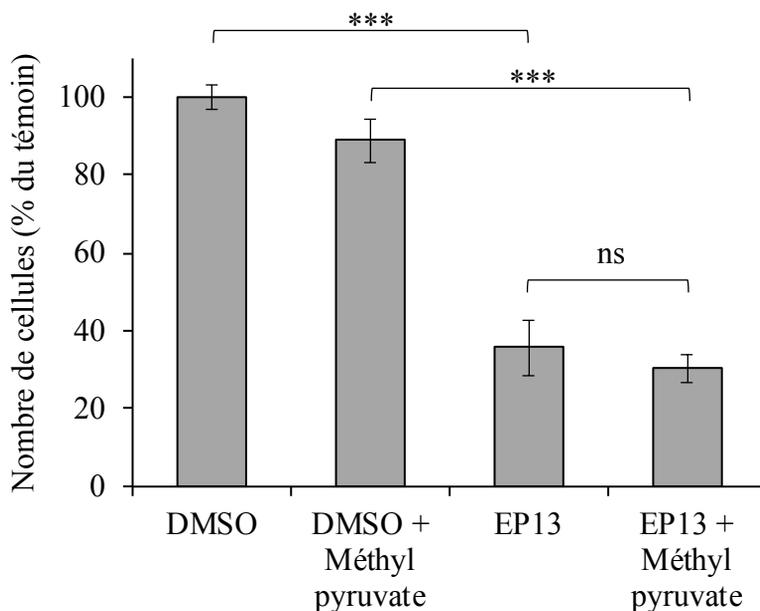
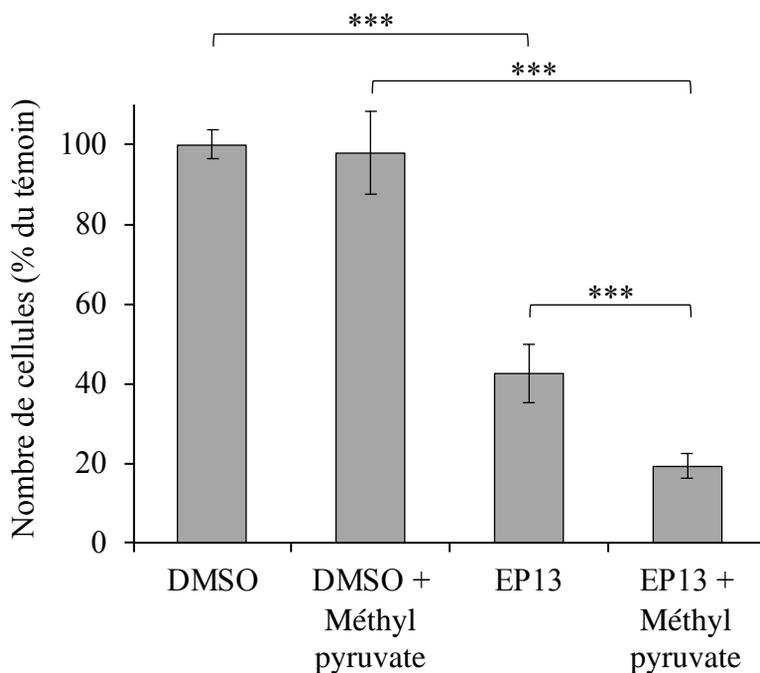
Figure 53 : EP13 et 2-DG ont un effet synergique sur la diminution du nombre de cellules. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées durant 72h avec des gammes de concentration d'EP13 et 2-DG utilisés seuls (A et B) ou en combinaison à ratio constant (concentrations indiquées dans le tableau, C). Le nombre de cellules a été déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. D. Les données sont soumises au logiciel Compusyn afin de déterminer les indices de combinaison (CI) selon la méthode de Chou Talalay. La zone délimitée par les pointillés ($0,9 < CI < 1,1$) représente un effet additif. Un $CI > 1,1$ indique un effet antagoniste et $CI < 0,9$ indique un effet synergique. E. Isobologramme représentant l'effet (Fa: fraction affectée) de la combinaison des deux composés par rapport à leur effet en utilisation seule. La Fa représente le taux de cellules ayant été affectées par les traitements. Une Fa de 0,5 correspond à une diminution du nombre de cellules de 50 %. La dose ou dose totale représente la part de chaque molécule dans les traitements, ne prenant pas en compte l'unité de mesure de la concentration. Pour une Fa donnée, lorsque le point de dose totale est situé sous le seuil établi par les points de chaque dose utilisée seule, l'effet des composés est synergique. Dans notre cas, l'effet est synergique pour chaque fraction affectée. Les données présentées sont issues des moyennes de trois expériences indépendantes.

en combinaison à des concentrations croissantes et à ratio constant (Figure 53C). Le nombre de cellules est déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. EP13 et 2-DG diminuent le nombre de cellules de façon dose-dépendante et présentent une IC₅₀ de 5,4 μ M et 2,9 mM respectivement (Figure 53A et B). A partir de ces résultats et des données associées au co-traitement, l'indice de combinaison (CI) est déterminé selon la méthode de Chou Talalay grâce à la formule du logiciel Compusyn présentée dans la figure 37C. Dans ce contexte, la notion de dose est utilisée pour désigner la concentration du composé, indépendamment de l'unité. Lors d'un co-traitement, les doses s'additionnent pour définir la dose totale (Figure 53C). Avec les doses totales 2, 5 et 10, les CI obtenus sont inférieurs à 0,9 ce qui correspond à un effet synergique de la combinaison EP13 et 2-DG alors que la dose totale 15 présente un CI compris entre 0,9 et 1,1 traduisant un effet additif du co-traitement (Figure 53D). D'après l'isobologramme, les doses d'EP13 et de 2-DG utilisés en combinaison (points sous la droite) nécessaires afin d'obtenir une fraction affectée (Fa) de 0,5 (50 % de de cellules en moins), 0,75 (75 % de cellules en moins) ou 0,9 (90 % de cellules en moins) sont inférieures aux doses nécessaires des composés utilisés seuls (points sur les axes) (Figure 53E). Ceci confirme donc que la combinaison EP13+2-DG possède des effets synergiques sur la diminution du nombre de cellules.

Ces résultats confortent l'hypothèse que la glycolyse semble être un mécanisme compensateur de l'altération de la fonction mitochondriale. Ils prouvent également l'intérêt de cibler simultanément le fonctionnement mitochondrial et la glycolyse.

2.5 L'effet anticancéreux d'EP13 dépend-il d'une inhibition du transport de pyruvate dans la mitochondrie ?

Une étude a montré que l'inhibition de MPC induite par la TGZ et la RGZ pouvait diminuer la respiration mitochondriale de myocytes provenant de muscle squelettique humain et augmenter l'absorption du glucose. Cette inhibition de la respiration peut être inversée par le méthyl pyruvate, un analogue du pyruvate traversant librement la membrane mitochondriale interne et alimentant le cycle de Krebs (Divakaruni *et al.*, 2013). Une des cibles potentielles d'EP13 pourrait être le MPC. Afin de déterminer si l'inhibition du MPC intervient dans l'action d'EP13 sur les cellules MDA-MB-231 et MCF-7, nous avons étudié l'impact du méthyl pyruvate sur l'effet antiprolifératif d'EP13. Les cellules ont été traitées pendant 48h avec 6 μ M d'EP13 et 5 mM de méthyl pyruvate puis le nombre de cellules a été déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. EP13 diminue de plus de moitié le nombre de cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (Figure 54 A et B). Son effet n'est pas modulé en présence de méthyl pyruvate dans les cellules MDA-MB-231 alors que dans les cellules MCF-7, l'effet d'EP13 est amplifié par le

A**B****Figure 54 : Le méthyl pyruvate ne modifie pas l'activité antiproliférative d'EP13.**

Les cellules MDA-MB-231 (A) et MCF-7 (B) ont été traitées avec 6 μ M d'EP13 et 5 mM de méthyl pyruvate pendant 48h. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012 %). La diminution du nombre de cellules a été déterminée par une coloration des noyaux au cristal violet. Les données représentent les moyennes \pm l'écart standard à la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. ***, $p < 0,001$.

méthyl pyruvate (Figure 54 A et B). Ainsi, le méthyl pyruvate ne contrecarre pas l'effet d'EP13 ce qui suggère que l'effet antiprolifératif d'EP13 ne serait pas la conséquence de l'inhibition de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie par son transporteur MPC.

3. Conclusion

Rapidement, après 4 heures de traitement, la TGZ et la $\Delta 2$ -TGZ ainsi que leur dérivé désoufré respectif DD216 et OP136 affectent la respiration mitochondriale des cellules MCF-7. Cependant, bien que l'absence de soufre améliore l'activité anticancéreuse de ces TZD, cette modification ne semble pas amplifier l'altération de la respiration mitochondriale observée avec les TZD soufrées.

EP13, le composé substitué et désoufré le plus efficace, altère de manière marquée le fonctionnement mitochondrial de façon précoce dès 4 heures de traitement dans les trois lignées cellulaires étudiées. Son action semble donc être indépendante du sous-type de cancer mammaire. Cette atteinte respiratoire est accompagnée d'une augmentation de la production d'ERO dans les cellules MDA-MB-231. En réponse à l'altération mitochondriale, l'activité glycolytique est stimulée dans les deux lignées cellulaires permettant certainement de compenser l'altération du fonctionnement mitochondrial pour maintenir la synthèse d'ATP. Enfin, le méthyl pyruvate ne permet pas de contrecarrer l'effet d'EP13 sur la diminution du nombre de cellules traduisant que son effet antiprolifératif ne dépend pas d'une inhibition du MPC. Il reste à déterminer s'il existe un lien entre l'altération du fonctionnement mitochondrial et la modification du métabolisme énergétique de manière globale et l'induction d'apoptose par EP13. Toutefois, EP13 pourrait être un candidat potentiel pour des stratégies thérapeutiques visant à cibler le métabolisme énergétique.

III. ETUDE DE LA COMBINAISON D'EP13 AVEC DES AGENTS DE CHIMIOTHÉRAPIE

Comme décrit dans le paragraphe III.3 de l'introduction, l'utilisation des TZD en thérapie combinatoire semble tout à fait intéressante. En effet, ils améliorent l'efficacité d'agents anticancéreux dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Fröhlich and Wahl, 2015). De la même manière, des études ont démontré que la metformine était capable de potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie (Rocha *et al.*, 2011). Précédemment au laboratoire, il a été montré que la $\Delta 2$ -TGZ augmente l'effet de la doxorubicine sur les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 mais pas celui du 5-FU et du paclitaxel (Thèse d'Audrey Berthe, 2017).

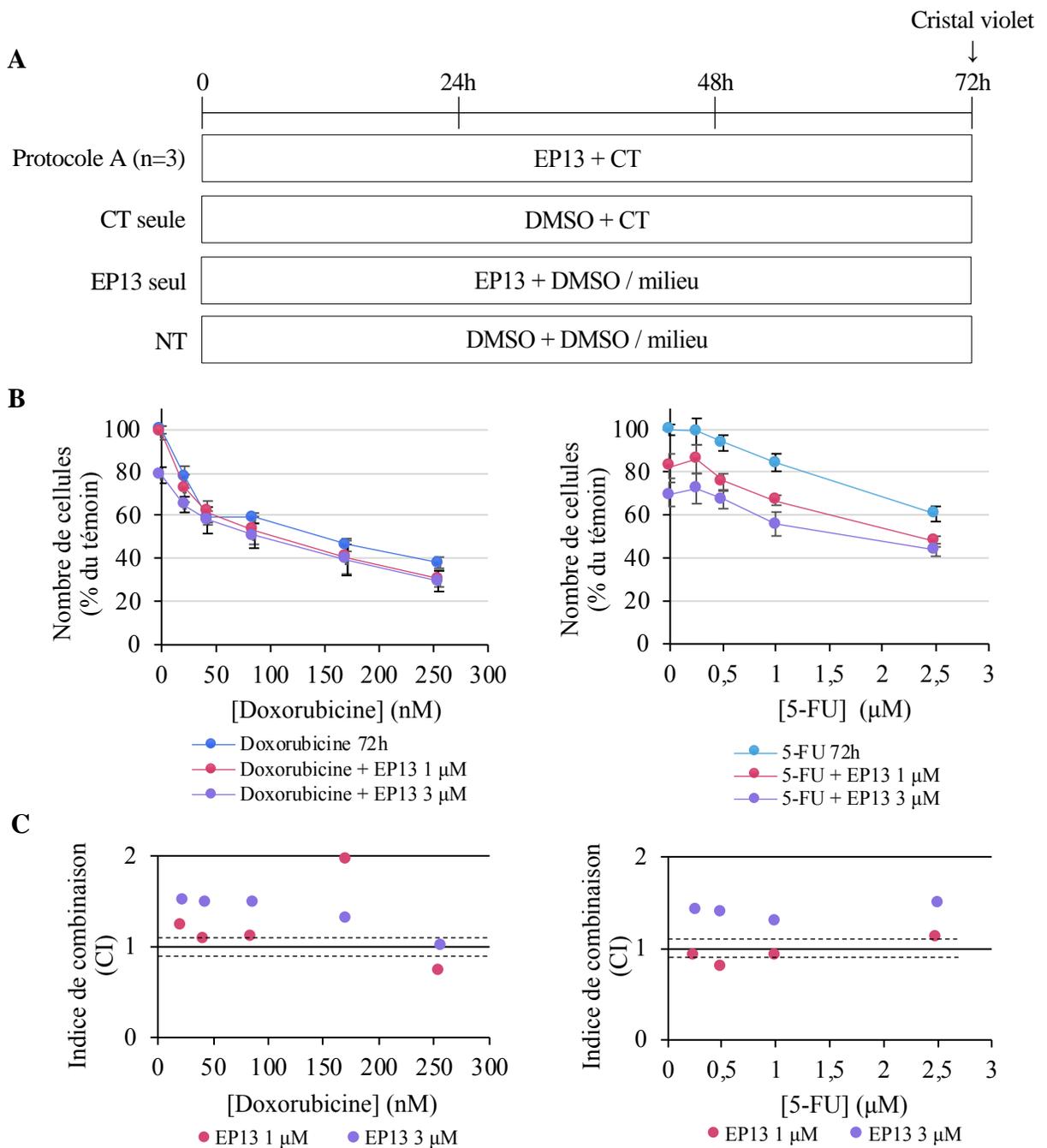


Figure 55 : Appliqués selon le protocole A, EP13 (1 μ M) et 5-FU ont des effets additifs sur la diminution du nombre de cellules. A. Schéma représentant le protocole de traitement A. Dans les protocoles témoins (CT ou EP13 seuls), EP13 et le 5-FU sont substitués par du DMSO, la doxorubicine par du milieu de culture. NT correspond au protocole permettant d'obtenir le nombre de cellules, en l'absence des composés utilisés, ramené à 100 %. B. Les cellules MDA-MB-231 sont traitées avec EP13 (1 ou 3 μ M) et une gamme de concentrations de doxorubicine (21,25 ; 42,5 ; 85 ; 170 ; 255 nM) ou de 5-FU (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 μ M). Pour le protocole NT, le DMSO est présent à un pourcentage de 0,007 %. Le nombre de cellules est déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. Les données représentent les moyennes \pm l'écart standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. C. L'indice de combinaison (CI) est calculé selon la méthode de Chou Talalay grâce au logiciel CompuSyn. La zone délimitée par les pointillés ($0,9 < CI < 1,1$) représente un effet additif. $CI > 1$ indique un effet antagoniste et $CI < 1$ indique un effet synergique. CT, chimiothérapie.

J'ai poursuivi cette étude en étudiant EP13 en thérapie combinatoire avec deux agents de chimiothérapie couramment utilisés dans le traitement du cancer du sein, la doxorubicine et le 5-FU. Les combinaisons sont réalisées dans la lignée MDA-MB-231 selon 3 protocoles de traitement présentés dans la figure 36. Dans ces combinaisons, EP13 est utilisé à des concentrations fixes et faibles (inférieures à l'IC₅₀) de 1 et 3 µM. Les agents de chimiothérapies sont quant à eux utilisés à des concentrations croissantes.

1. Étude de combinaison selon le protocole A

Le protocole A correspond à un co-traitement de 72 heures avec EP13 et un agent de chimiothérapie (CT) qui est soit la doxorubicine (Figure 55B graphique gauche) soit le 5-FU (Figure 55B graphique droite), appliquée à différentes concentrations (Figures 55A). Toutes les conditions témoins du protocole A sont indiquées dans la figure 55A.

Utilisé seul, EP13 à une concentration de 1 µM induit une diminution du nombre de cellules ($1,4 \pm 3,2$ % Figure 55B graphe de gauche et $16,9 \pm 5,7$ % Figure 55B droite) et celle-ci est plus importante avec une concentration de 3 µM ($21,1 \pm 3,7$ % Figure 55B graphe de gauche et $30,2 \pm 5,6$ % Figure 55B droite). La doxorubicine et le 5-FU utilisés seuls ou en combinaison avec EP13 diminuent le nombre de cellules MDA-MB-231 de façon dose-dépendante (Figure 55B). La diminution est légèrement plus importante en présence de la concentration la plus élevée d'EP13 (3 µM) (Figure 55B). A partir de ces données, les CI sont calculés d'après la formule présentée en figure 37C.

EP13, utilisé à 1 µM, et la doxorubicine ont soit des effets antagonistes pour les concentrations de doxorubicine de 21,25 et 170 nM ($CI > 1,1$), soit des effets additifs pour les concentrations de 42,5 et 85 nM ($CI \leq 1,1$), soit des effets synergiques pour 255 nM ($CI = 0,74$) (Figure 55C). EP13, utilisé à 3 µM, et la doxorubicine ont également des effets antagonistes pour les doses de doxorubicine comprises entre 21,25 et 170 nM ($CI > 1,1$). Nous n'observons des effets additifs que pour la concentration maximale de doxorubicine (255 nM) avec un CI de 1,03.

EP13, utilisé à 3 µM, et le 5-FU ont des effets antagonistes quelles que soient les concentrations de 5-FU utilisées. Lorsqu'il est utilisé à 1 µM, EP13 et 5-FU ont soit des effets additifs lorsque ce dernier est à 0,25, 1 et 2,5 µM ($0,9 \leq CI \leq 1,1$), soit des effets synergiques lorsque ce dernier est présent à 0,5 µM ($CI = 0,8$) (Figure 55C).

Appliqués selon le protocole A, EP13 à 3 µM et les agents de chimiothérapie ont donc des effets antagonistes. Des effets plutôt additifs sont observés lorsqu'EP13 est utilisé à 1 µM.

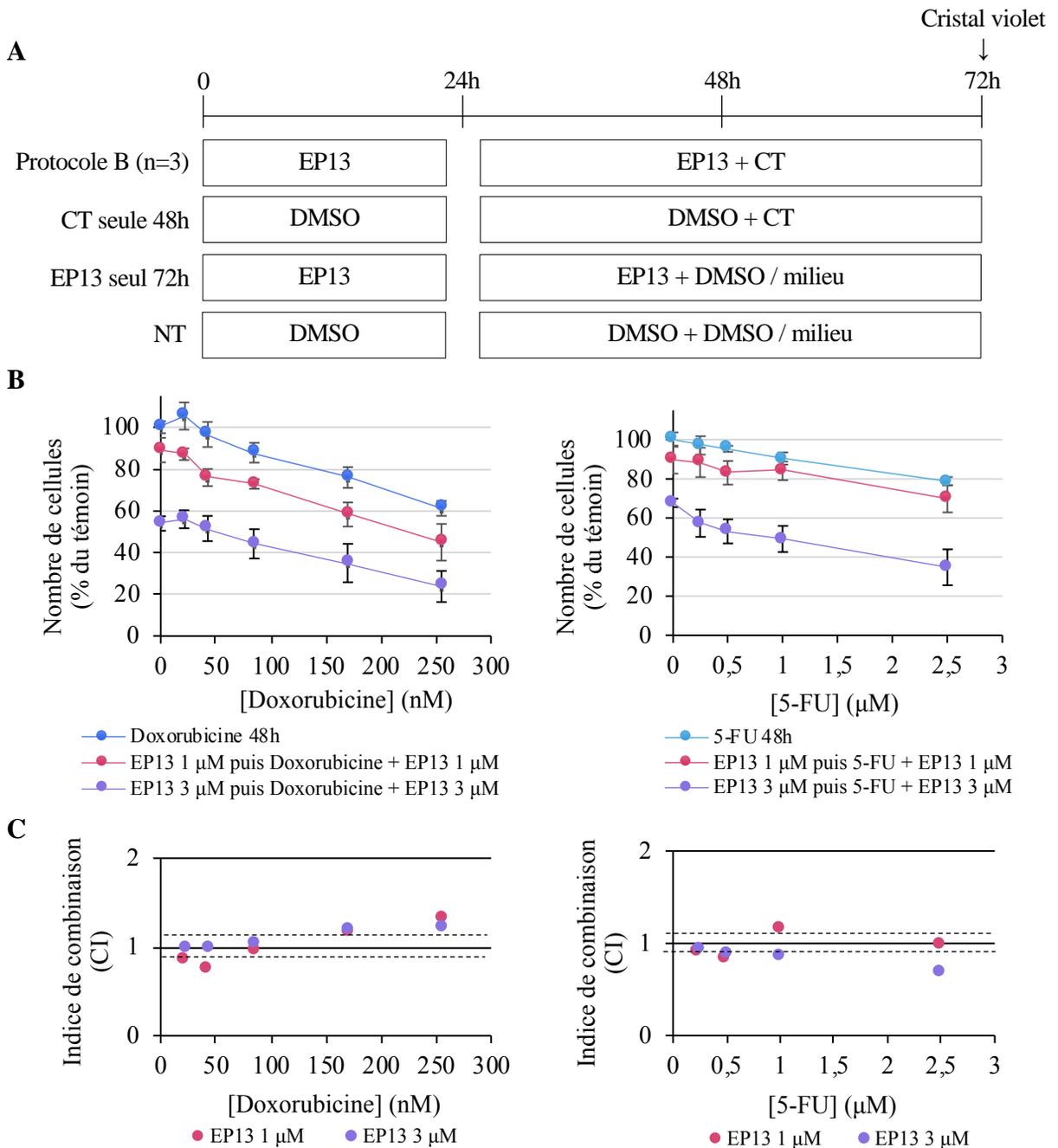


Figure 56 : Appliqués selon le protocole B, EP13 et les agents de chimiothérapie ont des effets additifs voire synergiques sur la diminution du nombre de cellules.

A. Schéma représentant le protocole de traitement B. Dans les protocoles témoins (CT ou EP13 seuls), EP13 et le 5-FU sont substitués par du DMSO, la doxorubicine par du milieu de culture. NT correspond au protocole permettant d'obtenir le nombre de cellules, en l'absence des composés utilisés, ramené à 100 %. B. Les cellules MDA-MB-231 sont traitées avec EP13 (1 ou 3 μM) et une gamme de concentrations de doxorubicine (21,25 ; 42,5 ; 85 ; 170 ; 255 nM) ou de 5-FU (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 μM). Pour le protocole NT, le DMSO est présent à un pourcentage $\leq 0,007\%$. Le nombre de cellules est déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. Les données représentent les moyennes \pm l'écart standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. C. L'indice de combinaison (CI) est calculé selon la méthode de Chou Talalay grâce au logiciel CompuSyn. La zone délimitée par les pointillés ($0,9 < \text{CI} < 1,1$) représente un effet additif. $\text{CI} > 1$ indique un effet antagoniste et $\text{CI} < 1$ indique un effet synergique. CT, chimiothérapie.

2. Étude de combinaison selon le protocole B

Le protocole B correspond à un pré-traitement de 24 heures avec EP13 à 1 ou 3 μM suivi d'un co-traitement durant 48 heures avec EP13 (1 ou 3 μM) et une gamme de doxorubicine ou de 5-FU (Figure 56A). Toutes les conditions témoins du protocole B sont indiquées dans la figure 56A.

Utilisé seul pendant 72 heures, EP13 à une concentration de 1 μM induit une diminution du nombre de cellules ($11 \pm 5,8$ % Figure 56B graphe de gauche et $10,2 \pm 7,1$ % Figure 56B droite) et celle-ci est plus importante avec une concentration de 3 μM ($46,1 \pm 3,5$ % Figure 56B graphe de gauche et $32,3 \pm 2,2$ % Figure 56B droite). La doxorubicine et le 5-FU utilisés pendant 48 heures seuls ou en combinaison avec EP13 diminuent le nombre de cellules MDA-MB-231 de façon dose-dépendante (Figure 56B). La diminution est plus importante en présence de la concentration la plus élevée d'EP13 (3 μM) (Figure 56B).

EP13, utilisé à 1 μM , et la doxorubicine ont soit des effets synergiques lorsque la doxorubicine est présente entre 21,25 et 42,5 nM ($\text{CI} < 0,9$), soit des effets additifs à 85 nM ($\text{CI} = 0,9$) (Figure 56C). En revanche, pour les concentrations de 170 et 255 nM de doxorubicine, les effets sont antagonistes ($\text{CI} > 1,1$). Lorsqu'EP13 est utilisé à 3 μM , nous observons des effets additifs pour les concentrations de doxorubicine comprises entre 21,25 et 85 nM ($0,9 \leq \text{CI} \leq 1,1$), mais nous observons des effets antagonistes pour les concentrations plus élevées de doxorubicine (170 et 255 nM) avec des $\text{CI} > 1,1$.

EP13, utilisé à 1 μM , et le 5-FU ont soit des effets additifs lorsque le 5-FU est présent à 0,25 et 2,5 μM ($0,9 \leq \text{CI} \leq 1,1$), soit des effets synergiques à 0,5 μM ($\text{CI} = 0,8$), soit des effets antagonistes à 1 μM de 5-FU ($\text{CI} > 1,1$) (Figure 56C). EP13, utilisé à 3 μM et le 5-FU à 0,25 μM ont des effets additifs ($\text{CI} = 0,94$) tandis qu'ils ont des effets synergiques ($\text{CI} < 0,9$) pour les concentrations plus fortes de 5-FU.

Appliqués selon le protocole B, EP13 et les agents de chimiothérapie ont des effets majoritairement additifs voire synergiques.

3. Étude de combinaison selon le protocole C

Le protocole C correspond à un pré-traitement de 24 heures avec une concentration fixe d'EP13 (1 ou 3 μM) suivi d'un traitement de 48 heures avec une gamme de doxorubicine ou de 5-FU (Figure 57A). Toutes les conditions témoins du protocole C sont indiquées dans la figure 57A. Utilisé seul pendant 24 heures, EP13 (1 μM) n'a pratiquement pas d'effet sur le nombre de cellules MDA-MB-231 au bout de 72 heures de culture. A 3 μM , nous observons une

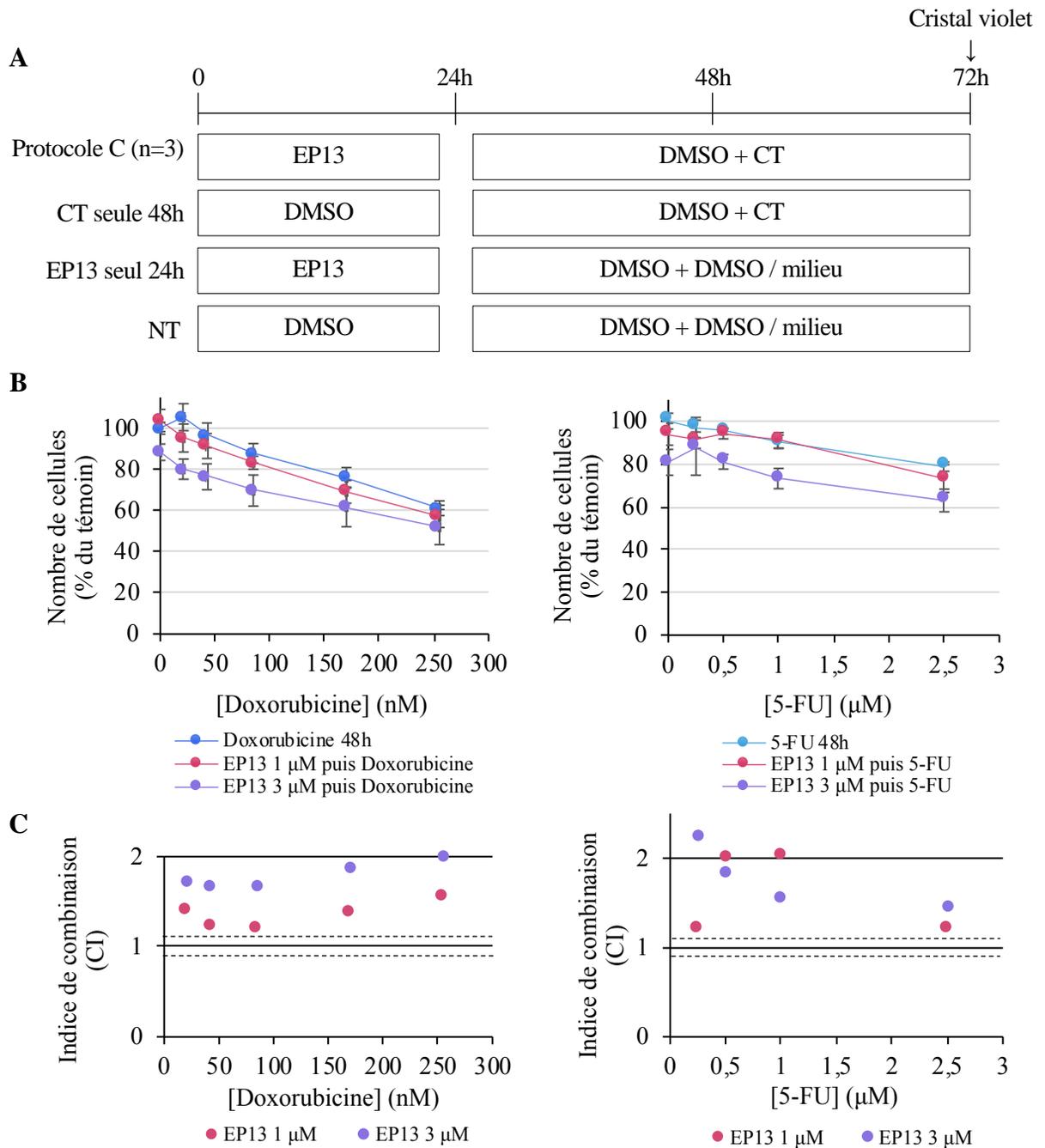


Figure 57 : Appliqués selon le protocole C, EP13 et les agents de chimiothérapie ont des effets antagonistes sur la diminution du nombre de cellules. A. Schéma représentant le protocole de traitement C. Dans les protocoles témoins (CT ou EP13 seuls), EP13 et le 5-FU sont substitués par du DMSO, la doxorubicine par du milieu de culture. NT correspond au protocole permettant d'obtenir le nombre de cellules, en l'absence des composés utilisés, ramené à 100%. B. Les cellules MDA-MB-231 sont traitées avec EP13 (1 ou 3 μM) et une gamme de concentrations de doxorubicine (21,25 ; 42,5 ; 85 ; 170 ; 255 nM) ou de 5-FU (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 μM). Pour le protocole NT, le DMSO est présent à un pourcentage $\leq 0,007\%$. Le nombre de cellules est déterminé par coloration des noyaux au cristal violet. Les données représentent les moyennes \pm l'écart standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. C. L'indice de combinaison (CI) est calculé selon la méthode de Chou Talalay grâce au logiciel CompuSyn. La zone délimitée par les pointillés ($0,9 < \text{CI} < 1,1$) représente un effet additif. $\text{CI} > 1$ indique un effet antagoniste et $\text{CI} < 1$ indique un effet synergique. CT, chimiothérapie.

diminution du nombre de cellules ($11,7 \pm 4 \%$ Figure 57B graphe de gauche et $19,3 \pm 6 \%$ Figure 57B graphe de droite). La doxorubicine et le 5-FU utilisés seuls pendant 48 heures, sans ou avec pré-traitement avec EP13 (24 heures à 1 ou 3 μM), diminuent le nombre de cellules MDA-MB-231 de façon dose-dépendante (Figure 57B).

Utilisés selon le protocole C, quelles que soient les concentrations, les agents de chimiothérapie et EP13 ont des effets antagonistes sur la diminution du nombre de cellules ($\text{CI} > 1,1$) (Figure 57C).

4. Conclusion

Le protocole B, incluant un prétraitement de 24h avec EP13, offre les résultats les plus encourageants puisque nous pouvons observer des effets additifs voire synergiques. Il est intéressant de noter que pour les protocoles A et B, EP13 à 1 μM associé à de faibles concentrations d'agents de chimiothérapie permet d'obtenir des effets additifs mais également des effets synergiques correspondant aux 3 combinaisons les plus intéressantes : 1 μM EP13 + 50 nM doxorubicine et 0,5 μM 5-FU appliqués selon le protocole B et 1 μM EP13 + 0,5 μM 5-FU appliqués selon le protocole A. Il apparaît donc que les combinaisons associant de faibles concentrations de molécules soient les plus pertinentes. L'analyse du CI montre que le protocole C conduirait exclusivement à des effets antagonistes voire très antagonistes ($\text{CI} > 2$). Ce résultat ne semble pas correspondre au profil des courbes dose-réponse qui montrent plutôt une absence d'effet d'EP13 sur la réponse des cellules à la doxorubicine et au 5-FU. Cela peut être dû à l'utilisation de la courbe dose-réponse d'EP13 définie lors d'un traitement de 72 heures comme référence pour le calcul des CI. L'analyse devra être réalisée à partir d'une courbe dose-réponse d'EP13 obtenue en réalisant une culture cellulaire de 72 heures incluant un traitement limité à 24 heures avec EP13 (Figure 57A, condition « EP13 seul 24h »).

Le profil de réponse des cellules aux combinaisons testées est identique que l'on soit en présence de doxorubicine ou de 5-FU qui ont pourtant des modes d'action différents. EP13 semble moduler la réponse cellulaire de façon non spécifique aux agents de chimiothérapie. C'est la séquence de traitement et éventuellement la concentration d'EP13 qui façonneraient la réponse des cellules. De manière plus générale, la concentration et la durée de traitement sont donc des paramètres importants pour définir un protocole.

IV. MISE EN PLACE D'UNE CULTURE CELLULAIRE TRIDIMENSIONNELLE

Au cours de mon travail de thèse, j'ai mis au point un protocole pour développer la culture de mammosphères à partir de plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein. La culture de sphéroïdes permet une organisation tridimensionnelle des cellules se rapprochant de l'organisation *in vivo*. Par ailleurs, cette culture permettrait un enrichissement en CSC. Comme décrit précédemment dans le paragraphe I.3 de l'introduction, au sein d'une tumeur, on distingue deux populations de cellules : les cellules cancéreuses ainsi qu'une petite population de CSC. Ces dernières possèdent des propriétés caractéristiques des cellules souches et sont pourvues d'une plasticité métabolique puisque leur métabolisme énergétique peut dépendre aussi bien de la phosphorylation oxydative que de la glycolyse (Fillmore and Kuperwasser, 2008; Colak and Medema, 2014; Peiris-Pagès *et al.*, 2016). Cibler le fonctionnement mitochondrial des CSC peut donc aussi être une stratégie thérapeutique intéressante afin d'éliminer cette population au sein des tumeurs (Skoda *et al.*, 2019). Des études suggèrent par exemple que la metformine est capable de cibler spécifiquement les CSC dans différents types de tumeurs et que sa combinaison avec des agents de chimiothérapie offre des effets synergiques (Hirsch *et al.*, 2009; Skoda *et al.*, 2019). Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse qu'EP13 pouvait affecter cette population de CSC. Nous avons alors testé l'effet d'EP13, mais également de la metformine et de la doxorubicine sur des mammosphères formées à partir de lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7.

1. Mise au point d'un protocole de culture de mammosphères

Avant d'aboutir au protocole final, nous avons testé plusieurs manières de cultiver les cellules cancéreuses mammaires afin d'obtenir des mammosphères. Dans la littérature, il existe différents types de support et différents milieux de culture permettant la formation des mammosphères.

❖ Les supports

Nous avons testé deux types de supports. Le premier consistait en des flasques de 75 cm² avec un revêtement en poly-HEMA empêchant l'adhésion des cellules au plastique et favorisant leur adhérence les unes aux autres pour former des structures en 3D. Le second était des plaques 6 puits de très faible adhérence (Corning®) comportant une couche d'hydrogel empêchant l'adhésion des cellules. Dans les deux conditions, nous avons pu obtenir des sphères mais nous avons choisi de réaliser notre culture 3D dans des plaques 6 puits de très faible adhérence.

❖ Les milieux de culture

Nous avons testé plusieurs milieux de culture, toujours dépourvus de sérum de veau fœtal :

- Milieu de culture utilisé pour la culture 2D contenant du rouge phénol : milieu RPMI pour les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 et milieu DMEM pour les lignées MCF-7 et Hs578T.
- Milieu de culture DMEM/F12 sans rouge phénol (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) supplémenté de 2 % de supplément B-27 (B-27™ Supplement (50X), Gibco™, Thermo Fisher Scientific) et 20 ng/mL d'EGF.
- Milieu de culture DMEM/F12 sans rouge phénol (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) supplémenté de 2 % de supplément B-27 (B-27™ Supplement (50X), Gibco™, Thermo Fisher Scientific), 20 ng/mL d'EGF et 10 µg/mL d'insuline.
- Milieu de culture complet utilisé pour la culture de neurosphères (Alicia Château, CRAN) : DMEM F12 sans rouge phénol, supplément B-27, supplément N2, EGF, FGF, insuline, héparine.

Les milieux de culture utilisés classiquement pour la culture 2D n'ont pas permis d'obtenir une formation optimale de mammosphères. Parmi les autres milieux, nous avons choisi d'utiliser le deuxième type de milieu de culture : DMEM/F12 sans rouge phénol + 2 % de supplément B-27 + 20 ng/mL d'EGF et supplémenté de 10 µg/mL d'insuline uniquement pour la lignée Hs578T.

❖ Les conditions d'ensemencement

Comme recommandé dans beaucoup de protocoles, nous avons commencé par des ensemencements à faible densité avec les quatre lignées cellulaires testées : MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-453 et MCF-7. Nous avons testé différentes densités cellulaires pour réaliser la culture tridimensionnelle des cellules : 10 et 20 000 cellules par puits et jusqu'à 250 et 500 000 cellules par puits pour les cellules MDA-MB-231 et MCF-7. Aux faibles densités (10 et 20 000 cellules par puits), les structures 3D formées sont bien définies et assez rondes surtout pour la lignée MCF-7. Aux plus fortes densités (250 et 500 000 cellules par puits), les structures 3D formées présentent des contours irréguliers et s'agglomèrent entre elles formant des amas de mammosphères. Beaucoup de cellules seules en suspension n'ayant pas formé de mammosphères sont observées après un ensemencement à forte densité contrairement aux plus faibles densités. Nous avons donc choisi d'ensemencer les quatre lignées cellulaires à raison de 20 000 cellules par puits.

