

**Université de Sherbrooke**

**ACIDE LINOLÉIQUE CONJUGUÉ : EFFET  
RADIOSENSIBILISATEUR DANS LE TRAITEMENT DU  
CANCER DU SEIN ET INHIBITEUR DU POTENTIEL  
MÉTASTATIQUE**

par

**Geneviève Drouin**

Département de Médecine Nucléaire et Radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître *ès sciences* (M.Sc.) en Radiobiologie

Juin 2004



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 0-612-94827-7*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 0-612-94827-7*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Table des matières.....</b>	<b>II</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>VI</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>X</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1. Cancer du sein.....	1
1.1 Épidémiologie.....	1
1.2 Pathogénèse.....	1
1.2.1 Prédispositions génétiques et mutations.....	2
1.2.2 Influence hormonale.....	3
1.2.3 Influences environnementales.....	3
1.3 Radiothérapie : Concepts de base et limitations.....	4
1.3.1 Rayonnements utilisés et doses impliquées.....	5
1.3.2 Types de morts cellulaires causées par les radiations.....	6
1.3.2.1 Mort mitotique.....	6
1.3.2.2 Mort reproductrice (arrêt de prolifération) .....	7
1.3.2.3 Apoptose.....	7

1.3.2.4	Nécrose.....	8
2.	Apoptose.....	8
2.1	Mécanismes moléculaires de l'apoptose.....	9
2.1.1	Voie mitochondriale.....	10
2.2	Radiorésistance des cellules cancéreuses du sein.....	11
2.2.1	Apoptose et radiosensibilité.....	12
2.2.2	Mort reproductive permanente ou temporaire.....	13
3.	Acide linoléique conjugué.....	14
3.1	Structure et isomères.....	14
3.2	Synthèse des CLAs.....	15
3.3	Effets anticancérigènes connus des CLAs.....	15
3.4	CLA ligand du PPAR $\gamma$ .....	16
3.4.1	Rôle du PPAR $\gamma$ sur l'expression de certains gènes.....	17
4.	Processus métastatique.....	17
4.1	Métalloprotéases de la matrice (MMPs) .....	19
4.1.1	Structure des MMPs.....	20
4.1.2	Classes des MMPs.....	21
4.1.3	Activation des MMPs.....	22
4.1.4	Régulation des MMPs.....	23
5.	Hypothèse et objectifs de l'étude.....	25

**Première partie : article.....26**

Effet radiosensibilisateur de l'acide linoléique conjugué chez les cellules  
cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231

G. Drouin, A. Douillette, P. Lacasse et B. Paquette

**Deuxième partie : Inhibition du potentiel métastatique .....60**

**Matériel et méthodes.....61**

1. Matériel.....61
2. Culture cellulaire.....61
3. Modulation du potentiel métastatique in vivo.....62
4. Détermination du potentiel invasif par chambre de Boyden.....63
5. Culture cellulaire sur Matrigel.....64
6. Préparation de milieux conditionnés.....65
7. Zymographie.....66
8. Extraction de l'ARN total.....67
9. Transcription inverse (RT) pour la synthèse de cDNA.....68
10. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....68
11. Quantification des niveaux d'ARNm de la MMP-2 et MMP-9.....69

**Résultats.....71**

1. Modulation in vivo du potentiel métastatique.....71

2.	Modulation in vitro du potentiel métastatique.....	72
3.	Détermination des niveaux protéiques de MMP-2 et MMP-9 par gel de zymographie.....	74
4.	Détermination des niveaux d'ARNm de MMP-2 et MMP-9 par RT-PCR.....	75
<b>Discussion.....</b>		<b>77</b>
<b>Conclusion.....</b>		<b>82</b>
<b>Remerciements.....</b>		<b>84</b>
<b>Bibliographie.....</b>		<b>85</b>

## LISTE DES FIGURES

1.	Vue latérale d'une coupe sagittale du sein.....	2
2.	Voie mitochondriale de l'apoptose.....	11
3.	Radiosensibilité cellulaire selon le niveau d'apoptose radio-induit.....	13
4.	Structure de deux isomères du CLA, le CLA-10trans 12cis (t10c12-CLA) et le CLA-9cis 11trans (c9t11-CLA), ainsi que l'acide linoléique.....	15
5.	Illustration schématique de la cascade métastatique.....	19
6.	Structure primaire de certaines MMPs.....	20
7.	Tableau des différentes classes de MMPs de vertébrés, de même que leurs substrats ou fonctions.....	22
8.	Activation en cascade des MMPs par des protéases ou des agents non-protéolytiques.....	23
9.	Inhibition de l'activité de la MMP-9 par la TIMP-2.....	24
10.	Représentation schématique d'une chambre d'invasion de Boyden.....	64
11.	Modulation in vivo du nombre de nodules pulmonaires suite à un prétraitement de 48 heures avec le CLA et trois de ses isomères.....	72
12.	Modulation in vitro du potentiel d'invasion des cellules MDA-MB-231 par le CLA-mixte et trois de ses isomères.....	74

13. Quantité relative d'ARN de MMP-2 dosée par RT-PCR chez les cellules MDA-MB-231 suite à une incubation avec les CLAs.....76