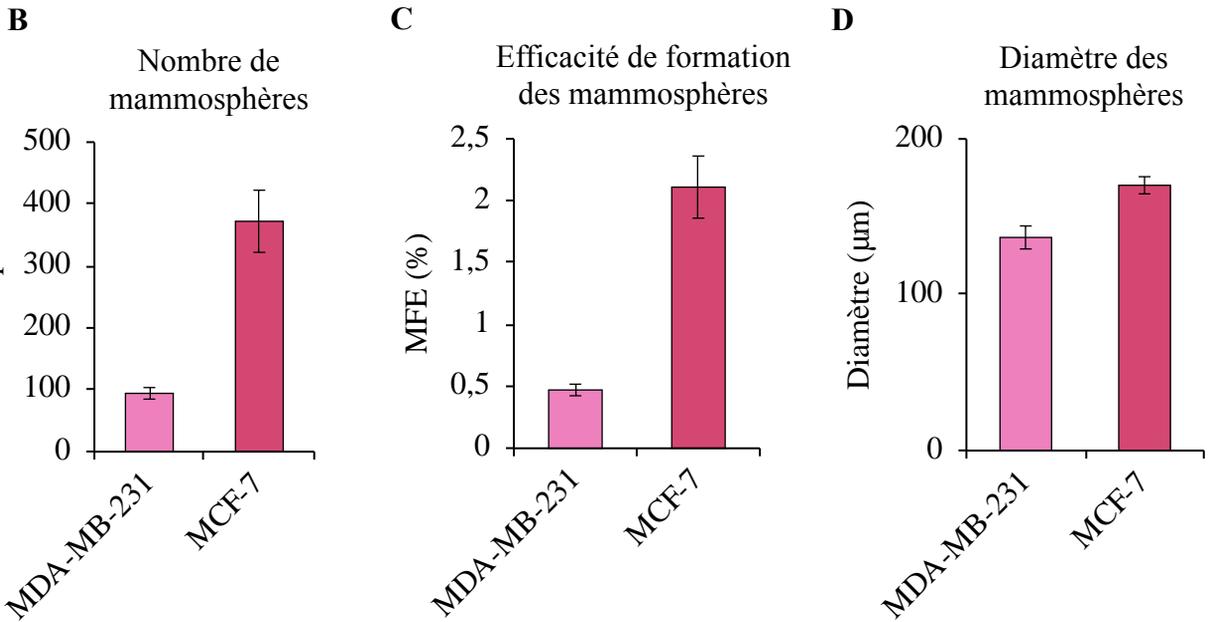
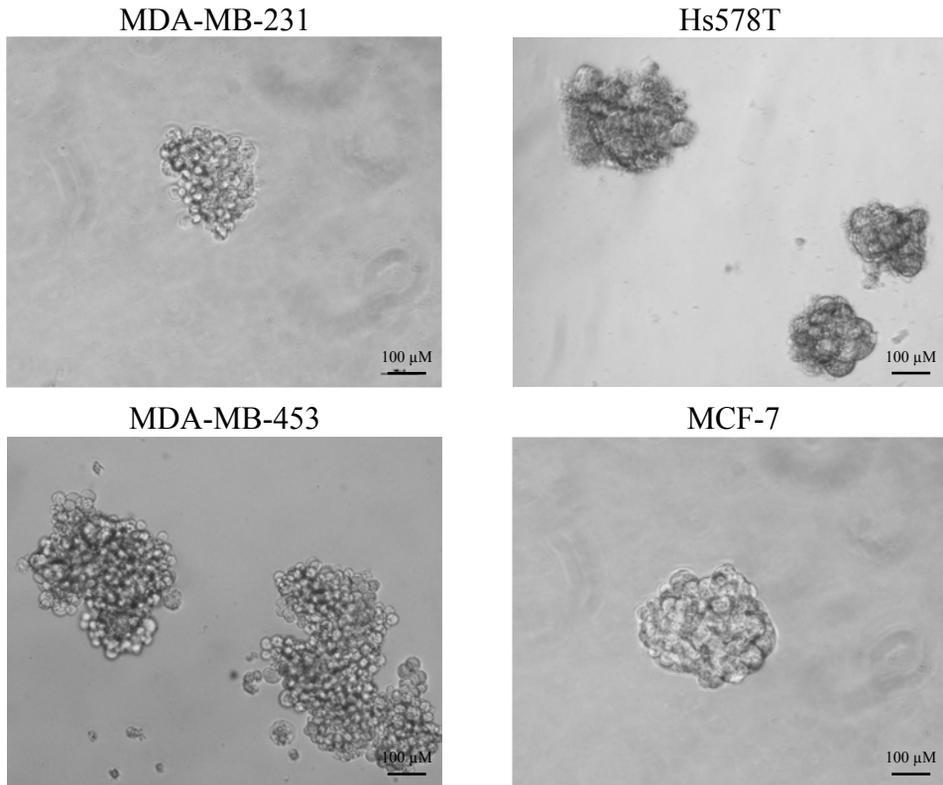
A

Figure 58: Capacité de formation de mammosphères. Les cellules MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-453 et MCF-7 ont été ensemencées en condition de culture 3D et cultivées durant 7 jours et 10 jours pour la lignée Hs578T. A. Aspect des mammosphères formées après 7 ou 10 jours (lignée Hs578T) de culture. L'échelle représente 100 µm. Les mammosphères formées ont ensuite été analysées grâce à un compteur de colonies (Gelcount™). Le nombre (B), le pourcentage d'efficacité de formation (C) et le diamètre (D) des mammosphères formées à partir des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 ont été déterminés. Les données représentent les moyennes ± l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en duplicat.

Après avoir déterminé le support, le milieu de culture, le temps de culture, le type cellulaire et la densité cellulaire adéquats, nous avons mis au point un protocole de culture cellulaire 3D à partir d'un protocole publié (Shaw *et al.*, 2012). Celui-ci est détaillé dans le paragraphe IX du matériel et méthodes. Les quatre lignées cancéreuses mammaires présentées précédemment ont été utilisées afin d'évaluer leur capacité à former des mammosphères. Le temps de culture a été défini à 7 jours pour les cellules MDA-MB-231, MDA-MB-453 et MCF-7 et à 10 jours pour les cellules Hs578T. Après 7 et 10 jours de culture respectivement, les cellules MDA-MB-231 et Hs578T forment des structures 3D assez bien définies mais relativement irrégulières. Les cellules MDA-MB-453 forment davantage d'importants amas de cellules que de structures 3D bien définies. Les cellules MCF-7 forment quant à elles des structures 3D rondes, compactes et bien délimitées (Figure 58A). Pour la suite du travail, nous avons réalisé nos expériences en utilisant les lignées MDA-MB-231 et MCF-7.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la capacité des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 à former des mammosphères après 7 jours de culture. En moyenne, 94 et 372 mammosphères sont obtenues à partir des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 respectivement (Figure 58B). A partir de la même densité cellulaire (20 000 cellules par puits), les cellules MCF-7 engendrent davantage de mammosphères que les cellules MDA-MB-231 avec un MFE de 2,11 % contre 0,47 % (Figure 58C). Le diamètre des mammosphères obtenues à partir de la lignée MCF-7 est également légèrement plus important que celui des mammosphères issues de la lignée MDA-MB-231 ($170,3 \pm 5,5 \mu\text{m}$ vs $136,8 \pm 7,4 \mu\text{m}$) (Figure 58D).

2. Détermination de l'impact d'EP13 sur les mammosphères

Par la suite, nous avons mis au point deux protocoles afin d'évaluer l'impact d'EP13 sur les mammosphères. Ils sont présentés dans la figure 38 et détaillés dans le paragraphe IX du matériel et méthodes. Le premier correspond à la détermination de la capacité des cellules à former des mammosphères après un traitement de 48 heures en conditions 2D. Pour cela les cellules sontensemencées en conditions 2D puis traitées pendant 48 heures avec EP13. A la fin du traitement les cellules sont récupérées puis réensemencées en conditions 3D durant 7 jours comme décrit précédemment. A la fin de la culture, le nombre et la taille des mammosphères sont analysés (Figure 38 Protocole 1). Le deuxième protocole permet de définir la capacité d'EP13 à affecter les mammosphères déjà formées. A cet égard, les cellules sontensemencées en conditions 3D durant 7 jours et traitées soit après 2 jours soit après 4 jours d'ensemencement. A la fin de la culture, le nombre et la taille des mammosphères sont analysés (Figure 38 Protocole 2A et B).

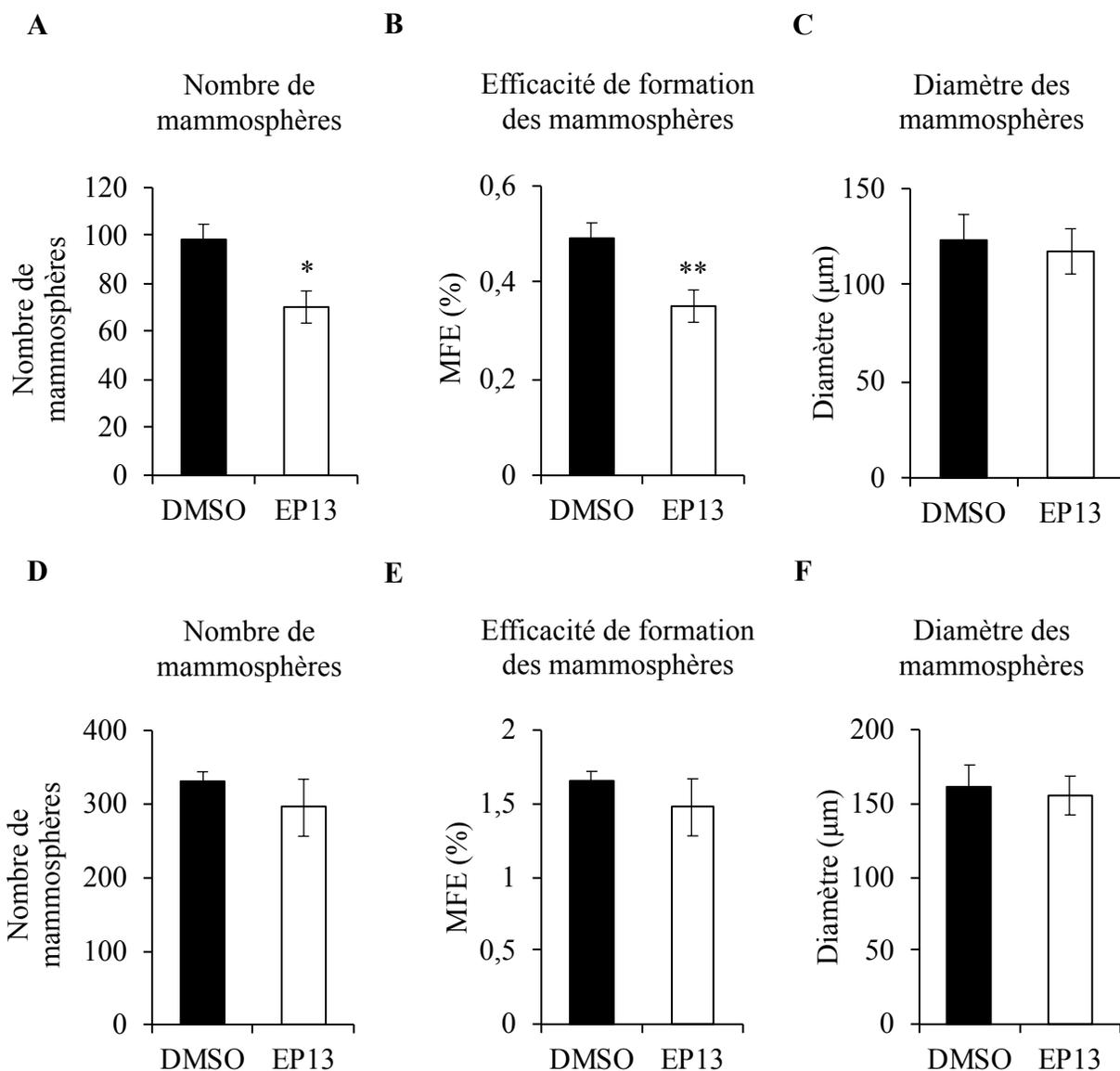


Figure 59 : Effet d'EP13 sur la capacité de formation de mammosphères

(Protocole 1). Les cellules MDA-MB-231 (A, B, C) et MCF-7 (D, E, F) ont été traitées pendant 48 h avec 6 μM d'EP13 puisensemencées en condition de culture 3D et cultivées durant 7 jours. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012 %). Après coloration au MTT, les mammosphères formées ont été analysées grâce à un compteur de colonies (Gelcount™). Le nombre (A,D), le pourcentage d'efficacité de formation (B,E) et le diamètre (C,F) des mammosphères formées à partir des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 ont été déterminés. Les données représentent les moyennes ± l'écart standard à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. *, p<0,5; **, p<0,01.

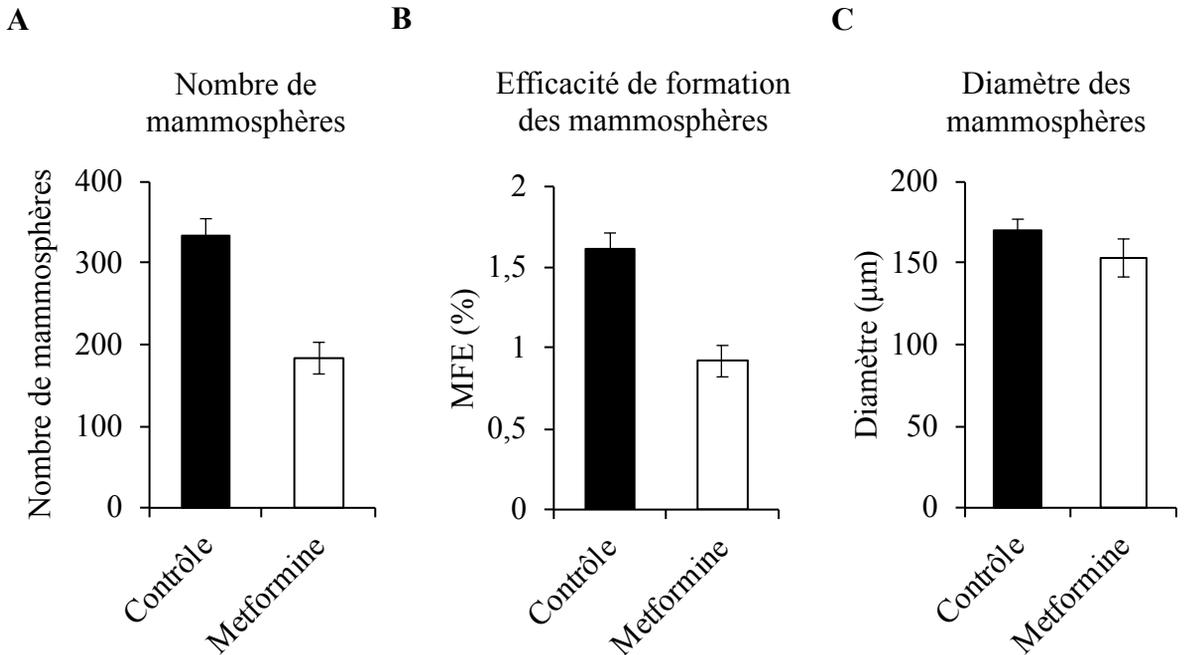


Figure 60 : Effet de la metformine sur la capacité de formation de mammosphères à partir de la lignée MCF-7 (Protocole 1). Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 48 h avec 20 mM de metformine puis ensemencées en condition de culture 3D et cultivées durant 7 jours. Après coloration au MTT, les mammosphères formées ont été analysées grâce à un compteur de colonies (Gelcount™). Le nombre (A), le pourcentage d'efficacité de formation (B) et le diamètre (C) des mammosphères formées à partir de la lignée MCF-7 ont été déterminés. Les données représentent les moyennes \pm l'écart standard à la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées en duplicat.

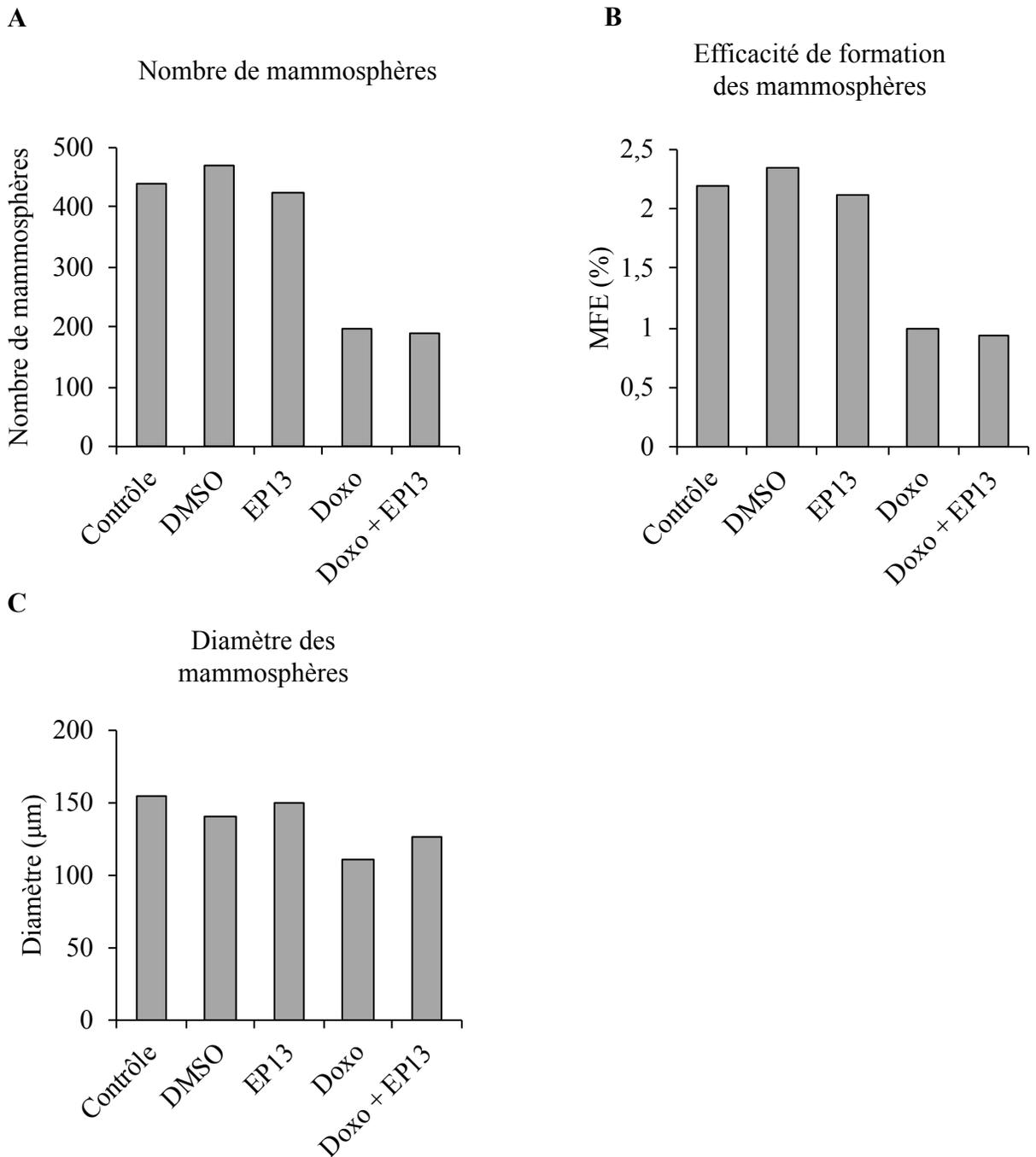


Figure 61 : Effet de la combinaison EP13 et doxorubicine sur la capacité de formation de mammosphères à partir de la lignée MCF-7 (Protocole 1). Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 48h avec 3 µM d'EP13 et/ou 155 nM de doxorubicine puis ensemencées en condition de culture 3D et cultivées durant 7 jours. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,006 %). Après coloration au MTT, les mammosphères formées ont été analysées grâce à un compteur de colonies (Gelcount™). Le nombre (A), le pourcentage d'efficacité de formation (B) et le diamètre (C) des mammosphères formées à partir de la lignée MCF-7 ont été déterminés. Les données représentent les moyennes ± l'écart standard à la moyenne d'une expérience réalisée en duplicat.

2.1 Effet d'EP13 sur la capacité des cellules à former des mammosphères

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sont traitées pendant 48 heures avec 6 μM d'EP13 puis ensemencées en conditions 3D pendant 7 jours. Les cellules MDA-MB-231 traitées avec EP13 forment moins de mammosphères que les cellules témoins traitées avec du DMSO (en moyenne 70 mammosphères contre 98) (Figure 59A). Par conséquent le MFE passe de 0,5 % à 0,35 % dans les conditions de traitement avec EP13 (Figure 59B). En revanche, le diamètre des mammosphères générées n'est pas modifié par un traitement avec EP13 (Figure 59C). Les cellules MCF-7 quant à elles forment le même nombre de mammosphères dans les conditions témoins ou de traitement avec EP13, avec un diamètre similaire (Figure 59D, E et F). EP13 semble affecter la formation des mammosphères à partir de la lignée MDA-MB-231 en induisant une diminution du nombre de mammosphères générées mais ne semble pas impacter la capacité des cellules MCF-7 à former des mammosphères.

Il a été montré que la metformine pouvait cibler la population de CSC issue d'un adénocarcinome mammaire et inhiber la croissance de mammosphères issues de cellules provenant d'un adénocarcinome mammaire (Iliopoulos *et al.*, 2011). Comme EP13 impacte également le fonctionnement de la chaîne respiratoire, nous avons voulu comparer les effets d'EP13 à ceux de la metformine sur la capacité des cellules à former des mammosphères. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 48 heures avec 20 mM de metformine (IC_{50} à 48h) puis ensemencées en conditions 3D durant 7 jours ($n=2$). Contrairement à EP13, la metformine semble affecter la formation de mammosphères à partir de la lignée MCF-7 puisqu'elle semble provoquer une diminution de presque de moitié du nombre de mammosphères formées et par conséquent une diminution du MFE (Figure 60A et B). En revanche, elle ne semble pas modifier le diamètre des mammosphères formées (Figure 60C).

Enfin, nous avons évalué l'effet d'une combinaison d'EP13 avec l'agent de chimiothérapie doxorubicine sur la capacité des cellules MCF-7 à former des mammosphères. Pour cela les cellules MCF-7 sont traitées durant 48 heures avec EP13 et la doxorubicine à une concentration équivalant à leur IC_{50} divisée par 2 soit 3 μM et 155 nM respectivement, puis ensemencées en conditions 3D durant 7 jours ($n=1$). Utilisé à 3 μM , EP13 ne semble pas affecter le nombre et le diamètre des mammosphères formées. La doxorubicine semble diminuer le nombre, le MFE ainsi que le diamètre des mammosphères formées par rapport aux conditions témoins. Lors de la combinaison, EP13 ne semble pas améliorer l'effet de la doxorubicine (Figure 61A, B et C). Ces résultats ne sont représentatifs que d'une seule expérience, il est donc nécessaire de la répéter.

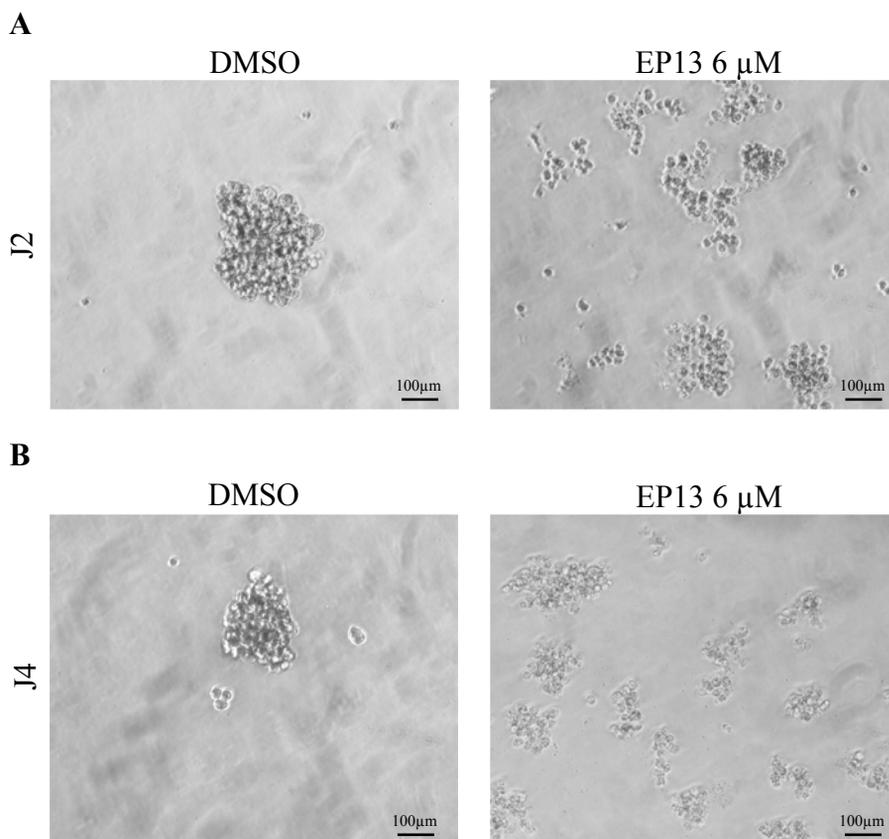


Figure 62 : EP13 affecte les mammosphères déjà formées à partir de la lignée MDA-MB-231 (Protocole 2). Les cellules MDA-MB-231 ont étéensemencées en condition de culture 3D puis traitées avec 6 μM d'EP13 après 2 ou 4 jours d'ensemencement et cultivées durant 7 jours. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012 %). A et B. Aspect des mammosphères formées après 7 jours et traitées après 2 et 4 jours d'ensemencement. L'échelle représente 100 μm.

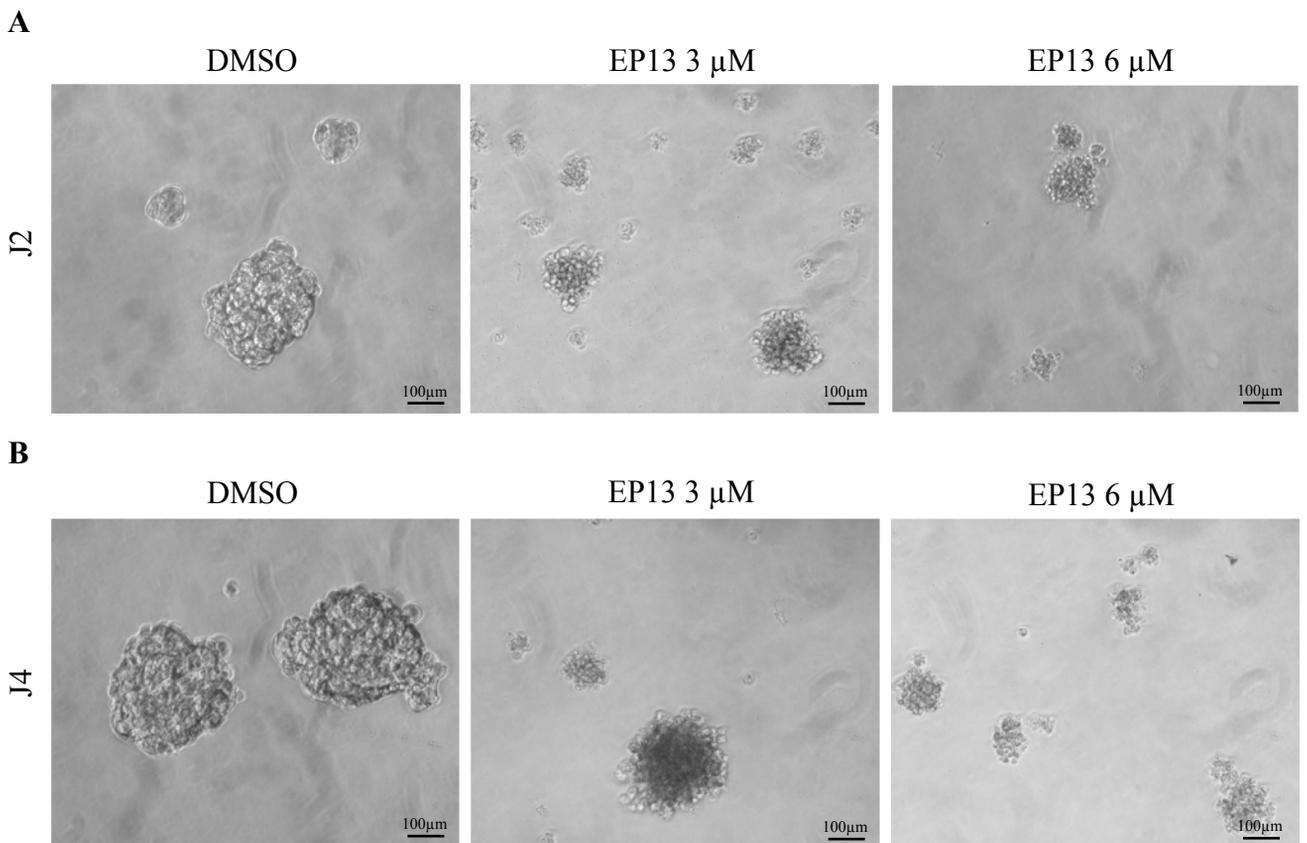


Figure 63 : EP13 affecte les mammosphères déjà formées à partir de la lignée MCF-7 (Protocole 2). Les cellules MCF-7 ont été ensemencées en condition de culture 3D puis traitées avec 3 ou 6 μM d'EP13 après 2 ou 4 jours d'ensemencement puis cultivées durant 7 jours. Les cellules témoins ont reçu du DMSO (0,012 %). A et B. Aspect des mammosphères formées après 7 jours et traitées après 2 et 4 jours d'ensemencement. L'échelle représente 100 μm.

2.2 Effet d'EP13 sur la capacité à affecter les mammosphères déjà formées

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sont ensemencées en conditions 3D durant 7 jours et traitées après 2 jours ou 4 jours avec EP13 à 3 et 6 μM . De manière inattendue, la coloration au MTT des mammosphères traitées avec EP13 ne fonctionne pas selon ce protocole habituel. Une optimisation du protocole a été tentée en augmentant la concentration de MTT, le temps d'incubation avec le MTT, cependant la coloration n'a quand même pas fonctionné. L'absence de coloration des mammosphères traitées avec EP13 ne nous a pas permis de réaliser les quantifications du nombre de sphères obtenues. Les cellules MDA-MB-231 forment des mammosphères en conditions témoins après un traitement avec du DMSO. Lorsque les mammosphères sont traitées après 2 et 4 jours d'ensemencement avec 6 μM d'EP13, elles semblent présenter un diamètre inférieur à celles cultivées en conditions témoins ainsi qu'une désintégration de leur structure (Figure 62A et B). Les cellules MCF-7 forment des mammosphères en condition témoin après un traitement avec du DMSO. Lorsque les mammosphères sont traitées après 2 et 4 jours d'ensemencement avec 3 ou 6 μM d'EP13, elles se dissocient et forment des sphères moins compactes et moins organisées par comparaison aux témoins (Figure 63A et B). EP13 semble donc altérer les mammosphères déjà formées lorsqu'il est utilisé après 2 ou 4 jours d'ensemencement à son IC_{50} et à une concentration deux fois plus faible.

Nous avons également étudié l'impact de la metformine sur les mammosphères déjà formées. Pour cela les cellules MCF-7 sont ensemencées en conditions 3D puis traitées après 2 ou 4 jours d'ensemencement avec 20 mM de metformine (n=2). Après 7 jours de culture, les mammosphères traitées avec la metformine se colorent au MTT contrairement à celles traitées avec EP13. Le nombre de mammosphères formées paraît diminuer lorsqu'elles sont traitées après 2 jours (Figure 64A) et 4 jours (Figure 64D) d'ensemencement. Elles semblent donc présenter un pourcentage d'efficacité de formation de mammosphères plus faible (Figure 64B et E). En revanche, le diamètre des mammosphères formées ne semble pas être modifié par la metformine (Figure 64C et F).

3. *Conclusion*

EP13 semble affecter non seulement la formation des mammosphères à partir des cellules MDA-MB-231, mais aussi l'organisation des mammosphères déjà formées à partir des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 malgré la difficulté de quantification. D'après les photographies, les cellules formant les mammosphères à partir de la lignée MCF-7 et MDA-MB-231 semblent se dissocier suite à un traitement par EP13. Afin de quantifier l'effet d'EP13 sur les

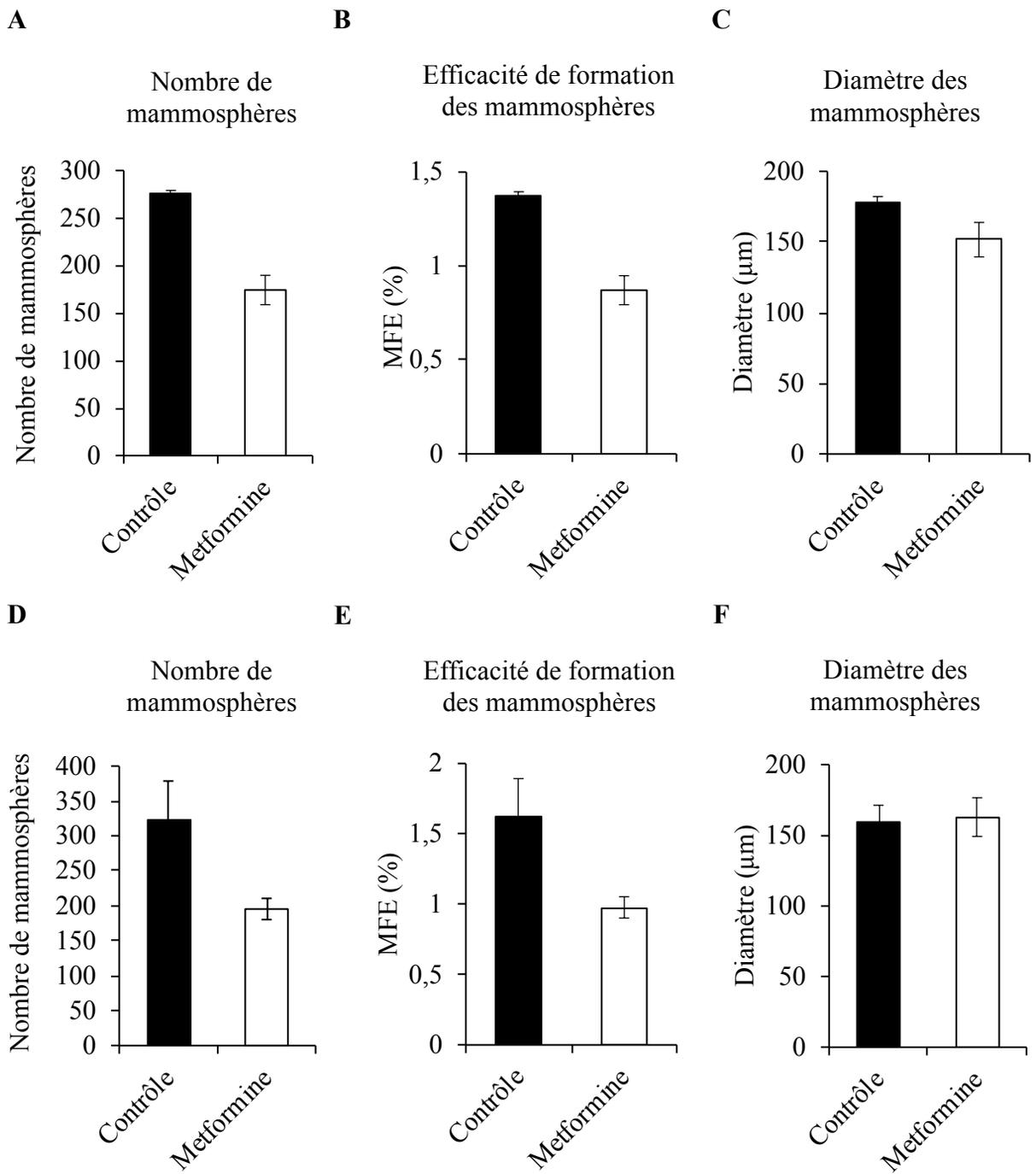


Figure 64 : La metformine semble affecter les mammosphères déjà formées à partir de la lignée MCF-7 (Protocole 2). Les cellules MCF-7 ont étéensemencées en condition de culture 3D puis traitées avec 20 mM de metformine après 2 jours (A,B et C) ou 4 jours (D,E, F) d'ensemencement puis cultivées durant 7 jours. Après coloration au MTT, les mammosphères formées ont été analysées grâce à un compteur de colonies (Gelcount™). Le nombre (A et D), le pourcentage d'efficacité de formation (B et E) et le diamètre (C et F) des mammosphères formées à partir de la lignée MCF-7 ont été déterminés. Les données représentent les moyennes ± l'écart standard à la moyenne de deux expériences indépendantes et réalisées en duplicat.

mammosphères déjà formées, il est nécessaire d'améliorer la réalisation du protocole 2. Il reste à finaliser les effets de la metformine sur les mammosphères selon les deux protocoles utilisés afin de pouvoir les comparer avec ceux obtenus avec EP13. De plus, il est intéressant d'approfondir les expériences de combinaison d'EP13 avec les agents de chimiothérapie dans le but de cibler les deux populations de cellules cancéreuses au sein des tumeurs et les comparer avec une combinaison metformine + agents de chimiothérapie.

Enfin, il reste à évaluer l'enrichissement de CSC dans les mammosphères formées à partir des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 en analysant le pourcentage de cellules CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺ par cytométrie en flux. Ensuite, il serait intéressant de déterminer si EP13 est capable d'affecter cette population de CSC au sein des mammosphères.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. INTERET POTENTIEL DES DERIVES DESOUFRES DE LA TGZ

Dans le cadre d'une étude de relation structure-activité, en collaboration avec une équipe de chimistes de l'Université de Lorraine (Laboratoire L2CM, UMR 7053), plusieurs modifications de la TGZ ont été réalisées dans le but de développer des composés plus efficaces et moins hépatotoxiques. L'ajout d'une double liaison adjacente au cycle TZD (Δ^2 -TGZ) ainsi que l'élimination de l'oxygène en position 6 du groupement chromane et l'ajout à cette position d'une chaîne alkyle hydrophobe (AB186) a permis d'augmenter l'efficacité anticancéreuse de la TGZ (Salamone *et al.*, 2012, Bordessa *et al.*, 2014). La dernière modification apportée, la suppression du soufre au niveau du cycle TZD, a permis de générer des dérivés désoufrés de la TGZ, qui de ce fait ne sont plus des TZD mais des pyrrolidinediones. Nous avons montré que ces composés possèdent tous une activité anticancéreuse puisqu'ils entraînent une diminution du nombre de cellules dans les quatre lignées cancéreuses mammaires utilisées appartenant à des sous-types de cancer du sein différents. Leur activité anticancéreuse est donc indépendante du sous-type de tumeur mammaire. Ces données corroborent les résultats obtenus par Saha et son équipe montrant que les formes désoufrées de la TGZ, de la PGZ et de la RGZ présentent toujours une activité anticancéreuse dans la lignée cancéreuse hépatique Huh-7 (Saha *et al.*, 2012).

La forme désoufrée de la TGZ, DD216, a une activité anticancéreuse plus élevée que la TGZ dans les différentes lignées cancéreuses mammaires, à l'exception de la lignée MDA-MB-231. En ce qui concerne la Δ^2 -TGZ qui possède une double liaison adjacente au cycle TZD, son dérivé désoufré OP136 présente aussi une activité accrue. Enfin, pour le dérivé AB186 qui comporte, en plus de la double liaison, le remplacement de l'oxygène en position 6 du groupement chromane par une chaîne alkyle hydrophobe, son dérivé désoufré EP13 est celui qui présente l'activité anticancéreuse la plus forte (1,4 et 1,6 fois plus actif que AB186 dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement). Chacune de ces modifications améliore l'efficacité anticancéreuse des TZD et leur association (insaturation, retrait de l'oxygène, chaîne alkyle, retrait du soufre) présente des effets synergiques (Bordessa *et al.*, 2014; Dupommier *et al.*, 2019 soumis).

L'absence de soufre au niveau du cycle TZD permet d'améliorer nettement l'activité anticancéreuse des composés dans les quatre lignées cancéreuses mammaires. Nos résultats sont partiellement en accord avec ceux obtenus par Saha *et al.* En effet, ces auteurs rapportent que le composé TSN correspondant à une forme désoufrée de la TGZ conserve une action anticancéreuse mais celle-ci n'est pas plus élevée que celle de la TGZ. En revanche, ces auteurs

rappellent que le dérivé désoufré de la RGZ présente une meilleure activité anticancéreuse que son composé parent dans la lignée cancéreuse hépatique Huh-7 (Saha *et al.*, 2012). De plus, des TZD analogues, dont la structure chimique ne diffère que par un atome (soufre ou oxygène), présentent des effets différents sur des cellules cancéreuses hépatiques Huh7 : l'analogue possédant l'atome de soufre présente une forte activité anticancéreuse alors que les cellules Huh7 ne sont pas sensibles à l'analogue possédant l'atome d'oxygène (Ozen *et al.*, 2017).

Dans la perspective d'une utilisation clinique, il sera primordial de déterminer la toxicité d'EP13, notamment son hépatotoxicité. Les modifications apportées à la TGZ ont permis jusqu'à présent de diminuer la toxicité hépatique. En effet, sur des hépatocytes humains en culture primaire, à une concentration identique de 100 μ M, la TGZ affecte davantage la viabilité cellulaire que la Δ 2-TGZ ou AB186 (48%, 37% et 27% respectivement). Cela pourrait s'expliquer par l'absence de l'atome d'oxygène en position 6 du groupement chromane empêchant la formation de dérivés toxiques de type quinone (Bordessa *et al.*, 2014). Saha *et al.* ont montré que les dérivés désoufrés TSN, PSN et RSN présentaient une toxicité hépatique moindre que leur composé parents TGZ, PGZ et RGZ respectivement (Saha *et al.*, 2010b, 2012). Une étude plus récente montre également que des composés ayant un cycle pyrrolidinedione n'affectent que très légèrement la viabilité des cellules HepG2 par rapport à la TGZ (Keil *et al.*, 2015). Ainsi, comme l'a suggéré l'équipe de Saha, l'atome de soufre du cycle TZD est impliqué dans la toxicité hépatique (Saha *et al.*, 2010b). Au vu de ces résultats, EP13, devrait avoir une toxicité hépatique plus faible qu'AB186 ou que le composé TSN. Les causes de la toxicité hépatique des TZD restent cependant difficiles à expliciter. En effet, la PGZ et la RGZ ne semblent pas être hépatotoxiques malgré la présence de l'atome de soufre dans le cycle TZD (Rachek *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2010).

La TGZ induit un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1, comme cela a été démontré au laboratoire avec la Δ 2-TGZ (Berthe *et al.*, 2016). En revanche, EP13 provoque l'apoptose des cellules MDA-MB-231. L'équipe de Saha a également observé une induction d'apoptose (par augmentation de l'activité de la caspase 3) par la TSN (Saha *et al.*, 2012). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'induction de l'apoptose est due à l'absence de soufre au niveau du cycle TZD. Toutefois, contrairement à EP13, les dérivés désoufrés DD216 et OP136 n'induisent pas l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (données non montrées). La suppression de l'atome de soufre au niveau du cycle TZD n'est donc pas une modification suffisante pour aboutir à ce changement d'activité qui résulterait plutôt de l'ensemble des modifications chimiques apportées pour obtenir le composé EP13. Les métabolites d'EP13

pourraient différer de ceux de la TGZ. Cela pourrait être à l'origine d'effets anticancéreux différents.

II. EP13 PERTURBE LE METABOLISME ENERGETIQUE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que la TGZ, la Δ^2 -TGZ et leurs dérivés désoufrés, altèrent la respiration mitochondriale des cellules cancéreuses mammaires. Cette atteinte de la respiration mitochondriale correspond donc à un mécanisme d'action commun à la TGZ et ses dérivés. Cependant, ces différents composés présentent une action anticancéreuse d'intensité variable. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le niveau d'inhibition de la respiration mitochondriale et l'efficacité anti-cancéreuse. Toutefois, EP13 qui présente la plus forte activité anti-proliférative est également le composé qui affecte le plus fortement la respiration mitochondriale.

1. Quel est le mécanisme d'action d'EP13 ?

Nous avons montré qu'EP13 impacte la respiration mitochondriale dans les 3 lignées cancéreuses mammaires étudiées. Cela est associé à une augmentation de la production d'ERO dans les cellules MDA-MB-231. L'altération de la respiration mitochondriale est accompagnée secondairement d'une stimulation de l'activité glycolytique en vue de maintenir la synthèse d'ATP.

Ces résultats sont cohérents avec de précédentes données obtenues pour d'autres TZD. En effet, Gottfried *et al.* ont montré que la PGZ diminue la consommation d'oxygène des cellules cancéreuses de la prostate LNCaP et PC3 et stimule la production de lactate (Gottfried *et al.*, 2011). De même, la TZG inhibe la respiration mitochondriale, induit une augmentation de la production d'ERO et stimule la glycolyse dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 et les cellules cancéreuses mammaires T47D (Moon *et al.*, 2016). L'ensemble de ces données sous-entendent que malgré les différentes modifications apportées à EP13, celui-ci garde les mêmes effets que la TGZ et d'autres TZD suggérant un mécanisme commun. Celui-ci pourrait résulter de l'atteinte d'une cible identique au sein de la mitochondrie.

En réponse à EP13 une baisse de la respiration mitochondriale basale et maximale est observée. Par conséquent la capacité de réserve est moins importante, ne permettant pas à la chaîne respiratoire de répondre à la forte demande induite par l'ajout de l'agent découplant FCCP. De surcroît, EP13 induit une diminution de l'efficacité de couplage se traduisant par un découplage de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP dans les cellules MDA-MB-231 et

Hs578T. Ce découplage induirait une augmentation de la perméabilité de la membrane interne aux protons, à l'origine d'une fuite de protons, et serait associé une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, $\Delta\Psi_m$ (Kadenbach, 2003). Ainsi, nous pourrions potentiellement observer une diminution du $\Delta\Psi_m$ en réponse à EP13. Dans une expérience préliminaire, nous avons évalué le potentiel de membrane mitochondrial des cellules MDA-MB-231 par cytométrie en flux en utilisant la sonde JC-1. Les premiers résultats montrent qu'après 6 heures de traitement, EP13 diminue le pourcentage de cellules qui présentent un fort $\Delta\Psi_m$. Ces résultats, qui doivent être validés avec des expériences complémentaires, seraient en accord avec le découplage mitochondrial induit par EP13, mais également avec les données de la littérature concernant la TGZ. En effet, Friday *et al.* ont observé une rapide chute du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 traitées avec la TGZ (Friday *et al.*, 2011). Ce composé induit également une diminution du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules T47D et HCT116 (Moon *et al.*, 2016).

Par ailleurs, la TGZ induit une augmentation de la transcription du gène codant PGC1- α , co-activateur transcriptionnel impliqué dans la biogenèse mitochondriale, dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et LCC9 (Skildum *et al.*, 2011). De plus, la PGZ permet d'augmenter le contenu en ADN mitochondrial et l'expression de sous-unités protéiques appartenant aux complexes de la chaîne respiratoire (Ghosh *et al.*, 2007). L'altération mitochondriale induite par EP13 pourrait être liée à une stimulation de la biogenèse mitochondriale. En effet, la biogenèse mitochondriale est stimulée en réponse à un stress environnemental comme une demande énergétique afin de permettre à la cellule de répondre aux besoins énergétiques (Lin *et al.*, 2005; Scarpulla, 2011). Ce processus est principalement régulé par PGC1- α . Ce dernier active des facteurs de transcription régulant la biogenèse mitochondriale comme NRF1, contrôlant l'expression de gènes codant les complexes de la chaîne respiratoire, puis TFAM (Scarpulla, 2002, 2011). Une étude récente a montré que la metformine stimule la biogenèse mitochondriale dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP via l'augmentation de l'expression de NRF1, TFAM et d'une protéine appartenant au complexe I de la chaîne respiratoire. Une augmentation du contenu en ADNmt et de la masse mitochondriale est également observée en réponse à la metformine. Ce processus pourrait permettre de préserver la capacité mitochondriale (Loubiere *et al.*, 2017). Il serait donc intéressant d'étudier, en réponse à EP13, l'expression protéique de ces différents acteurs de la biogenèse mitochondriale ainsi que la masse mitochondriale par cytométrie en flux en utilisant la sonde mitotracker green. Des expériences préliminaires semblent montrer une augmentation

d'expression de TFAM et du contenu en ADNmt suite à un traitement avec EP13. Cependant, il ne semble pas induire de variation d'expression des protéines des différents complexes de la chaîne respiratoire. Des expériences supplémentaires sont nécessaires. Une autre hypothèse serait que la diminution du taux de consommation d'oxygène des cellules cancéreuses mammaires exposées à EP13 soit la conséquence d'une diminution du nombre de mitochondries.

Par ailleurs, la capacité des mitochondries à moduler leur morphologie en fonction des besoins énergétiques est un autre mécanisme de régulation permettant aux cellules de s'adapter à un stress énergétique. Nous pourrions aussi étudier le réseau mitochondrial des cellules cancéreuses mammaires traitées avec EP13.

2. *Quelles sont les cibles mitochondriales d'EP13 ?*

Nos résultats indiquent qu'EP13 impacte le fonctionnement mitochondrial. Nous pouvons donc suggérer que ce composé possède une ou des cibles au sein de la mitochondrie. D'autant plus que plusieurs cibles mitochondriales des TZD ont déjà été décrites.

L'altération de la respiration mitochondriale est observée dès 4 heures de traitement. EP13 a donc un effet rapide, ce qui pourrait suggérer que la chaîne respiratoire en est une cible directe. De plus, EP13 induit une augmentation de la production d'ERO dans les cellules MDA-MB-231 après 4 heures de traitement également. La production d'ERO au sein de la mitochondrie provient généralement de la phosphorylation oxydative au cours de laquelle des électrons peuvent fuir du complexe I majoritairement et réagir avec une molécule d'oxygène (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006). L'augmentation de la production d'ERO peut résulter d'un défaut d'assemblage ou d'activité du complexe I (Papa *et al.*, 2012). Ainsi une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire par EP13 pourrait être à l'origine de la perturbation de la respiration mitochondriale et de la génération d'ERO.

Il a été montré que les TZD telles que la TGZ, la PGZ et la RGZ inhibent l'activité du complexe I dans les tissus sains (hépatiques et musculaires) de souris (Brunmair *et al.*, 2004). Dans les cellules de gliomes de rat, les TZD (RGZ, PGZ et CGZ) sont également à l'origine d'une inhibition du complexe I associée à une production d'ERO et une dépolarisation mitochondriale (Pérez-Ortiz *et al.*, 2004, 2007). Nos expériences préliminaires de mesure de la consommation d'oxygène réalisées sur des mitochondries isolées de foies de souris mises en contact avec EP13 semblent conforter l'hypothèse selon laquelle EP13 pourrait également inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire. Celle-ci est renforcée par des données sur la metformine, dont le

mécanisme d'action repose aussi sur l'inhibition du complexe I, qui induit les mêmes effets qu'EP13. Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, elle induit une diminution de la respiration basale, un découplage mitochondrial ainsi qu'une stimulation de l'activité glycolytique (Andrzejewski *et al.*, 2014).

De surcroît, Garcia-Ruiz *et al.* ont observé qu' *in vitro* et *in vivo*, la PGZ est capable de se fixer sur des sous-unités du complexe I et d'induire son désassemblage conduisant à une baisse de son activité (García-Ruiz *et al.*, 2013). EP13 pourrait donc altérer la respiration mitochondriale en se fixant directement au complexe I de la chaîne respiratoire. Par ailleurs, les TZD affectent également l'activité des autres complexes de la chaîne respiratoire (Nadanaciva *et al.*, 2007; Sanz *et al.*, 2011; García-Ruiz *et al.*, 2013). Ces cibles ne sont donc pas à exclure pour EP13.

Une autre cible mitochondriale des TZD a été mise en avant, le transporteur de pyruvate MPC (Colca *et al.*, 2013a). Divakaruni *et al.* ont montré que les TZD, en inhibant MPC dans des cellules musculaires, induisent une diminution de la respiration mitochondriale et une augmentation de l'entrée de glucose dans ces cellules (Divakaruni *et al.*, 2013). Ce phénomène peut provenir d'une diminution des substrats nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire, le NADH (complexe I) et le FADH₂ (complexe II), due à l'absence d'apport de pyruvate dans la mitochondrie. Une inhibition de MPC par EP13, empêcherait l'entrée de pyruvate dans la mitochondrie ainsi que la génération des cofacteurs NADH et FADH₂ entraînant la baisse du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Toutefois, dans nos expériences préliminaires, malgré la présence de substrats nécessaires au fonctionnement du complexe I, EP13 empêche toujours la consommation d'oxygène de mitochondries isolées.

Par ailleurs, Divakaruni *et al.* ont également observé que les effets des TZD sur l'activité mitochondriale sont inhibés suite à l'ajout d'un dérivé du pyruvate, le méthyl pyruvate, qui traverse librement la membrane interne mitochondriale sans utiliser le transporteur MPC (Divakaruni *et al.*, 2013). Nous avons montré que le méthyl pyruvate ne permettait pas de contrecarrer l'effet d'EP13 sur la diminution du nombre de cellules, suggérant que son effet antiprolifératif ne dépend pas d'une inhibition de MPC. Cependant, même s'il n'intervient pas dans l'effet d'EP13, ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que ce transporteur n'est pas une cible d'EP13. Pour cela il serait nécessaire d'étudier la consommation d'oxygène des cellules traitées avec EP13 en présence de méthyl pyruvate.

3. Existe-t-il un lien entre l'altération du métabolisme énergétique et l'induction d'apoptose par EP13 ?

Il reste à déterminer s'il existe une corrélation entre l'altération du fonctionnement mitochondrial et la modification du métabolisme énergétique de manière globale et l'induction de l'apoptose par EP13.

Une stratégie serait d'inhiber la traduction protéique mitochondriale avec la tigécycline conduisant à un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative et d'évaluer l'activité pro-apoptotique d'EP13. Nos expériences préliminaires ne nous ont pas permis de conclure car nous n'avons pas pu confirmer que la tigécycline était fonctionnelle dans les cellules MDA-MB-231.

La production d'ERO pourrait contribuer à l'effet pro-apoptotique d'EP13. Nous avons observé une augmentation de la production d'ERO dans les cellules MDA-MB-231 après 4 heures de traitement avec EP13 et l'induction d'apoptose à 48 et 72 heures. Une production élevée et maintenue d'ERO provoque un stress oxydant pouvant aboutir à la mort cellulaire par apoptose (Dröge, 2002). Ainsi, pour déterminer si la production d'ERO se prolonge dans le temps, nous pourrions envisager de mesurer la production d'ERO à des temps plus tardifs à 48 ou 72 heures (temps auxquels est détecté le déclenchement de l'apoptose). Toutefois, afin de définir l'importance des ERO dans la mort cellulaire par apoptose induite par EP13 dans les cellules MDA-MB-231, nous avons étudié la diminution du nombre de cellules MDA-MB-231 ainsi que leur répartition dans le cycle cellulaire suite à un traitement avec EP13 et en présence de l'antioxydant N-acétyl-cystéine (NAC). Nos résultats montrent que l'ajout d'antioxydant ne modifie pas l'effet d'EP13 sur les cellules MDA-MB-231. Ainsi l'augmentation de la production d'ERO par EP13 ne semble pas être impliquée dans son action pro-apoptotique.

Comme la TGZ, EP13 pourrait induire une variation du $\Delta\Psi_m$ (Friday *et al.*, 2011; Moon *et al.*, 2016). La perte du $\Delta\Psi_m$ pourrait constituer une étape précoce de l'induction d'apoptose. Il peut conduire à la déstabilisation de la membrane mitochondriale interne, permettant la libération de facteurs pro-apoptotiques de la matrice mitochondriale vers le cytoplasme comme le cytochrome c (Zamzami *et al.*, 1995). Toutefois ces données sont contestées et la chute du $\Delta\Psi_m$ pourrait ne pas constituer un évènement précoce du processus d'apoptose (Ly *et al.*, 2003). Nous pourrions cependant évaluer le relargage de cytochrome c en analysant par western blot l'expression de ce facteur dans la fraction mitochondriale et la fraction cytoplasmique de cellules cancéreuses mammaires traitées avec EP13.

Nos travaux ont porté sur l'action d'EP13 sur le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses mammaires mais nous ne pouvons pas exclure qu'EP13 impacte d'autres processus cellulaires ou active d'autres voies intracellulaires pouvant être associés à l'induction d'apoptose.

Précédemment au laboratoire, il a été montré que la TGZ et la $\Delta 2$ -TGZ induisent une augmentation très précoce du calcium intracellulaire, à l'origine de la phosphorylation de ERK 1/2 qui conduit à l'expression d'EGR1 (Chbicheb *et al.*, 2011). Or une augmentation de calcium cytosolique peut être suivie d'une augmentation de calcium au sein de la matrice mitochondriale. Ce phénomène est capable d'affecter le fonctionnement de la mitochondrie à divers niveaux (Pinton *et al.*, 2008; Osellame *et al.*, 2012; Bhosale *et al.*, 2015). Par exemple, cela peut induire l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) qui pourrait expliquer la chute du potentiel mitochondrial (Hurst *et al.*, 2017). L'augmentation de calcium dans la matrice mitochondriale régule également la mort cellulaire par apoptose (Pinton *et al.*, 2008). Il serait donc intéressant de déterminer si EP13 peut également être à l'origine d'une augmentation de calcium intracellulaire. Une étude cinétique permettrait de savoir si l'amplitude de cette augmentation et son maintien dans le temps sont différentes de celles de la TGZ et de la $\Delta 2$ -TGZ. Afin de savoir s'il existe un lien entre l'augmentation de calcium cytosolique et l'atteinte mitochondriale, nous pourrions mesurer la consommation en oxygène dans des cellules cancéreuses mammaires où les effets de l'augmentation de calcium seraient annihilés par un chélateur comme le BAPTA. Plus largement, il serait intéressant de déterminer si le ciblage calcique (canaux, pompes calciques) interfère avec la réponse apoptotique des cellules à EP13.

III. UNE POTENTIELLE UTILISATION THERAPEUTIQUE D'EP13 ?

Malgré les modifications structurales apportées au composé EP13, on ne peut pas exclure que son action mitochondriale puisse être associée à une toxicité envers les cellules saines notamment une hépatotoxicité puisque le foie est un organe riche en mitochondries. Néanmoins, la metformine est utilisée pour le traitement du diabète de type II, ce qui pourrait justifier le fait de cibler la phosphorylation oxydative ou la mitochondrie à des fins cliniques avec des effets secondaires acceptables. Pourtant, comme décrit dans le paragraphe II.2.6 de l'introduction, beaucoup de composés ciblant la mitochondrie (mitocans) ont été testés pour leur activité anticancéreuse en conditions *in vitro* et *in vivo* et ont montré des résultats encourageants mais très peu ont fait l'objet d'études cliniques (Ralph *et al.*, 2006; Neuzil *et al.*, 2013). La

metformine et IAC-010759, deux inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire ainsi que le trioxyde d'arsenic, inhibiteur du complexe III, font partie de cette famille de composés évalués en essais cliniques ou utilisés actuellement chez les patients comme agents anticancéreux (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017; Molina *et al.*, 2018). Cependant la plupart de ces composés dont le mode d'action repose sur le ciblage mitochondrial présentent des limitations pharmacologiques (toxicité et manque d'efficacité) peu favorables à leur utilisation en thérapie anticancéreuse (Molina *et al.*, 2018). Néanmoins, le composé CPI-613[®] ciblant la PDH et l' α -cétoglutarate déshydrogénase, deux enzymes appartenant au cycle de Krebs, est actuellement testé en essais cliniques de phase III chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe récidivant et réfractaire (essais cliniques NCT03504410, 2018-001588-22). La FDA et l'agence européenne des médicaments ont octroyé à ce composé la désignation de médicament orphelin pour la leucémie myéloïde aigüe et le cancer du pancréas (Rafaelpharma). Nous ne pouvons donc pas exclure un intérêt pour EP13.

Une stratégie thérapeutique envisageable serait d'utiliser EP13 en thérapie combinatoire ou adjuvante avec des agents anticancéreux conventionnels. Tout d'abord, cette stratégie permettrait de diminuer les concentrations d'EP13, dans le but de réduire le seuil de toxicité pour les cellules saines. D'autre part, les modifications du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses peuvent être associées à une sensibilisation aux traitements anticancéreux (Zhao *et al.*, 2013; Marchetti *et al.*, 2015). Des études ont démontré que des agents ciblant le métabolisme énergétique tels que le 2-DG et la metformine sont capables de potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie (Aft and Zhang, 2009; Iliopoulos *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2011). De surcroît, de nombreux travaux ont montré que l'utilisation des TZD en thérapie combinatoire améliore l'efficacité des agents anticancéreux dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Fröhlich and Wahl, 2015). Précédemment au laboratoire, il a été démontré que la Δ 2-TGZ améliore l'effet de la doxorubicine sur les cellules MDA-MB-231 (Thèse d'Audrey Berthe, 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'EP13 pouvait être un candidat potentiel pour potentialiser l'action d'agents de chimiothérapie. Nous avons donc utilisé EP13 en combinaison avec la doxorubicine et le 5-FU selon différents protocoles de traitement. Cependant ces expériences de cotraitement avec la chimiothérapie donnent des résultats peu encourageants. Seule l'association d'EP13 à faible concentration avec les agents de chimiothérapie suivant le protocole B (prétraitement EP13 24 h puis co-traitement 48h) et le protocole A (co-traitement 72 h) pour le 5-FU montre des effets additifs voire synergiques. Autrement, des effets

antagonistes sont observés. Ces résultats restent préliminaires, il faudrait caractériser de manière plus approfondie l'effet de ces combinaisons pour comprendre les différences de réponse observées en fonction du protocole utilisé.

La séquence d'administration des composés semble moduler la réponse cellulaire aux thérapies combinatoires. Reddy et son équipe ont montré que la TGZ potentialise l'effet du cisplatine et du paclitaxel dans les cellules cancéreuses pulmonaires A549 et H522, lorsque ces deux agents de chimiothérapie sont administrés avant la TGZ. Inversement, un effet antagoniste est observé lorsque la TGZ précède l'administration des agents de chimiothérapie (Reddy *et al.*, 2008). Il pourrait donc être intéressant de modifier la séquence de traitement et déterminer si une autre séquence offrirait des effets synergiques.

La doxorubicine est un agent qui s'intercale dans l'ADN bloquant ainsi sa réplication et inhibe la topoisomérase II. Le 5-FU est un anti-métabolite altérant la synthèse d'ADN et d'ARN (Minotti *et al.*, 2004; Lansiaux, 2011). Ces deux agents de chimiothérapie ciblent les cellules en prolifération. Nos résultats indiquent qu'à 6 μM , EP13 induit une augmentation du pourcentage de cellules MDA-MB-231 dans le compartiment sub-G1 accompagnée d'une diminution du pourcentage de cellules dans les autres phases du cycle cellulaire. Bien qu'en combinaison EP13 soit utilisé à 1 et 3 μM , il pourrait également diminuer le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, y compris les cellules en cours de synthèse d'ADN, limitant ainsi l'effet de la doxorubicine et du 5-FU.

Par ailleurs, nous pourrions également envisager l'hypothèse selon laquelle les effets additifs et antagonistes observés pourraient être dus à un mécanisme d'action commun ou une cible commune des deux composés. La doxorubicine conduit également à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et semble affecter l'activité du complexe I dans les cellules MCF-7 (Kuznetsov *et al.*, 2011; Meredith and Dass, 2016). Nos résultats démontrent qu'EP13 altère le fonctionnement mitochondrial, potentiellement par une inhibition du complexe I. Ces deux composés pourraient entrer en compétition pour cette action mitochondriale menant ainsi à des effets additifs ou antagonistes. En accord avec cette hypothèse, la metformine qui est un agent ciblant la respiration mitochondriale par son inhibition du complexe I n'augmente pas la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-468 à la doxorubicine et cette combinaison présente même un effet antagoniste (Soo *et al.*, 2015). Cependant un traitement combinatoire alliant la RGZ ou la CGZ, inhibant également le complexe I de la chaîne respiratoire, et la doxorubicine, présente un effet synergique sur la baisse de viabilité des cellules cancéreuses mammaires (Arif *et al.*, 2013). De plus, Zhao *et al.*, ont montré que le 5-

FU induit une hausse de l'activité glycolytique des cellules cancéreuses pulmonaires A549, avec une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate (Zhao *et al.*, 2014). L'altération de la respiration mitochondriale induite par EP13 est compensée par une stimulation de l'activité glycolytique. Ces composés stimulent tous les deux la glycolyse, ce qui peut limiter leur action anticancéreuse aboutissant à un effet additif voire antagoniste.

En revanche, le cisplatine réduit l'activité glycolytique et sa combinaison avec le 5-FU a des effets synergiques sur la diminution de la viabilité des cellules A549 (Zhao *et al.*, 2014). Le trastuzumab inhibe également l'activité glycolytique des cellules cancéreuses mammaires HER2 positives et offre des effets synergiques sur la croissance de cellules cancéreuses mammaires lorsqu'il est combiné à la TGZ (Yang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2011). EP13 pourrait potentiellement augmenter l'action d'autres agents anticancéreux ciblant la glycolyse comme le cisplatine ou le trastuzumab.

En accord avec cette dernière hypothèse, nos résultats de combinaison les plus intéressants résultent de l'association d'EP13 avec l'inhibiteur de la glycolyse, 2-DG. Ce double blocage métabolique entraîne un effet synergique sur la diminution du nombre de cellules. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature montrant que l'association du 2-DG et de la metformine affiche des effets synergiques dans les tumeurs mammaires en conditions *in vitro* et *in vivo* (Cheong *et al.*, 2011; Wokoun *et al.*, 2017). L'utilisation du DCA associé à la metformine induit de façon synergique l'apoptose des cellules cancéreuses ovariennes et une diminution de la croissance de tumeurs xénotreffées (Li and Shao, 2016). Toutefois, le 2-DG est un composé présentant des effets secondaires (fatigue, maux de tête, hypoglycémie et arythmie cardiaque) qui limitent son utilisation clinique (Dwarakanath and Jain, 2009; Raez *et al.*, 2013). Le DCA est toujours en évaluation clinique mais il est également à l'origine d'effets secondaires chez des patients (nausées, fatigue, vomissements) (Chu *et al.*, 2015). Nous pourrions imaginer utiliser EP13 avec d'autres agents ciblant la glycolyse et avec de meilleures perspectives pour une utilisation en clinique. Cette approche thérapeutique, appelée létalité synthétique, a pour but de cibler deux voies interagissant pour contribuer à un processus cellulaire essentiel. Par exemple, induire un double blocage du métabolisme énergétique par la combinaison de composés ciblant les deux voies majeures du métabolisme énergétique. Cependant cela sous-entend potentiellement bloquer les voies du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses et des cellules saines, ce qui serait susceptible d'entraîner des effets secondaires.

IV. EP13 PEUT-IL CIBLER LA POPULATION DE CSC ?

Une autre interrogation concernant EP13 est de savoir si une population de cellules cancéreuses pourrait être plus sensible à son mécanisme d'action de ciblage mitochondrial. Est-il envisageable que ce composé affecte la sous-population de CSC qui est persistante et impliquée dans le développement de métastases et des récives (Marjanovic *et al.*, 2013)? En effet, les CSC ont un métabolisme énergétique adaptatif mais dépendent fortement de la respiration mitochondriale et présentent une activité glycolytique moins forte (Lagadinou *et al.*, 2013; Vlashi *et al.*, 2014; De Luca *et al.*, 2015; Lamb *et al.*, 2015). De plus, la fonction mitochondriale est importante pour le phénotype de CSC (Sancho *et al.*, 2016). C'est pourquoi à l'heure actuelle, une des pistes thérapeutiques pour éliminer cette petite population de CSC est de cibler la fonction mitochondriale. Par exemple, la metformine est capable de cibler la population de CSC dans différents types de tumeurs comme les tumeurs mammaires, prostatiques, pancréatiques ou colorectales (Hirsch *et al.*, 2009; Iliopoulos *et al.*, 2011; Lonardo *et al.*, 2013; Sancho *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018). Un autre composé, l'atovaquone, inhibant le complexe III de la chaîne respiratoire de cellules MCF-7 est capable de diminuer la formation de mammosphères et d'inhiber la population de CSC CD44⁺/CD24⁻ dérivant de cette lignée (Fiorillo *et al.*, 2016). Lamb *et al.* ont mis en évidence que des agents antibiotiques de différentes classes, inhibant la biogenèse mitochondriale, induisent une diminution du nombre de sphères formées à partir de différents types de lignées cancéreuses (Lamb *et al.*, 2015). Comme EP13 semble avoir un mécanisme d'action proche de la metformine sur le métabolisme énergétique, nous pourrions imaginer qu'EP13 puisse également cibler la population de CSC. De surcroît, certaines TZD sont capables de cibler cette population de CSC. Prost *et al.* ont montré que la PGZ est capable de cibler la population de CSC de leucémie myéloïde chronique (Prost *et al.*, 2015). La RGZ est également capable de cibler la population de CSC d'ostéosarcomes (Basu-Roy *et al.*, 2016).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis au point un protocole permettant de former des mammosphères à partir de lignées de cellules cancéreuses mammaires. D'après les conditions de culture utilisées, cette technique est décrite dans la littérature comme favorisant un enrichissement en CSC (Fillmore and Kuperwasser, 2008; Charafe-Jauffret *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2012). Gottfried *et al.* ont montré que la PGZ qui diminue la consommation d'oxygène inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate LNCap et PC3 cultivées sous forme de sphéroïdes (Gottfried *et al.*, 2011). En accord avec ces données de la littérature, nous avons montré qu'EP13 est capable de réduire le nombre de mammosphères constituées à partir

des cellules MDA-MB-231 et MCF-7. La formation des mammosphères à partir des cellules MDA-MB-231 traitées avec EP13 (protocole 1) est cependant plus impactée par ce composé. Ce résultat pourrait être expliqué par le pourcentage de CSC au sein des lignées cancéreuses mammaires, en effet des études ont montré que la lignée MDA-MB-231 contenait davantage de CSC que la lignée MCF-7 (Fillmore and Kuperwasser, 2008; Soo *et al.*, 2015). Cependant d'après la littérature les cellules MDA-MB-231 sont considérées comme ayant un métabolisme « glycolytique » par rapport aux cellules MCF-7 considérées comme étant « mitochondriales » (Gatenby and Gillies, 2004; Amaral *et al.*, 2018). Par la suite, il sera nécessaire d'évaluer l'enrichissement en CSC dans les mammosphères formées à partir des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 en analysant le pourcentage de cellules CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺ par cytométrie en flux et l'expression des gènes de pluripotence *OCT4*, *SOX2* et *NANOG* par q-PCR.

Les ERO jouent un rôle important dans les fonctions des cellules souches. Au sein des cellules souches hématopoïétiques, un faible niveau d'ERO est requis pour activer les voies de prolifération. En revanche, un niveau élevé d'ERO altère leur fonction d'autorenouveau (Schieber and Chandel, 2014). Il a été montré que les ERO induisent une perte de la capacité d'autorenouveau, une diminution des marqueurs souches et la différenciation de cellules souches de gliomes (Sato *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015). La production d'ERO, induite par un traitement au SVF à 5%, inhibe la formation de neurosphères et ce phénomène est contrecarré par la présence de l'antioxydant NAC (Yuan *et al.*, 2015). Nous avons démontré qu'EP13 induit une augmentation de la production d'ERO dans les cellules MDA-MB-231 et qu'il diminue l'efficacité de formation de mammosphères à partir de ces mêmes cellules. Nous pourrions imaginer que via la production d'ERO, EP13 empêche la capacité des cellules à former des mammosphères, suite à l'altération des propriétés souches des CSC. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait évaluer la capacité de formation de mammosphères des cellules MDA-MB-231 traitées avec EP13 en présence de NAC. Cependant une des caractéristiques des CSC est d'avoir un système antioxydant fortement actif. De plus dans l'étude de Yuan *et al.*, les effets observés *in vitro* ne sont pas retrouvés en conditions *in vivo* dans lesquelles le traitement au SVF 5% promeut la tumorigenèse (Yuan *et al.*, 2015).

De manière inattendue, nous avons observé une absence de coloration au MTT des mammosphères traitées avec EP13, mais pas avec les autres dérivés de TGZ (Protocole 2). Le test MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité de l'enzyme succinate déshydrogénase à réduire le MTT soluble en formazan insoluble provoquant une coloration violette. Cette enzyme appartient au complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale.

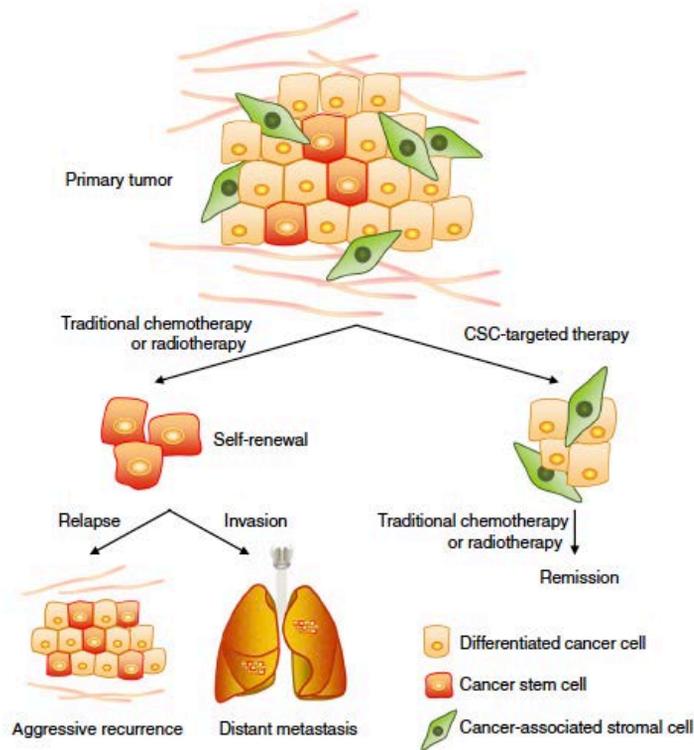


Figure 65 : Intérêt de la stratégie de ciblage des CSC sur l'efficacité de la thérapie anticancéreuses. Les thérapies anticancéreuses conventionnelles permettent de réduire la tumeur de façon transitoire en éliminant les cellules cancéreuses, sans impacter les CSC. Deux obstacles majeurs limitent le succès de ces thérapies anticancéreuses : la capacité des CSC à survivre à ces traitements cytotoxiques et leur potentialité à former des métastases. L'utilisation de composés ciblant spécifiquement les CSC suivie de thérapies anticancéreuses conventionnelles permettrait de réduire la résistance aux traitements, la dissémination des cellules à l'origine des métastases et les récives (Peiris-Pagès *et al.*, 2016).

L'absence de coloration des mammosphères traitées avec EP13 pourrait être due à l'inhibition de cette enzyme. Toutefois la coloration des mammosphères fonctionne après un traitement des cellules cultivées en conditions 2D avec EP13 puis mises en culture pour former les mammosphères (Protocole 1). Le test MTT fonctionne également lorsque les cellules cancéreuses mammaires sont traitées avec EP13 en conditions classiques de culture 2D (données non montrées).

Suite au traitement réalisé selon le protocole 2, les mammosphères traitées avec EP13 ne se colorent pas et présentent une structure moins compacte et désorganisée suggérant qu'EP13 pourrait déstabiliser les jonctions intercellulaires ou modifier les protéines transmembranaires. Cela peut être une future piste à explorer dans la poursuite de ce travail.

Cette stratégie de cibler les CSC est d'autant plus intéressante qu'elle peut s'inscrire dans la méthode de combinaison de traitement. Le but étant d'améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses conventionnelles qui présentent un succès thérapeutique limité due à la présence de CSC qui sont résistantes à ces traitements et impliquées dans la formation de métastases (Figure 65). Les thérapies anticancéreuses conventionnelles ciblent les cellules cancéreuses et les agents ciblant le métabolisme mitochondrial pourraient inhiber spécifiquement les CSC (Peiris-Pagès *et al.*, 2016). Cette stratégie permettrait d'éliminer la population de CSC et de prévenir leur propagation afin de réduire les phénomènes de résistance aux traitements et les récives. Des études ont montré que la metformine, qui cible la population de CSC, combinée à des agents de chimiothérapie comme la doxorubicine inhibe la croissance tumorale et prolonge la rémission dans des souris xénogreffées (Hirsch *et al.*, 2009; Iliopoulos *et al.*, 2011). Comme mentionné précédemment, cette approche permettrait de diminuer les concentrations des traitements. Utilisé à 3 μM ($\text{IC}_{50}/2$), EP13 altère la respiration mitochondriale des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (données non montrées) et impacte les sphères formées à partir de la lignée MDA-MB-231 et MCF-7 (Protocole 2). Nous avons évalué l'effet de la combinaison d'EP13 (3 μM) + doxorubicine sur la capacité des cellules MCF-7 à former des mammosphères. Nos résultats préliminaires ne montrent pas d'effet synergique. Il faudra donc valider ces expériences et les réaliser avec d'autres agents anticancéreux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aalders, K.C., Tryfonidis, K., Senkus, E., and Cardoso, F. (2017). Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews* 53, 98–110.

Abate, M., Festa, A., Falco, M., Lombardi, A., Luce, A., Grimaldi, A., Zappavigna, S., Sperlongano, P., Irace, C., Caraglia, M., et al. (2019). Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

Abdulkareem, I., and Zurmi, I. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 15, 9.

Acin-Perez, R., and Enriquez, J.A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 444–450.

Adam-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2006a). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 639–645.

Adam-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2006b). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 639–645.

Aft, R., and Zhang, F. (2009). Chemosensitizing and cytotoxic effects of 2-deoxy-D-glucose on breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 5, 41.

Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine* 19, 557–566.

Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell* (New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group).

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 3983–3988.

Amaral, I., Silva, C., Correia-Branco, A., and Martel, F. (2018). Effect of metformin on estrogen and progesterone receptor-positive (MCF-7) and triple-negative (MDA-MB-231) breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 102, 94–101.

Anampa, J., Makower, D., and Sparano, J.A. (2015). Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Medicine* 13.

Andrzejewski, S., Gravel, S.-P., Pollak, M., and St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & Metabolism* 2, 12.

Arafa, E.A., Abdelazeem, A.H., Arab, H.H., and Omar, H.A. (2014). OSU-CG5, a novel energy restriction mimetic agent, targets human colorectal cancer cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica* 35, 394–400.

Arif, I.S., Hooper, C.L., Greco, F., Williams, A.C., and Boateng, S.Y. (2013). Increasing doxorubicin activity against breast cancer cells using PPAR γ -ligands and by exploiting circadian rhythms: Reducing the cardiovascular toxicity of doxorubicin. *British Journal of Pharmacology* 169, 1178–1188.

Atkins, M.B., Yasothan, U., and Kirkpatrick, P. (2009). Everolimus. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 535–536.

Balic, M., Lin, H., Young, L., Hawes, D., Giuliano, A., McNamara, G., Datar, R.H., and Cote, R.J. (2006). Most Early Disseminated Cancer Cells Detected in Bone Marrow of Breast Cancer Patients Have a Putative Breast Cancer Stem Cell Phenotype. *Clinical Cancer Research* 12, 5615–5621.

Basu-Roy, U., Han, E., Rattanakorn, K., Gadi, A., Verma, N., Maurizi, G., Gunaratne, P.H., Coarfa, C., Kennedy, O.D., Garabedian, M.J., et al. (2016). PPAR γ agonists promote differentiation of cancer stem cells by restraining YAP transcriptional activity. *Oncotarget* 7.

Berstein, L.M., Yue, W., Wang, J.-P., and Santen, R.J. (2011). Isolated and combined action of tamoxifen and metformin in wild-type, tamoxifen-resistant, and estrogen-deprived MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 128, 109–117.

Berthe, A., Flament, S., Grandemange, S., Zaffino, M., Boisbrun, M., and Mazerbourg, S. (2016). Δ 2-Troglitazone promotes cytostatic rather than pro-apoptotic effects in breast cancer cells cultured in high serum conditions. *Cell Cycle* 15, 3402–3412.

Berthe A. (2017). Métabolisme énergétique et traitements anticancéreux : caractérisation des effets de la Δ 2-troglitazone et du 2-désoxyglucose sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires. **Thèse.**

Berthe, A., Zaffino, M., Muller, C., Foulquier, F., Houdou, M., Schulz, C., Bost, F., De Fay, E., Mazerbourg, S., and Flament, S. (2018). Protein N-glycosylation alteration and glycolysis inhibition both contribute to the antiproliferative action of 2-deoxyglucose in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 171, 581–591.

Bhosale, G., Sharpe, J.A., Sundier, S.Y., and Duchon, M.R. (2015). Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death: Mitochondrial calcium signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1350, 107–116.

Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E., and Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology* 13, 674–690.

Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A-S., Bossard, N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 1 – Tumeurs solides.

Biswas, S.K. (2015). Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity* 43, 435–449.

Blanquicett, C., Roman, J., and Hart, C.M. (2008). Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Therapy* 17, 6(A): 25–34.

van der Blik, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a011072–a011072.

- Bordessa, A., Colin-Cassin, C., Grillier-Vuissoz, I., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Husson, G., Vo, M., Flament, S., Martin, H., Chapleur, Y., et al. (2014). Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: Towards more active and less toxic compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry* 83, 129–140.
- Boroughs, L.K., and DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology* 17, 351–359.
- Boucher, E., Davidenko, I., Hadler, D., von Roemeling, R., and Aprile, G. (2014). A randomized, placebo-controlled, phase 2 study of efatutazone maintenance therapy in patients with advanced colorectal cancer who have achieved disease control following first-line chemotherapy. *Annals of Oncology* 25, ii8–ii8.
- Bova, M.P., Tam, D., McMahon, G., and Mattson, M.N. (2005). Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells. *Toxicology Letters* 155, 41–50.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005). Migrating cancer stem cells — an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 5, 744–749.
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., and Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 755–767.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 215–290.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, 394–424.
- Briskin, C. (2008). Endocrine Disruptors and Breast Cancer. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 62, 406–409.
- Brooks, M.D., Burness, M.L., and Wicha, M.S. (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* 17, 260–271.
- Brunmair, B., Gras, F., Neschen, S., Roden, M., Wagner, L., Waldhausl, W., and Fornsinn, C. (2001). Direct Thiazolidinedione Action on Isolated Rat Skeletal Muscle Fuel Handling Is Independent of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Mediated Changes in Gene Expression. *Diabetes* 50, 2309–2315.
- Brunmair, B., Staniek, K., Gras, F., Scharf, N., Althaym, A., Clara, R., Roden, M., Gnaiger, E., Nohl, H., Waldhausl, W., et al. (2004). Thiazolidinediones, Like Metformin, Inhibit Respiratory Complex I: A Common Mechanism Contributing to Their Antidiabetic Actions? *Diabetes* 53, 1052–1059.
- Burstein, H.J., Demetri, G.D., Mueller, E., Sarraf, P., Spiegelman, B.M., and Winer, E.P. (2003). Use of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ Ligand Troglitazone

as Treatment for Refractory Breast Cancer: A Phase II Study. *Breast Cancer Research and Treatment* 79, 391–397.