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

APAF-1	apoptosis protease activating factor-1
APMA	acétate de 4-aminophénylmercurique
ATP	adénosine triphosphate
Bad	Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter
Bax	Bcl associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma X long
BPE	bovine pituitary extract
BRCA-1	Breast cancer gene1
BRCA-2	Breast cancer gene 2
BSA	albumine sérique bovine
cDNA	acide désoxyribonucléique complémentaire
CLA	acide linoléique conjugué
dNTP	nucléotides
ECM	matrice extracellulaire
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
FBS	sérum foetal bovin
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate-déhydrogénase
GC	chromatographie en phase gazeuse
GSSG	glutathion oxydé
Gy	Gray

hEGF	human recombinant epidermal growth factor
HOCl	hypochlorite
LA	acide linoléique
MEBM	mammary epithelium basal medium
MEM	minimal essential medium
ml	millilitre
MMP	métalloprotéase de la matrice
MT-MMP	métalloprotéase de la matrice de type membranaire
pb	paire de base
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator activated receptor gamma
PPRE	peroxisome proliferator response element
Rb	rétinoblastome
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RT	transcription inverse
RXR	récepteur rétinoïde X
SDS	sodium dodécyle sulfate
SH	thiol
TIMP	inhibiteur tissulaire des métalloprotéases de la matrice
15d-PGJ <sub>2</sub>	15-déoxy-delta 12,14-prostaglandin J <sub>2</sub>

## RÉSUMÉ

Les voies apoptotiques sont fréquemment altérées chez les cellules cancéreuses du sein diminuant l'efficacité de la radiothérapie. L'acide linoléique conjugué (CLA), connu pour déclencher l'apoptose, a été testé comme radiosensibilisateur chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Le CLA-mixte, constitué des isomères le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis, a été comparé à trois isomères purifiés, soit le CLA-9cis 11cis, CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis.

À l'aide du marqueur apoptotique YO-PRO®-1, le CLA-9cis 11cis à 50  $\mu$ M s'est avéré le meilleur inducteur d'apoptose. Des niveaux d'apoptose 10 fois plus élevés chez les cellules MCF-7 et 2.5 fois plus élevés chez les cellules MDA-MB-231 ont été observés suite à l'ajout du CLA-9cis 11cis à 50  $\mu$ M, comparativement au CLA-mixte où une faible induction de l'apoptose a été observée. Le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis n'ont pas induit d'apoptose chez les cellules cancéreuses du sein testées. Nos résultats suggèrent aussi que les deux principaux constituants du CLA-mixte, soit le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis ne sont pas impliqués dans l'induction de l'apoptose chez les carcinomes du sein étudiés.

L'effet radiosensibilisateur des CLAs a ensuite été vérifié. Sans CLA, une dose de 5 Gy n'a pas induit d'apoptose chez les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. L'ajout du CLA-9cis 11cis ou du CLA-mixte a permis d'observer une apoptose radio-induite, le CLA-9cis 11cis étant environ 8 fois supérieure au CLA-mixte. Le CLA-9cis 11cis s'est aussi avéré être le meilleur

radiosensibilisateur, bien que les isomères CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis ont aussi réduit la survie cellulaire après irradiation, mais en empruntant un mécanisme non relié à l'apoptose. L'effet radiosensibilisateur du CLA-9cis 11cis supporte son potentiel comme adjuvant combiné à la radiothérapie pour traiter les carcinomes du sein.

Un autre problème chez les carcinomes du sein est qu'il y a régulièrement dissémination de cellules de la tumeur vers d'autres organes pour former des métastases. La capacité des CLAs à diminuer l'invasion des cellules tumorales a été vérifiée. Dans les essais chez la souris, le CLA-mixte et le CLA-9cis 11cis se sont avérés être les meilleurs inhibiteurs de la formation de nodules pulmonaires suite à l'injection intraveineuses de cellules 4T1 ayant préalablement été incubées avec les CLAs. L'incubation des cellules avec le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis n'a pas diminué le nombre de nodules pulmonaires chez la souris. Pour les essais in vitro dans les chambres d'invasion Boyden, les résultats ont confirmés ceux obtenus chez la souris; seuls les CLA-mixte et CLA-9cis 11cis ont diminué la capacité d'invasion des cellules cancéreuses étudiées alors qu'aucune baisse n'a été notée pour les CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis.

Puisque les MMPs sont impliquées dans le processus métastatique, l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9 a été vérifiée suite à l'incubation des cellules MDA-MB-231 aux différents CLAs. L'effet des CLAs sur l'expression de la MMP-9 n'a pu être vérifié à cause de la faible expression de la MMP-9 chez les cellules étudiées. Par contre, des résultats préliminaires ont montrés que les niveaux d'ARNm de la MMP-2 ont été significativement diminués pour le CLA-mixte de même que les trois isomères purifiés. L'inhibition du potentiel métastatique par le CLA-mixte et le CLA-9cis 11cis pourrait donc être causée par

une diminution de l'expression de certaines MMPs. Cette hypothèse devra cependant être confirmée en faisant de nouveaux essais sur l'expression de différentes MMPs.

En conclusion, le CLA-9cis 11cis pourrait donc s'avérer très prometteur comme adjuvant à la radiothérapie de cancer du sein, en plus de diminuer la migration des cellules dans la matrice extracellulaire et la formation de métastases.

Mots clés : cancer du sein, CLA, apoptose, métastases, radiosensibilisateur

# INTRODUCTION

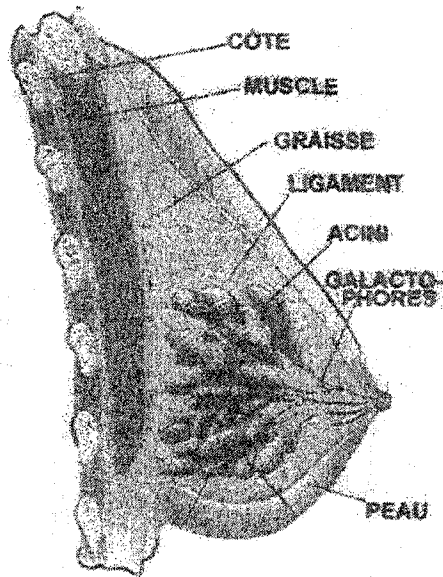
## 1. Cancer du sein

### 1.1 Épidémiologie

Au Canada une femme sur neuf risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie et une femme sur vingt-sept risque d'en mourir dans les cinq premières années suivant le diagnostic. Le cancer du sein est donc le cancer féminin le plus souvent diagnostiqué au Canada et le deuxième en importance quant aux nombres de décès, le premier étant le cancer des poumons. En effet, selon Santé Canada, en 2003 21 100 nouveaux cas de cancer du sein seront diagnostiqués et 5300 femmes mourront de ce cancer (INSTITUT NATIONAL DU CANCER DU CANADA, 2003).

### 1.2 Pathogénèse

Le cancer du sein se développe principalement à partir des cellules épithéliales tapissant les acini et les canaux galactophores (figure 1). Comme c'est le cas pour tous les types de cancer, les causes du cancer du sein demeurent largement inconnues. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer l'apparition du cancer du sein. Ces facteurs sont regroupés en trois catégories; les prédispositions génétiques et mutations, l'influence hormonale et les influences environnementales (KUMAR et al., 1997).



**Figure 1 : Vue latérale d'une coupe sagittale du sein (LEE DAVIS et BRADLOW, 1995).**

### **1.2.1 Prédispositions génétiques et mutations**

On estime qu'environ 5 % à 10 % des cancers du sein ont une origine familiale. En effet, certaines mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs comme BRCA-1, BRCA-2 et p53 peuvent être transmises de génération en génération (BENNETT et al., 2000). Outre l'origine familiale, certaines mutations peuvent survenir dans les cellules du sein pendant la vie d'une femme et provoquer par exemple une surexpression de protooncogènes tels que c-erbB2, c-ras ou c-myc ou encore un dysfonctionnement de gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb). Finalement, cette accumulation de mutations conduit au processus de transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse (KUMAR et al., 1997).

### **1.2.2 Influence hormonale**

L'implication des estrogènes dans l'apparition du cancer du sein est maintenant bien connue (HENDERSON et al., 1988). Cette implication des estrogènes se manifeste de deux façons. Tout d'abord les estrogènes stimulent la prolifération des cellules épithéliales du tissu mammaire en activant des gènes responsables de la division cellulaire. La réplication de l'ADN se fait alors plus fréquemment ce qui favorise la fixation de mutations spontanées et facilite du même coup la carcinogénèse. Les estrogènes peuvent également stimuler la prolifération des cellules tumorales (BARRET, 1993). Enfin, le métabolisme des estrogènes est altéré dans les cellules mammaires transformées conduisant à la formation d'hydroxyestrogènes capables de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via un cycle rédox (PAQUETTE et al., 2001). Ces ROS peuvent endommager l'ADN (THIBODEAU et PAQUETTE, 1999).

### **1.2.3 Influences environnementales**

Des facteurs environnementaux comme la consommation d'alcool, l'obésité, la cigarette et une diète riche en lipides peuvent augmenter le risque de développer un cancer du sein. Cependant, leur contribution n'a été notée que sur une base épidémiologique (KUMAR et al., 1997).



### 1.3 Radiothérapie : Concepts de base et limitations

Il existe différents types de traitements permettant une prise en charge d'un cancer du sein. Ces traitements comprennent la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. La radiothérapie et la chirurgie sont ce qu'on appelle des traitements loco-régionaux contrairement à la chimiothérapie et l'hormonothérapie qui ont une action sur l'ensemble du corps (HARRIS et al., 1996)

La radiothérapie est un traitement de choix contre le cancer du sein puisqu'elle agit directement sur la zone touchée par les cellules cancéreuses et que ses effets secondaires sont généralement minimales. La radiothérapie est souvent pratiquée suite à une chirurgie et peut également être combinée à la chimiothérapie. La radiothérapie consiste en l'utilisation de radiations ionisantes afin de détruire les cellules tumorales (HALL, 2000). Cependant, l'utilisation de la radiothérapie devient trop complexe dans le cas de cancers plus invasifs et les thérapeutes doivent alors se tourner vers des traitements plus généraux comme la chimiothérapie.

La cible la plus importante des radiations chez les cellules est l'ADN (HALL, 2000). Les radiations peuvent endommager directement ou indirectement l'ADN. L'action est directe lorsque le photon ou la particule (chargée ou non) interagit la molécule d'ADN et l'endommagement alors que l'effet est indirect si le photon ou la particule interagit tout d'abord avec une autre molécule de la cellule, particulièrement les molécules d'eau, pour former des radicaux libres qui vont à leur tour endommager l'ADN (HALL, 2000). L'accumulation de dommages à l'ADN finit par tuer la cellule.

### 1.3.1 Rayonnements utilisés et doses impliquées

Selon le type de cancer et la zone à traiter, divers types de rayonnements peuvent être utilisés en radiothérapie. Le rayonnement peut être particulaire, comme les électrons, les protons, les neutrons et les particules  $\alpha$ , ou encore électromagnétique incluant les rayons X et les rayons  $\gamma$ . Les rayons X et  $\gamma$  sont des photons et leur seule distinction est leur origine : les rayons X proviennent de couches électroniques de l'atome alors que les rayons  $\gamma$  proviennent du noyau (HALL, 2000). Les rayons X et  $\gamma$  sont très utilisés en radiothérapie, ils sont très pénétrants et peuvent être utilisés à un moindre coût que les radiations particulaires (HALL, 2000).