Butera, G., Pacchiana, R., and Donadelli, M. (2018). Autocrine mechanisms of cancer chemoresistance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 78, 3–12.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11, 85–95.

Campbell, N.A., Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P. and Jackson, R. (2012). *Campbell biologie*. Saint-Laurent; Montréal, ERPI ; Pearson.

Carnero, A., and Lleónart, M. (2016). The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution: Hypoxic niche and cancer stem cells. *BioEssays* 38, S65–S74.

Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., et al. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 7950–7955.

Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Ginestier, C., Dontu, G., Birnbaum, D., and Wicha, M.S. (2008). Cancer Stem Cells in Breast: Current Opinion and Future Challenges. *Pathobiology* 75, 75–84.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., and Birnbaum, D. (2009). Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* 9.

Chbicheb, S., Yao, X., Rodeau, J.-L., Salamone, S., Boisbrun, M., Thiel, G., Spohn, D., Grillier-Vuissoz, I., Chapleur, Y., Flament, S., et al. (2011). EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR γ -independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 81, 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., and 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. *Journal of Biological Chemistry* 286, 9968–9976.

Chen, S.-W., Tsan, Y.-T., Chen, J.-D., Hsieh, H.-I., Lee, C.-H., Lin, H.-H., Wang, J.-D., Chen, P.-C., and Health Data Analysis in Taiwan Research Group (2013). Use of Thiazolidinediones and the Risk of Colorectal Cancer in Patients With Diabetes: A nationwide, population-based, case-control study. *Diabetes Care* 36, 369–375.

Cheong, J.-H., Park, E.S., Liang, J., Dennison, J.B., Tsavachidou, D., Nguyen-Charles, C., Wa Cheng, K., Hall, H., Zhang, D., Lu, Y., et al. (2011). Dual Inhibition of Tumor Energy Pathway by 2-Deoxyglucose and Metformin Is Effective against a Broad Spectrum of Preclinical Cancer Models. *Molecular Cancer Therapeutics* 10, 2350–2362.

Chiarelli, F., and Di Marzio, D. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; agonists and diabetes: Current evidence and future perspectives. *Vascular Health and Risk Management* Volume 4, 297–304.

- Chiche, J., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* *14*, 771–794.
- Chojkier, M. (2005). Troglitazone and liver injury: In search of answers. *Hepatology* *41*, 237–246.
- Chu, Q.S.-C., Sangha, R., Spratlin, J., J. Vos, L., Mackey, J.R., McEwan, A.J.B., Venner, P., and Michelakis, E.D. (2015). A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs* *33*, 603–610.
- Ciavardelli, D., Rossi, C., Barcaroli, D., Volpe, S., Consalvo, A., Zucchelli, M., De Cola, A., Scavo, E., Carollo, R., D'Agostino, D., Forli F., D'Aguzzo S., Todaro M., Stassi G., Di Ilio C., De Laurenzi V., Urbani A. (2014). Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death & Disease* *5*, e1336–e1336.
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine* *17*, 313–319.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., Perales-Clemente E., Salviati L., Fernandez-Silva P., Enriquez J., Scorrano L. (2013). Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency. *Cell* *155*, 160–171.
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* *41*, 261–273.
- Colak, S., and Medema, J.P. (2014). Cancer stem cells - important players in tumor therapy resistance. *FEBS Journal* *281*, 4779–4791.
- Colca, J.R., McDonald, W.G., Waldon, D.J., Leone, J.W., Lull, J.M., Bannow, C.A., Lund, E.T., and Mathews, W.R. (2004). Identification of a novel mitochondrial protein (“mitoNEET”) cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* *286*, E252–E260.
- 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., Graveche E., Korshunova Y., Trusgnich M., Karr R., Wiley S., Divakaruni A.S., Murphy A., Vigueira P., Finck B., Kletzien R. (2013a). Identification of a Mitochondrial Target of Thiazolidinedione Insulin Sensitizers (mTOT)—Relationship to Newly Identified Mitochondrial Pyruvate Carrier Proteins. *PLoS ONE* *8*, e61551.
- Colca, J.R., VanderLugt, J.T., Adams, W.J., Shashlo, A., McDonald, W.G., Liang, J., Zhou, R., and Orloff, D.G. (2013b). Clinical Proof-of-Concept Study With MSDC-0160, a Prototype mTOT-Modulating Insulin Sensitizer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* *93*, 352–359.
- Colin, C., Salamone, S., Grillier-Vuissoz, I., Boisbrun, M., Kuntz, S., Lecomte, J., Chapleur, Y., and Flament, S. (2010). New troglitazone derivatives devoid of PPAR γ agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* *124*, 101–110.

- Colin-Cassin, C., Yao, X., Cerella, C., Chbicheb, S., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Boisbrun, M., Chapleur, Y., Diederich, M., Flament, S., Grillier-Vuissoz I. (2015). PPAR γ -inactive Δ 2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells: PPAR γ -INDEPENDENT EFFECTS IN BREAST CANCER CELLS. *Molecular Carcinogenesis* 54, 393–404.
- Cowppli-Bony, A., Uhry, Z., Remontet, L., Guizard, A-V., Voirin, N., Monnereau, A., Bouvier, A-M., Colonna, M., Bossard, N., Woronoff, A-S., Grosclaude, P. (2016). Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2013. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 1 – Tumeurs solides.
- Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., et al. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13820–13825.
- Dang, C.V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes & Development* 26, 877–890.
- Danhier, P., Bański, P., Payen, V.L., Grasso, D., Ippolito, L., Sonveaux, P., and Porporato, P.E. (2017). Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1858, 556–572.
- Day, C. (1999). Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabetic Medicine* 16, 179–192.
- De Luca, A., Fiorillo, M., Peiris-Pagès, M., Ozsvári, B., Smith, D.L., Sanchez-Alvarez, R., Martinez-Outschoorn, U.E., Cappello, A.R., Pezzi, V., Lisanti, M.P., Sotgia F. (2015). Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget* 6.
- DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* 2, e1600200.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19345–19350.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism* 7, 11–20.
- Debrock, G., Vanhentenrijk, V., Sciote, R., Debiec-Rychter, M., Oyen, R., and Van Oosterom, A. (2003). A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *British Journal of Cancer* 89, 1409–1412.
- Dello Russo, C., Gavriilyuk, V., Weinberg, G., Almeida, A., Bolanos, J.P., Palmer, J., Pelligrino, D., Galea, E., and Feinstein, D.L. (2003). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Thiazolidinedione Agonists Increase Glucose Metabolism in Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 5828–5836.

- Demetri, G.D., Fletcher, C.D.M., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M., and Singer, S. (1999). Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 3951–3956.
- Diers, A.R., Broniowska, K.A., Chang, C.-F., and Hogg, N. (2012). Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochemical Journal* *444*, 561–571.
- Dieter, S.M., Ball, C.R., Hoffmann, C.M., Nowrouzi, A., Herbst, F., Zavidij, O., Abel, U., Arens, A., Weichert, W., Brand, K., et al. (2011). Distinct Types of Tumor-Initiating Cells Form Human Colon Cancer Tumors and Metastases. *Cell Stem Cell* *9*, 357–365.
- Dittmer, J. (2018). Breast cancer stem cells: Features, key drivers and treatment options. *Seminars in Cancer Biology* *53*, 59–74.
- 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., et al. (2013). Thiazolidinediones are acute, specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 5422–5427.
- Dontu, G. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Development* *17*, 1253–1270.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* *82*, 47–95.
- D'Souza, A., Spicer, D., and Lu, J. (2018). Overcoming endocrine resistance in metastatic hormone receptor-positive breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology* *11*.
- Dubois, M. (2019). Thiazolidinediones dans le diabète de type 2 Rôle du peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *Annales d'endocrinologie* *63*, 511-523.
- Dumontet, C. (2011). Antitubulin agents. *Bulletin du Cancer* *98*, 1275–1285.
- Dupommier, D., Muller, C., Comoy, C., Mazerbourg, S., Bordessa, A., Piquard, E., Pawlak, M., Piquard, F., De Fays, E., Grandemange, S., Flament, S., Boisbrun, M. (2019). New desulfured troglitazone derivatives: improved synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **Soumis**.
- Dwarakanath, B., and Jain, V. (2009). Targeting glucose metabolism with 2-deoxy- D - glucose for improving cancer therapy. *Future Oncology* *5*, 581–585.
- Eikawa, S., Nishida, M., Mizukami, S., Yamazaki, C., Nakayama, E., and Udono, H. (2015). Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, 1809–1814.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* *35*, 495–516.
- Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J.W., Heber, D., and Koeffler, H.P. (1998). Ligands for peroxisome proliferator-

activated receptor and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 8806–8811.

Epstein, T., Xu, L., Gillies, R.J., and Gatenby, R.A. (2014). Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. *Cancer & Metabolism* 2.

Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* 38, 698–707.

Feinstein, D.L., Spagnolo, A., Akar, C., Weinberg, G., Murphy, P., Gavrilyuk, V., and Russo, C.D. (2005). Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochemical Pharmacology* 70, 177–188.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases* 5, 77–106.

Fillmore, C.M., and Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research* 10.

Fiorillo, M., Lamb, R., Tanowitz, H.B., Mutti, L., Krstic-Demonacos, M., Cappello, A.R., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2016). Repurposing atovaquone: Targeting mitochondrial complex III and OXPHOS to eradicate cancer stem cells. *Oncotarget* 7.

Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., Bucci, E.O., Finzi, G., Sessa, F., Noonan, D.M., Albini A. (2015). Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *PLOS ONE* 10, e0115686.

Fragomeni, S.M., Sciallis, A., and Jeruss, J.S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 27, 95–120.

Frezza, C., and Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biology* 19, 4–11.

Friday, E., Oliver, R., Welbourne, T., and Turturro, F. (2011). Glutaminolysis and glycolysis regulation by troglitazone in breast cancer cells: Relationship to mitochondrial membrane potential. *Journal of Cellular Physiology* 226, 511–519.

Fröhlich, E., and Wahl, R. (2015). Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *BioMed Research International* 2015, 1–14.

Fryer, L.G.D., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002). The Anti-diabetic Drugs Rosiglitazone and Metformin Stimulate AMP-activated Protein Kinase through Distinct Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25226–25232.

- Fujita, M., Hasegawa, A., Yamamori, M., and Okamura, N. (2017). In vitro and in vivo cytotoxicity of troglitazone in pancreatic cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36.
- Fujita, T., Sugiyama, Y., Taketomi, S., Sohda, T., Kawamatsu, Y., Iwatsuka, H., and 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*.
- Funk, C. (2001). 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* 167, 83–98.
- Funk, C., Ponelle, C., Scheuermann, G., and Pantze, M. (2001). 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. *Molecular Pharmacology* 59, 627–635.
- Fürnsinn, C., Neschen, S., Noe, C., Bisschop, M., Roden, M., Vogl, C., Schneider, B., and Waldhäusl, W. (1997). Acute non-insulin-like stimulation of rat muscle glucose metabolism by troglitazone *in vitro*. *British Journal of Pharmacology* 122, 1367–1374.
- Fürnsinn, C.F., Brunmair, B., Neschen, S., Roden, M., and Usl, W.W. (2000). Troglitazone Directly Inhibits CO₂ Production from Glucose and Palmitate in Isolated Rat Skeletal Muscle. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 293, 487-493.
- Gambhir, S.S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature Reviews Cancer* 2, 683–693.
- García-Ruiz, I., Solís-Muñoz, P., Fernández-Moreira, D., Muñoz-Yagüe, T., and Solís-Herruzo, J.A. (2013). Pioglitazone leads to an inactivation and disassembly of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *BMC Biology* 11.
- Garrido-Castro, A.C., Lin, N.U., and Polyak, K. (2019). Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discovery* 9, 176–198.
- Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 4, 891–899.
- Gervois, P., and Fruchart, J.-C. (2003). PPAR γ : un récepteur nucléaire majeur de l'adipogénèse. *médecine/sciences* 19, 20–22.
- Ghayad, S., and Cohen, P. (2010). Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR Pathway: New Hope for Breast Cancer Patients. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 5, 29–57.
- Ghosh, S., Patel, N., Rahn, D., McAllister, J., Sadeghi, S., Horwitz, G., Berry, D., Wang, K.X., and Swerdlow, R.H. (2007). The Thiazolidinedione Pioglitazone Alters Mitochondrial Function in Human Neuron-Like Cells. *Molecular Pharmacology* 71, 1695–1702.

- Ginestier, C., Korkaya, H., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M.S., and Charafe-Jauffret, E. (2007). La cellule souche cancéreuse: Un pilote aux commandes du cancer du sein. *médecine/sciences* 23, 1133–1140.
- Ginestier, C., Wicinski, J., Cervera, N., Monville, F., Finetti, P., Bertucci, F., Wicha, M.S., Birnbaum, D., and Charafe-Jauffret, E. (2009). Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle* 8, 3297–3302.
- Girnun, G.D., Chen, L., Silvaggi, J., Drapkin, R., Chirieac, L.R., Padera, R.F., Upadhyay, R., Vafai, S.B., Weissleder, R., Mahmood, U., et al. (2008). Regression of Drug-Resistant Lung Cancer by the Combination of Rosiglitazone and Carboplatin. *Clinical Cancer Research* 14, 6478–6486.
- Gitlin, N. (1998). Two Cases of Severe Clinical and Histologic Hepatotoxicity Associated with Troglitazone. *Annals of Internal Medicine* 129, 36.
- Glasauer, A., and Chandel, N.S. (2013). ROS. *Current Biology* 23, R100–R102.
- Gottfried, E., Rogenhofer, S., Waibel, H., Kunz-Schughart, L.A., Reichle, A., Wehrstein, M., Peuker, A., Peter, K., Hartmannsgruber, G., Andreesen, R., Kreutz M. (2011). Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 67, 117–126.
- Govindarajan, R., Ratnasinghe, L., Simmons, D.L., Siegel, E.R., Midathada, M.V., Kim, L., Kim, P.J., Owens, R.J., and Lang, N.P. (2007). Thiazolidinediones and the Risk of Lung, Prostate, and Colon Cancer in Patients With Diabetes. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1476–1481.
- Grillier Vuissoz, I., Mazerbourg, S., Boisbrun, M., Kuntz, S., Chapleur, Y., Flament, S. (2012). PPAR γ -independent Activity of Thiazolidinediones: A Promising Mechanism of Action for New Anticancer Drugs? *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* 01.
- Gu, G., Dustin, D., and Fuqua, S.A. (2016). Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Current Opinion in Pharmacology* 31, 97–103.
- Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D.J., Zickermann, V., Vonck, J., Kühlbrandt, W., and Meier, T. (2016). Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Molecular Cell* 63, 445–456.
- Hamaguchi, N., Hamada, H., Miyoshi, S., Irifune, K., Ito, R., Miyazaki, T., and Higaki, J. (2010). In vitro and in vivo therapeutic efficacy of the PPAR- γ agonist troglitazone in combination with cisplatin against malignant pleural mesothelioma cell growth. *Cancer Science* 101, 1955–1964.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology* 8, R76.

- Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., Tsiichlis, P.N., and Struhl, K. (2009). Metformin Selectively Targets Cancer Stem Cells, and Acts Together with Chemotherapy to Block Tumor Growth and Prolong Remission. *Cancer Research* 69, 7507–7511.
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U.G.A., and Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. *Cancer Research* 71, 6921–6925.
- Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 13.
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. In *Apoptosis and Medicine*, T. Ntuli. Intechopen.
- Hu, D., Wu, C., Li, Z., Liu, Y., Fan, X., Wang, Q., and Ding, R. (2015). Characterizing the mechanism of thiazolidinedione-induced hepatotoxicity: An in vitro model in mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology* 284, 134–141.
- Hu, J., Locasale, J.W., Bielas, J.H., O’Sullivan, J., Sheahan, K., Cantley, L.C., Heiden, M.G.V., and Vitkup, D. (2013). Heterogeneity of tumor-induced gene expression changes in the human metabolic network. *Nature Biotechnology* 31, 522–529.
- Huang, J.-W., Shiau, C.-W., Yang, Y.-T., Kulp, S.K., Chen, K.-F., Brueggemeier, R.W., Shapiro, C.L., and Chen, C.-S. (2005). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Independent Ablation of Cyclin D1 by Thiazolidinediones and Their Derivatives in Breast Cancer Cells. *Molecular Pharmacology* 67, 1342–1348.
- Hurst, S., Hoek, J., and Sheu, S.-S. (2017). Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 49, 27–47.
- Ichim, G., and Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer* 16, 539–548.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., and Struhl, K. (2011). Metformin Decreases the Dose of Chemotherapy for Prolonging Tumor Remission in Mouse Xenografts Involving Multiple Cancer Cell Types. *Cancer Research* 71, 3196–3201.
- INCa. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-points-cles>
- INCa. (2016). <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Therapies-ciblees>
- INCa. (2017). Les cancers en France, édition 2017, collection Les Données, Institut national du cancer.
- Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., and Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142, 1028–1042.
- Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., and Brand, M.D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays In Biochemistry* 47, 53–67.

- Javed, A., and Lteif, A. (2013). Development of the Human Breast. *Seminars in Plastic Surgery* 27, 005–012.
- Joshi, H., Pal, T., and Ramaa, C. (2014). A new dawn for the use of thiazolidinediones in cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 23, 501–510.
- Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1604, 77–94.
- Kebebew, E., Peng, M., Reiff, E., Treseler, P., Woeber, K.A., Clark, O.H., Greenspan, F.S., Lindsay, S., Duh, Q.-Y., and Morita, E. (2006). A phase II trial of rosiglitazone in patients with thyroglobulin-positive and radioiodine-negative differentiated thyroid cancer. *Surgery* 140, 960–967.
- Kebebew, E., Lindsay, S., Clark, O.H., Woeber, K.A., Hawkins, R., and Greenspan, F.S. (2009). Results of Rosiglitazone Therapy in Patients with Thyroglobulin-Positive and Radioiodine-Negative Advanced Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 19, 953–956.
- Keil, A.M., Frederick, D.M., Jacinto, E.Y., Kennedy, E.L., Zauhar, R.J., West, N.M., Tchao, R., and Harvison, P.J. (2015). Cytotoxicity of thiazolidinedione-, oxazolidinedione- and pyrrolidinedione-ring containing compounds in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 29, 1887–1896.
- Kim, J.H., Lee, K.J., Seo, Y., Kwon, J.-H., Yoon, J.P., Kang, J.Y., Lee, H.J., Park, S.J., Hong, S.P., Cheon, J.H., et al. (2018). Effects of metformin on colorectal cancer stem cells depend on alterations in glutamine metabolism. *Scientific Reports* 8.
- Koeffler, H.P. (2003). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Cancers. *Clinical Cancer Research* 10.
- Koga, H. (2011). PPAR γ potentiates anticancer effects of gemcitabine on human pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*.
- Konrad, D., Rudich, A., Bilan, P.J., Patel, N., Richardson, C., Witters, L.A., and Klip, A. (2005). Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. *Diabetologia* 48, 954–966.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Panteliadou, M., Pouliliou, S.E., Chondrou, P.S., Mavropoulou, S., and Sivridis, E. (2014). Lactate dehydrogenase 5 isoenzyme overexpression defines resistance of prostate cancer to radiotherapy. *British Journal of Cancer* 110, 2217–2223.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 13, 472–482.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology* 13.
- Kumari, S., Badana, A.K., G, M.M., G, S., and Malla, R. (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights* 13, 117727191875539.

Kusminski, C.M., Holland, W.L., Sun, K., Park, J., Spurgin, S.B., Lin, Y., Askew, G.R., Simcox, J.A., McClain, D.A., Li, C., Scherer P.E. (2012). MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nature Medicine* 18, 1539–1549.

Kuznetsov, A.V., Margreiter, R., Amberger, A., Saks, V., and Grimm, M. (2011). Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1144–1152.

Lagadinou, E.D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R.M., Neering, S.J., Minhajuddin, M., Ashton, J.M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K.M., et al. (2013). BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 329–341.

Lamb, R., Harrison, H., Hult, J., Smith, D.L., Lisanti, M.P., and Sotgia, F. (2014). Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition. *Oncotarget* 5.

Lamb, R., Bonuccelli, G., Ozsvári, B., Peiris-Pagès, M., Fiorillo, M., Smith, D.L., Bevilacqua, G., Mazzanti, C.M., McDonnell, L.A., Naccarato, A.G., et al. (2015). Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: Understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling. *Oncotarget* 6.

Lansiaux, A. (2011). Antimetabolites. *Bulletin du Cancer* 98, 1263–1274.

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., Kalluri R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology* 16, 992–1003.

LeBrasseur, N.K., Kelly, M., Tsao, T.-S., Farmer, S.R., Saha, A.K., Ruderman, N.B., and Tomas, E. (2006). Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 291, E175–E181.

Lecomte, J., Flament, S., Salamone, S., Boisbrun, M., Mazerbourg, S., Chapleur, Y., and Grillier-Vuissoz, I. (2008). Disruption of ER α signalling pathway by PPAR γ agonists: evidences of PPAR γ -independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 112, 437–451.

Lee, G., and R Hall, R. (2016). Cancer Stem Cells: Cellular Plasticity, Niche, and its Clinical Relevance. *Journal of Stem Cell Research & Therapy* 06.

Lee, K., Giltnane, J.M., Balko, J.M., Schwarz, L.J., Guerrero-Zotano, A.L., Hutchinson, K.E., Nixon, M.J., Estrada, M.V., Sánchez, V., Sanders, M.E., et al. (2017). MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metabolism* 26, 633-647.e7.

Lee, K.-H., Hsu, E.-C., Guh, J.-H., Yang, H.-C., Wang, D., Kulp, S.K., Shapiro, C.L., and Chen, C.-S. (2011). Targeting Energy Metabolic and Oncogenic Signaling Pathways in

- Triple-negative Breast Cancer by a Novel Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK) Activator. *Journal of Biological Chemistry* 286, 39247–39258.
- Lewis, J.D., Ferrara, A., Peng, T., Hedderson, M., Bilker, W.B., Quesenberry, C.P., Vaughn, D.J., Nessel, L., Selby, J., and Strom, B.L. (2011). Risk of Bladder Cancer Among Diabetic Patients Treated With Pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 34, 916–922.
- Li, J.-J., and Shao, Z.-M. (2016). Endocrine therapy as adjuvant or neoadjuvant therapy for breast cancer: selecting the best agents, the timing and duration of treatment. *Chinese Clinical Oncology* 5, 40–40.
- Liao, X., Wang, Y., and Wong, C.-W. (2010). Troglitazone induces cytotoxicity in part by promoting the degradation of peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α protein: Troglitazone promotes PGC-1 α degradation. *British Journal of Pharmacology* 161, 771–781.
- Liberti, M.V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* 41, 211–218.
- Lim, P.L.K., Liu, J., Go, M.L., and Boelsterli, U.A. (2008). The Mitochondrial Superoxide/Thioredoxin-2/Ask1 Signaling Pathway is Critically Involved in Troglitazone-Induced Cell Injury to Human Hepatocytes. *Toxicological Sciences* 101, 341–349.
- Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism* 1, 361–370.
- Liu, S., Dontu, G., and Wicha, M.S. (2005). Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 7.
- Lo-Coco, F., Avvisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S.M., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi, L., Di Bona, E., et al. (2013). Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 369, 111–121.
- Lonardo, E., Cioffi, M., Sancho, P., Sanchez-Ripoll, Y., Trabulo, S.M., Dorado, J., Balic, A., Hidalgo, M., and Heeschen, C. (2013). Metformin Targets the Metabolic Achilles Heel of Human Pancreatic Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 8, e76518.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 3, 330–338.
- Loubière, C., Dirat, B., Tanti, J.-F., and Bost, F. (2013). Metformine et cancer : de nouvelles perspectives pour un ancien médicament. *Annales d'Endocrinologie* 74, 130–136.
- Loubiere, C., Clavel, S., Gilleron, J., Harisseh, R., Fauconnier, J., Ben-Sahra, I., Kaminski, L., Laurent, K., Herkenne, S., Lacas-Gervais, S., Ambrosetti D., Alcor D., Rocchi S., Cormont M., Michiels J-F., Mari B., Mazure N.M., Scorrano L., Lacampagne A., Gharib A., Tanti J-F., Bost F. (2017). The energy disruptor metformin targets mitochondrial integrity via modification of calcium flux in cancer cells. *Scientific Reports* 7.
- Loureiro, R., Mesquita, K.A., Magalhães-Novais, S., Oliveira, P.J., and Vega-Naredo, I. (2017). Mitochondrial biology in cancer stem cells. *Seminars in Cancer Biology* 47, 18–28.

- Ly, J.D., Grubb, D.R., and Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* ; **8**: 115–12814.
- Ma, J., Guo, Y., Chen, S., Zhong, C., Xue, Y., Zhang, Y., Lai, X., Wei, Y., Yu, S., Zhang, J., Liu W. (2014). Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive breast carcinoma. *BMC Cancer* *14*.
- Mammucari, C., Raffaello, A., Vecellio Reane, D., Gherardi, G., De Mario, A., and Rizzuto, R. (2018). Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: from molecular mechanism to animal models. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* *470*, 1165–1179.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell L.L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R.A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* *133*, 704–715.
- Marchetti, P., Guerreschi, P., Mortier, L., and Kluza, J. (2015). Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics. *International Journal of Cell Biology* *2015*, 1–17.
- Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A., and Chaffer, C.L. (2013). Cell Plasticity and Heterogeneity in Cancer. *Clinical Chemistry* *59*, 168–179.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature Reviews Clinical Oncology* *14*, 11–31.
- Maughan, K.L., Lutterbie, M.A., and Ham, P.S. (2010). Treatment of Breast Cancer. *Breast Cancer* *81*, 8.
- Mazerbourg, S., Kuntz, S., Grillier-Vuissoz, I., Berthe, A., Geoffroy, M., Flament, S., Bordessa, A., and Boisbrun, M. (2016). Reprofilng of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment? *Current Topics in Medicinal Chemistry* *16*, 2115–2124.
- McCommis, K.S., and Finck, B.N. (2015). Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochemical Journal* *466*, 443–454.
- Meredith, A.-M., and Dass, C.R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* *68*, 729–741.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* *56*, 185–229.
- Miranda-Gonçalves, V., Honavar, M., Pinheiro, C., Martinho, O., Pires, M.M., Pinheiro, C., Cordeiro, M., Bebiano, G., Costa, P., Palmeirim, I., Reis R.M., Baltazar F. (2013). Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro-Oncology* *15*, 172–188.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* *191*, 144–148.

- Molina, J.R., Sun, Y., Protopopova, M., Gera, S., Bandi, M., Bristow, C., McAfoos, T., Morlacchi, P., Ackroyd, J., Agip, A.-N.A., et al. (2018). An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nature Medicine* 24, 1036–1046.
- Monami, M., Dicembrini, I., and Mannucci, E. (2014). Thiazolidinediones and cancer: results of a meta-analysis of randomized clinical trials. *Acta Diabetologica* 51, 91–101.
- Moon, S.-H., Lee, S.J., Jung, K.-H., Quach, C.H.T., Park, J.-W., Lee, J.H., Cho, Y.S., and Lee, K.-H. (2016). Troglitazone Stimulates Cancer Cell Uptake of 18F-FDG by Suppressing Mitochondrial Respiration and Augments Sensitivity to Glucose Restriction. *Journal of Nuclear Medicine* 57, 129–135.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* 3, e2888.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells: Glycolytic and mitochondrial metabolism of tumor cells. *FEBS Journal* 274, 1393–1418.
- Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, A., Saavedra, E., Pardo, J.P., Ralph, S.J., and Rodríguez-Enríquez, S. (2014). Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 50, 10–23.
- Moussard, C. (2006). *Biochimie structurale et métabolique : cours*. Bruxelles; [Paris], De Boeck.
- Moyret-Lalle, C., Pommier, R., Bouard, C., Nouri, E., Richard, G., and Puisieux, A. (2016). Plasticité des cellules cancéreuses et dissémination métastatique. *médecine/sciences* 32, 725–731.
- Nadanaciva, S., Dykens, J.A., Bernal, A., Capaldi, R.A., and Will, Y. (2007). Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 223, 277–287.
- Nakajima, E.C., and Van Houten, B. (2013). Metabolic symbiosis in cancer: Refocusing the Warburg lens. *Molecular Carcinogenesis* 52, 329–337.
- Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., Rossetti L., Scherer P.E. (2006). Mice Lacking Adiponectin Show Decreased Hepatic Insulin Sensitivity and Reduced Responsiveness to Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonists. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2654–2660.
- Neuzil, J., Dong, L.-F., Rohlena, J., Truksa, J., and Ralph, S.J. (2013). Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 13, 199–208.
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L.B., Martin, S., Wedge, D.C., et al. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 534, 47–54.

Osellame, L.D., Blacker, T.S., and Duchen, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26, 711–723.

Ozen, C., Ceylan Unlusoy, M., Aliary, N., Ozturk, M., and Bozdag Dundar, O. (2017). Thiazolidinedione or Rhodanine: A Study on Synthesis and Anticancer Activity Comparison of Novel Thiazole Derivatives. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 20, 415.

Pandhare, J., Cooper, S.K., and Phang, J.M. (2006). Proline Oxidase, a Proapoptotic Gene, Is Induced by Troglitazone: EVIDENCE FOR BOTH PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR γ -DEPENDENT AND -INDEPENDENT MECHANISMS. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2044–2052.

Papa, S., Martino, P.L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmio, D., Signorile, A., and Petruzzella, V. (2012). The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. *Advances in Mitochondrial Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology* 942pp. 3–37.

Papaccio, F., Paino, F., Regad, T., Papaccio, G., Desiderio, V., and Tirino, V. (2017). Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development: Stem Cells-Cancer Stem Cells Interplay. *STEM CELLS Translational Medicine* 6, 2115–2125.

Pavlidis, 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., Lisanti M.P. (2009). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8, 3984–4001.

Payen, V.L., Porporato, P.E., Baselet, B., and Sonveaux, P. (2016). Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, 1333–1348.

Pedersen, P.L., Mathupala, S., Rempel, A., Geschwind, J., and 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1555, 14–20.

Peiris-Pagès, M., Martinez-Outschoorn, U.E., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2016). Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Research* 18.

Pérez-Ortiz, J.M., Tranque, P., Vaquero, C.F., Domingo, B., Molina, F., Calvo, S., Jordán, J., Ceña, V., and Llopis, J. (2004). Glitazones Differentially Regulate Primary Astrocyte and Glioma Cell Survival: involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Journal of Biological Chemistry* 279, 8976–8985.

Pérez-Ortiz, J.M., Tranque, P., Burgos, M., Vaquero, C.F., and Llopis, J. (2007). Glitazones Induce Astrogloma Cell Death by Releasing Reactive Oxygen Species from Mitochondria: Modulation of Cytotoxicity by Nitric Oxide. *Molecular Pharmacology* 72, 407–417.

Perou, C.M., Sørlie, 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., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.

- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., and Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407–6418.
- Plissonnier, M.L., Fauconnet, S., Bittard, H., and Lascombe, I. (2010). Insights on distinct pathways of thiazolidinediones (PPAR γ ligand)-promoted apoptosis in TRAIL-sensitive or -resistant malignant urothelial cells. *International Journal of Cancer* 127, 1769–1784.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *Journal of Clinical Investigation* 117, 3155–3163.
- Polyak, K., and Kalluri, R. (2010). The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a003244–a003244.
- Porporato, P.E., Dhup, S., Dadhich, R.K., Copetti, T., and Sonveaux, P. (2011). Anticancer Targets in the Glycolytic Metabolism of Tumors: A Comprehensive Review. *Frontiers in Pharmacology* 2.
- Porporato, P.E., Payen, V.L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C.J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., Feron O., Michiels C., Gallez B., Sonveaux P. (2014). A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Reports* 8, 754–766.
- Potter, M., Newport, E., and Morten, K.J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions* 44, 1499–1505.
- Pourquier, P. (2011). Alkylating agents. *Bulletin du Cancer* 98, 1237–1251.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* 5, 5–23.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research* 12.
- Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J.-P., Verhoeven, E., Raggiueneau, V., Maneglier, B., Castaigne S., Chomienne C., Chretien S., Rousselot P., Leboulch P. (2015). Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature* 525, 380–383.
- Rachek, L.I., Yuzefovych, L.V., LeDoux, S.P., Julie, N.L., and Wilson, G.L. (2009). Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 240, 348–354.
- Raez, L.E., Papadopoulos, K., Ricart, A.D., Chiorean, E.G., DiPaola, R.S., Stein, M.N., Rocha Lima, C.M., Schlesselman, J.J., Tolba, K., Langmuir, V.K., et al. (2013). A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71, 523–530.
- Ralph, S., Low, P., Dong, L., Lawen, A., and Neuzil, J. (2006). Mitocans: Mitochondrial Targeted Anti-Cancer Drugs as Improved Therapies and Related Patent Documents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1, 327–346.

- Reddy, R.C., Srirangam, A., Reddy, K., Chen, J., Gangireddy, S., Kalemkerian, G.P., Standiford, T.J., and Keshamouni, V.G. (2008). Chemotherapeutic Drugs Induce PPAR- γ Expression and Show Sequence-Specific Synergy with PPAR- γ Ligands in Inhibition of Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* 10, 597–603.
- Reynolds, M.R., and Clem, B.F. (2015). Troglitazone suppresses glutamine metabolism through a PPAR-independent mechanism. *Biological Chemistry* 396, 937–947.
- Rocca, A., Schirone, A., Maltoni, R., Bravaccini, S., Cecconetto, L., Farolfi, A., Bronte, G., and Andreis, D. (2017). Progress with palbociclib in breast cancer: latest evidence and clinical considerations. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 9, 83–105.
- Rocha, G.Z., Dias, M.M., Ropelle, E.R., Osorio-Costa, F., Rossato, F.A., Vercesi, A.E., Saad, M.J.A., and Carvalheira, J.B.C. (2011). Metformin Amplifies Chemotherapy-Induced AMPK Activation and Antitumoral Growth. *Clinical Cancer Research* 17, 3993–4005.
- Rodríguez-Enríquez, S., Gallardo-Pérez, J.C., Avilés-Salas, A., Marín-Hernández, A., Carreño-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V., and Moreno-Sánchez, R. (2008). Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *Journal of Cellular Physiology* 216, 189–197.
- Rodríguez-Enríquez, S., Carreño-Fuentes, L., Gallardo-Pérez, J.C., Saavedra, E., Quezada, H., Vega, A., Marín-Hernández, A., Olín-Sandoval, V., Torres-Márquez, M.E., and Moreno-Sánchez, R. (2010). Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 1744–1751.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2001). PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry* 276, 37731–37734.
- Saha, S., New, L.S., Ho, H.K., Chui, W.K., and Chan, E.C.Y. (2010a). Direct toxicity effects of sulfo-conjugated troglitazone on human hepatocytes. *Toxicology Letters* 195, 135–141.
- Saha, S., New, L.S., Ho, H.K., Chui, W.K., and Chan, E.C.Y. (2010b). Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicology Letters* 192, 141–149.
- Saha, S., Chan, D.S.Z., Lee, C.Y., Wong, W., New, L.S., Chui, W.K., Yap, C.W., Chan, E.C.Y., and Ho, H.K. (2012). Pyrrolidinediones reduce the toxicity of thiazolidinediones and modify their anti-diabetic and anti-cancer properties. *European Journal of Pharmacology* 697, 13–23.
- Salamone, S., Colin, C., Grillier-Vuissoz, I., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Flament, S., Martin, H., Richert, L., Chapleur, Y., and Boisbrun, M. (2012). Synthesis of new troglitazone derivatives: Anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *European Journal of Medicinal Chemistry* 51, 206–215.
- Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., Barneda, D., Sellers, K., Campos-Olivas, R., Graña, O., et al. (2015). MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metabolism* 22, 590–605.

- Sancho, P., Barneda, D., and Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British Journal of Cancer* *114*, 1305–1312.
- San-Millán, I., and Brooks, G.A. (2016). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis* *37*, 127.
- Santos, J.C., Lima, N. da S., Sarian, L.O., Matheu, A., Ribeiro, M.L., and Derchain, S.F.M. (2018). Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. *Scientific Reports* *8*.
- Sanz, M.-N., Sánchez-Martín, C., Detaille, D., Vial, G., Rigoulet, M., El-Mir, M.-Y., and Rodríguez-Villanueva, G. (2011). Acute Mitochondrial Actions of Glitazones on the Liver: a Crucial Parameter for their Antidiabetic Properties. *Cellular Physiology and Biochemistry* *28*, 899–910.
- Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T., and Kitanaka, C. (2014). Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Research* *12*, 119–131.
- Sattler, U.G.A., Meyer, S.S., Quennet, V., Hoerner, C., Knoerzer, H., Fabian, C., Yaromina, A., Zips, D., Walenta, S., Baumann, M., Mueller-Klieser W. (2010). Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiotherapy and Oncology* *94*, 102–109.
- Scarpulla, R.C. (2002). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* *286*, 81–89.
- Scarpulla, R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1813*, 1269–1278.
- Scatena, R., Bottoni, P., Martorana, G.E., Ferrari, F., De Sole, P., Rossi, C., and Giardina, B. (2004). Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *319*, 967–973.
- Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* *24*, R453–R462.
- Schöckel, L., Glasauer, A., Basit, F., Bitschar, K., Truong, H., Erdmann, G., Algire, C., Hägebarth, A., Willems, P.H., Kopitz, C., et al. (2015). Targeting mitochondrial complex I using BAY 87-2243 reduces melanoma tumor growth. *Cancer & Metabolism* *3*.
- Schrepfer, E., and Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Molecular Cell* *61*, 683–694.
- Schulze, A., and Harris, A.L. (2012). How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* *491*, 364–373.
- Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell* *48*, 158–167.

- Sever, R., and Brugge, J.S. (2015). Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5, a006098–a006098.
- Seyfried T. (2012). Respiratory Dysfunction in Cancer Cells. *Cancer as a Metabolic Disease: On the Origin, Management and Prevention of Cancer*, First Edition.
- Shackleton, M. (2010). Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Seminars in Cancer Biology* 20, 85–92.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84–88.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell* 138, 822–829.
- Shaw, F.L., Harrison, H., Spence, K., Ablett, M.P., Simões, B.M., Farnie, G., and Clarke, R.B. (2012). A Detailed Mammosphere Assay Protocol for the Quantification of Breast Stem Cell Activity. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 17, 111–117.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R.K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C.H., Goulet, R., Badve, S., and Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research* 8.
- Shiau, C.-W., Yang, C.-C., Kulp, S.K., Chen, K.-F., Chen, C.-S., Huang, J.-W., and Chen, C.-S. (2005). Thiazolidenediones Mediate Apoptosis in Prostate Cancer Cells in Part through Inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 Functions Independently of PPAR; *Cancer Res* 10.
- Shin, S.J., Kim, J.Y., Kwon, S.Y., Mun, K.-C., Cho, C.H., and Ha, E. (2014). Ciglitazone enhances ovarian cancer cell death via inhibition of glucose transporter-1. *European Journal of Pharmacology* 743, 17–23.
- Shiraishi, T., Verdone, J.E., Huang, J., Kahlert, U.D., Hernandez, J.R., Torga, G., Zarif, J.C., Epstein, T., Gatenby, R., McCartney, A., Elisseeff J.H., Mooney S.M., An S.S., Pienta K.J. (2015). Glycolysis is the primary bioenergetic pathway for cell motility and cytoskeletal remodeling in human prostate and breast cancer cells. *Oncotarget* 6.
- Skildum, A., Dornfeld, K., and Wallace, K. (2011). Mitochondrial amplification selectively increases doxorubicin sensitivity in breast cancer cells with acquired antiestrogen resistance. *Breast Cancer Research and Treatment* 129, 785–797.
- Skoda, J., Borankova, K., Jansson, P.J., Huang, M.L.-H., Veselska, R., and Richardson, D.R. (2019). Pharmacological targeting of mitochondria in cancer stem cells: An ancient organelle at the crossroad of novel anti-cancer therapies. *Pharmacological Research* 139, 298–313.
- Snyder, V., Reed-Newman, T.C., Arnold, L., Thomas, S.M., and Anant, S. (2018). Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology* 8.
- Sonveaux, P., Végran, 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., Dewhirst M.W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *Journal of Clinical Investigation*.