Pour traiter en radiothérapie un cancer du sein, une dose totale de plus de 50 Gy peut être donnée. Puisque les radiations ne touchent pas seulement les cellules cancéreuses mais également les cellules saines, il est impensable de donner cette dose en une seule fois. Il faut donc fractionner la dose. Normalement une patiente reçoit 2 Gy par jour cinq fois par semaine. Une dose de 2 Gy cause aux cellules irradiées des dommages qui peuvent être réparables. Cette possibilité de réparation protège les cellules normales mais aussi les cellules tumorales, par contre les cellules saines réparent plus efficacement les dommages. De plus, le fractionnement de la dose permet une repopulation des cellules saines (AWWAD, 1990).

Le fractionnement de la dose apporte aussi d'autres avantages en plus d'épargner dans une certaine proportion les cellules saines. Effectivement, le fractionnement augmente les dommages aux cellules tumorales parce qu'il permet d'abord une réoxygénation de la tumeur et une redistribution des cellules tumorales dans le cycle cellulaire. En effet, l'hypoxie

confère une importante protection des cellules aux radiations. La présence d'oxygène permet notamment d'augmenter la formation du radical hydroxyle par la radiolyse de l'eau contenue dans les cellules. Le radical hydroxyle est le principal radical responsable des dommages causés à l'ADN. Selon des estimations, le deux tiers des dommages à l'ADN seraient causés par le radical hydroxyle (HALL, 2000). Dans les tumeurs solides, seules les cellules en périphérie de la tumeur sont bien oxygénées. L'utilisation de doses fractionnées permet de réoxygéner les cellules du centre de la tumeur, les rendant alors plus radiosensibles. La redistribution signifie quant à elle que suite à une irradiation il y a synchronisation des cellules en phase G<sub>2</sub>/M du cycle cellulaire, phase où les cellules sont particulièrement radiosensibles (AWWAD, 1990).

### **1.3.2 Types de morts cellulaires causées par les radiations**

Le type de mort cellulaire observé suite à une irradiation dépend de la dose reçue par les cellules et du type de cellule. Les types de morts cellulaires post-irradiation sont la mort mitotique, la mort reproductive, l'apoptose et la nécrose (HALL, 2000).

#### **1.3.2.1 Mort mitotique**

La mort mitotique signifie que les cellules meurent en tentant de se diviser. La mort peut survenir lors de la première division mais peut également se produire après une, deux et même cinq divisions. Les dommages à l'ADN peuvent persister même s'ils ne sont pas réparés ou mal réparés parce qu'ils n'interfèrent pas avec les fonctions vitales de la cellule. Ils peuvent cependant faire surface lors de l'initiation du cycle cellulaire. La mort mitotique

est observée à des faibles doses (2-5 Gy) et est donc fréquemment observée lors du traitement des tumeurs par radiothérapie (HALL, 2000).

### **1.3.2.2 Mort reproductive (arrêt de prolifération)**

On parle de mort reproductive lorsque la cellule est toujours vivante, c'est-à-dire qu'elle a toujours un certain niveau d'activité métabolique, mais qu'elle n'arrive plus à se diviser afin de produire une grande progéniture. Bien que la cellule soit toujours physiquement présente, elle a perdu son caractère clonogénique et est donc, en quelque sorte, morte. La mort mitotique est observable à des doses faibles (HALL, 2000).

### **1.3.2.3 Apoptose**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée survient, comme la mort mitotique et la mort reproductive, à des doses faibles (moins de 5 Gy). Si les dommages causés par les radiations sont irréparables la cellule peut "choisir" de mourir, il y aura alors initiation de l'apoptose. Ce type de mort cellulaire est caractérisé par une série d'évènements morphologiques et biochimiques stéréotypés tels que la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN nucléaire et la formation de corps apoptotiques (HUYNH et TEEL, 2000; HUNAKOVA et al., 2000).

#### 1.3.2.4 Nécrose

Contrairement à l'apoptose, la nécrose n'est pas programmée. Elle survient accidentellement lorsque la cellule subit des dommages importants. Elle se caractérise par la rupture de la membrane de la cellule qui répand alors tout son contenu dans le milieu environnant, provoquant une réaction inflammatoire. La nécrose apparaît suite à une irradiation des cellules à de fortes doses (20 Gy) (HALL, 2000; RAINALDI et al., 2003; HARMS-RINGDAHL et al., 1996). Ce type de mort ne serait généralement pas rencontré en radiothérapie puisque les doses requises sont trop élevées (HALL, 2000).

## 2. Apoptose

L'apoptose, aussi nommée mort cellulaire programmée, est un processus permettant à l'organisme d'éliminer les cellules non-désirées ou endommagées et potentiellement dangereuses. Par exemple, si la cellule subit des dommages qu'elle estime irréparables, elle peut "décider" de s'éliminer afin d'éviter de répandre, par sa progéniture, les dommages subis à son ADN. L'apoptose est également très importante lors de l'embryogénèse afin de remodeler les structures en formation. Toute anomalie de ce processus peut être responsable de diverses pathologies caractérisées par un excès ou un défaut d'apoptose (DLAMINI et al., 2004).

Dans le cycle menstruel de la femme, l'estradiol contribue à la croissance et la différenciation des cellules épithéliales du sein. À la fin de ce cycle et lors de la ménopause,

la concentration d'estradiol diminue conduisant alors à une régression par apoptose des structures épithéliales (HARRIS et al., 2000). Par contre, chez les cellules cancéreuses du sein, les voies de l'apoptose sont souvent altérées amenant une prolifération incontrôlée des tumeurs du sein (CHADDERTON et al., 2000; YANG et al., 2001).

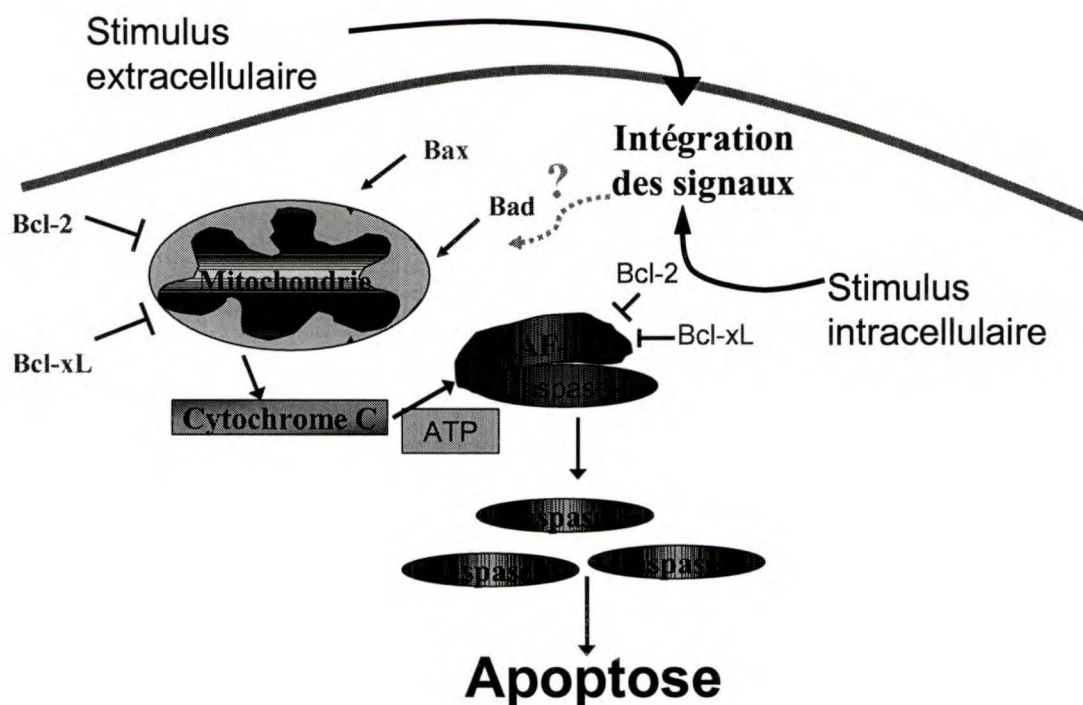
## **2.1 Mécanismes moléculaires de l'apoptose**

Trois phases caractérisent l'apoptose, l'initiation, l'exécution et la dégradation (VERRELLE, 1998). Lors de la phase d'initiation, la cellule reçoit un stimulus (dommages cellulaires, récepteurs de mort cellulaire activés, carence en facteurs de croissance). Les régulateurs de l'apoptose entrent alors en jeu. Ces régulateurs regroupent les protéines de la famille Bcl-2. Ces protéines se divisent en deux catégories, les pro-apoptotiques, comprenant les protéines Bax et Bad et les anti-apoptotiques, incluant Bcl-2 et Bcl-xL. Les niveaux relatifs de protéines pro- et anti-apoptotiques déterminent la sensibilité de la cellule à un stimulus de nature apoptotique (BIOLA et PALARDY, 2001).

Les principaux effecteurs de l'apoptose sont les caspases. Les caspases aussi nommées protéases à cystéines sont produites sous une forme latente. Une fois activée lors de la cascade des caspases, elles sont responsables de coupures protéolytiques au niveau de résidus aspartate, aboutissant à la destruction de protéines impliquées dans l'organisation structurale ou le métabolisme de la cellule (BIOLA et PALARDY, 2001).

### 2.1.1 Voie mitochondriale

Suite à un stress que subit la cellule, par exemple un dommage irréparable à l'ADN causé par des radiations ionisante, l'équilibre entre protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques est brisé. Un déséquilibre en faveur des protéines pro-apoptotiques amène une chute du potentiel trans-membranaire de la mitochondrie permettant l'ouverture de mégapores et un relâchement dans le cytoplasme de molécules apoptogènes comme le cytochrome c et la protéine APAF-1. Le cytochrome c, la pro-caspase-9 et la protéine APAF-1 en présence d'ATP forment un complexe nommé apoptosome. La formation de l'apoptosome amène l'activation de la caspase-9 par clivage autocatalytique de la pro-caspase-9 et alors l'induction de la cascade d'activation des caspases (WOLF et al., 2001). La phase de dégradation de l'apoptose est alors amorcée (figure 2).



**Figure 2 : Voie mitochondriale de l'apoptose.** Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL empêchent l'ouverture des pores de la mitochondrie mais aussi la formation de l'apoptosome. Si la balance penche plutôt du côté des protéines pro-apoptotiques, les pores de la mitochondrie s'ouvrent, laissant sortir le cytochrome c et la pro-caspase-9. L'apoptosome se formera et il y aura déclenchement de la cascade d'activation des caspases.