Soo, J.S.-S., Ng, C.-H., Tan, S.H., Malik, R.A., Teh, Y.-C., Tan, B.-S., Ho, G.-F., See, M.-H., Taib, N.A.M., Yip, C.-H., Chung F. F-L., Hii L-W., Teo S-H., Leong C-O. (2015). Metformin synergizes 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) combination therapy through impairing intracellular ATP production and DNA repair in breast cancer stem cells. *Apoptosis* 20, 1373–1387.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 10869–10874.

Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8418–8423.

Spagnolo, A., Grant, E.N., Glick, R., Lichtor, T., and Feinstein, D.L. (2007). Differential effects of PPAR γ agonists on the metabolic properties of gliomas and astrocytes. *Neuroscience Letters* 417, 72–77.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439, 993–997.

Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719–724.

Strickaert, A., Saiselet, M., Dom, G., De Deken, X., Dumont, J.E., Feron, O., Sonveaux, P., and Maenhaut, C. (2017). Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map. *Oncogene* 36, 2637–2642.

Strohecker, A.M., Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S.M., Chen, G.J., Mathew, R., McMahon, M., and White, E. (2013). Autophagy Sustains Mitochondrial Glutamine Metabolism and Growth of BrafV600E-Driven Lung Tumors. *Cancer Discovery* 3, 1272–1285.

Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M.F., and Wang, B. (2016). Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 16, 335–343.

Tikoo, K., Kumar, P., and Gupta, J. (2009). Rosiglitazone synergizes anticancer activity of cisplatin and reduces its nephrotoxicity in 7, 12-dimethyl benz{a}anthracene (DMBA) induced breast cancer rats. *BMC Cancer* 9.

Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry* 77, 289–312.

Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B.M., Sarraf, P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D.M., Brun, R.P., Mueller, E., Altiock, S., Oppenheim, H., Evans R.M., Spiegelman B.M. (1997). Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-

- activated receptor and the retinoid X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *94*, 237–241.
- Tran, Q., Lee, H., Park, J., Kim, S.-H., and Park, J. (2016). Targeting Cancer Metabolism - Revisiting the Warburg Effects. *Toxicological Research* *32*, 177–193.
- Vander Heiden, M.G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery* *10*, 671–684.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.
- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & Development* *23*, 2563–2577.
- Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & Development* *28*, 1143–1158.
- Vlashi, E., and Pajonk, F. (2015). The metabolic state of cancer stem cells—a valid target for cancer therapy? *Free Radical Biology and Medicine* *79*, 264–268.
- Vlashi, E., Lagadec, C., Vergnes, L., Matsutani, T., Masui, K., Poulou, M., Popescu, R., Della Donna, L., Evers, P., Dekmezian, C., Reue, K., Christofke, H., Mischel, P.S., Pajonk, F. (2011). Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 16062–16067.
- Vlashi, E., Lagadec, C., Vergnes, L., Reue, K., Frohnen, P., Chan, M., Alhiyari, Y., Dratver, M.B., and Pajonk, F. (2014). Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Research and Treatment* *146*, 525–534.
- Wai, T., and Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* *27*, 105–117.
- Walenta, S., and Mueller-Klieser, W.F. (2004). Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in Radiation Oncology* *14*, 267–274.
- Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer* *12*, 685–698.
- Wang, Y., Fang, F., and Wong, C.-W. (2010). Troglitazone is an estrogen-related receptor α and γ inverse agonist. *Biochemical Pharmacology* *80*, 80–85.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science, New Series* *123*, 309–314.
- Watanabe, I., Tomita, A., Shimizu, M., Sugawara, M., Yasuno, H., Koishi, R., Takahashi, T., Miyoshi, K., Nakamura, K., Izumi, T., Matsushita, Y., Furukawa, H., Haruyama, H., Koga, T. (2003). A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* *73*, 435–455.
- Watkins, P.B., and Whitcomb, R.W. (1998). Hepatic Dysfunction Associated with Troglitazone. *New England Journal of Medicine* *338*, 916–917.

- Wei, S., Lin, L.-F., Yang, C.-C., Wang, Y.-C., Chang, G.-D., Chen, H., and Chen, C.-S. (2007). Thiazolidinediones Modulate the Expression of β -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 γ . *Molecular Pharmacology* 72, 725–733.
- Wei, S., Yang, J., Lee, S.-L., Kulp, S.K., and Chen, C.-S. (2009). PPAR γ -independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Letters* 276, 119–124.
- Wei, S., Kulp, S.K., and Chen, C.-S. (2010). Energy Restriction as an Antitumor Target of Thiazolidinediones. *Journal of Biological Chemistry* 285, 9780–9791.
- Weinberg, F., and Chandel, N.S. (2009). Mitochondrial Metabolism and Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1177, 66–73.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 8788–8793.
- Weinhouse, S., Warburg, O., Burk, D., and Schade, A.L. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* 124, 267–272.
- Weng, J.-R., Chen, C.-Y., Pinzone, J.J., Ringel, M.D., and Chen, C.-S. (2006). Beyond peroxisome proliferator-activated receptor γ signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. *Endocrine-Related Cancer* 401–413.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 872–884.
- Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Birbe, R., Howell, A., Pavlides, S., Gandara, R., Pestell R.G., Sotgia F., Philp N.J., Lisanti M.P. (2011). Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 10, 1772–1783.
- Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Research* 66, 1883–1890.
- Wiley, S.E., Murphy, A.N., Ross, S.A., van der Geer, P., and Dixon, J.E. (2007). MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5318–5323.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology* 25, 85–101.
- Wokoun, U., Hellriegel, M., Emons, G., and Gründker, C. (2017). Co-treatment of breast cancer cells with pharmacologic doses of 2-deoxy-D-glucose and metformin: Starving tumors. *Oncology Reports* 37, 2418–2424.
- Woo, S.H., Seo, S.-K., Park, Y., Kim, E.-K., Seong, M.-K., Kim, H.-A., Song, J.-Y., Hwang, S.-G., Lee, J.K., Noh, W.C., et al. (2016). Dichloroacetate potentiates tamoxifen-induced cell

- death in breast cancer cells via downregulation of the epidermal growth factor receptor. *Oncotarget* 7.
- Wood, I.S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* 89, 3–9.
- Yamamoto, Y., Nakajima, M., Yamazaki, H., and Yokoi, T. (2001). Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. *Life Sciences* 70, 471–482.
- Yan, Y., Li, Z., Xu, X., Chen, C., Wei, W., Fan, M., Chen, X., Li, J.J., Wang, Y., and Huang, J. (2016). All-trans retinoic acids induce differentiation and sensitize a radioresistant breast cancer cells to chemotherapy. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16.
- Yang, X., Wang, H., and Jiao, B. (2017). Mammary gland stem cells and their application in breast cancer. *Oncotarget* 8.
- Yang, Z., Bagheri-Yarmand, R., Balasenthil, S., Hortobagyi, G., Sahin, A.A., Barnes, C.J., and Kumar, R. (2003). HER2 Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Expression and Sensitivity of Breast Cancer Cells to PPAR γ Ligand Therapy. *Clinical Cancer Research* 9, 3198-3203.
- Ye, J.-M., Dzamko, N., Hoy, A.J., Iglesias, M.A., Kemp, B., and Kraegen, E. (2006). Rosiglitazone Treatment Enhances Acute AMP-Activated Protein Kinase-Mediated Muscle and Adipose Tissue Glucose Uptake in High-Fat-Fed Rats. *Diabetes* 55, 2797–2804.
- Yokoi, T. (2010). Troglitazone. In *Adverse Drug Reactions*, J. Uetrecht, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 419–435.
- 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. (2008). Troglitazone enhances tamoxifen-induced growth inhibitory activity of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 242–247.
- Yu, L.-Y., Tang, J., Zhang, C.-M., Zeng, W.-J., Yan, H., Li, M.-P., and Chen, X.-P. (2017). New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14, 68.
- Yuan, S., Lu, Y., Yang, J., Chen, G., Kim, S., Feng, L., Ogasawara, M., Hammoudi, N., Lu, W., Zhang, H., et al. (2015). Metabolic activation of mitochondria in glioma stem cells promotes cancer development through a reactive oxygen species-mediated mechanism. *Stem Cell Research & Therapy* 6.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, Vayssière, J-L., Petit, P., and Kroemer, G. (1995). Reduction in Mitochondrial Potential Constitutes an Early Irreversible Step of Programmed Lymphocyte Death In Vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 1661-1672.
- Zhao, J., Ren, K., and 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. *Tumor Biology* 35, 12305–12315.

Zhao, Y., Liu, H., Liu, Z., Ding, Y., LeDoux, S.P., Wilson, G.L., Voellmy, R., Lin, Y., Lin, W., Nahta, R., et al. (2011). Overcoming Trastuzumab Resistance in Breast Cancer by Targeting Dysregulated Glucose Metabolism. *Cancer Research* 71, 4585–4597.

Zhao, Y., Butler, E.B., and Tan, M. (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death & Disease* 4, e532–e532.

Zhou, J., Chen, Q., Zou, Y., Zheng, S., and Chen, Y. (2019). Stem Cells and Cellular Origins of Mammary Gland: Updates in Rationale, Controversies, and Cancer Relevance. *Stem Cells International* 2019, 1–12.

Zhou, Y., Zhou, Y., Shingu, T., Feng, L., Chen, Z., Ogasawara, M., Keating, M.J., Kondo, S., and Huang, P. (2011). Metabolic Alterations in Highly Tumorigenic Glioblastoma Cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. *Journal of Biological Chemistry* 286, 32843–32853.

Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *OncoImmunology* 1, 1223–1225.

Zu, X.L., and Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 459–465.

ANNEXES



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

Audrey Berthe¹ · Marie Zaffino¹ · Claire Muller¹ · François Foulquier² · Marine Houdou² · Céline Schulz² · Frédéric Bost^{3,4} · Elia De Fay¹ · Sabine Mazerbourg¹  · Stéphane Flament¹

Received: 8 February 2018 / Accepted: 1 July 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Cancer cells often elicit a higher glycolytic rate than normal cells, supporting the development of glycolysis inhibitors as therapeutic agents. 2-Deoxyglucose (2-DG) is used in this context due to its ability to compete with glucose. However, many studies do not take into account that 2-DG inhibits not only glycolysis but also N-glycosylation. Since there are limited publications on 2-DG mechanism of action in breast cancer, we studied its effects in breast cancer cell lines to determine the part played by glycolysis inhibition and N-linked glycosylation interference.

Methods and Results 2-Deoxyglucose behaved as an anticancer agent with a similar efficiency on cell number decrease between the hormone-dependent MCF-7 and hormone-independent MDA-MB-231 breast cancer cells. It also interfered with the N-linked glycosylation process in both cell lines as illustrated by the migration profile of the lysosomal-associated membrane protein 2 and calumenin. These results are reinforced by the appearance of an abnormal Man7GlcNAc2 structure both on lipid-linked oligosaccharides and N-linked glycoproteins of 2-DG incubated MDA-MB-231 cells. Besides, 2-DG-induced a transient endoplasmic reticulum stress that was more sustained in MDA-MB-231 cells. Both changes were abrogated by mannose. 2-DG, even in the presence of mannose, decreased glycolysis in both cell lines. Mannose partially reversed the effects of 2-DG on cell numbers with N-linked glycosylation interference accounting for 37 and 47% of 2-DG anti-cancerous effects in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively.

Conclusion N-linked glycosylation interference and glycolysis disruption both contribute to the anticancer properties of 2-DG in breast cancer cells.

Keywords Breast cancer · 2-Deoxyglucose · Glycolysis · N-Glycosylation · Endoplasmic reticulum stress

Abbreviations

2-DG 2-Deoxyglucose
BiP Binding immunoglobulin protein
CHOP Transcription factor CEBP homologous protein

ER Endoplasmic reticulum
Glc Glucose
GlcNAc *N*-Acetylglucosamine
IC₅₀ Half maximal inhibitory concentration
IRE1 Inositol requiring enzyme 1
LAMP2 Lysosomal-associated membrane protein 2
LLO Lipid-linked oligosaccharides
Man Mannose
N-GP N-linked glycoproteins
PERK Pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase
UPR Unfolded protein response
XBP-1 X-box-binding protein-1

✉ Sabine Mazerbourg
sabine.mazerbourg@univ-lorraine.fr

¹ Université de Lorraine, CNRS, CRAN, 54000 Nancy, France

² Université de Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France

³ Inserm U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Team “Targeting Prostate Cancer cell metabolism”, 06204 Nice, France

⁴ Faculty of Medicine, Université de Nice Sophia-Antipolis, 06204 Nice, France

Introduction

Most cancer cells elicit a high rate of glycolysis even under normal oxygen concentrations, called the Warburg effect [1]. This metabolic property is clinically exploited by positron emission tomography imaging with 2-¹⁸F-fluoro-2-deoxy-D-glucose [2]. This altered metabolism responds to requirements of rapid proliferating tumor cells such as rapid ATP generation, stimulated biosynthesis of macromolecules and maintenance of cellular redox homeostasis [3].

Up-regulation of glycolysis was reported to promote invasive tumor growth and to contribute to drug resistance in cancer therapy [4, 5]. Hence, consequent efforts have been initiated to develop anticancer treatments targeting tumor glycolysis [6]. Among them, 2-deoxy-D-glucose (2-DG) emerged as an interesting candidate. This sugar analog displayed anticancer activity in numerous *in vitro* and *in vivo* studies and improved the chemosensitivity and radiosensitivity of cancer cells [7].

2-Deoxyglucose is a glucose analog, 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. 2-DG firstly decreases the cellular glucose uptake suggesting a competition between both sugars [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 cellular accumulation. As a consequence, phosphoglucosomerase and hexokinase are respectively competitively and non-competitively inhibited by 2-DG-6-phosphate [9, 10].

Due to 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-diphosphate derivative GDP-2-DG, before being incorporated in lipid-linked oligosaccharides precursors [11, 12]. The resulting intermediates cannot be further extended by the addition of mannosyl residues, leading to a disruption of glycosylation of proteins [11]. Consequently, misfolded N-glycoproteins accumulate in the ER leading to ER stress and the activation of the unfolded protein response (UPR) [13]. This interference with the N-linked glycosylation process can be reversed by addition of exogenous mannose [13].

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. Moreover, there are limited publications on 2-DG mechanism of action in breast cancer [7]. Then, we studied its effects in breast cancer cell lines to determine the part played by glycolysis inhibition and N-linked glycosylation interference.

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). They were grown at 37 °C under 5% CO₂ 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, supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich). 24 h after seeding, cells were treated for various times with 2-DG (Sigma-Aldrich) and/or mannose (Sigma-Aldrich) at the indicated concentrations.

Crystal violet staining assay

MDA-MB-231 (2×10^4 cells) and MCF-7 (1.5×10^4 cells) cells were seeded in 96-well plates. Cells were fixed and stained for 20 min with 0.2% crystal violet (Sigma-Aldrich) in 2% ethanol, as previously described [14]. 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 (IC₅₀) was determined.

Western immunoblotting

MDA-MB-231 (8.0×10^5 cells) and MCF-7 (6.5×10^5 cells) cells were seeded in 60 mm-diameter culture dishes. Western blot experiments were performed as described previously [14]. 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 Biotechnology, Heidelberg, Germany), the rabbit polyclonal anti-calumenin (HPA006018, Sigma-Aldrich), and the goat polyclonal antibody anti-Actin (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology) were diluted at 1:1000. The immunostaining was 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).

Metabolic labeling

MDA-MB-231 cells treated for 30 h or not with 2-DG (5 mM) were then metabolically labeled for 2 h with 150 μCi of (2-³H)mannose. The lipid-linked

oligosaccharides (LLO) and the N-linked glycoproteins (N-GP) were extracted and processed as described elsewhere [15].

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

MDA-MB-231 (1.8×10^5 cells) and MCF-7 cells (1.6×10^5 cells) were seeded in 12-well plates. 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 Fisher Scientific). The cDNAs were synthesized and further amplified by PCR as previously described [14]. The primers sequences were: *XBP-1* (NM_005080) forward 5'-TTACGAGAGAAACTCATGGC-3', reverse 5'-GGGTCCAAGTTGTCCAGATGC-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. 25 μ L of the PCR product were mixed with loading buffer (5 μ L) and 15 μ L 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. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories).

Immunocytochemistry

MDA-MB-231 (1.8×10^5) and MCF-7 (1.6×10^5) cells were seeded on glass coverslips in 12-well plates. Cells were fixed and subjected to protein immunodetection and hoechst counterstaining, as previously described [14]. The mouse monoclonal antibody anti-CHOP (SC-7351, Santa Cruz Biotechnology) was diluted at 1:100. Fluorescence labeling 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

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). Production of lactate was calculated by subtracting the blank value (medium without cultured cells) 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 were depicted as mean \pm standard error of the mean (s.e.m) of at least three independent experiments. Statistical analyses 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 were statistically significant.

Results

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

To assess the anti-proliferative properties of 2-DG on breast cancer cells, the hormone-independent MDA-MB-231 and hormone-dependent MCF-7 breast cancer cell lines were treated for 48 h with increasing concentrations of 2-DG. Crystal violet staining revealed that 2-DG-induced a significant dose-dependent decrease of cell number for both cell lines (Fig. 1). The concentration leading to a 50% decrease in cell number (IC_{50}) was 4.2 ± 0.5 and 3.1 ± 0.5 mM in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively. Thus, both the hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines were sensitive to 2-DG.

2-DG triggers transient ER stress in breast cancer cells

To determine whether 2-DG treatment induces ER stress in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, we followed several key players of the UPR: (i) the phosphorylation of the pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), (ii) the cleavage of the inositol requiring enzyme 1 (IRE1)-dependent X-box-binding protein-1 (*XBP-1*) mRNA, and (iii) the expression of the immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP), a luminal ER chaperone [16]. We used concentrations above the obtained IC_{50} values of 2-DG, 5 and 4 mM for MDA-MB-231 and MCF-7 cells, respectively.

In MDA-MB-231 cells, we observed an early and transient increase of PERK phosphorylation, as demonstrated by its transient mobility shift (Fig. 2a). This shift in molecular weight was evident after 6 h of treatment with 2-DG and then progressively disappeared up to 72 h. RT-PCR analysis also revealed a transient cleavage of *XBP-1* mRNA in 2-DG-treated cells (Fig. 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

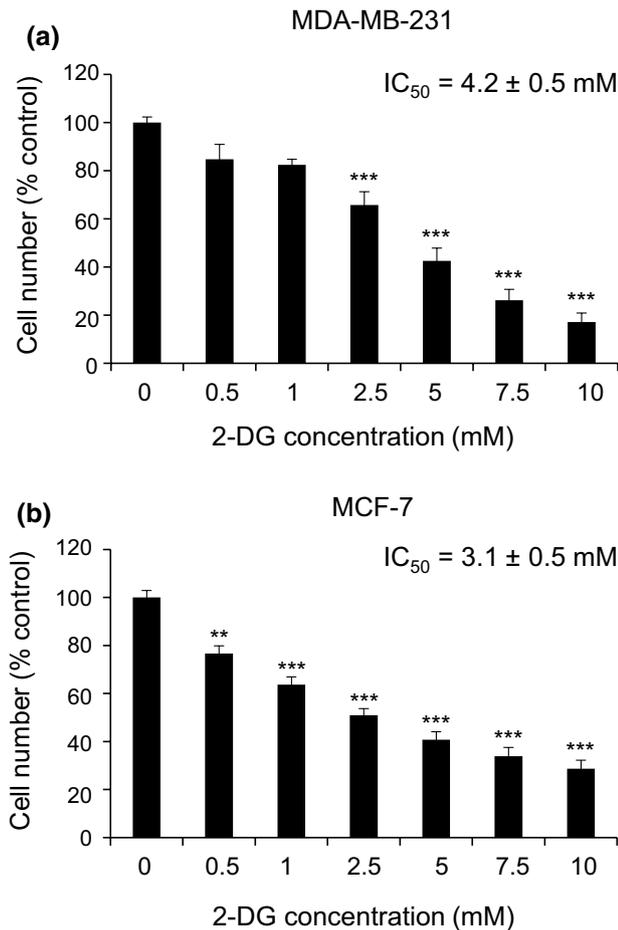


Fig. 1 2-DG induces a decrease in cell number. MDA-MB-231 (a) and MCF-7 (b) cells were treated for 48 h with increasing concentrations of 2-DG. Control cells were not treated. Cell number was evaluated by a crystal violet staining assay and the IC_{50} were determined. Results are depicted as mean \pm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

to 2-DG with a maximum of induction after 24 h and was maintained up to 72 h (Fig. 2a). In MCF-7 cells, 6 h after addition of 2-DG, PERK displayed a high electrophoretic shift which then gradually decreased (Fig. 2a). No evident splicing of *XBP-1* mRNA was detected after exposure to 2-DG (Fig. 2b). The expression of BiP was enhanced with a maximum after 24 h of exposure to 2-DG and decreased after 48 h (Fig. 2a). Control untreated cells did not exhibit any of these modifications.

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 rescue 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

(Fig. 2c). CHOP was still detected after 48 h but the immunostaining intensity was lower. Interestingly, in MCF-7 cells, CHOP protein expression was not induced after 2-DG treatment (Fig. 2c).

Altogether these results demonstrate that 2-DG triggers a transient ER stress, more pronounced in MDA-MB-231 cells than in MCF-7 cells.

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

Based on these results, we then 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 protein glycosylation process. To tackle this point, the steady-state glycosylation status of LAMP2, an extensively N-glycosylated lysosomal resident protein, and calumenin, a single N-linked glycosylated ER protein, were followed in MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed to 2-DG treatment for 24 or 48 h. As presented on western blots (Fig. 3), while a subtle change in the LAMP2 mobility arguing for slight heterogeneity in glycosylation could be observed after 24 h of 2-DG treatment, a stronger increase in LAMP2 gel mobility was observed after 48 h of 2-DG treatment for both cell lines. Moreover, our results also show that 2-DG treatment only affects the steady-state level of LAMP2 in MDA-MB-231 treated cells. Remarkably, when mannose was added to the cell culture, the observed altered gel mobility of LAMP2 was completely suppressed in 2-DG-treated cells. This was clearly the case for both MDA-MB-231 and MCF7 cells. The stability of LAMP2 is rescued in 2-DG-treated MDA-MB-231 cells likely due to the restoration of the N-linked glycosylation pathway. Calumenin also presented a gel mobility shift in 2-DG-treated MDA-MB-231, completely reversed by addition of mannose, whereas no shift was observed in MCF-7 cells (Fig. 3).

In order to assess the ER N-glycosylation defect, metabolic labeling with ($2\text{-}^3\text{H}$) mannose was performed in MDA-MB-231 cells treated or not with 2-DG. Lipid-linked oligosaccharides (LLO) and N-linked glycoproteins (N-GP) were extracted and analyzed by HPLC. The results show that 2-DG treatment affects the ER N-glycosylation process with the appearance of an abnormal Man7GlcNAc2 structure both on LLO and N-GP of 2-DG incubated MDA-MB-231 cells (Fig. 4). 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

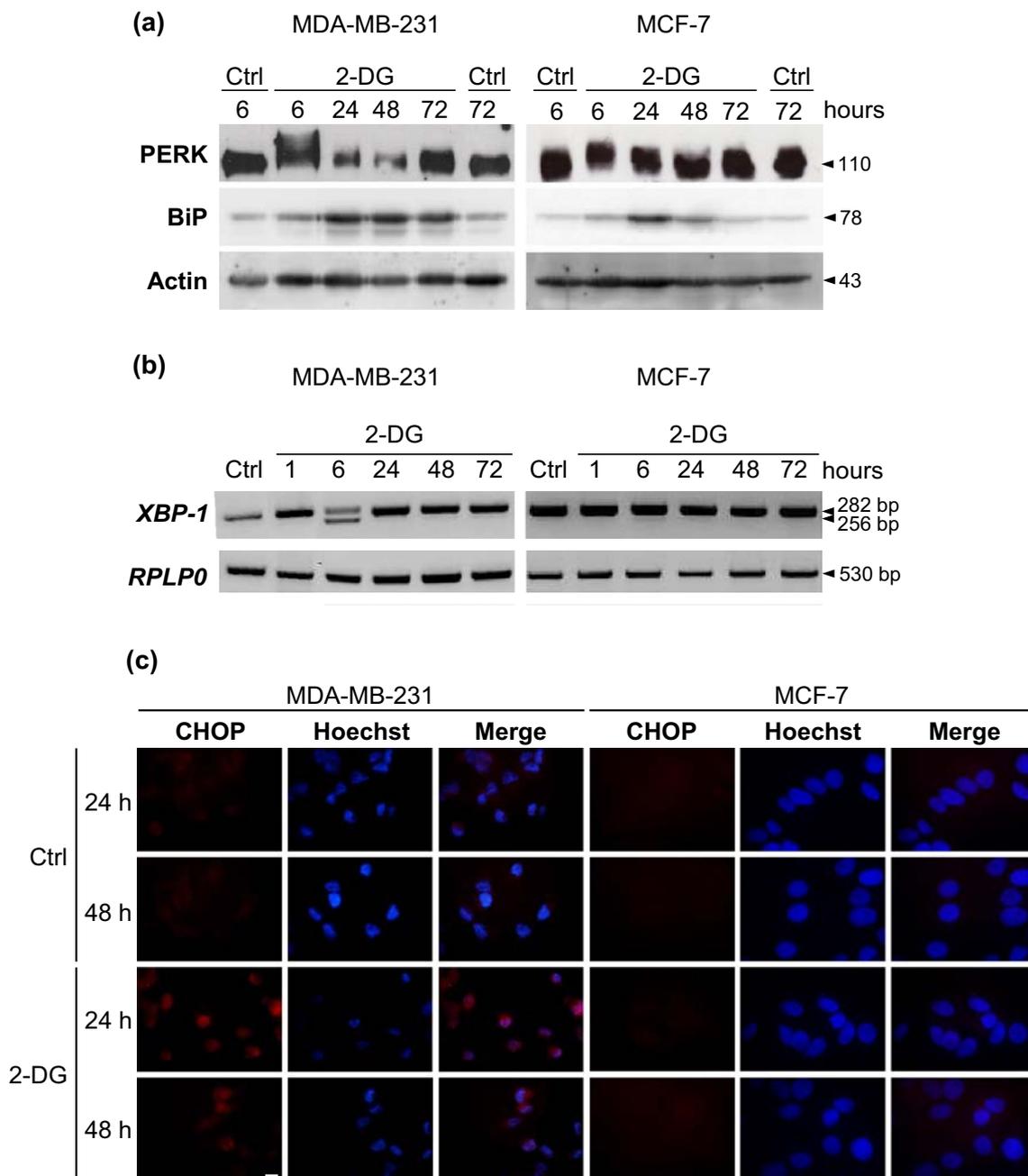


Fig. 2 2-DG triggers a transient ER stress. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated for indicated times with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) or were not treated (Control, Ctrl). Cells were harvested for protein (**a**, **c**) or RNA (**b**) analysis. **a** PERK phosphorylation and BiP expression were 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 to the unspliced and spliced forms of *XBP-1* mRNA, respectively. The housekeeping gene *RPLP0* was used as an internal control. **c** CHOP expression was analyzed by immunofluorescence. 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 μ m

glycosylation of proteins, cells were exposed to 2-DG in the presence or absence of mannose to follow the expression of ER stress markers. 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 (Fig. 5a). Similarly, in MDA-MB-231 cells, the cleavage of *XBP-1* mRNA observed after 6 h of treatment with 2-DG was absent in the presence of mannose (Fig. 5b). The increase in the expression of CHOP induced by a 24 h 2-DG treatment of MDA-MB-231 cells was also

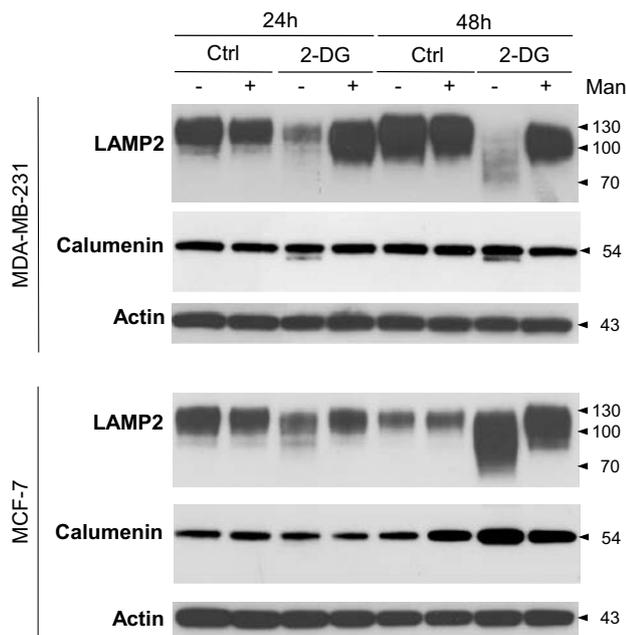


Fig. 3 Mannose prevents the 2-DG-induced alteration of N-linked protein glycosylation. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated or not (Ctrl) with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) in the presence (+) or absence (–) of mannose (Man, 1 mM). Western blot analysis was then performed using anti-LAMP2, anti-calumenin, and anti-actin antibodies. Actin was used as a loading control. Protein MW (kDa) is indicated on the right

highly reduced in the presence of mannose (Fig. 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, addition of exogenous mannose tends to suppress the effects of 2-DG on N-linked glycosylation pathway and ER stress.

2-DG still induces the inhibition 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. After addition of 2-DG, we observed a 2.3-fold and 3.3-fold decrease in lactate production in MDA-MB-231 (Fig. 6a) and MCF-7 cells (Fig. 6b), respectively. Production of lactate was thus significantly reduced in 2-DG-treated cells. Nevertheless, addition of mannose did not impact the induced 2-DG decrease of lactate production in MDA-MB-231 and MCF-7 cells (Fig. 6). These results demonstrate that addition of mannose only suppresses the observed ER stress related to 2-DG-induced inhibition of N-linked glycosylation but does not affect the 2-DG-induced inhibition of glycolysis.

Both inhibition of glycolysis and N-linked glycosylation contribute to 2-DG anticancer activity

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 (Fig. 7). A 70% decrease in the MDA-MB-231 cell number was observed following 2-DG treatment (Fig. 7a). In the presence of mannose, this decrease was limited to 44%. Thus in MDA-MB-231 cells, mannose supplementation only reduced the anticancer effect of 2-DG by 37% (1–44%/70%). In MCF-7 cells, a 42% reduction in the number of 2-DG-treated cells was detected (Fig. 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 partially to the anticancer effects of 2-DG in these breast cancer cells.

Discussion

It has been demonstrated that 2-DG, a known glycolysis inhibitor, reduces energy production in several types of cancer cells [7]. However, 2-DG treatment affects several other intracellular activities and its mode of action is 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 effects 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 and MCF-7 cells were affected by 2-DG. The measured IC_{50} (3.1 and 4.2 mM for MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively) after 48 h of 2-DG treatment were in the millimolar range and in accordance with previously reported values (from 4.2 mM to 10 mM) [17–20]. Differences in sensitivity to 2-DG between breast cancer cell lines have already been reported by Aft et al., with SKBR-3 being the most sensitive one [21]. These differences in sensitivity could be the result of differences in the kinetics of 2-DG uptake. The differences among the studies could be explained by the method used to monitor cell number and by the treatment duration. The culture medium used for cell growth and its glucose concentration could also enter into account [22].

In the present work, using a real-time ($2\text{-}^3\text{H}$)mannose metabolic labeling, we show that 2-DG alters the ER N-glycosylation process in MDA-MB-231 cells, reinforcing the

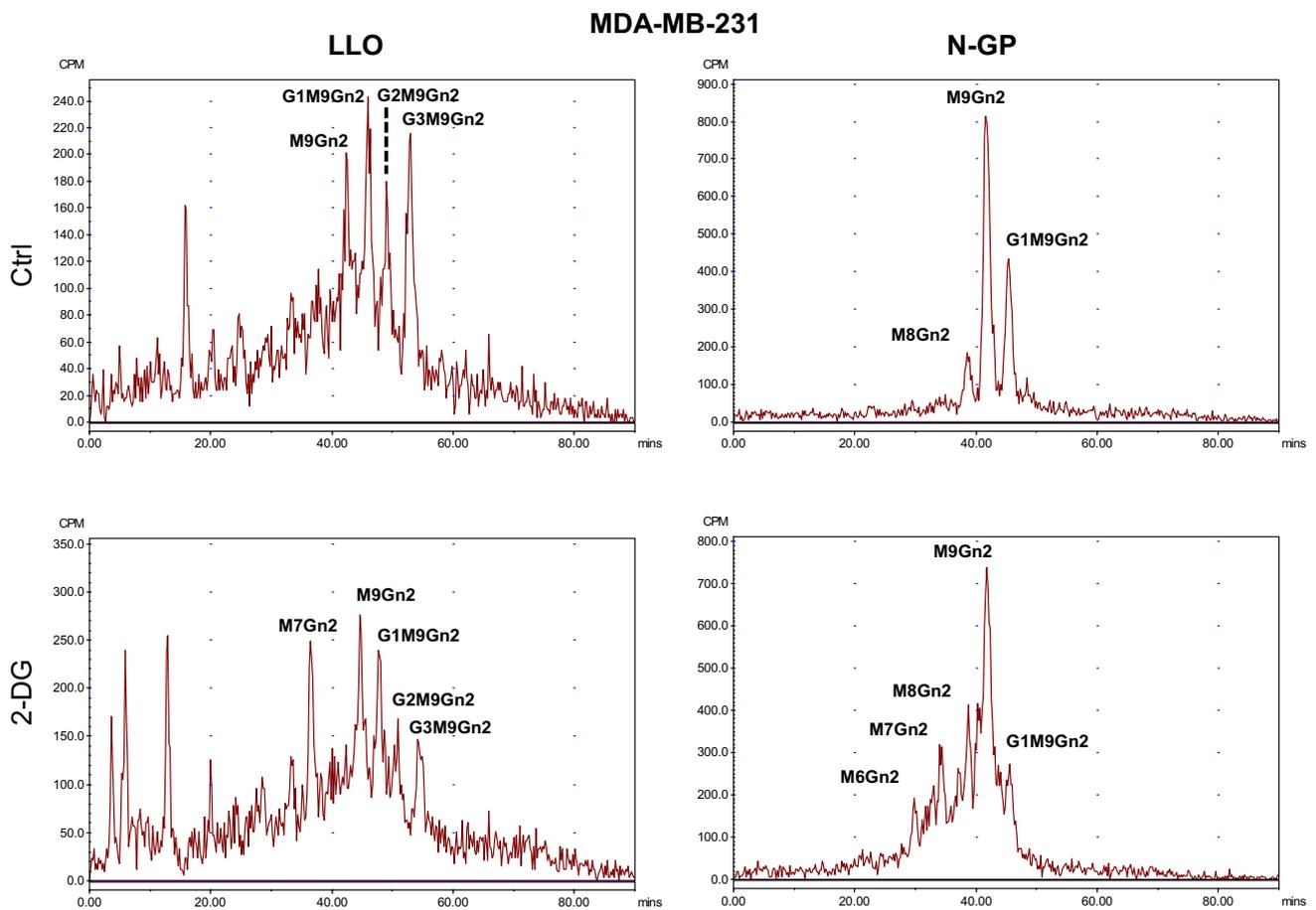


Fig. 4 MDA-MB-231 cells treated or not (Ctrl) with 2-DG (5 mM) were incubated with [^3H]mannose for 2 h. After sequential extraction, LLO and N-GP were analyzed by HPLC as described in Materials and Methods. G1-3M9Gn2 indicates oligomannosides containing

one, two, or three Glc, nine Man, and two GlcNAc residues. M7Gn2, M8Gn2, and M9Gn2 indicate oligomannosides containing seven, eight, or nine Man and two GlcNAc residues, respectively

data obtained by Kurtoglu et al. [13]. 2-DG affects the LLO structures with the appearance of shorter LLO structures that can still be transferred onto newly synthesized glycoproteins, although less efficiently than the Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol. As such, the consequence is the lack of N-glycan structures on certain N-glycosylation sites and the presence of abnormal N-glycan structures transferred onto newly synthesized glycoproteins. 2-DG treatment appears much lighter compared to a treatment with tunicamycin, a strong inhibitor of the N-glycosylation process, which prevents the formation of GlcNAc-PP-dolichol/LLO [23]. Several findings illustrate the importance of glycosylation in tumor growth and malignant transformation but also in the modulation of the responsiveness of cancer cells to treatments [23]. Indeed, in gastrointestinal tumors, 2-DG-induced the reduction of the glycosylation of the proto-oncogene KIT accompanied by inhibition of its phosphorylation and membrane expression [24]. Besides, maintenance of the breast cancer SKBR-3 cells in tunicamycin-containing medium increased

their sensitivity to herceptin and doxorubicin [25]. These data clearly highlight a potential interest for glycosylation inhibitors in breast cancer treatment.

Competition with mannose completely prevents the 2-DG effects on both N-glycosylation process and ER stress activation. These data strongly suggest that ER stress due to the accumulation of unfolded proteins is the consequence of an ER N-linked protein glycosylation pathway alteration observed in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. These results strengthen a set of data obtained in different type of cell lines, including MDA-MB-231 and SKBR-3 breast cancer cells [13, 20, 26–29]. We further demonstrated that ER stress was transient in both cell lines and *XBP-1* mRNA splicing absent in MCF-7 cells. This could be explained by a lower impact of 2-DG on the N-linked glycosylation process in MCF-7 cells, as shown on LAMP2 and calumenin molecular shifting. Moreover, such a difference of sensitivity between the two cell lines is in agreement with other studies. Indeed, thiazolidinediones derivatives ($\Delta 2$ -TGZ and TZD18) and

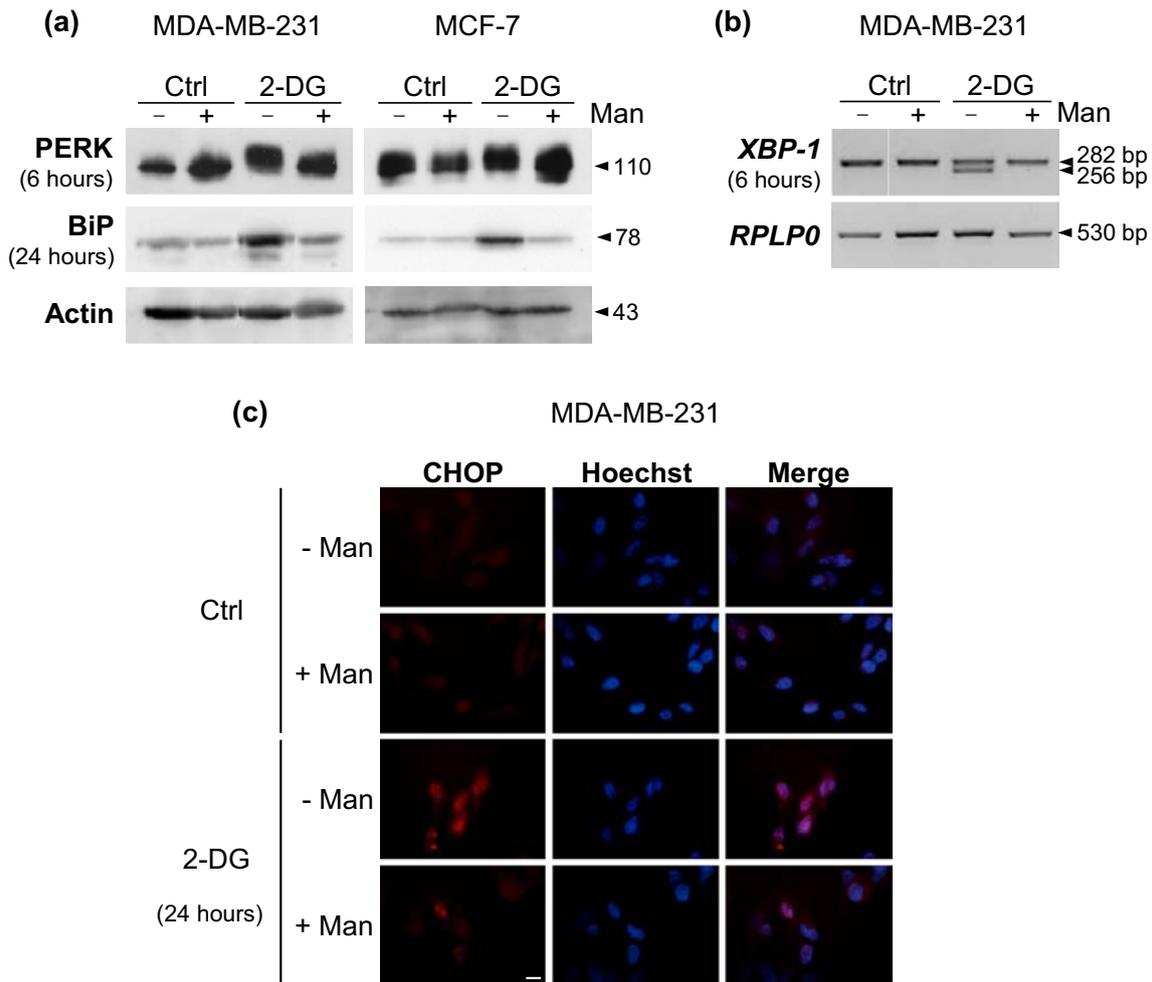


Fig. 5 Mannose prevents 2-DG-induced ER stress. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were treated or not (Control, Ctrl) for indicated times with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) in the presence (+) or absence (–) of mannose (Man, 1 mM). Cells were harvested for protein (**a**, **c**) or RNA (**b**) analysis. **a** Western blot analysis was performed using anti-PERK and anti-BiP antibodies. Actin was used as a loading control. Protein MW (kDa) is 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 μ m

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 [14, 30, 31]. At this time, it is difficult to determine if these differences are a consequence of their different molecular marker expression profile (estrogen receptor).