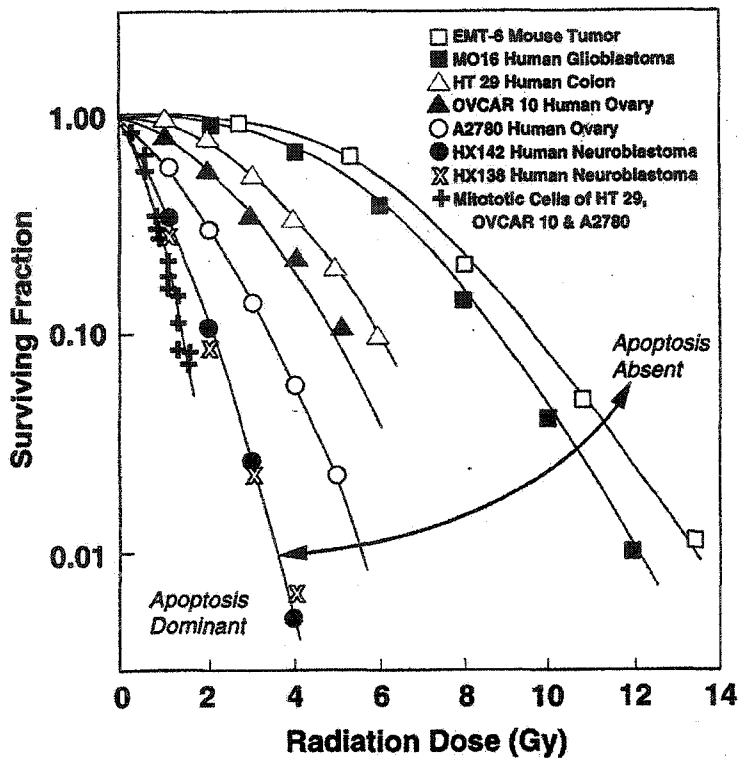
## 2.2 Radiorésistance des cellules cancéreuses du sein

Malgré les traitements de radiothérapie et de chimiothérapie le cancer du sein peut réapparaître jusqu'à 15 ans après les traitements. Cette récurrence prend la forme de nodules loco-régionaux ou de métastases à distance (LANGSTEIN et al., 2003). Elle s'expliquerait en partie par une radiorésistance des cellules cancéreuses du sein à l'apoptose mais également par une mort reproductive temporaire des cellules irradiées (SCHMIDT-ULLRICH et al. 1992).



### 2.2.1 Apoptose et radiosensibilité

La radiosensibilité des cellules cancéreuses dépend de leur capacité à entrer en apoptose suite à l'irradiation comme le démontre le graphique de la figure 3 (HALL, 2000). Malheureusement chez les cellules cancéreuses du sein, les voies d'induction de l'apoptose sont fréquemment altérées diminuant ainsi la capacité du rayonnement ionisant d'induire l'apoptose chez ces cellules. Un lien entre des mutations dans le gène de p53 et la radiorésistance de carcinomes mammaires a déjà été observé (MARCHETTI et al., 2003). Cependant, les mutations dans le gène de p53 ne constituent pas le seul mécanisme responsable de cette radiorésistance à l'apoptose. D'autres mécanismes ont été suggérés dont une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 rapportée l'équipe d'Olopade (OLOPADE et al. 1997).



**Figure 3 : Radiosensibilité cellulaire selon le niveau d'apoptose radio-induit (HALL, 2000).** Chez les cellules où l'apoptose est absente une dose d'irradiation beaucoup plus grande doit être donnée pour obtenir une mortalité équivalente aux cellules où l'apoptose est dominante.

### 2.2.2 Mort reproductive permanente ou temporaire

Initialement, la mort reproductive était perçue comme étant irréversible et par conséquent les cellules affectées ne pouvaient pas être impliquées dans la récurrence du cancer. Cependant, ce concept a dû être repensé suite à l'étude effectuée par l'équipe de Schmidt-Ullrich (SCHMIDT-ULLRICH et al. 1992). Ces derniers ont exposé les cellules cancéreuses du sein humaines MCF-7 à une dose totale de 20 à 60 Gy fractionnée à 2 Gy par jour. Ils ont tout d'abord observé un arrêt de prolifération, mais 30 à 45 jours post-irradiation une reprise de

prolifération cellulaire a été notée chez une petite fraction des cellules irradiées. Cette mort reproductive temporaire pourrait donc expliquer en partie la récurrence des cancers du sein.

### **3. Acide linoléique conjugué**

#### **3.1 Structure et isomères**

L'acide linoléique conjugué (CLA) est un acide gras formé d'une chaîne de 18 carbones contenant deux doubles liaisons. Le CLA se différencie de l'acide linoléique (LA) par la disposition des deux doubles liaisons. Chez l'acide linoléique les deux doubles liens sont séparés par deux liaisons simples alors que chez le CLA les doubles liaisons ne sont séparées que par un seul lien simple, d'où le terme acide linoléique conjugué. Le CLA ne possède pas qu'une seule structure, il est composé d'un mélange d'isomères géométriques et de positions. La géométrie des doubles liaisons peut être de forme cis ou trans alors que les positions des doubles liaisons peuvent varier mais les plus communes sont en position 9 et 11, 10 et 12 ou encore 11 et 13 (KELLY, 2001; BELURY, 2002).

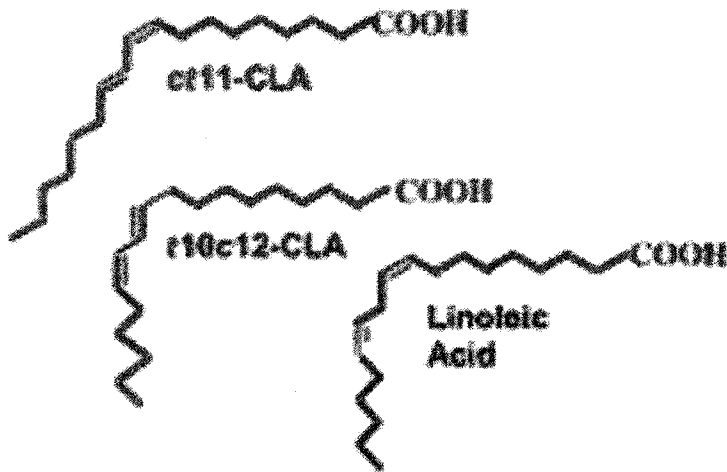


Figure 4 : Structure de deux isomères du CLA, le CLA-10trans 12cis (t10c12-CLA) et le CLA-9cis 11trans (c9t11-CLA) ainsi que de l'acide linoléique (BELURY, 2002).

### 3.2 Synthèse des CLAs

Le CLA est produit dans le rumen de la vache grâce à la biohydrogénation du LA par des bactéries. L'enzyme delta(9)-désaturase dans le tissu mammaire de la vache produit également du CLA à partir de l'acide 11(trans)-octadécadiénoïque (GRINARI et al., 2000). Les produits laitiers et la viande bovine sont donc des sources naturelles privilégiées de CLA.

### 3.3 Effets anticancérigènes connus des CLAs

Certaines études ont déjà démontrées le potentiel anticancéreux du CLA au niveau cellulaire et animal. Une diminution de la prolifération de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses a été observée suite à une incubation avec le CLA, notamment chez les cellules cancéreuses du sein humaines MCF-7 (CUNNINGHAM et al., 1997; SHULTZ et al., 1992; DURGAM et FERNANDES, 1997; PARK et al., 2000; O'SHEA et al., 2000). Également au niveau

cellulaire, le CLA a induit de l'apoptose chez des cellules cancéreuses mammaires de rat (IP et al., 2000). L'équipe de Majumder a déjà démontré que le CLA-mixte pouvaient augmenter ou diminuer l'expression de certains gènes reliés à l'apoptose tels que p53, bcl-2 et bax chez les cellules MDA-MB-231 (MAJUMDER et al. 2002). Chez le rat femelle, le CLA a également montré un effet anticancérigène en protégeant contre la carcinogénèse mammaire causée par le diméthylbenz[a]anthracène (IP et SCIMECA, 1997; IP et al., 1996; IP et al., 1991) mais aussi en induisant de l'apoptose dans des lésions pré malignes de la glande mammaire (IP et al., 2000). Certains des isomères purifiés du CLA ont également démontrés des effets anticancérigènes. C'est notamment le cas du CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis qui ont induit l'apoptose chez les cellules tumorales de colon SW480 (MILLER et al., 2002). Le CLA-9cis 11trans a aussi conduit à un arrêt de prolifération et une induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuse gastriques SGC7901 (LIU et al., 2002)

### **3.4 CLA ligand du PPAR $\gamma$**

Le CLA est un ligand naturel du "peroxisome proliferator activated receptor gamma" (PPAR $\gamma$ ). Le PPAR $\gamma$  fait partie de la famille des récepteurs nucléaires. Il est surtout présent dans le tissus adipeux de même que chez les cellules épithéliales du sein. Une étude a également démontré que l'expression du PPAR $\gamma$  était plus abondant chez les cellules cancéreuses que chez les cellules normales du sein (NWANKWO et ROBBINS, 2001). En plus du CLA, il existe d'autres ligands naturels et synthétiques du PPAR $\gamma$ . Certains de ces ligands ont montré un effet apoptotique chez plusieurs types de cancers, notamment le cancer du sein (CLAY et al., 2001; YIN et al., 2001; ELSTNER et al., 2002)