The induction of ER stress could be protective for the cells [7]. In the case of the 2-DG treatment performed in our study, the results of our competition experiments using mannose disagree with a protective role of ER stress since mannose, a compound that prevents this process, reverses 2-DG cytotoxicity. Such a reversion of ER stress and UPR in the presence of mannose has never been described for these two cell lines but was previously observed in other cell types

[13, 28, 29]. If ER stress is not protective and the cell cannot overcome this process, the up-regulation of CHOP could lead to the activation of an UPR-specific apoptotic pathway [32]. 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. 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 thiazolidinediones [18, 33]. In contrast, in lymphoma and rhabdomyosarcoma cells, 2-DG induces

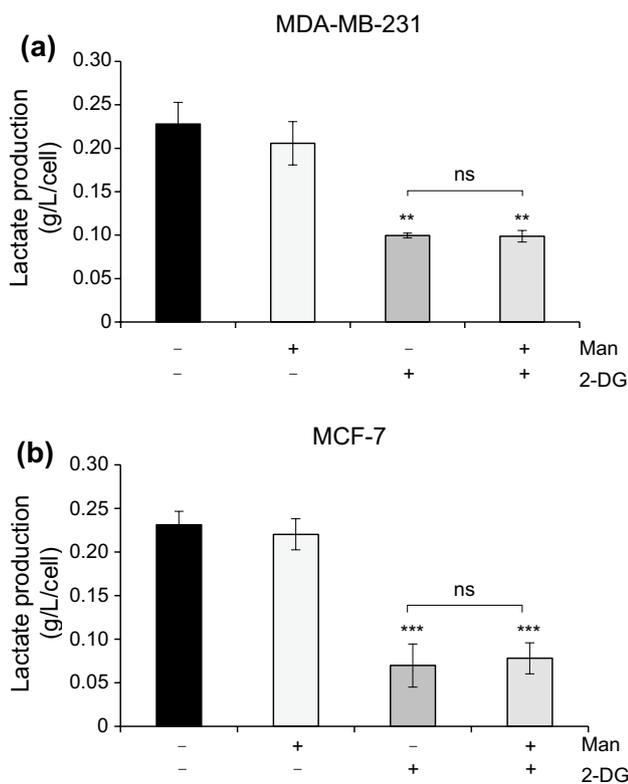


Fig. 6 2-DG reduces lactate production, even in the presence of mannose. MDA-MB-231 (a) and MCF-7 (b) cells were treated or not for 48 h with 2-DG (5 and 4 mM, respectively), in the presence (+) or absence (-) of mannose (Man, 1 mM). Lactate concentration in culture medium was assessed using a biochemistry 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 \pm SEM 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

an UPR-mediated mitochondrial apoptosis involving CHOP and ATF-4 [29, 34, 35]. This discrepancy could be dependent on the cellular context.

Then, we analyzed the effects of 2-DG on glycolysis. We observed in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed to 2-DG for 48 h that lactate production was greatly reduced. 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 [17, 19, 36]. In the presence of mannose, ER stress and UPR did not occur but the decrease in lactate production was still observed in 2-DG-treated cells indicating that mannose did not interfere with glycolysis inhibition, supporting previous data [37]. 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 and that N-glycosylation inhibition does not act alone. This is consistent with results obtained in T cell lymphoma

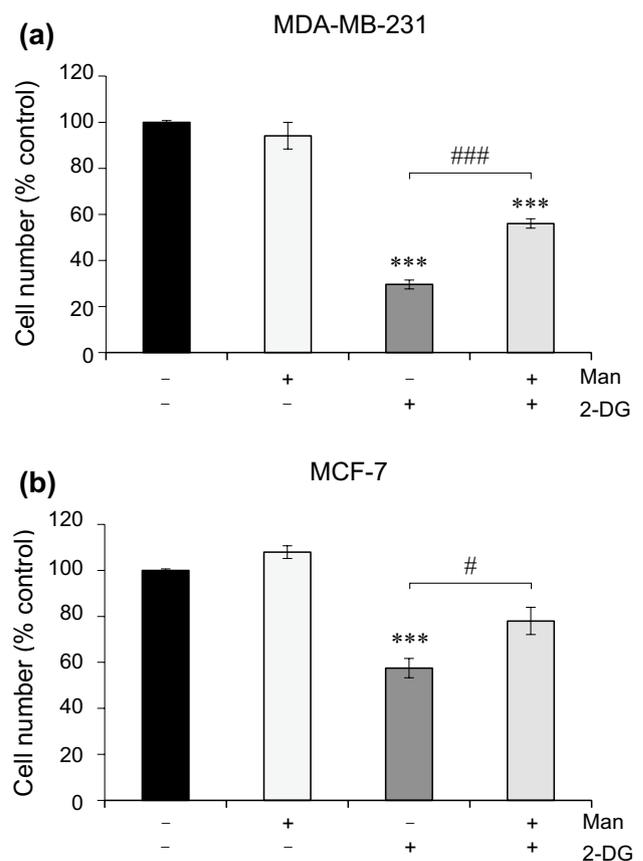


Fig. 7 Effects of 2-DG on cell number are attenuated in the presence of mannose. MDA-MB-231 (a) and MCF-7 (b) cells were treated or not for 48 h with 2-DG (5 and 4 mM, respectively) in the presence (+) or absence (-) of mannose (Man, 1 mM). Cell number was determined by a crystal violet staining assay. Results are depicted as mean \pm SEM 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

cell lines [34] whereas inhibition of N-linked glycosylation has been reported as the predominant mechanism leading to 2-DG's cytotoxicity in other studies [13, 24, 28, 29, 35]. 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 [38]. 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].

To conclude, our data reveal 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. Thus, 2-DG has really to be considered both as a glycolytic and as a glycosylation inhibitor. The right

association and clinical applications of this agent has still to be defined but at this time, increasing our knowledge about its mode of action is crucial.

Funding This project was funded by University of Lorraine and Région de Lorraine. Audrey Berthe and Claire Muller were recipient of a PhD grant of the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

Compliance with ethical standards

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

References

- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011) Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11(5):325–337. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>
- Gambhir SS (2002) Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2(9):683–693. <https://doi.org/10.1038/nrc882>
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11(2):85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4(11):891–899. <https://doi.org/10.1038/nrc1478>
- Zhao Y, Butler EB, Tan M (2013) Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis* 4:e532. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.60>
- Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P (2011) Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2:49. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00049>
- Kuntz S, Mazerbourg S, Boisbrun M, Cerella C, Diederich M, Grillier-Vuissoz I, Flament S (2014) Energy restriction mimetic agents to target cancer cells: comparison between 2-deoxyglucose and thiazolidinediones. *Biochem Pharmacol* 92(1):102–111. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.021>
- Nakada HI, Wick AN (1956) The effect of 2-deoxyglucose on the metabolism of glucose, fructose, and galactose by rat diaphragm. *J Biol Chem* 222(2):671–676
- Chen W, 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
- Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB (1957) Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* 224(2):963–969
- Datema R, Schwarz RT (1978) Formation of 2-deoxyglucose-containing lipid-linked oligosaccharides. Interference with glycosylation of glycoproteins. *Eur J Biochem* 90(3):505–516
- Schmidt MF, Schwarz RT, Scholtissek C (1974) Nucleoside-diphosphate derivatives of 2-deoxy-D-glucose in animal cells. *Eur J Biochem* 49(1):237–247
- Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, Savaraj N, Lane AN, Lampidis TJ (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. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0310>
- Berthe A, Flament S, Grandemange S, Zaffino M, Boisbrun M, Mazerbourg S (2016) Delta2-Troglitazone promotes cytostatic rather than pro-apoptotic effects in breast cancer cells cultured in high serum conditions. *Cell Cycle* 15(24):3402–3412. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1245248>
- Peanne R, Vanbeselaere J, Vicogne D, Mir AM, Biot C, Matthijs G, Guerardel Y, Foulquier F (2013) Assessing ER and Golgi N-glycosylation process using metabolic labeling in mammalian cultured cells. *Methods Cell Biol* 118:157–176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417164-0.00010-0>
- Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, Lavandero S (2013) Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 301:215–290. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-40770-4-1.00005-1>
- Tagg SL, Foster PA, Leese MP, Potter BV, Reed MJ, Purohit A, Newman SP (2008) 2-Methoxyoestradiol-3,17-O,O-bis-sulphamate and 2-deoxy-D-glucose in combination: a potential treatment for breast and prostate cancer. *Br J Cancer* 99(11):1842–1848. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604752>
- Wei S, Kulp SK, Chen CS (2010) Energy restriction as an anti-tumor target of thiazolidinediones. *J Biol Chem* 285(13):9780–9791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065466>
- Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, Thompson HJ (2005) 2-Deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: effects on mammary carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro. *Cancer Res* 65(15):7023–7030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0453>
- Huang YY, Liu H, Li Y, Pu LJ, Jiang CC, Xu JC, Jiang ZW (2013) Down-regulation of RIP1 by 2-deoxy-D-glucose sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol* 705(1–3):26–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.005>
- Aft RL, Zhang FW, Gius D (2002) Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer* 87(7):805–812. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600547>
- Kaplan O, Navon G, Lyon RC, Faustino PJ, Straka EJ, Cohen JS (1990) Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res* 50(3):544–551
- Vasconcelos-Dos-Santos A, Oliveira IA, Lucena MC, Mantuano NR, Whelan SA, Dias WB, Todeschini AR (2015) Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. *Front Oncol* 5:138. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00138>
- Mühlenberg T, Grunewald S, Treckmann J, Podleska L, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S (2015) Inhibition of KIT-glycosylation by 2-deoxyglucose abrogates KIT-signaling and combination with ABT-263 synergistically induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor. *PLoS ONE* 10(3):e0120531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120531>
- Peiris D, Spector AF, Lomax-Browne H, Azimi T, Ramesh B, Loizidou M, Welch H, Dwek MV (2017) Cellular glycosylation affects herceptin binding and sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and growth factors. *Sci Rep* 7:43006. <https://doi.org/10.1038/srep43006>
- Liu H, Kurtoglu M, Cao Y, Xi H, Kumar R, Axten JM, Lampidis TJ (2013) Conversion of 2-deoxyglucose-induced growth inhibition to cell death in normoxic tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 72(1):251–262. <https://doi.org/10.1007/s0028-0-013-2193-y>
- Ramirez-Peinado S, Leon-Annicchiarico CL, Galindo-Moreno J, Iurlaro R, Caro-Maldonado A, Prehn JH, Ryan KM, Munoz-Pinedo C (2013) Glucose-starved cells do not engage in

- prosurvival autophagy. *J Biol Chem* 288(42):30387–30398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490581>
28. Merchan JR, Kovacs K, Railsback JW, Kurtoglu M, Jing Y, Pina Y, Gao N, Murray TG, Lehrman MA, Lampidis TJ (2010) Antiangiogenic activity of 2-deoxy-D-glucose. *PLoS ONE* 5(10):e13699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013699>
 29. Ramirez-Peinado S, Alcazar-Limones F, Lagares-Tena L, El Mjiyad N, Caro-Maldonado A, Tirado OM, Munoz-Pinedo C (2011) 2-Deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 71(21):6796–6806. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0759>
 30. Galluzzi L, De Santi M, Crinelli R, De Marco C, Zaffaroni N, Duranti A, Brandi G, Magnani M (2012) Induction of endoplasmic reticulum stress response by the indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivative CTet in human breast cancer cell lines. *PLoS ONE* 7(8):e43249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043249>
 31. Zang C, Liu H, Bertz J, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E, Eucker J (2009) 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* 8(8):2296–2307. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-09-0347>
 32. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12(7):982–995
 33. Colin-Cassin C, Yao X, Cerella C, Chbicheb S, Kuntz S, Mazerbourg S, Boisbrun M, Chapleur Y, Diederich M, Flament S, Grillier-Vuissoz I (2015) PPAR γ -inactive Δ 2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. *Mol Carcinog* 54(5):393–404. <https://doi.org/10.1002/mc.22109>
 34. Zagorodna O, Martin SM, Rutkowski DT, Kuwana T, Spitz DR, Knudson CM (2012) 2-Deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. *Oncogene* 31(22):2738–2749. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.454>
 35. Leon-Annicchiarico CL, Ramirez-Peinado S, Dominguez-Villanueva D, Gonsberg A, Lampidis TJ, Munoz-Pinedo C (2015) ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. *FEBS J* 282(18):3647–3658. <https://doi.org/10.1111/febs.13369>
 36. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC Jr, Joseph J, Kalyanaraman B (2012) Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res* 72(10):2634–2644. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3928>
 37. Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M, Liu X, Savaraj N, Lampidis TJ (2011) 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol* 67(4):899–910. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1391-0>
 38. Xi H, Kurtoglu M, Lampidis TJ (2014) The wonders of 2-deoxy-D-glucose. *IUBMB Life* 66(2):110–121. <https://doi.org/10.1002/iub.1251>

New desulfured troglitazone derivatives: improved synthesis and biological evaluation

Dorian Dupommier^{a,1}, Claire Muller^{b,1}, Corinne Comoy^a, Sabine Mazerbourg^b, Andrea Bordessa^a, Eline Piquard^a, Manon Pawlak^a, Flavian Piquard^a, Elia De Fay^b, Stéphanie Grandemange^b, Stéphane Flament^b, Michel Boisbrun^{a*}

^aUniversité de Lorraine, CNRS, L2CM, F-54000 Nancy, France

^bUniversité de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France

ABSTRACT

Breast cancer is a major medical threat which cannot be sufficiently addressed by current therapies because of spontaneous or acquired treatment resistance. Besides, triple-negative breast cancer (TNBC) tumors do not respond to targeted therapies, thus new therapeutic strategies are needed. In this context, we designed and prepared new desulfured troglitazone (TGZ)-derived molecules and evaluated them *in vitro* for their anti-proliferative activity, with a special focus on triple-negative breast cancer cell lines. Optimization of the synthetic strategies and deracemization of the lead compound were performed to give highly active compound **10** with low-micromolar potency. Further studies revealed that this compound triggers apoptosis rather than cell cycle arrest as observed with TGZ.

Keywords: Troglitazone, Chromane, Deracemization, Lipase, Breast cancer, Apoptosis

1. Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women worldwide [1]. Current treatments for breast cancer are multimodal with surgery, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapy [2]. However, all types of breast cancers develop resistance to these conventional therapies. A tumor could be resistant to multiple treatment strategies, such as chemotherapy and targeted therapy based on monoclonal antibody treatment [3–5]. Besides, the triple-negative breast cancer tumors (TNBCs), characterized by a lack of expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor HER2, do not respond to targeted therapies. They further present a higher chance of recurrence after treatment with conventional chemotherapeutic agents. TNBCs (15% of breast cancer cases worldwide) are a heterogeneous group of higher grade cancer, with the worst prognosis, compared to other breast cancer subtypes [6]. The

*Corresponding author. Tel.: +33 372 74 52 64;
E-mail address: michel.boisbrun@univ-lorraine.fr (M. Boisbrun).

¹These authors contributed equally to the work.

increasing prevalence of drug resistant cancers and the limited treatment efficacy for TNBCs are strong arguments for the search for new therapeutic agents and optimized therapeutic strategies. In this context, thiazolidine-2,4-diones (TZDs) are studied in order to develop alternative or complementary anticancer agents towards breast cancers. Compounds bearing this moiety were recently proved to be of high interest as they exhibited numerous biological activities [7–11] and many of them showed promising in vitro and in vivo anticancerous properties. In particular, our team developed [12–14] Structure-Activity Relationships (SAR) studies starting from the structure of troglitazone (TGZ) (Figure 1), a molecule formerly used as an antidiabetic. We showed that some structural features both increased the anti-proliferative activity toward breast cancer cell lines and decreased the toxicity against primary cultured non-malignant human hepatocytes. These aspects comprised mainly the introduction of a double bond adjacent to the TZD moiety (yielding Δ^2 -TGZ, Figure 1), and the presence of a lipophilic group on the 6-position of the chromane moiety. Meanwhile, Saha and coworkers [15,16] synthesized some analogs of well-known TZDs such as rosiglitazone (RGZ), pioglitazone (PGZ), and troglitazone (TGZ) which were all used as antidiabetics, due to their affinity for the PPAR- γ receptor. These new compounds were devoid of the sulfur atom in the TZD ring, yielding pyrrolidinedione derivatives. These compounds showed diminished PPAR- γ binding, but also a lower toxicity toward THLE-2 model of primary normal liver cells. Furthermore, they showed enhanced anti-cancer properties; in particular, a desulfured analog of TGZ called trosuccinimide (TSN) was promising. The aim of the present study was to investigate a possible synergistic effect between the desulfuration and our previous SAR studies on the anti-cancer properties of the molecules. Thus, we prepared new desulfured TGZ derivatives bearing or not a double bond adjacent to the TZD moiety, and a lipophilic group at the 6-position of the chromane heterocycle. The inhibition of proliferation of breast cancer cell lines was studied, with a special attention toward cell lines derived from TNBCs, and the impact on cell cycle was also studied. Furthermore, since the chromane moiety of TGZ bears an asymmetric center, we set up a deracemization procedure in order to evaluate the influence of stereochemistry on the activity. Finally, we investigated a vectorization approach in order to still increase the potency of our molecules.

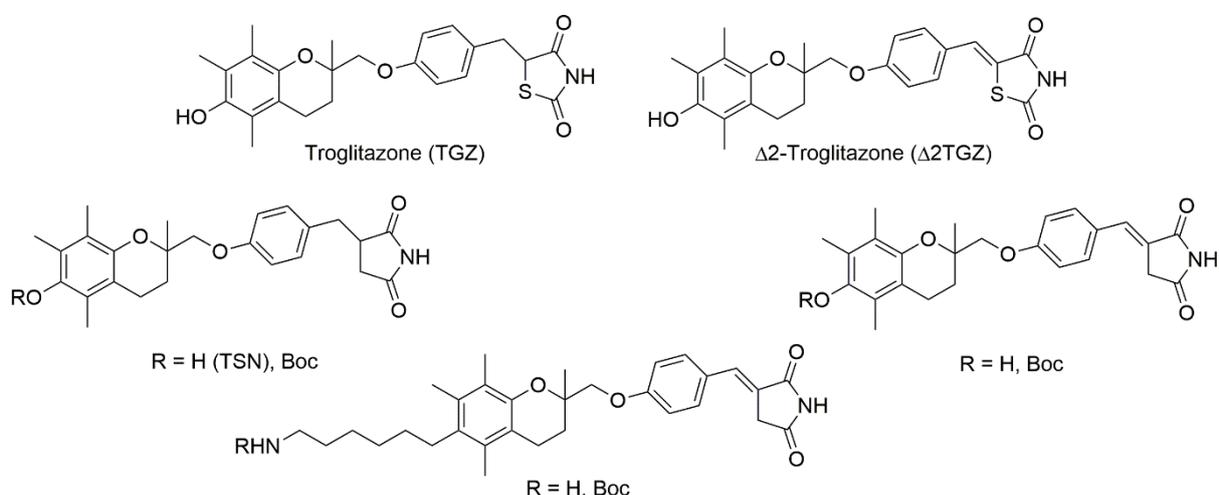
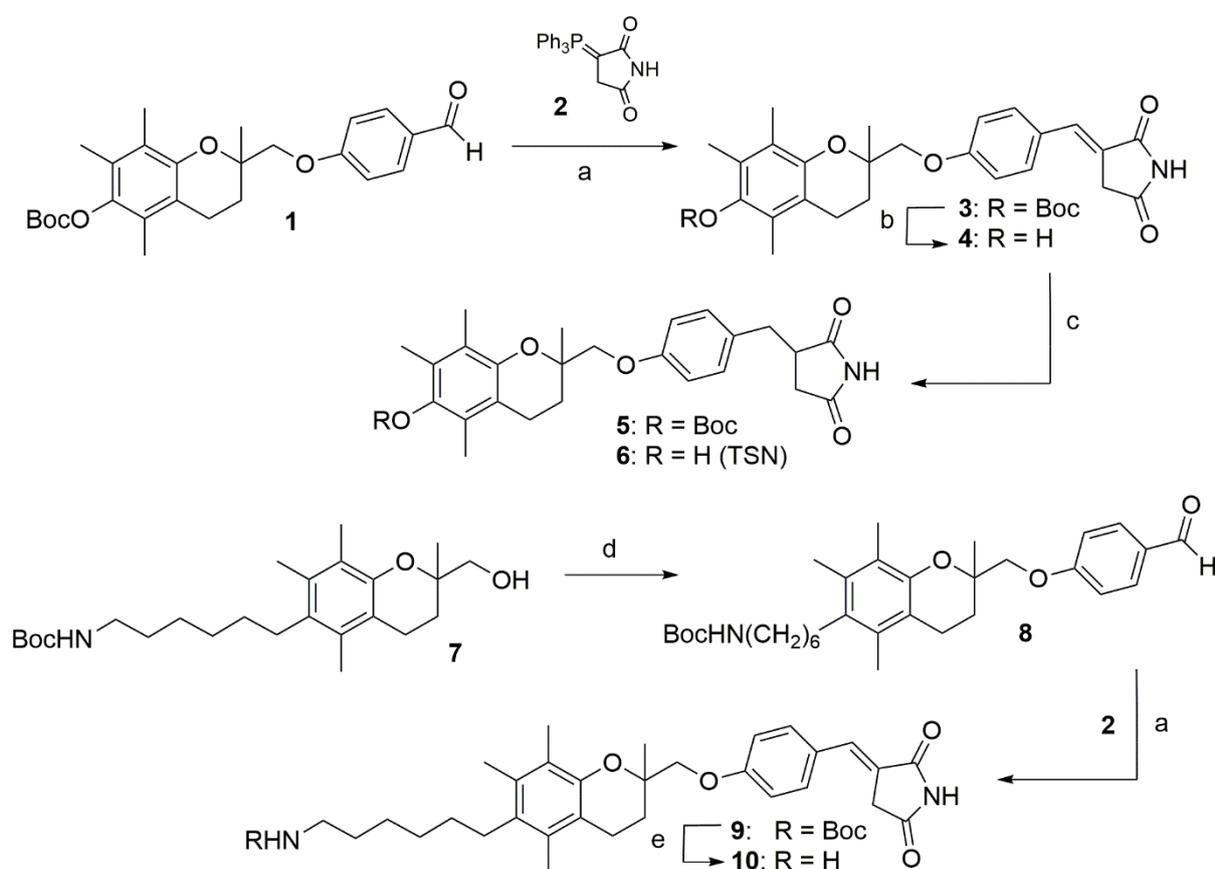


Fig. 1. Structures of troglitazone, Δ^2 -troglitazone, and target desulfured molecules

2. Chemistry

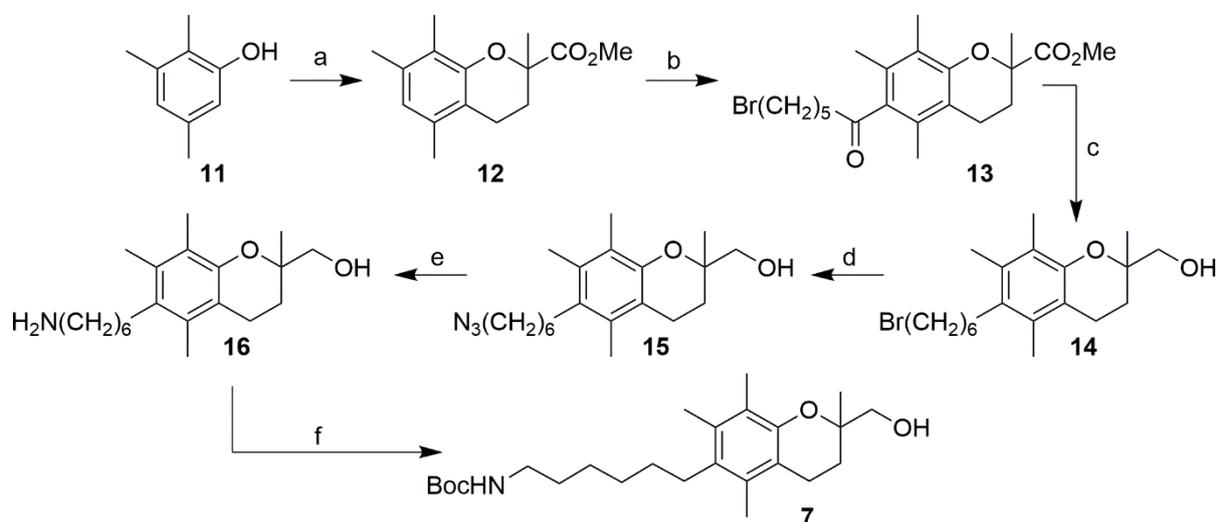
In order to prepare the envisioned desulfured troglitazone derivatives, we decided not to follow the global procedure reported by Saha and coworkers [15], as it was hampered by two very low-yield steps. Indeed, we protected the phenol function of the chromane heterocycle by a Boc group which is very easy to introduce and to remove, compared to the allyl group. Thus, we easily prepared aldehyde **1** using our reported procedure [12] (Scheme 1). It was then reacted with 3-(triphenylphosphoranylidene)pyrrolidine-2,5-dione **2** [15] to give Boc-protected desulfured analog of Δ 2-TGZ **3** in good yield. Acidic treatment easily afforded the deprotected counterpart **4** which we could name Δ 2-TSN. Both **3** and **4** could be reduced by hydrogenation to give saturated compounds **5** and **6** (TSN) in good yield.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) MeOH, RT; (b) TFA, CH₂Cl₂; (c) H₂, Pd/C, EtOAc; (d) Tf₂O, Pyr., CH₂Cl₂, then 4-hydroxybenzaldehyde, Cs₂CO₃, DMF; (e) HCl gas, CH₂Cl₂.

We reported [13] that the introduction of an aminoalkyl group linked to the chromane moiety is even more effective than a Boc group in increasing the anti-proliferative activity. Thus, we prepared alcohol **7** [13] (Scheme 1) and after activation as a triflate, we reacted it with 4-hydroxybenzaldehyde, giving aldehyde **8**. To improve this reported procedure, the latter step was done in the presence of cesium carbonate instead of previously used potassium carbonate. In these conditions, the reaction was complete after 24 h instead of 48 h. Compound **8** was then reacted with **2** as above to give **9**, which was further *N*-deprotected to afford **10**.

Performing nuclear Overhauser enhancement measurements between the methylene protons of the pyrrolidinedione ring and the phenyl protons of compound **9** showed a 5% enhancement of the signal, confirming the (*E*) stereochemistry of the double bond. As compounds **9** and **10** gave interesting biological results (see later), we intended to go further with them. Thus, we had to scale up the synthesis and the preparation of **7** [13] had to be reinvestigated (Scheme 2).



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) (HCHO)_n, methyl methacrylate, AcOH, Bu₂NH; (b) Br(CH₂)₅COCl, AlCl₃, CH₂Cl₂; (c) LiAlH₄, AlCl₃, Et₂O; (d) NaN₃, DMF; (e) H₂, Pd/C, EtOAc; (f) Boc₂O, CH₂Cl₂.

First, we intended to prepare easily chromane **12**. Instead of achieving a three-step procedure [12] starting from commercial trolox, we applied a reported procedure [17] on 2,3,5-trimethylphenol by condensing it with methylmethacrylate and paraformaldehyde. This method afforded **12** in modest (42%) yield, but it was straightforward since after refluxing, a simple filtration afforded a pure compound. Furthermore, as all the starting materials were very cheap and since this reaction was easily scalable, huge quantities (up to 19 g) of the desired compound could be obtained per batch. Besides, when we had to prepare compound **13** at the multi-gram scale following our reported procedure [13], it was difficult to isolate it in sufficient purity. Some by-products were generated and among them, low amounts of the sulfide **17** (Figure 2) could be identified by mass spectrometry. Its formation might be due to a reaction of **12** with remaining traces of highly electrophilic thionyl chloride in the freshly prepared bromohexanoyl chloride. A previous study already described the obtaining of a sulfide from a reaction between thionyl chloride and an aromatic compound [18]. In addition, traces of dimer **18** (Figure 2) were also identified by the same technique. As **17** exhibits a polarity close to the desired compound **13**, it was difficult to remove it by chromatography.

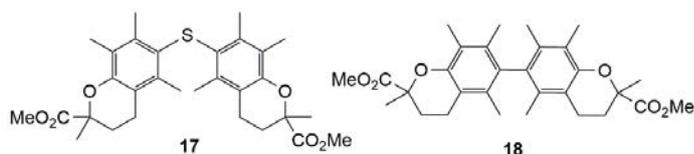
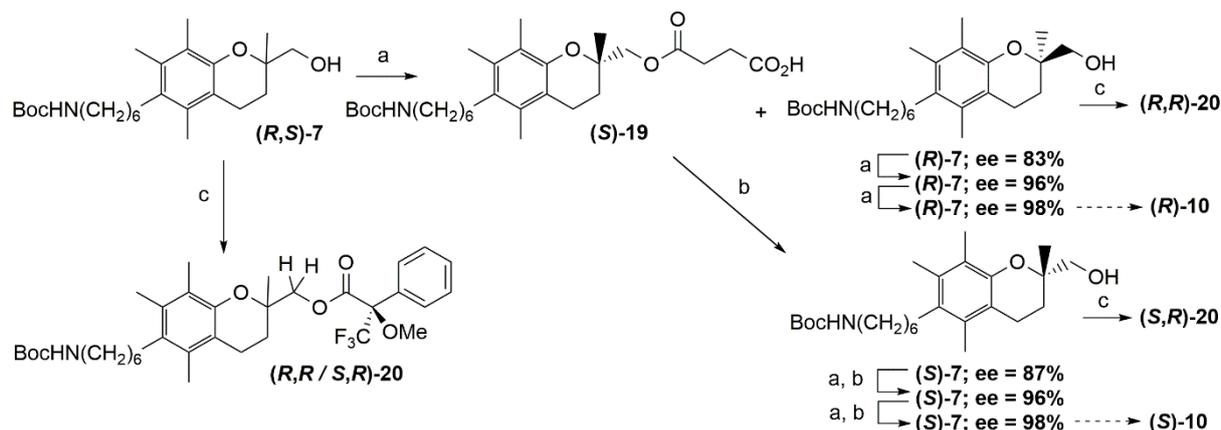


Fig. 2. Structures of by-products **17** and **18** obtained during the Friedel-Crafts reaction.

Thus, in order to avoid such side-products formation, we developed a meticulous workup. Indeed, after careful evaporation of the excess of thionyl chloride, the crude bromohexanoyl chloride was treated with formic acid in order to remove any trace of remaining reactant (see experimental section). The isolation of pure **13** was thus achieved at 6 g scale. Reduction to give **14** and formation of azide **15** proceeded as previously reported [13], but again in order to scale up the whole procedure, we had to change our protocol for the final steps. Indeed, one-pot reduction of azide **15** and protection to give **7** gave tedious results at more than 500 mg scale. Some non-isolated by-products were generated at the hydrogenation step; thus the primary amine **16** could preferentially be chromatographed before protecting it to give multi-gram amounts of **7** with high purity.

Since the chromane moiety contains an asymmetric carbon, it was challenging to separate both enantiomers of our lead structures in the search for a difference in anti-proliferative activity. In our hands, chiral chromatography failed to separate both isomers of either compound **9** or **10**. Thus, we intended to separate them by a kinetic resolution method. Hyatt and Skelton reported [19] on the separation of both enantiomers of (*R,S*)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-chromanmethanol through a succinic anhydride acylation catalyzed by supported Amano lipase PS. Thereby, we applied this technique to racemic alcohol **7**, considering that the protected aminoalkyl chain should not interfere with the acylation reaction which would take place at the other side of the heterocycle. Indeed, after 18 hours of reaction and according to TLC, approximately half of **7** was converted to the expected acid-ester **19**, together with remaining **7** (Scheme 3). Unlike Hyatt's work, the acid-ester **19** was too lipophilic to be isolated by aqueous basic extraction, nevertheless both compounds were easily separated by column chromatography. Subsequently, **19** was saponified to give the expected alcohol. According to Hyatt and Skelton work, we assume that the stereoselection should be identical, thus the lipase should preferentially catalyze the acylation of the (*S*) isomer of **7**, giving (*S*)-**19** (Scheme 3).



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) Succinic anhydride, supported Amano Lipase PS, MTBE; (b) LiOH, THF/MeOH; (c) (*R*)-Mosher acyl chloride, CDCl₃, C₅D₅N, C₆D₆.

The enantiomeric excess of (*R*)-**7** and (*S*)-**7** were evaluated by coupling these compounds with (*R*)-Mosher acyl chloride as reported[20] (Scheme 3) to give the corresponding esters (*R,R*)-**20** and (*S,R*)-**20** (Scheme 3, Figure 3). The relative amounts of the resulting diastereomers were evaluated by ¹H NMR, since each oxymethylene group gave an AB system between 4.00 and 4.35 ppm, without overlapping with any other signals. After one

lipase reaction, the deduced ee was 83% in one case and 87% for the other case. It reached 96% after two reactions for both isomers, and 98% after three reactions (Figure 3). Compounds (*R*)-**7** and (*S*)-**7** with 98% ee were subsequently used as substrates for a 3-steps synthesis leading to (*R*)-**10** and (*S*)-**10** as described before. We payed attention to the possibility of racemization of the chiral carbon atom during the final acidic deprotection leading to the desired final compounds. We first examined the stability of the stereochemistry of compound (*S*)-**7** in acidic conditions. In a first attempt, we noticed that it led to partial decomposition. We thus easily acetylated (*S*)-**7** and then deprotected it with HCl to give the

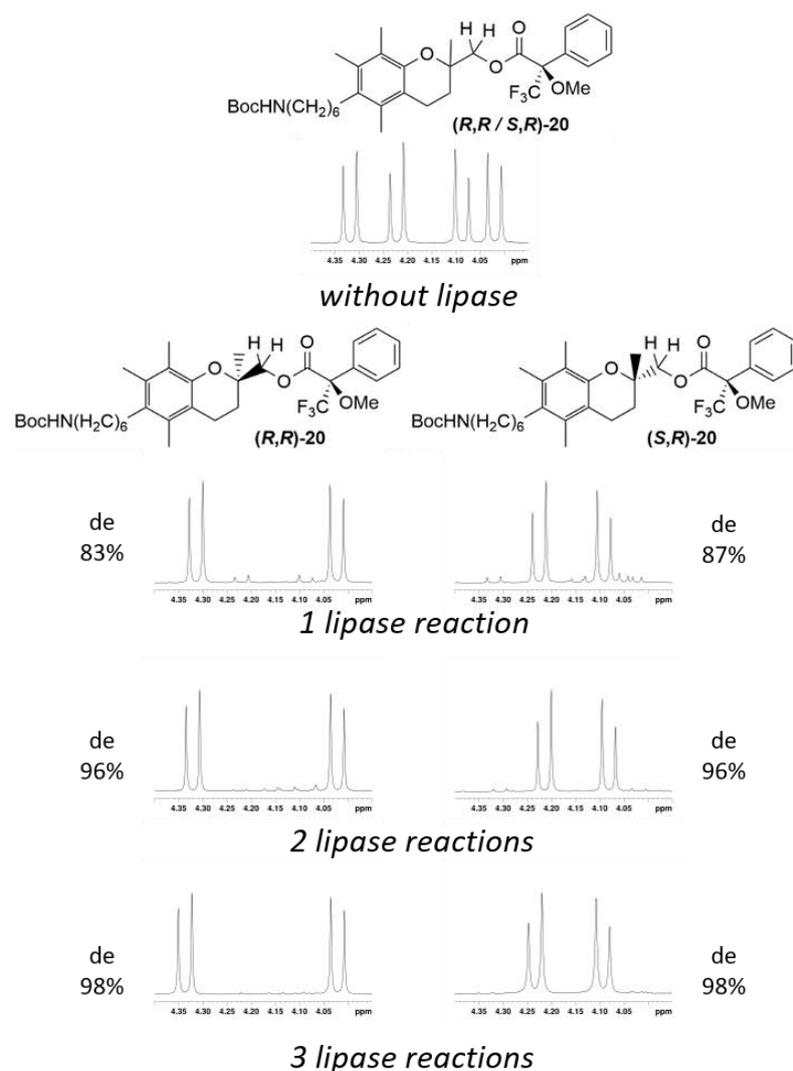
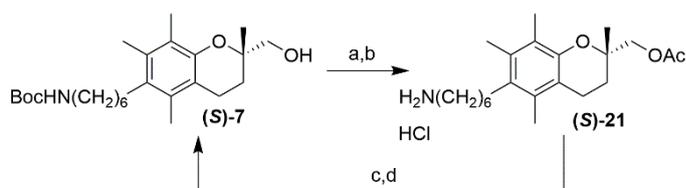


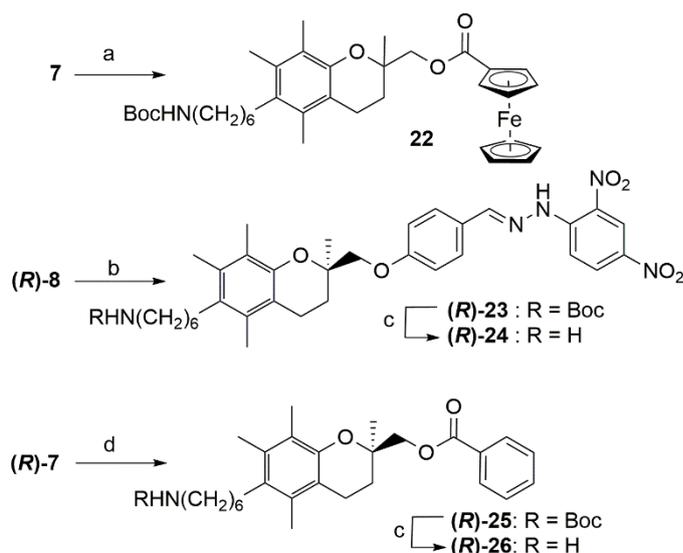
Fig. 3. Parts of NMR spectra (400MHz, 4.00-4.35 ppm range) showing the AB system of the oxomethylene group of ester **20** obtained from **7** as a racemic or after one, two, and three kinetic resolution reactions.

primary ammonium chloride (*S*)-**21** (Scheme 4). It was then re-protected and deacetylated to give back the starting compound. The latter was coupled with Mosher acyl chloride as previously and the deduced ee was the same than the starting material one. Furthermore, it was also comforting that (*R*)-**10** and (*S*)-**10** obtained from (*R*)-**7** and (*S*)-**7** exhibited opposite optical rotation (see experimental part).



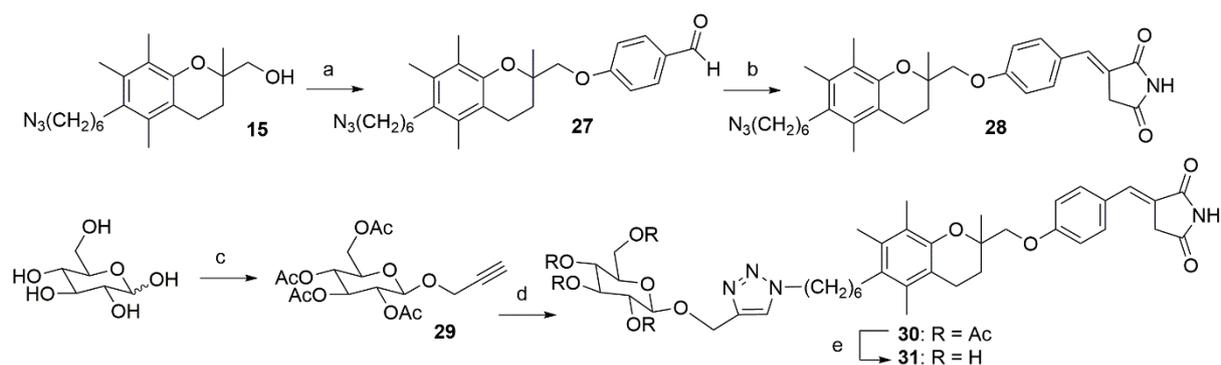
Scheme 4. Reagents and conditions: (a) Ac₂O, Pyr., DMAP, CH₂Cl₂; (b) HCl gas, CH₂Cl₂; (c) Boc₂O, TEA, CH₂Cl₂; (d) LiOH, THF/MeOH.

With the aim of confirming the attributed stereochemistry, we did many attempts in order to get suitable crystals for X-ray diffraction. Since ferrocenyl esters were reported to facilitate the formation of crystals from carboxylic acids [21], ester **22** was prepared from racemic compound **7**, but unfortunately it showed no tendency to give crystals, and acidic removal of the protecting group resulted in decomposition of the structure (Scheme 5). As we had success in getting crystals from dinitrophenylhydrazones [22], we condensed aldehyde (**R**)-**8** with 2,4-dinitrophenylhydrazine to give hydrazone (**R**)-**23** in good yield, which could be deprotected to give (**R**)-**24**. Besides, compound (**R**)-**7** was converted to benzoate (**R**)-**25** which was further *N*-deprotected to give (**R**)-**26** (Scheme 5). Among these compounds, (**R**)-**23** and (**R**)-**26** gave crystals which were submitted to X-ray analysis. For both crystals, diffraction was observed, but with a too-low resolution to be resolved.



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) Ferrocenoyl chloride, *i*Pr₂NEt, DMAP, CH₂Cl₂; (b) 2,4-dinitrophenylhydrazine, MS 4Å, toluene; (c) HCl gas, CH₂Cl₂; (d) Benzoyl chloride, pyridine, CH₂Cl₂.

Besides, we intended to vectorize our lead compound toward cancerous cells by grafting a glucose unit. For this purpose, we envisioned a copper-mediated Huisgen click reaction between an alkyne-derived glucose and an analog of **10** bearing an azide function. Thus, azide **15** was coupled to 4-hydroxybenzaldehyde to give aldehyde **27**, which was in turn reacted with phosphoranylidene **2** to give compound **28** (Scheme 6). D-glucose was peracetylated as previously reported [23] to give β-D-glucopyranose pentaacetate which was reacted with propargyl alcohol to give **29** as described by Murray [24]. Cycloaddition reaction between **28** and **29** was conducted in the presence of in situ generated Cu(I) to give adduct **30**, which could be deacetylated to give target compound **31** in good yield (Scheme 6).



Scheme 6. Reagents and conditions: (a) Tf_2O , Pyr., CH_2Cl_2 , then 4-hydroxybenzaldehyde, Cs_2CO_3 , DMF; (b) **2**, MeOH, RT; (c) Ac_2O , AcONa, then propargyl alcohol, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 ; (d) **21**, CuSO_4 , sodium ascorbate, *t*-BuOH/MeOH; (e) MeONa, MeOH.

3. Biological studies and discussion

The synthesized molecules were tested for their anti-proliferative activity against 4 breast cancer cell lines: one hormone-dependent (MCF-7) and 3 TNBC derived (hormone-independent) (MDA-MB-231, MDA-MB-435, and Hs578T) breast cancer cell lines. The results are expressed as IC_{50} in the Table 1. TGZ and $\Delta 2$ -TGZ, prepared as previously reported [12], were also tested for comparison. The representative dose-dependent responses of MDA-MB-231 cancer cells to TGZ and compound **10** are presented in supplementary data.

Table 1. Anti-proliferative activity of TGZ and some derivatives on different breast cancer cell lines.

Compound	$\text{IC}_{50}^{\text{a}}$			
	MCF-7 ^b	MDA-MB-231 ^c	MDA-MB-453 ^c	Hs578T ^c
TGZ	74.3 ± 3.9	45.5 ± 3.7	67.1 ± 6.1	> 100
6 (TSN)	35.9 ± 3.1	61.2 ± 2.9	35.8 ± 4.1	72.6 ± 6.8
5	15.8 ± 3.9	28.0 ± 2.0	13.6 ± 2.0	38.2 ± 3.4
$\Delta 2$-TGZ	57.0 ± 4.4	56.5 ± 3.3	58.3 ± 4.1	> 100
4	13.2 ± 1.3	32.4 ± 3.3	13.2 ± 1.0	38.9 ± 2.2
3	6.7 ± 0.6	20.6 ± 1.0	3.9 ± 0.4	30.8 ± 1.3
9	4.0 ± 0.2	5.4 ± 0.7	1.04 ± 0.2	6.4 ± 0.8
10	5.8 ± 0.4	5.9 ± 0.1	3.5 ± 0.1	8.8 ± 0.6

^a Concentration (μM) required to decrease tumor cell number by 50% ± SEM (Standard Error of the Mean).

^b Hormone-dependent breast cancer cell line.

^c Hormone-independent breast cancer cell line.

First of all, we could notice that the highest IC₅₀ values (corresponding to the lowest activities) were obtained with the Hs578T cell line, while the most sensitive cell line (except for TGZ) was MDA-MB-453. Hs578T cells were not sensitive to TGZ and Δ2-TGZ, but the IC₅₀ of all the other molecules were lower than 100 μM, whatever the cell line. Removal of the sulfur atom of TGZ yielded **6** and our tests confirmed that this molecule (named TSN in other studies) was more active than TGZ, except against the MDA-MB-231 cell line. The lipophilic Boc-derived compound **5** was approximately two-fold more active than **6**, in accordance with our previous results in the sulfured series [12]. Δ2-TGZ showed a slightly better potency than TGZ as expected, and the removal of the sulfur afforded **4** (which we could name Δ2-TSN), which was more potent than both Δ2-TGZ and the related saturated compound **6**. Thus, the presence of the double bond shows a synergistic effect with the removal of the sulfur atom. It is interesting to notice that the introduction of the double bond on **6** to give compound **4**, has the same enhancing effect on the activity than the adjunction of the Boc group on **6**, as **4** and **5** have c.a. the same anti-proliferative activity toward each cell line. Furthermore, the adjunction of the Boc group on **4** afforded very active compound **3**, with low micromolar activity on two cell lines. Finally, the addition of a *N*-Boc protected aminoalkyl chain gave compound **9**, which showed a further fourfold increase in potency compared to **3** for the three hormone-independent breast cancer cell lines, and a lower effect against MCF-7. Removal of the Boc protecting group yielded **10** which showed a slightly lower activity than **9**. Altogether, one can notice that the removal of the sulfur atom has a synergistic effect with the chemical modifications which were previously showed to increase the potency, i.e. the presence of a double bond and of a lipophilic group at the 6-position of the chromane heterocycle. This approach led to very active compounds **9** and **10** with low-micromolar activities. Because of its lower lipophilicity, we chose compound **10** for further consideration.

First, as depicted above we used a kinetic resolution method to separate both enantiomers of compound **10**. It allowed us to evaluate the anti-proliferative activity of each isomer. We tested them against two representative breast cancer cell lines: a hormone-dependent one (MCF-7) and a triple negative (hormone-independent) one (MDA-MB-231). The measured IC₅₀ were quite surprising (Table 2). Concerning MCF-7, both (*R*) (10.9 μM) and (*S*) (9.9 μM) isomers were significantly less active than the racemic compound (5.8 μM). On the other hand, the opposite was seen concerning the MDA-MB-231 cell line: both isomers were more active than the racemic compound (5.9 μM), (*S*) derivative being the most potent one with IC₅₀ = 2.7 μM. It is quite difficult to rationalize, since we expected to have the anti-proliferative activity of the racemic compound as being roughly the mean of the IC₅₀ of the two enantiomers in both cell lines. Without knowledge about the exact target of this family of compounds, one may however estimate that concerning the hormone-dependent cell line, both enantiomers have a synergistic action whereas in the hormone-independent one, when they are mixed in the racemic mixture, they somehow impede each other.

Furthermore, we envisioned to vectorize our lead compound in order to preferentially target cancer cells. Due to the famous Warburg effect [25,26], the rate of the aerobic glycolysis is higher in cancerous cells than in normal cells, leading to an overexpression of the glucose receptors. Thus, we chose a strategy consisting in the addition of a glucose unit to our compound. Numerous examples of this strategy have been reported [27]. As depicted above, azide analog **28** was easily prepared, which was linked to an alkyne-derived peracetylated

glucose via a copper-mediated cycloaddition, giving **30**. Final deacetylation gave target compound **31**. As depicted in Table 2, the azide intermediate **28** kept a fair anti-proliferative activity, but lower than compound **10**. Grafting the peracetylated glucose unit (giving **30**) totally abrogated the anti-proliferative activity toward MDA-MB-231 hormone-independent breast cancer cell line, but some activity was kept toward MCF-7 cell line, at the same level as TSN (**6**). Finally, the deprotected target compound **31** showed no activity against both cancer cell lines (Table 2). It seems clear that the nature of the substituents located at the end of the alkyl chain have a strong influence on the anti-proliferative activity. Replacing the primary amine of **10** by an azide group has a negative effect on the activity which could be attributed to the loss of H-bond donor. Unfortunately, the grafting of a glucose moiety is even more detrimental to the activity, in opposition to what was initially planned. In particular, the total absence of activity of compound **31** could find two explanations. First, one could consider that the high polarity of **31** prevents its passive diffusion into the cancerous cells, contrary to the other compounds. From another point of view, the glucose moiety of **31** could lead to a strong anchorage of the molecule on the cell surface via linkage to the glucose receptor, once again preventing any passive diffusion. This time, the loss of activity could be attributed to an unexpected inability of the whole molecular structure to enter the cell through the glucose receptor.

Table 2. Anti-proliferative activity of TGZ derivatives on different breast cancer cell lines.

Compound	IC ₅₀ ^a	
	MCF-7 ^b	MDA-MB-231 ^c
<i>rac</i> - 10	5.8 ± 0.4	5.9 ± 0.1
(<i>R</i>)- 10	10.9 ± 1.7	4.3 ± 0.3
(<i>S</i>)- 10	9.9 ± 0.9	2.7 ± 0.4
28	18.1 ± 1.7	21.7 ± 3.4
30	33.4 ± 7.9	> 100
31	> 100	> 100

^a Concentration (μM) required to decrease tumor cell number by 50% ± SEM (Standard Error of the Mean).

^b Hormone-dependent breast cancer cell line.

^c Hormone-independent breast cancer cell line.

The activity of compound **10** was further characterized in the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. Cell cycle analysis performed by flow cytometry revealed that 23.4 ± 5.8% and 43.9 ± 7% of compound **10**-treated cells were detected in the sub-G1 fraction, corresponding to the apoptotic cells, after 48 and 72 h, respectively (figure 4A). By contrast, in cells exposed to TGZ, there was no significant increase in the number of cells in the sub-G1 fraction compared to control cells (DMSO) (figure 4B). These data are in accordance with our previous results [28] showing that the related compound Δ2-TGZ induced only a slight increase (< 5%) in the proportion of MDA-MB-231 cells number in the sub-G₁ fraction. After 48 h of

TGZ treatment, in comparison to control cells, we observed an increase in the proportion of cells in the G₀/G₁ phase ($85.5 \pm 0.3\%$ versus $62.6 \pm 0.5\%$) and a decrease in the proportion of cells in the S phase ($2.3 \pm 0.2\%$ versus $15.7 \pm 0.4\%$) and G₂/M phase ($10.4 \pm 0.6\%$ versus $20.5 \pm 0.6\%$). The situation was similar after 72 h: $80 \pm 3.8\%$ versus $62 \pm 2.7\%$ in G₀/G₁ phase; $1.9 \pm 0.1\%$ versus $13.1 \pm 1.2\%$ in S phase; $12.2 \pm 0.8\%$ versus $19.5 \pm 0.5\%$ in G₂/M phase. This indicates a cell cycle arrest in the G₀/G₁ phase induced by TGZ that we also previously reported in MDA-MB-231 cells after exposure to the related compound $\Delta 2$ -TGZ [28]. In compound **10**-treated cells, we observed a global decrease in the cell number in the three phases of the cell cycle after 48 and 72 h of treatment. After a 48 h treatment, this decrease was significant only for cells in the S phase ($8 \pm 0.8\%$ versus $14.8 \pm 0.2\%$). After 72 h of treatment, the decrease was significant for cells in the G₀/G₁ phase ($35 \pm 3.9\%$ versus $62.4 \pm 1\%$) and for cells in the S phase ($6.1 \pm 0.9\%$ versus $11.8 \pm 0.9\%$). Thus, in contrast to TGZ and $\Delta 2$ -TGZ which are cytostatic agents inducing a cell cycle arrest in G₀/G₁ phase, compound **10** appears as a potent pro-apoptotic molecule.

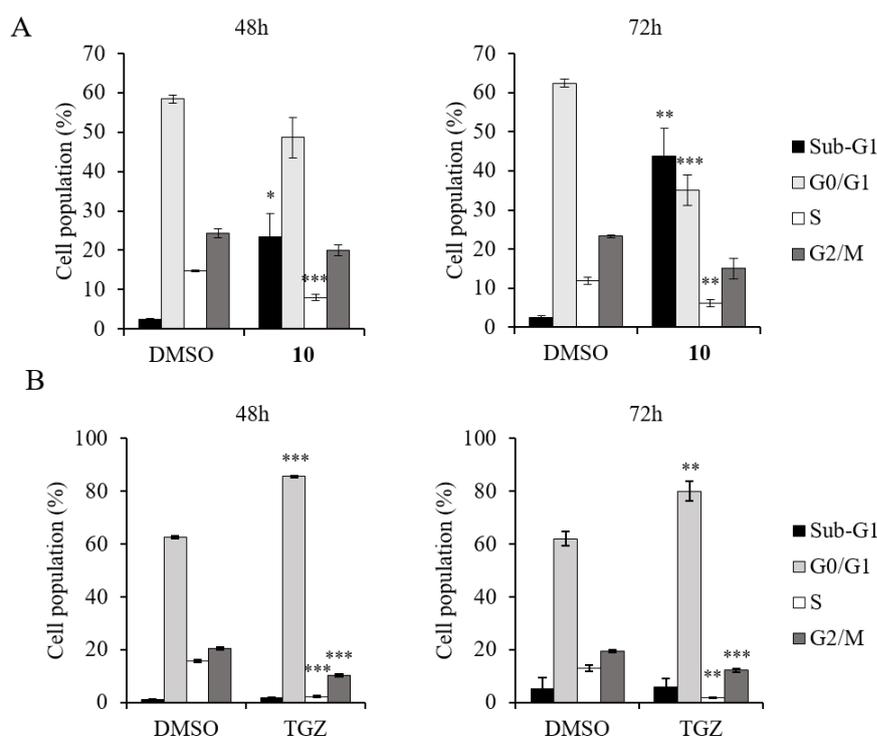


Fig. 4. Compound **10** increases the sub-G₁ population of MDA-MB-231 breast cancer cells whereas TGZ induces cell cycle arrest. MDA-MB-231 cells were treated for indicated times with 6 μ M of **10** (A), 45 μ M of TGZ (B) or DMSO for control cells. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. Bar diagrams represent the percentage of cells in the different phases of the cell cycle. Data are represented as mean \pm standard error of the mean of at least three independent experiments. Statistical significances of treated cells compared to control cells are indicated (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

To confirm the pro-apoptotic activity of compound **10**, caspase 3/7 activity was measured after 48 and 72 hours of treatment (figure 5A). Compound **10** induced a 2.7-fold and 1.4-fold increase of MDA-MB-231 caspase 3/7 activity after 48h and 72h treatment respectively, compared to control cells. The lower, but significant, increase in caspase 3/7 activity after 72 hours of treatment could be explained by the 1.7-fold increase in the basal level of caspase 3/7 activity in control cells between 48 h and 72 h conditions. To comfort these data, we further determined

the percentage of apoptotic cells by propidium iodide (nuclear labelling of dead cells) and FITC-Annexin V double-staining followed by flow cytometry analysis (figure 5B and 5C). Annexin V is an apoptosis marker able to bind to phosphatidyl serine, a membrane component translocated from the cytoplasmic face of the plasma membrane to the cell surface during apoptosis. Compound **10** induced a 2.3-fold and 3.7-fold ($23.8 \pm 4.3\%$ versus $10.4 \pm 1.3\%$ and $37.4 \pm 4.3\%$ versus $10.2 \pm 0.9\%$) significant increase of the proportion of MDA-MB-231 labelled with FITC-Annexin V after 48h and 72h treatment respectively, compared to control cells (figure 5B and 5C). Overall, these convergent results show that compound **10** is not a cytostatic but a pro-apoptotic agent in the TNBC cell line MDA-MB-231.

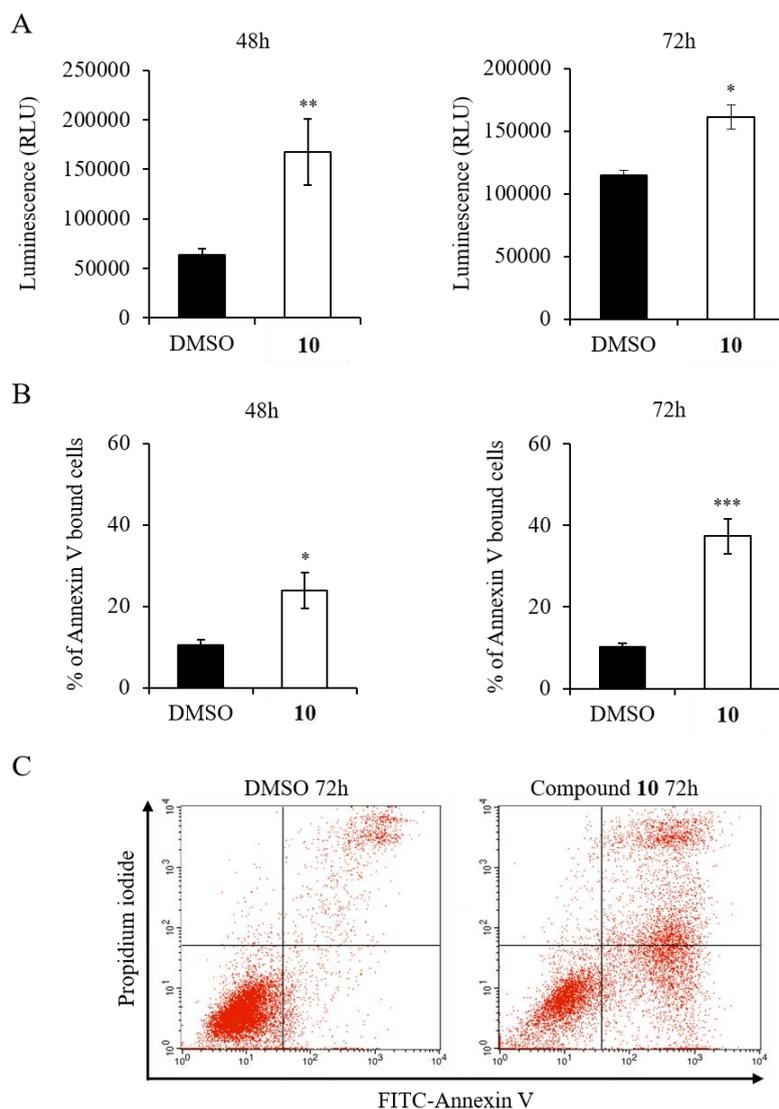


Fig. 5. Compound **10** induces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were treated for indicated times with 6 μ M of **10** or DMSO for control cells. (A) Caspase 3/7 activity was measured by a luminescent method. (B) Double-staining intensity with Propidium Iodide and Annexin V was quantified by flow cytometry and bar graphs show the percentage of apoptotic cells. (C) Dot-plot graphs representative of the flow cytometry analysis: the apoptotic cells annexin V labeled are localized in the lower and upper right quadrants. Data are represented as mean \pm standard error of the mean of at least three independent experiments. Statistical significances of treated cells compared to control cells are indicated (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

4. Conclusion

In this study, numerous desulfured derivatives of TGZ were prepared and tested for their anti-proliferative activity against hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. A clear synergistic effect on the activity was observed between the desulfuration and our previously reported key structural modifications of the TGZ template. This led to very active compounds from which the best ones exhibited low-micromolar activities. Synthetic efforts were done in order to scale up initial procedures at the multi-gram scale and a kinetic resolution method was used to prepare and evaluate both isomers of the most promising compound (**10**). Flow cytometry, caspase 3/7 activity measurement and FITC-Annexin V double staining showed that this compound is clearly a pro-apoptotic agent. Further studies are ongoing in our team to better understand the underlying mode of action of this compound.

5. Experimental protocols

5.1. Chemistry

5.1.1. General methods

Diethylether and toluene were dried using a MBRAUN MB-SPS-800 solvent purification system. Other solvents and liquid reagents were purified and dried according to recommended procedures. Chemical reagents were purchased from Merck, Fisher Scientific or TCI Europe and were used as received. Amano lipase PS from *Burkholderia cepacia* and Hyflo Supercel[®] were purchased from Sigma-Aldrich. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F254, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Merck). Compounds were visualized using UV light (254 nm) and a solution of cerium sulfate tetrahydrate and phosphomolybdic acid in 10% aqueous sulfuric acid as developing agent. Alternatively, a 1% ethanolic solution of ninhydrin or a potassium permanganate aqueous solution were used. Column chromatographies were performed using a Grace Reveleris[®] apparatus using 40 μ M silica gel. NMR spectra were recorded at 303K on a Bruker Avance III 200 (200 MHz for ¹H and 50.3 MHz for ¹³C), DPX250 (250 MHz for ¹H and 62.9 MHz for ¹³C) or on a Bruker DRX400 (400 MHz for ¹H and 100.6 MHz for ¹³C) spectrometer. The chemical shifts are reported in ppm (δ) relative to residual solvent peak [29]. Mass spectra (MS) were recorded on a micrOTOFq (Bruker) ESI/QqTOF spectrometer. Melting points (M.p.) were determined with a Kofler bench and are uncorrected. FTIR spectra were recorded on a Perkin-Elmer spectrum 1000 spectrophotometer using a thin film deposition on NaCl window or KBr pellets, or on a Shimadzu IRAffinity-1 apparatus equipped with an ATR PIKE diamond gladiATR. Optical rotations were measured on an Anton Paar MCP 300 polarimeter (sodium D-line: 589 nm) using a 10 cm cell at 20 °C in CHCl₃ or 10% v/v MeOH in CHCl₃, and the concentration is expressed in g/100mL. Elemental analyses were performed using a Thermofinnigan Flash EA 1112 apparatus.

5.1.2. (*E*)-*tert*-butyl (2-((4-((2,5-dioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl)phenoxy)methyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl) carbonate (**3**)

To a solution of compound **1** (2.30 g, 5.22 mmol) in dry MeOH (160 mL) was added the phosphoranylidene **2** (1.88 g, 5.22 mmol). The suspension was stirred at room temperature under argon for 24 h, filtered, and washed with cooled MeOH. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 80:20) to give 2.01 g (3.85 mmol, 74% yield) of white crystals. M.p. 206-208 °C. IR (film) ν (cm⁻¹): 3163, 2918, 1745, 1703, 1601, 1514, 1342, 1234, 1170, 1155, 1093, 839. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 9H, *t*-Bu), 1.89 (m, 1 H, chromane 3-*HaHb*), 2.04 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 1 H, chromane 3-*HaHb*), 2.64 (m, 2 H, chromane 4-CH₂), 3.57 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, CH₂CO), 3.94, 4.04 (AB system, *J* = 9.5 Hz, 2H, OCH₂), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.55 (br t, 1 H, CH=C), 8.40 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 11.9 (CH₃), 12.0 (CH₃), 12.8 (CH₃), 20.2 (CH₂), 22.9 (CH₃), 27.8 (*t*-Bu), 28.4 (CH₂), 35.2 (CH₂), 72.8, 74.5, 83.0, 115.6 (CH_{arom}), 117.3, 121.6, 123.3, 125.6, 127.0, 127.6, 132.2 (CH_{arom}), 135.0 (CH=C), 141.5, 148.9, 152.4, 160.9, 171.3 (C=O), 174.2 (C=O). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 544.23 ([M+Na]⁺). Anal. Calcd for C₃₀H₃₅NO₇, 1/3 H₂O (527.62): C, 68.29; H, 6.81; N, 2.65. Found: C, 68.35; H, 6.66; N, 2.64.

5.1.3. (*E*)-3-(4-((6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methoxy)benzylidene)pyrrolidine-2,5-dione (**4**)

To a solution of compound **3** (959 mg, 1.84 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) was added trifluoroacetic acid (8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in EtOAc (70 mL), the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 x 50 mL), water (2 x 50 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. The residue was crystallized in EtOH to give 565 mg (1.28 mmol, 70% yield) of white crystals. M.p. 174-176 °C. IR (film) ν (cm⁻¹): 3415, 2975, 1749, 1705, 1651, 1251. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.92 (m, 1 H, chromane 3-*HaHb*), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.10 (m, 1 H, chromane 3-*HaHb*), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.66 (m, 2 H, chromane 4-CH₂), 3.58 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH₂CO), 3.95, 4.04 (AB system, *J* = 9.2 Hz, 2H, OCH₂), 4.27 (s, 1H, OH), 7.00 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.55 (br t, 1 H, CH=C), 8.11 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 11.4 (CH₃), 12.0 (CH₃), 12.4 (CH₃), 20.4 (CH₂), 22.7 (CH₃), 28.9 (CH₂), 35.3 (CH₂), 73.0, 74.1, 115.6 (CH_{arom}), 117.3, 118.7, 121.4, 121.5, 122.9, 126.9, 132.2 (CH_{arom}), 135.1 (CH=C), 145.1, 145.2, 161.0, 171.1 (C=O), 174.0 (C=O). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 460.15 ([M+K]⁺). Anal. Calcd for C₂₅H₂₇NO₅, H₂O (439.51): C, 68.32; H, 6.65; N, 3.19. Found: C, 68.61; H, 6.28; N, 3.30.

5.1.4 *tert*-butyl (2-((4-((2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)methyl)phenoxy)methyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl) carbonate (**5**)

In a round bottom flask was first introduced 10% palladium on carbon (10 mg), in order to avoid any ignition of the solvent. A solution of **3** (100 mg, 0.19 mmol) in EtOAc (10 mL) was then added. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 18 h at room temperature, then filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 70:30) to afford **5** as a colorless foam (45 mg, 0.09 mmol, 47 % yield). M.p. 69-71 °C. IR (ATR): ν (cm⁻¹) 3169, 2928, 1749, 1714, 1609, 1510, 1456, 1367. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.41

(s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 9H, *t*-Bu), 1.88 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.03 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 6H, 2×CH₃), 2.13 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.49 (AB part of an ABX system, *J* = 18.4, 5.0 Hz, 1H, PhCH_{*a*}H_{*b*}), 2.63 (m, 2H, chromane 4-CH₂), 2.72 (AB part of an ABX system, *J* = 18.4, 9.0 Hz, 1H, PhCH_{*a*}H_{*b*}), 2.87 (m, 1H, TZD CHCH_{*a*}H_{*b*}), 3.09-3.19 (m, 2H, TZD CHCH_{*a*}H_{*b*} + CHCH_{*a*}H_{*b*}), 3.84, 3.96 (AB system, *J* = 9.1 Hz, OCH₂), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.95 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 11.9 (CH₃), 12.0 (CH₃), 12.8 (CH₃), 20.3 (CH₂), 23.1 (CH₃), 27.8 (*t*-Bu), 28.4 (CH₂), 34.4 (CH₂), 35.5 (CH₂), 43.0 (CH), 72.7, 74.7, 82.9, 115.2 (CH_{arom}), 117.4, 123.2, 125.1, 127.4, 129.2, 130.2 (CH_{arom}), 141.4, 149.0, 152.4, 158.3, 176.2 (C=O), 179.3 (C=O). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 446.25 [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₂₉NO₅, ½ H₂O (432.52): C, 69.43; H, 6.99; N, 3.24. Found: C, 69.20; H, 7.06; N, 3.05.

5.1.5. 3-(4-((6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methoxy)benzyl)pyrrolidine-2,5-dione (**6**)

In a round bottom flask was first introduced 10% palladium on carbon (10 mg), in order to avoid any ignition of the solvent. A suspension of **4** (100 mg, 0.24 mmol) in EtOAc (10 mL) was then added. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 18 h at room temperature, then filtered on celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure to give a pale yellow foam (91 mg, 0.21 mmol, 89% yield). M.p. 75-77 °C. IR (ATR): ν (cm⁻¹) 3486, 3200, 2922, 1771, 1699, 1608, 1510, 1456, 1418, 1352. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.89 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃), 2.12 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.48 (A part of an ABX system, *J* = 18.5, 4.9 Hz, 1H, PhCH_{*a*}H_{*b*}), 2.64 (m, 2H, chromane 4-CH₂), 2.71 (B part of an ABX system, *J* = 18.5, 9.0 Hz, 1H, PhCH_{*a*}H_{*b*}), 2.88 (m, 1H, TZD CHCH_{*a*}H_{*b*}), 3.07-3.19 (m, 2H, TZD CHCH_{*a*}H_{*b*} + CHCH_{*a*}H_{*b*}), 3.86-3.96 (AB system, *J* = 9.1 Hz, CH₂O), 4.33 (br s, 1H, OH), 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 8.20 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 11.4 (CH₃), 12.0 (CH₃), 12.3 (CH₃), 20.5 (CH₂), 22.9 (CH₃), 28.8 (CH₂), 34.4 (CH₂), 35.4 (CH₂), 43.0 (CH), 72.8, 74.2, 115.2 (CH_{arom}), 117.5, 118.7, 121.4, 122.8, 129.1, 130.1 (CH_{arom}), 145.1, 145.2, 158.4, 176.5 (C=O), 179.5 (C=O). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 446.1936 [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₂₉NO₅, 1/3 H₂O (429.52): C, 69.91; H, 6.96; N, 3.26. Found: C, 70.18; H, 7.02; N, 3.19.

5.1.6 *tert*-butyl (6-(2-((4-formylphenoxy)methyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl)hexyl) carbamate (**8**)

Preparation of the triflate intermediate: to an ice cooled solution of anhydrous pyridine (445 μL, 5.5 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise trifluoromethanesulfonic anhydride (211 μL, 1.3 mmol) under argon. A solution of **7** (385 mg, 0.9 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added 5 minutes later to the reaction mixture. The solution was stirred for 20 minutes at 0 °C and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in EtOAc (15 mL), the solution was washed with water (2 x 10 mL), 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 x 10 mL), and brine (2 x 10 mL). The organic phase was then dried (MgSO₄) and the solvent was removed under vacuum to afford a brownish liquid.

Condensation with 4-hydroxybenzaldehyde: to a solution of the above triflate in dry DMF (4 mL) were added 4-hydroxybenzaldehyde (112 mg, 0.9 mmol) and Cs₂CO₃ (449 mg, 1.4 mmol). The reaction mixture was stirred under argon at room temperature for 24h, and then EtOAc (20 mL) was added. The organic layer was washed with water (2 x 20 mL), 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 x 20 mL), water (2 x 20 mL), dried (MgSO₄) and the solvent was evaporated under vacuum to give a yellow liquid. The residue was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 85:15) to afford **8** (328 mg, 0.63 mmol, 68 % yield) as a colorless liquid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.43 (s, 3H, chromane 2-CH₃), 1.35-1.53 (m, 8H, linker-CH₂), 1.44 (s, 9H, *t*-Bu), 1.90 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.57-2.71 (m, 4H, chromane 4-CH₂, linker CH₂), 3.12 (m, 2H, CH₂NHBoc), 3.98, 4.08 (AB system, *J* = 9.3 Hz, 2H, CH₂O), 4.51 (br s, 1H, NHBoc), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 9.88 (s, 1H, CHO). Other analytical data were in accordance with the previous one [13].

5.1.7. tert-butyl (E)-(6-(2-((4-((2,5-dioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl)phenoxy)methyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl)hexyl)carbamate (9)

To a solution of compound **8** (208 mg, 0.40 mmol) in anhydrous MeOH (10 mL) was added compound **2** (143 mg, 0.40 mmol). The suspension was stirred at room temperature under argon for 12 h. The mixture was filtered and washed with cooled MeOH to give a white powder. M.p. 205-207 °C. IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3381, 2924, 1769, 1705, 1688, 1603, 1514, 1308, 1252, 1163. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.44 (m, 8H, linker CH₂), 1.45 (s, 9H, *t*-Bu), 1.90 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.12 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.59 (m, 2H, linker CH₂), 2.66 (m, 2H, chromane 4-CH₂), 3.12 (m, 2H, CH₂NHBoc), 3.58 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH₂CO), 3.95, 4.05 (AB system, *J* = 9.2 Hz, 2H, OCH₂), 4.50 (br s, 1H, NHBoc), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.55 (br t, *J* = 2.2 Hz, 1H, CH=C), 8.09 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 12.2 (CH₃), 15.1 (CH₃), 16.0 (CH₃), 20.8 (CH₂), 22.9 (CH₃), 26.8 (CH₂), 28.6 (*t*-Bu), 28.8 (CH₂), 30.0 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.3 (CH₂), 35.3 (CH₂), 40.7 (CH₂), 73.0, 74.2, 115.6 (CH_{arom}), 116.9, 121.4, 122.3, 126.8, 131.1, 131.7, 132.2 (CH_{arom}), 133.6, 135.1 (CH=C), 149.1, 156.1, 161.0, 171.0 (C=O), 174.0 (C=O). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 627.34 [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₃₆H₄₈N₂O₆ (604.79): C, 71.50; H, 8.00; N, 4.63. Found: C, 71.75; H, 8.08; N, 4.54.

5.1.8. (E)-3-(4-((6-(6-aminohexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methoxy)benzylidene)pyrrolidine-2,5-dione hydrochloride (10)

To a solution of compound **9** (172 mg, 0.28 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added a saturated solution of HCl in EtOAc (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and the resulting suspension was filtered and washed with Et₂O, giving after drying 89 mg (0.16 mmol, 57% yield) of white powder. M.p. 250-252 °C. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3422, 3218, 2931, 1774, 1698, 1652, 1602, 1510, 1343, 1249, 1186, 1165, 1117, 1071, 835. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.31 (s, 3H, CH₃), 1.36 (m, 6H, linker CH₂), 1.56 (m, 2H, linker CH₂), 1.86 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 1.98 (s, 3H, CH₃), 2.03 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.10 (s, 6H, CH₃

x 2), 2.59 (m, 2H, CH₂), 2.62 (m, 2H, CH₂), 2.76 (m, 2H, CH₂), 3.59 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, CH₂CO), 4.06 (m, 2H, OCH₂), 7.06 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.33 (br s, 1H, CH=C), 7.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.85 (br s, 3H, NH₃⁺), 11.34 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.9 (CH₃), 14.6 (CH₃), 15.6 (CH₃), 20.0 (CH₂), 21.6 (CH₃), 25.7 (CH₂), 27.0 (CH₂), 28.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.6 (CH₂), 34.8 (CH₂), 38.8 (CH₂), 72.6, 74.0, 115.3 (CH_{arom}), 116.6, 121.0, 124.1, 127.0, 130.0, 131.0, 131.4 (CH=C), 132.0 (CH_{arom}), 132.5, 148.5, 160.0, 172.1 (C=O), 175.8 (C=O). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 505.30$ [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₃₁H₄₁ClN₂O₄, ½ H₂O (550.14): C, 67.68; H, 7.70; N, 5.09. Found: C, 67.34; H, 7.47; N, 5.14.

(S)-10 and **(R)-10** were prepared in three steps from respectively **(S)-7** and **(R)-7**. These compounds showed the same spectral data than the racemic compound **10**. Specific data:

(S)-10: $[\alpha]_D^{20} +11.6$ (*c* 0.1 in CHCl₃:MeOH, 9:1). Anal. Calcd for C₃₁H₄₁ClN₂O₄, 2/3 H₂O: C, 67.31; H, 7.71; N, 5.06. Found: C, 67.33; H, 7.54; N, 5.04.

(R)-10: $[\alpha]_D^{20} -11.6$ (*c* 0.1 in CHCl₃:MeOH, 9:1). Anal. Calcd for C₃₁H₄₁ClN₂O₄, H₂O: C, 66.59; H, 7.75; N, 5.01. Found: C, 66.53; H, 7.49; N, 4.88.

5.1.9 methyl 2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylate (**12**)

A solution of 2,3,5-trimethylphenol (25.00 g, 183.57 mmol) in methyl methacrylate (100 mL, 937.87 mmol) was cooled in an ice bath and paraformaldehyde (6.00 g, 100.00 mmol) was added. The mixture was stirred under argon for 15 minutes and acetic acid (5.50 mL, 95.99 mmol) and dibutylamine (3.80 mL, 22.55 mmol) were added and the reaction medium was stirred at 0°C for further 15 minutes. Ice bath was removed and the mixture was heated at reflux for 48 h. The yellow solution was cooled down to room temperature, and then let at 4°C for 12 h. The resulting suspension was filtered and the crystals were washed with cooled MeOH and cooled Et₂O to give after drying 19.15 g (77.10 mmol, 42% yield) of white crystals. M.p. 105-107 °C. IR (ATR): ν (cm⁻¹): 2965, 2920, 1726, 1568, 1447, 1310, 1281, 1206, 1194, 1128, 1109. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.63 (s, 3H, CH₃), 1.88 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.40-2.68 (m, 3H, chromane 3-*H_aH_b*, chromane 4-CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 6.58 (s, 1H, H_{arom}). ¹³C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.5 (CH₃), 18.8 (CH₃), 19.8 (CH₃), 20.5 (CH₂), 25.6 (CH₃), 30.4 (CH₂), 52.5 (OCH₃), 77.5, 116.5, 122.0, 123.4 (CH_{arom}), 133.3, 135.0, 151.5, 174.5 (C=O). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 271.14$ [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₅H₂₀O₃ (248.14): C, 72.55; H, 8.12. Found: C, 72.69; H, 8.16.

5.1.10 methyl 6-(6-bromohexanoyl)-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylate (**13**)

Preparation of the intermediate acyl chloride: a solution of 6-bromohexanoic acid (19.60 g, 100 mmol) and thionyl chloride (21.6 mL, 291 mmol) in dry CH₂Cl₂ (50 mL) was refluxed under argon for 3 hours. The solvent was removed under vacuum for 3 h to remove the excess of thionyl chloride. The resulting colorless liquid was then dissolved in CH₂Cl₂ (15 mL) and formic acid (0.75 mL, 20.00 mmol) was added to remove the last traces of thionyl chloride. The mixture was stirred 2 h at room temperature until no bubbling occurred and used without further purification.

Friedel-Crafts acylation: To the above solution were added AlCl₃ (10.50 g, 78.00 mmol) and anhydrous dichloromethane (10 mL). A solution of **12** (5.00 g, 20.13 mmol) in CH₂Cl₂ (35 mL) was then added dropwise in 20 minutes at 0 °C. 15 minutes after the end of the addition were added EtOAc (250 mL) and water (80 mL). The organic layer was then washed twice with water (80 mL), and with a 5% aqueous solution of potassium bicarbonate (10 x 30 mL) to remove the excess of hydrolyzed acyl chloride, and then with water (50 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and concentrated under vacuum to give a brownish liquid which was further purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 100/0 to 88/12) to afford 6.00 g (14.11 mmol, 70% yield) of a colorless liquid which crystallized upon storage at 4 °C. M.p. 68-70 °C. IR (ATR): ν (cm⁻¹): 2930, 2864, 1746, 1693, 1460, 1435, 1240, 1138, 1111. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.51 (m, 2H, linker-CH₂), 1.61 (s, 3H, CH₃), 1.73 (m, 2H, linker-CH₂), 1.79-1.95 (m, 3H, linker-CH₂ + chromane 3-*H_aH_b*), 1.98 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.39-2.50 (m, 2H, chromane 4-*H_aH_b* + chromane 3-*H_aH_b*), 2.60 (m, 1H, chromane 4-*H_aH_b*), 2.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂CO), 3.42 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂Br), 3.67 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 11.5 (CH₃), 15.7 (CH₃), 16.7 (CH₃), 20.6 (CH₂), 22.7 (CH₂), 25.5 (CH₃), 27.9 (CH₂), 30.4 (CH₂), 32.8 (CH₂), 33.7 (CH₂), 45.6 (CH₂), 52.6 (OCH₃), 77.5 (C_{quat}), 117.1, 122.9, 128.0, 129.7, 135.6, 151.6, 174.1 (ester C=O), 211.5 (ketone C=O). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 447.12 [M+Na, ⁷⁹Br]⁺, 449.12 [M+Na, ⁸¹Br]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₂₉BrO₄ (425.36): C, 59.30; H, 6.87. Found: C, 59.36; H, 6.87.

5.1.11 (6-(6-bromohexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methanol (**14**)

To a suspension of LiAlH₄ (1.82 g, 48.00 mmol) in dry Et₂O (30 mL) under argon was added AlCl₃ (4.27 g, 32.02 mmol). Five minutes later, a solution of AlCl₃ (2.14 g, 16.05 mmol) and **13** (6.82 g, 16.03 mmol) in dry Et₂O (90 mL) was slowly added. The mixture was stirred under argon at room temperature for 2 h, and the reaction was then quenched with cold water (140 mL) and 6 M aqueous H₂SO₄ solution (80 mL). The aqueous layer was extracted twice with EtOAc (100 mL), and the combined organic layers were washed with 2 M Na₂CO₃ aqueous solution (70 mL), dried (MgSO₄) and the solvent was removed under vacuum to give a yellow liquid which was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 100/0 to 88/12) to afford 4.42 g (11.5 mmol, 72% yield) of colorless liquid. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (s, 3H, CH₃), 1.46 (m, 6H, linker CH₂), 1.66-2.08 (m, 5H, linker CH₂ + chromane 3-CH₂ + CH₂OH), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.55-2.79 (m, 4H, linker CH₂ + chromane 4-CH₂), 3.43 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂Br), 3.58, 3.68 (AB system, *J* = 11.4 Hz, 2H, CH₂OH). Other analyses were in accordance with published results [13].

5.1.12. (6-(6-azidohexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methanol (**15**)

A solution of **14** (4.81 g, 12.55 mmol) and NaN₃ (1.63 g, 25.1 mmol) in dry DMF (50 mL) was heated at 80 °C for 3 h. The mixture was cooled to room temperature then diluted with EtOAc (60 mL), washed with water (5 x 30 mL) and with brine (2 x 30 mL). The organic layer was then dried (MgSO₄), and the solvent was removed under vacuum to afford 3.76 g (10.88 mmol, 87% yield) of **15** as a colorless liquid which was used without further

purification. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (s, 3H, chromane CH₃), 1.45 (m, 6H, linker CH₂), 1.54-1.82 (m, 4H, linker CH₂ + chromane 3-*H_aH_b* + CH₂OH), 1.98 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.66 (m, 4H, linker CH₂ + chromane 4-CH₂), 3.28 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N₃), 3.62 (m, 2H, CH₂O). Other analyses were in accordance with published results [13].

5.1.13. (6-(6-aminohexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methanol (**16**)

In a round bottom flask was first introduced 10% palladium on carbon (352 mg), in order to avoid any ignition of the solvent. A solution of **15** (3.52 g, 10.19 mmol) in EtOAc (30 mL) was then added. The mixture was stirred under a hydrogen atmosphere for 18 h at room temperature, then filtered on celite[®], and the resulting solution was concentrated. Column chromatography (eluent: CH₂Cl₂ (+1 % Et₃N)/MeOH, 100/0 to 90/10 in 10 minutes, then 30 minutes in isocratic mode) afforded 2.61 g (8.17 mmol, 80% yield) of slightly yellow liquid. IR (ATR): 2920, 2851, 1570, 1449, 1312, 1105, 1063. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (s, 3H, CH₃), 1.43 (m, 6H, linker CH₂), 1.48 (m, 2 H, linker CH₂), 1.74 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.00 (m, 3H, chromane 3-*H_aH_b* + NH₂), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.58-2.75 (m, 6H, chromane 4-CH₂ + linker CH₂ + CH₂NH₂), 3.58, 3.65 (AB system, 2H, *J* = 11.3 Hz, CH₂OH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 12.2 (CH₃), 15.1 (CH₃), 16.0 (CH₃), 20.7 (2 pics: CH₃ + CH₂), 26.9 (CH₂), 28.0 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.3 (CH₂), 33.2 (CH₂), 40.7 (CH₂), 42.0 (CH₂), 69.6, 75.3, 117.0, 122.2, 131.1, 131.8, 133.5, 149.0. ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 320.26 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₀H₃₃NO₂, ¼ H₂O (323.99): C, 74.14; H, 10.42; N, 4.32. Found: C, 74.42; H, 10.32; N, 4.41.

5.1.14 tert-butyl (6-(2-(hydroxymethyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl)hexyl)carbamate (**7**)

To a solution of compound **16** (1.59 g, 4.98 mmol) in dry CH₂Cl₂ (15 mL) was added under stirring at room temperature Boc₂O (773 μL, 5.0 mmol). After 45 minutes, the solvent was removed under vacuum, and the crude product was diluted in EtOAc (20 mL), the solution was washed with an aqueous 5% citric acid solution (2 x 20 mL), water (10 mL), and brine (10 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and the solvent was removed under vacuum to afford a yellow liquid which was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 100/0 to 80/20 in 20 minutes then 20 minutes in isocratic mode) to afford **7** (2.08 g, 4.96 mmol, 100% yield) as a colorless liquid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.23 (s, 3H, CH₃), 1.45 (s, 9H, *t*-Bu), 1.36-1.53 (m, 6 H, linker CH₂), 1.64 (br s, 3H, linker CH₂ + CH₂OH), 1.72 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.01 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.57-2.70 (m, 4H, chromane 4-CH₂ + linker CH₂), 3.12 (t, *J* = 6.2 Hz, CH₂NHBoc), 3.59, 3.65 (AB system, *J* = 11.2 Hz, 2H, CH₂OH), 4.48 (br s, 1H, NHBoc). Other analyses were in accordance with published results [13].

5.1.15. Deracemization of compound **7**

5.1.15.1. Preparation of the supported Lipase

According to Couladouros *et al.* [17], lipase PS-30 (3 g) and Hyflo Supercel[®] (10 g) were added to a buffered solution (10 mL) of Na₂HPO₄ (117.12 mg) and KH₂PO₄ (82.66 mg) in

distilled water (30 mL, pH 7). The suspension was shaken vigorously then dried under high vacuum for 24 h.

*5.1.15.2. (S)-4-((6-(6-((tert-butoxycarbonyl)amino)hexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methoxy)-4-oxobutanoic acid: ((S)-enriched **19**), first lipase reaction.*

To a stirred solution of **7** (1.00 g, 2.38 mmol) in MTBE (6 mL) were added succinic anhydride (346 mg, 3.46 mmol) and supported Amano Lipase PS (720 mg). After 18 h of stirring at room temperature, the precipitate was filtered, washed with MTBE (5 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc 100/0 to 80/20 in 20 minutes, then 20 minutes in isocratic mode) to give 415 mg of (*R*)-enriched **7** (0.98 mmol, 44% yield) as a white powder and 600 mg of (*S*)-enriched **19** (1.15 mmol, 52% yield) as a slightly trouble liquid. IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3342, 2974, 2924, 2851, 1736, 1711, 1649, 1572, 1510, 1448, 1366, 1246. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 9H, *t*-Bu), 1.33-1.52 (m, 8H, linker CH₂), 1.79 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 1.93 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.56-2.70 (m, 8H, succinate CH₂ x 2, chromane 4-CH₂, linker CH₂), 3.11 (m, 2H, CH₂NHBoc), 4.09, 4.21 (AB system, *J* = 11.2 Hz, 2H, CH₂O), 4.52 (br s, 1H, NHBoc), 5.39 (br s, 1H, CO₂H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 12.1 (CH₃), 15.0 (CH₃), 16.0 (CH₃), 20.7 (CH₂), 22.2 (CH₃), 26.8 (CH₂), 27.1 (CH₂), 28.6 (*t*-Bu), 28.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.2 (CH₂, 2 peaks), 40.8 (CH₂), 69.3, 73.4, 116.7, 122.4, 131.0, 131.5, 133.4, 149.1, 172.0, 176.6. ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 542.31 [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₉H₄₅NO₇ (519.68): C, 67.03; H, 8.73; N, 2.70. Found: C, 66.95; H, 8.88; N, 2.56.

*5.1.15.3. General procedure for the saponification of **19**.*

To a stirred solution of (*S*)-enriched **19** in a 1:1 mixture of THF and MeOH (10 mL per mmol) was added a 3 M aqueous solution of LiOH (3.0 eq). After 30 minutes of stirring at room temperature, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (10 mL), and diluted in EtOAc (25 mL per mmol). The solution was washed with distilled water (3 x 15 mL per mmol), the organic layer was dried (MgSO₄), and the solvent was removed under vacuum to afford (*S*)-enriched **7** which was used without further purification. The NMR spectrum was in accordance with the expected data.

*5.1.15.4. General procedure for the resolution of the racemic compound **7** (second and third lipase reactions).*

Both (*S*)-enriched compound **7** and (*R*)-enriched compound **7** were subjected twice to the same procedure as before. The final yields after the three enzymatic resolutions are given below, taking into account that the maximum theoretical yield is 50%. The resolved compounds exhibit identical spectroscopic data to the racemic alcohol **7**.

(S)-7 : Yield : 22 % [α]²⁰_D +1.1° (*c* 0.1 in CHCl₃), ee = 98%

(R)-7 : Yield : 23 % , [α]²⁰_D -1.1° (*c* 0.1 in CHCl₃), ee = 98%

5.1.15.5. General procedure for the measurement of enantiomeric excess of 7.

According to reported procedure [20], in a NMR tube was introduced a solution of 7 (3-7 mg, 7.15 μmol - 16.68 μmol) in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (0.1 mL) and CDCl_3 (0.1 mL), and (*R*)-Mosher acyl chloride (5 μL , 26.72 μmol) was added. After 3 h reaction, C_6D_6 (0.5 mL) and CDCl_3 (0.1 mL) were added. The NMR signal of interest are displayed in the 4.00-4.35 area as two AB systems for both diastereomers.

5.1.16. Verification of the conservation of the enantiomeric excess in acidic conditions

5.1.16.1. (*S*)-(6-(6-aminohexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methyl acetate hydrochloride ((*S*)-21).

To a stirred solution of (*S*)-7 (100 mg, 0.24 mmol) in dry CH_2Cl_2 (6 mL) were added Ac_2O (24 μL , 0.26 mmol), pyridine (21 μL , 0.26 mmol) and DMAP (3 mg, 0.024 mmol). The mixture was stirred under argon for 16 h and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in dry CH_2Cl_2 (4 mL) and a 1.5 M solution of HCl in EtOAc was added (2 mL, 3.0 mmol). After 3 h stirring at room temperature, the solvents were removed under reduced pressure, and the HCl was co-evaporated twice with CH_2Cl_2 to give a pale-yellow powder, which was suspended in CH_2Cl_2 , filtered, washed with Et_2O (2 \times 5 mL) and with CH_2Cl_2 (2 \times 2 mL) to give 87 mg (0.22 mmol, 92% yield) of white powder. M.p.: 130-132 $^\circ\text{C}$. IR (ATR): ν (cm^{-1}) 2920, 1732, 1658, 1520, 1383, 1240. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.28 (s, 3H, CH_3), 1.45 (br s, 6H, linker CH_2), 1.80 (m, 3H, chromane 3- H_aH_b + linker CH_2), 1.93 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.08 (s, 3H, CH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3), 2.14 (s, 3H, CH_3), 2.18 (s, 3H, CH_3), 2.55-2.67 (m, 4H, chromane 4- CH_2 linker CH_2), 3.00 (m, 2 H, CH_2NH_3^+), 4.07, 4.15 (AB system, $J = 11.2$ Hz, 2H, CH_2O), 8.28 (br s, 3H, NH_3^+). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 12.1 (CH_3), 15.0 (CH_3), 16.0 (CH_3), 20.6 (CH_2), 21.0 (CH_3), 21.9 (CH_3), 26.6 (CH_2), 27.9 (CH_2), 28.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 30.0 (CH_2), 30.1 (CH_2), 40.1 (CH_2), 69.0, 73.5, 116.6, 122.4, 130.6, 131.5, 133.4, 149.1, 171.0 (C=O). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 362.2690$ [M] $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{ClNO}_3$ (397.98): C, 66.40; H, 9.12; N, 3.52. Found: C, 66.28; H, 9.15; N, 3.48.

5.1.16.2. Recovery of compound (*S*)-7 after acidic treatment: conservation the absolute configuration.

To a solution of (*S*)-21 (55 mg, 0.14 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) were added Et_3N (195 μL , 1.4 mmol) and Boc_2O (61 mg, 0.28 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 2 h, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was diluted in a 1:1 mixture of THF and MeOH (4 mL) and an aqueous solution of 3 M LiOH (0.23 mL, 0.70 mmol) was added. After 1 h stirring at room temperature, the reaction was quenched by addition of a saturated solution of NH_4Cl (10 mL), diluted with EtOAc (50 mL) and washed with water (3 \times 10 mL). The organic layer was dried (MgSO_4) and the solvent was removed under reduce pressure. The residue was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc 100/0 to 30/70 in 20 minutes) to give 53 mg of colorless liquid (0.13 mmol, 93% yield). This compound exhibited the same spectral data than the previously

described molecule **7**. Furthermore, its optical rotation and the deduced ee after reaction with (*R*)-Mosher acyl chloride were identical to starting compound (**S**)-**7**.

5.1.17 4-((6-(6-azidohexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methoxy)benzaldehyde (27)

Preparation of the triflate intermediate: to an ice cooled solution of anhydrous pyridine (1.15 mL, 14.29 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise trifluoromethanesulfonic anhydride (560 μL, 3.3 mmol) under argon. A solution of **16** (822 mg, 2.38 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was added 5 minutes later to the reaction mixture. The solution was stirred for 30 minutes at 0 °C and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in EtOAc (30 mL), the solution was washed with water (3 x 20 mL), 5% aqueous NaHCO₃ solution (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic phase was then dried (MgSO₄) and the solvent was removed under vacuum to afford an orange liquid.

Condensation with 4-hydroxybenzaldehyde: to a solution of the above triflate in dry DMF (5 mL) were added 4-hydroxybenzaldehyde (291 mg, 2.38 mmol) and K₂CO₃ (658 mg, 4.76 mmol). The reaction mixture was stirred under argon at room temperature for 5 days, and then EtOAc (50 mL) was added. The organic layer was washed with water (5 x 20 mL), 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 x 20 mL), water (2 x 20 mL), dried (MgSO₄) and the solvent was evaporated under vacuum to give a yellow liquid. The residue was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 90:10) to afford **26** (623 mg, 1.39 mmol, 58 % yield) as a colorless liquid. IR (film) ν (cm⁻¹): 3379, 2930, 2094, 1691, 1601, 1574, 1508, 1310, 1248, 1157, 1109, 1038. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (br s, 9H, CH₃ + 3 x linker CH₂), 1.63 (m, 2H, linker CH₂), 1.92 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.12 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.63 (m, 4H, chromane 4- CH₂ + linker CH₂), 3.28 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N₃), 3.98, 4.08 (AB system, *J* = 9.3 Hz, 2H, OCH₂), 7.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 9.89 (s, 1H, CHO). ¹³C NMR (62.9 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.2 (CH₃), 15.1 (CH₃), 16.0 (CH₃), 20.7 (CH₂), 22.9 (CH₃), 26.8 (CH₂), 28.8 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.8 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.2 (CH₂), 51.6 (CH₂-N₃), 73.1, 74.1, 115.2 (CH_{arom}), 116.9, 122.4, 130.3, 131.0, 131.7, 132.1 (CH_{arom}), 133.6, 149.1, 164.2, 190.9 (CHO). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 472.25 [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₇H₃₅N₃O₃ (449.60): C, 72.13; H, 7.85; N, 9.35. Found: C, 72.50; H, 7.92; N, 9.09.

5.1.18. (E)-3-(4-((6-(6-azidohexyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl)methoxy)benzylidene)pyrrolidine-2,5-dione (28)

To a solution of **26** (0.52 mmol) in anhydrous MeOH (10 mL) was added compound **2** (187 mg, 0.52 mmol) and the mixture was stirred under argon at room temperature for 12 h. The suspension was filtered and washed with cooled MeOH to give 189 mg (0.36 mmol, 69% yield) of white powder. M.p. 130-132 °C. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 2927, 2853, 2085, 1746, 1699, 1601, 1514, 1456, 1352, 1306, 1244, 1175, 1111. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.45 (br s, 6H, linker CH₂), 1.63 (m, 2H, linker CH₂), 1.91 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 1H, chromane-3-*H_aH_b*), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 2.61 (m, 2H, linker CH₂), 2.67 (m, 2H, chromane 4- CH₂), 3.28 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N₃), 3.58 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH₂CO), 3.95, 4.05 (AB system, *J* = 9.3 Hz, 2H, OCH₂), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.56 (m, 1H, CH=C), 8.38 (br s, 1H, NH). ¹³C

NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ 12.2 (CH₃), 15.1 (CH₃), 16.0 (CH₃), 20.7 (CH₂), 22.9 (CH₃), 26.8 (CH₂), 28.8 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.8 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.2 (CH₂), 35.3 (CH₂), 51.6 (CH₂N₃), 73.0, 74.2, 115.6 (CH_{arom}), 116.9, 121.4, 122.4, 126.8, 130.9, 131.7, 132.2 (CH_{arom}), 133.5, 135.0 (CH=C), 149.1, 161.0, 171.3 (C=O), 174.2 (C=O). ESI-MS (pos. mode): m/z = 531.29 [M+H]⁺, 553.28 [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₃₁H₃₈N₄O₄ (530.67): C, 70.16; H, 7.22; N, 10.56. Found: C, 70.50; H, 7.22; N, 10.20.

5.1.19. (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate (29)

Acetylation of α -D-glucose: procedure reported by Wolfrom and Thompson [23] was adapted as follows: to a suspension of α -D-glucose (3.00 g, 16.65 mmol) in acetic anhydride (20.46 mL, 216.47 mmol) was added sodium acetate (1.50 g, 18.32 mmol) under argon. The mixture was refluxed during 2 h and cooled to room temperature before being cooled in an ice bath. Water (50 mL) was added and the suspension was filtered, washed with water (3 x 20 mL), and carefully dried to give 3.618 g (9.27 mmol, 56% yield) of white powder which was used in the next step without further purification.

Propargylation at the 1-position: this step was realized according to the work of Murray et al. [24]. Spectral data of the compound agreed with the reported data.

5.1.20. (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-((1-(6-(2-((4-((E)-(2,5-dioxopyrrolidin-3-ylidene)methyl)phenoxy)methyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl)hexyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate (30)

To a mixture of **28** (138 mg, 0.26 mmol) and **29** (100 mg, 0.26 mmol) were added *t*-BuOH (20 mL) and MeOH (2 mL) and sonication was applied. To the resulting solution was added a mixture of CuSO₄ (58 mg, 0.36 mmol) and sodium ascorbate (71 mg, 0.36 mmol) in water (0.5 mL). The reaction mixture was stirred under argon at room temperature for 12 h, and the solvents were evaporated. The residue was dissolved in EtOAc (30 mL) and the solution was washed with water (3 x 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated under vacuum to give a yellow residue which was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 100:0 to 20:80) to afford **30** as a white powder 171 mg (0.19 mmol, 74 % yield). M.p. 88-90 °C. IR (ATR): ν (cm⁻¹) 2928, 2853, 1748, 1713, 1601, 1510, 1217, 1034. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (m, 9H, chromane CH₃ + linker CH₂ x 3), 1.91 (m, 3H, chromane 3-*HaHb* + triazole-CH₂-CH₂), 1.98 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 2.09 (s, 6H, COCH₃ + chromane CH₃), 2.12 (m, 1H, chromane 3-*HaHb*), 2.14 (s, 3H, chromane CH₃), 2.19 (s, 3H, chromane CH₃), 2.59 (m, 2H, linker CH₂), 2.66 (m, 2H, chromane 4-H), 3.59 (d, J = 2.3 Hz, 2H, CH₂CO), 3.74 (X part of an ABX system, 1H, glucose 5-H), 3.95, 4.04 (AB system, J = 9.3 Hz, 2H, OCH₂), 4.15, 4.27 (AB part of an ABX system, J = 12.3, 4.7, 2.1 Hz, 2H, glucose 6-H + 6'H), 4.35 (br t, J = 7.1 Hz, 2H, linker triazole-CH₂), 4.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H, glucose 1-H), 4.84, 4.95 (AB system, J = 12.6 Hz, 2H, OCH₂), 5.01 (dd, J = 9.5, 8.0 Hz, 1H, glucose 2-H), 5.10 (t, J = 9.6 Hz, 1H, glucose 4-H), 5.20 (t, J = 9.5 Hz, 1H, glucose 3-H), 6.99 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.42 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.50 (br s, 1H, triazole H),

7.55 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, C=CH), 7.88 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 12.2 (CH₃), 15.1 (CH₃), 16.0 (CH₃), 20.7 (2 x COCH₃), 20.8 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 22.9 (CH₃), 26.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 30.0 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.5 (CH₂), 35.3 (CH₂), 50.7 (CH₂N), 62.0, 63.2, 68.5 (glucose CH), 71.4 (glucose CH), 72.0 (glucose CH), 72.9 (glucose CH), 73.0, 74.2, 100.2 (glucose 1-CH), 115.6 (phenyl CH) 116.9, 121.4, 122.4, 122.8 (triazole CH), 126.9, 130.8, 131.7, 132.2 (phenyl CH), 133.5, 135.0 (CH=C), 144.2, 149.1, 161.0, 169.5 (C=O), 169.6 (C=O), 170.4 (C=O), 170.8 (C=O), 171.0 (C=O), 174.0 (C=O). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 917.41$ [M+H]⁺, 939.40 [M+Na]⁺, 955.37 [M+K]⁺. Anal. Calcd for C₄₈H₆₀N₄O₁₄ (917.01): C, 62.87; H, 6.59; N, 6.11. Found: C, 62.39; H, 6.68; N, 6.05.

5.1.21. 3-((E)-4-((2,5,7,8-tetramethyl-6-(6-(4-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)chroman-2-yl)methoxy)benzylidene)pyrrolidine-2,5-dione (31)

A suspension of compound **30** (87 mg, 0.09 mmol) in anhydrous MeOH (5 mL) was sonicated until dissolution. A solution of MeONa in MeOH (2.09 mL, 1.15 mg/mL) was added at room temperature and stirred under argon for 1 h. Amberlite[®] IR 120H was added until neutral pH and the suspension was filtered to give after evaporation an orange liquid which was purified by reverse-phase column chromatography (eluent: H₂O (0.1% TFA)/MeOH, 90:10 to 10:90) to afford after lyophilisation **31** as a white powder 71 mg (0.09 mmol, 100 % yield). M.p. 126-128 °C. IR (ATR): ν (cm⁻¹) 3387, 2914, 2855, 1717, 1684, 1600, 1340, 1306, 1250, 1165, 1076, 1043, 525. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.31 (m, 7H, chromane CH₃ + linker CH₂ x 2), 1.39 (m, 2H, linker CH₂ x 2), 1.82 (m, 3H, chromane 3-HaHb + triazole-CH₂-CH₂), 1.97 (s, 3H, chromane CH₃), 2.00 (m, 1H, chromane 3-HaHb), 2.08 (s, 6H, chromane CH₃), 2.50 (2H, linker CH₂), 2.61 (m, 2H, chromane 4-H), 2.97 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H, glucose 2-H), 3.01-3.17 (m, 3H, glucose 3-H + 4-H + 5-H), 3.45, 3.70 (AB part of an ABX system, $J = 11.8, 6.2, 1.6$ Hz, 2H, glucose 6-H + 6'-H), 3.59 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, CH₂CO), 4.03, 4.08 (AB system, $J = 10.1$ Hz, 2H, OCH₂), 4.14 (br s, 4H, 4 x OH), 4.25 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, glucose 1-H), 4.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, linker triazole-CH₂), 4.62, 4.83 (AB system, $J = 12.2$ Hz, 2H, OCH₂), 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.33 (s, 1H, C=CH), 7.55 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_{arom}), 8.11 (s, 1H, triazole H), 11.34 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 11.9 (CH₃ chromane), 14.6 (CH₃ chromane), 15.5 (CH₃ chromane), 20.0 (CH₂), 21.6 (CH₃ chromane), 25.8 (CH₂), 28.1 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.8 (CH₂), 34.8 (CH₂CO) 49.3 (CH₂N triazole), 61.1 (CH₂OH), 61.6 (OCH₂ triazole), 70.1 (glucose CH), 72.6 (OCH₂), 73.4 (glucose CH), 73.9 (OC_{quat}), 76.7 (glucose CH), 77.0 (glucose CH), 102.1 (glucose 1-CH), 115.3 (phenyl CH), 116.6, 120.9, 124.1 (triazole CH), 124.1, 127.0, 130.0, 131.0, 131.4 (CH=C), 132.0 (phenyl CH), 132.5, 143.7, 148.5, 160.0, 172.1 (C=O), 175.8 (C=O). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 771.36$ [M+Na]⁺. Anal. Calcd for C₄₀H₅₂N₄O₁₀, 2H₂O (784.39): C, 61.21; H, 7.19; N, 7.14. Found: C, 61.01; H, 7.32; N, 6.95.

5.2. Biological evaluation

5.2.1. Cell Lines and Reagents

MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs578T human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). These cell lines

were grown at 37 °C under 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) for MCF-7 and Hs578T, and Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco[®]) for MDA-MB-231 and MDA-MB-453. These phenol red containing media were supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 10% fetal calf serum (FCS, Sigma-Aldrich). In addition, the medium was supplemented with 10 µg/mL insulin for Hs578T cell line. TGZ and its derivatives were dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich).

5.2.2. Cell Treatments

MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs578T cells were seeded at the appropriate density in their respective medium supplemented with 10% FCS and incubated for 24 h to allow for cell attachment. For crystal violet staining, cells were seeded in 96-well plates at a density of 1.5×10^4 cells/well (MDA-MB-231, MCF-7 and Hs578T cells) or 2×10^4 cells/well (MDA-MB-453 cells). For flow cytometry analyses, MDA-MB-231 cells were seeded in 60 mm-diameter culture dishes at 9×10^5 cells/dish. The cells were then treated in their respective medium for 48 or 72 hours with either TGZ derivatives at the indicated concentrations. Control cells were treated with DMSO 0.090 % or 0.012 % to compare with cells exposed with 45 µM TGZ or 6 µM compound **10**, respectively.

5.2.3. 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) in 2% ethanol. This staining solution was filtered prior to use with a syringe-driven filter unit (0.2 µm pore size, VWR international, Radnor, PA, 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). In each condition, the concentration leading to a decrease of 50% of the cell number (IC₅₀) was determined.

5.2.4. Cell Cycle Analysis

At the end of the treatment, culture medium containing the non-adherent cells was collected. Adherent cells were washed with PBS, trypsinized (0.05% trypsin-EDTA in PBS buffer, Gibco[®]) and resuspended in a medium containing 10% FCS. Non-adherent cells and trypsinized cells were pooled and counted. 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 100% ethanol were added drop by drop while vortexing the suspension to permeabilize and fix the cells efficiently. 5×10^5 cells were then centrifuged

at 800 g for 10 min at room temperature. The pellet was resuspended in 500 μ L of DNA staining solution containing 200 μ g of RNase A (Invitrogen) and 2 μ g of propidium iodide (PI) (Life TechnologiesTM, Thermo Fisher Scientific). Samples were incubated for 15 min in the dark at room temperature. Finally, cellular DNA content was determined with a BD FACSCaliburTM flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuestTM Pro software (BD Biosciences). 20,000 events were analyzed and the percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined.

5.2.5. Annexin V/propidium iodide (PI) apoptosis assay

At the end of the treatment, culture medium containing the non-adherent cells was collected. Adherent cells were washed with PBS, trypsinized (0.05% trypsin-EDTA in PBS buffer, Gibco[®]) and resuspended in a medium containing 10% FCS. Non-adherent cells and trypsinized cells were pooled and centrifuged at 200 g for 10 min at room temperature and the pellet was rinsed with PBS. 1×10^6 cells were centrifuged at 200 g for 10 min at room temperature and then added to a binding buffer solution (0.1 M HEPES pH 7.4, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂, pH 7.4) to facilitate Annexin V binding to phosphatidylserine. 2 μ g of PI (Life TechnologiesTM, Thermo Fisher Scientific) and 2.5 μ L of FITC Annexin V (BD Biosciences) were added to the cell suspension and incubated for 15 min in the dark at room temperature. Action of Annexin V was inhibited by addition of binding buffer solution. 10,000 events were analyzed and the percentage of Annexin V and/or PI positive cells was determined with a BD FACSCaliburTM flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuestTM Pro software (BD Biosciences).

5.2.6. Statistical Analysis

The results of cell cycle analysis and Annexin V/PI apoptosis assay were analyzed using a two-tailed unpaired t test with Welch's correction. Differences in which P-value was less than 0.05 were statistically significant.

Acknowledgments

The authors thank Fabien Lachaud and François Dupire for spectroscopic measurements, Sandrine Adach for elemental analysis, MENRT for a fellowship to Dorian Dupommier and Claire Muller. Technical help from Jessica Camera and Marie Zaffino is also gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/xxxxx>. These data include ¹H and ¹³C NMR spectra of tested compounds, and synthetic protocols in the frame of the attempts to prepare derivatives suitable for X-ray

analysis. Representative dose-dependent responses of MDA-MB-231 cells to TGZ and compound **10** were also included.

References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68 (2018) 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [2] K.L. Maughan, M.A. Lutterbie, P. Ham, Treatment of Breast Cancer, *AFP*. 81 (2010) 1339–1346.
- [3] E.A. Musgrove, R.L. Sutherland, Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer, *Nature Reviews Cancer*. 9 (2009) 631–643. doi:10.1038/nrc2713.
- [4] F.X. Claret, T.T. Vu, Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer, *Front. Oncol.* 2 (2012). doi:10.3389/fonc.2012.00062.
- [5] K.G. Chen, B.I. Sikic, Molecular Pathways: Regulation and Therapeutic Implications of Multidrug Resistance, *Clin Cancer Res*. 18 (2012) 1863–1869. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1590.
- [6] C. Yam, S.A. Mani, S.L. Moulder, Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field, *The Oncologist*. 22 (2017) 1086–1093. doi:10.1634/theoncologist.2017-0095.
- [7] Mohd.J. Naim, Md.J. Alam, S. Ahmad, F. Nawaz, N. Shrivastava, M. Sahu, O. Alam, Therapeutic journey of 2,4-thiazolidinediones as a versatile scaffold: An insight into structure activity relationship, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 129 (2017) 218–250. doi:10.1016/j.ejmech.2017.02.031.
- [8] Sucheta, S. Tahlan, P.K. Verma, Biological potential of thiazolidinedione derivatives of synthetic origin, *Chemistry Central Journal*. 11 (2017) 130. doi:10.1186/s13065-017-0357-2.
- [9] N. Chadha, M.S. Bahia, M. Kaur, O. Silakari, Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 23 (2015) 2953–2974. doi:10.1016/j.bmc.2015.03.071.
- [10] S. Prost, F. Relouzat, M. Spentchian, Y. Ouzegdouh, J. Saliba, G. Massonnet, J.-P. Beressi, E. Verhoeyen, V. Ragueneau, B. Maneglier, S. Castaigne, C. Chomienne, S. Chrétien, P. Rousselot, P. Leboulch, Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists, *Nature*. 525 (2015) 380–383. doi:10.1038/nature15248.
- [11] V. Shafiei-Irannejad, N. Samadi, R. Salehi, B. Yousefi, N. Zarghami, New insights into antidiabetic drugs: Possible applications in cancer treatment, *Chemical Biology & Drug Design*. 90 (2017) 1056–1066. doi:10.1111/cbdd.13013.
- [12] S. Salamone, C. Colin, I. Grillier-Vuissoz, S. Kuntz, S. Mazerbourg, S. Flament, H. Martin, L. Richert, Y. Chapleur, M. Boisbrun, Synthesis of new troglitazone derivatives: Anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 51 (2012) 206–215. doi:10.1016/j.ejmech.2012.02.044.
- [13] A. Bordessa, C. Colin-Cassin, I. Grillier-Vuissoz, S. Kuntz, S. Mazerbourg, G. Husson, M. Vo, S. Flament, H. Martin, Y. Chapleur, M. Boisbrun, Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: Towards more active and less toxic compounds, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 83 (2014) 129–140. doi:10.1016/j.ejmech.2014.06.015.
- [14] S. Mazerbourg, S. Kuntz, I. Grillier-Vuissoz, A. Berthe, M. Geoffroy, S. Flament, A. Bordessa, M. Boisbrun, Reprofiling of troglitazone towards more active and less toxic derivatives: a new hope for cancer treatment?, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 16 (2016) 2115–2124.
- [15] S. Saha, L.S. New, H.K. Ho, W.K. Chui, E.C.Y. Chan, Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity, *Toxicology Letters*. 192 (2010) 141–149. doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.014.

- [16] S. Saha, D.S.Z. Chan, C.Y. Lee, W. Wong, L.S. New, W.K. Chui, C.W. Yap, E.C.Y. Chan, H.K. Ho, Pyrrolidinediones reduce the toxicity of thiazolidinediones and modify their anti-diabetic and anti-cancer properties, *European Journal of Pharmacology*. 697 (2012) 13–23. doi:10.1016/j.ejphar.2012.09.021.
- [17] E.A. Couladouros, V.I. Moutsos, M. Lampropoulou, J.L. Little, J.A. Hyatt, A Short and Convenient Chemical Route to Optically Pure 2-Methyl Chromanmethanols. Total Asymmetric Synthesis of β -, γ -, and δ -Tocotrienols, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 6735–6741. doi:10.1021/jo0705418.
- [18] G. Machek, H. Haas, Zur Kenntnis der Dioxydiphenylsulfone, *Journal Für Praktische Chemie*. 160 (1942) 41–64. doi:10.1002/prac.19421600105.
- [19] J.A. Hyatt, C. Skelton, A kinetic resolution route to the (S)-chromanmethanol intermediate for synthesis of the natural tococls, *Tetrahedron: Asymmetry*. 8 (1997) 523–526. doi:10.1016/S0957-4166(97)00020-7.
- [20] R.V. Shafikov, A.Yu. Spivak, V.N. Odinkov, Enantioselective transesterification of (\pm)-6-benzyloxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-ylmethanol catalyzed by the Amano PS lipase in the ionic liquid [bmim]PF₆, *Russ Chem Bull.* 59 (2010) 2129–2132. doi:10.1007/s11172-010-0367-x.
- [21] P.M. Holstein, J.J. Holstein, E.C. Escudero-Adán, O. Baudoin, A.M. Echavarren, Ferrocene derivatives of liquid chiral molecules allow assignment of absolute configuration by X-ray crystallography, *Tetrahedron: Asymmetry*. 28 (2017) 1321–1329. doi:10.1016/j.tetasy.2017.09.002.
- [22] S. Salamone, M. Boisbrun, C. Didierjean, Y. Chapleur, From D-glucuronic acid to L-iduronic acid derivatives via a radical tandem decarboxylation–cyclization, *Carbohydrate Research*. 386 (2014) 99–105. doi:10.1016/j.carres.2014.01.006.
- [23] M.L. Wolfrom, A. Thompson, Acetylation, in: *Reactions of Carbohydrates*, Academic Press, New York - London, 1963: pp. 211–215.
- [24] A.B. Murray, M. Quadri, H. Li, R. McKenna, N.A. Horenstein, Synthesis of saccharin-glycoconjugates targeting carbonic anhydrase using a one-pot cyclization/deprotection strategy, *Carbohydrate Research*. 476 (2019) 65–70. doi:10.1016/j.carres.2019.03.001.
- [25] J.S. Burns, G. Manda, Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance, *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (2017) 2755. doi:10.3390/ijms18122755.
- [26] S.-Y. Kim, Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory, *Biomolecules & Therapeutics*. 26 (2018) 39–44. doi:10.4062/biomolther.2017.184.
- [27] E.C. Calvaresi, P.J. Hergenrother, Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer, *Chemical Science*. 4 (2013) 2319. doi:10.1039/c3sc22205e.
- [28] A. Berthe, S. Flament, S. Grandemange, M. Zaffino, M. Boisbrun, S. Mazerbourg, Δ^2 -Troglitazone promotes cytostatic rather than pro-apoptotic effects in breast cancer cells cultured in high serum conditions, *Cell Cycle*. 15 (2016) 3402–3412. doi:10.1080/15384101.2016.1245248.
- [29] H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *J. Org. Chem.* 62 (1997) 7512–7515. doi:10.1021/jo971176v.

Résumé

De nombreuses options thérapeutiques sont disponibles pour les cancers du sein luminaux, HER2 et normal like. En revanche, seule la chimiothérapie est utilisée pour les cancers du sein triple-négatifs. Par ailleurs, quels que soient les sous-types de cancer du sein, il existe de nombreux cas d'absence de réponse et des phénomènes de résistance aux traitements. Dans certains cas les phénomènes de résistance peuvent être associés à la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) au sein des tumeurs. Afin de disposer de nouveaux outils thérapeutiques, une des pistes est de cibler le métabolisme énergétique souvent modifié dans les cellules cancéreuses et les CSC. Les thiazolidinediones (TZD) sont étudiées dans ce contexte car elles présentent une action anticancéreuse pouvant résulter d'une altération du métabolisme énergétique. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à la troglitazone (TGZ) dont plusieurs dérivés présentent une efficacité accrue et une toxicité réduite envers les hépatocytes. Des dérivés désoufrés de la TGZ ont récemment été synthétisés.

Au cours de cette thèse, nous avons d'abord réalisé une étude des relations structure activité afin d'évaluer l'importance du soufre dans l'action anticancéreuse. Nous avons montré que la suppression du soufre au niveau du cycle TZD améliore l'efficacité anticancéreuse des composés sur des lignées de cellules cancéreuses mammaires. Le dérivé le plus actif est EP13, composé qui combine les modifications chimiques précédemment identifiées comme potentialisatrices et l'absence de soufre. Contrairement à la TGZ qui a un effet cytotatique, EP13 induit l'apoptose des cellules MDA-MB-231.

Nous avons ensuite étudié l'effet d'EP13 sur le métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-231 et MCF-7. EP13 induit une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules MDA-MB-231. Une stimulation de la glycolyse permet secondairement de compenser l'altération de la respiration mitochondriale.

De faibles concentrations d'EP13 potentialisent l'action de la doxorubicine et du 5-fluorouracile dans les cellules MDA-MB-231.

Enfin nous avons établi un modèle de culture cellulaire tridimensionnelle (mammosphères), qui permettrait un enrichissement en CSC. EP13 est capable d'affecter les mammosphères constituées à partir de cellules MDA-MB-231 et MCF-7.

Ce travail de thèse a permis de caractériser un nouveau dérivé de TGZ et de préciser son mode d'action sur les cellules cancéreuses mammaires. EP13 se présente comme un candidat potentiel pour des stratégies thérapeutiques visant à cibler le métabolisme énergétique. Il reste à déterminer s'il existe un lien entre la modification du métabolisme énergétique et l'effet anti-cancéreux et à exploiter le modèle des mammosphères pour déterminer si EP13 affecte aussi les CSC.

Mots clés : cancer du sein, thiazolidinediones, métabolisme énergétique, mitochondries, cellules souches cancéreuses, mammosphères.

Abstract

Numerous therapeutic options are available for Luminal, HER2-enriched and Normal-like breast cancers. However, only chemotherapy can be used for triple-negative breast cancers. Moreover, regardless of breast cancer subtypes, there are many cases of absence of responsiveness and treatment resistances. In some cases, resistance comes from the presence of cancer stem cells (CSC) within the tumor. A possible therapeutic approach consists of targeting the energy metabolism often modified in cancer cells and CSC. Thiazolidinediones (TZD) are studied in this context since they display an anticancer activity and can induce alterations of the energy metabolism. Our laboratory studies troglitazone (TGZ) from which we could obtain several derivatives displaying a higher efficiency and a lower toxicity towards human hepatocytes. Desulfurated derivatives of TGZ have been synthesized recently.

During the PhD, first we performed a structure-activity relationship study in order to determine the impact of the sulfur atom on the anticancer activity. We observed that desulfurated derivatives of TGZ displayed a higher efficiency towards breast cancer cells. and the most active compound was EP13, one of the desulfurated TDZ derivatives, on breast cancer cells.

The most active compound, EP13, combined the chemical modifications previously identified as potentiating and the removal of the sulfur moiety from the TZD cycle. Unlike TGZ which possesses a cytostatic effect, EP13 induces apoptosis of MDA-MB-231 cells.

Then we showed that EP13 disrupted energy metabolism of MDA-MB-231 and MCF-7 cells by inducing alteration of mitochondrial respiratory chain function, associated with reactive oxygen species (ROS) production in MDA-MB-231 cells. A glycolysis stimulation seems to compensate secondarily the mitochondrial respiration alteration.

EP13 at low doses was able to potentiate doxorubicin and 5-fluorouracil actions on MDA-MB-231 cells.

Finally, we established a three dimensional cell culture model, which could allow enrichment in CSC. EP13 could alter the establishment of mammospheres from MDA-MB-231 and MCF-7 cells.

This work allowed the characterization of a new TGZ derivative and the elucidation of its mechanism of action on breast cancer cells. This suggests a potential interest of EP13 for the development of therapeutic strategies targeting energy metabolism. It remains to establish if there is a link between modifications of energy metabolism and EP13-induced apoptosis and to use the mammosphere experimental model to determine if EP13 can affect breast CSC.

Key words: breast cancer, thiazolidinediones, energy metabolism, mitochondria, cancer stem cells, mammospheres.