### **3.4.1 Rôle du PPAR $\gamma$ sur l'expression de certains gènes**

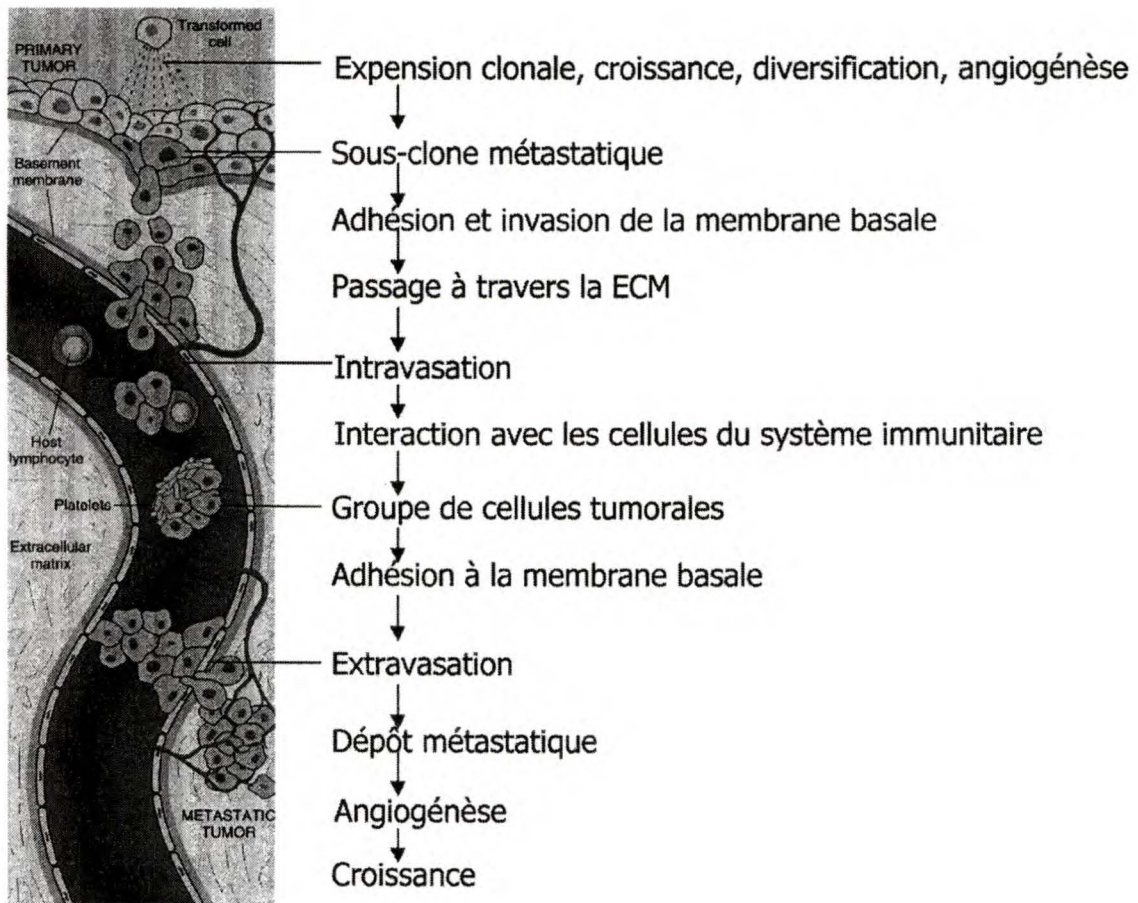
Le PPAR $\gamma$  peut diminuer ou augmenter l'expression de certains gènes en agissant comme facteur de transcription. Une fois activé par un ligand, le PPAR $\gamma$  forme un hétérodimère avec un récepteur rétinoïde X (RXR) et se fixe sur l'élément de réponse du PPAR (PPRE) contenu dans le promoteur de plusieurs gènes et modifie alors leur expression (SHIMADA et al., 2002). L'induction de l'apoptose par certains ligands du PPAR $\gamma$  serait due à une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak (YOSHIZAWA et al. 2002; LI et al. 2003; CHEN et al. 2002; ELSTNER et al. 1998).

La capacité du CLA d'induire l'apoptose lors des traitements de radiothérapie afin d'augmenter la radiosensibilité des cellules cancéreuses du sein n'a jamais été étudiée.

## **4. Processus métastatique**

Une métastase est par définition un amas de cellules cancéreuses s'étant formé à distance du foyer initial. Le processus métastatique est donc la série d'étapes menant une cellule cancéreuse de la tumeur primaire jusqu'à un point éloigné de cette dernière pour y former une métastase. Les deux principales étapes du processus métastatique sont la migration à travers la matrice extracellulaire (ECM) et la dissémination par le système lymphatique ou sanguin.

La migration dans la ECM s'effectue en quatre étapes. Des cellules tumorales se détachent tout d'abord de la tumeur primaire et s'attachent ensuite aux protéines de la ECM. Les cellules sécrètent alors des enzymes protéolytiques dont le rôle est de dégrader les différentes composantes de la ECM. Ces enzymes protéolytiques sont appelées métalloprotéases de la matrice (MMPs). La dernière étape de l'invasion est la migration des cellules tumorales dans la ECM jusqu'à la circulation sanguine ou lymphatique par les zones de protéolyse. Une fois dans la circulation sanguine ou lymphatique, les cellules tumorales peuvent alors se disséminer dans le corps. Les cellules tumorales adhèrent à l'endothélium vasculaire puis pénètrent l'organe cible par des mécanismes similaires à ceux impliqués dans l'invasion. Dans le cas de cancers du sein, la dissémination des cellules tumorales touche n'importe quel organe ou tissu mais les endroits favorisés sont les poumons, les os et le foie (KUMAR et al., 1997). Les étapes du processus métastatique sont illustrées à la figure 5.



**Figure 5 : Illustration schématique de la cascade métastatique (KUMAR et al., 1997).**

#### **4.1 Métalloprotéases de la matrice (MMPs)**

Les MMPs sont des enzymes protéolytiques jouant un rôle important dans le remodelage de la ECM associé dans le développement et la croissance des mammifères. En effet les MMPs sont essentielles par exemple, à la cicatrisation de blessures, l'angiogénèse et l'embryogénèse (CLARK, 2001; JOHNSON et al., 2003). Cependant, elles sont également impliquées dans le processus dégénératif associé à certaines maladies telles que l'emphysème pulmonaire et l'arthrite rhumatoïde (MANDAL et al., 2003). Une surexpression de certaines MMPs peut être notée dans différentes tumeurs. Il n'est donc pas



surprenant de les retrouver dans plusieurs étapes du développement des cancers, soit l'angiogénèse (permettant une bonne irrigation sanguine de la tumeur), l'invasion des cellules tumorales et la formation des métastases (CLARK, 2001).

#### 4.1.1 Structure des MMPs

L'un des points communs des MMPs est qu'elles contiennent toutes un atome de zinc dans leur domaine catalytique. La plupart des MMPs possèdent un fragment, nommé propeptide, recouvrant leurs domaines catalytiques et les rend inactifs. Le propeptide est maintenu en place grâce à une interaction du groupement thiol (SH) d'une cystéine contenue dans le propeptide avec l'atome de zinc du site actif (NAGASE, 1997). La figure 6 montre la structure de certaines MMPs.

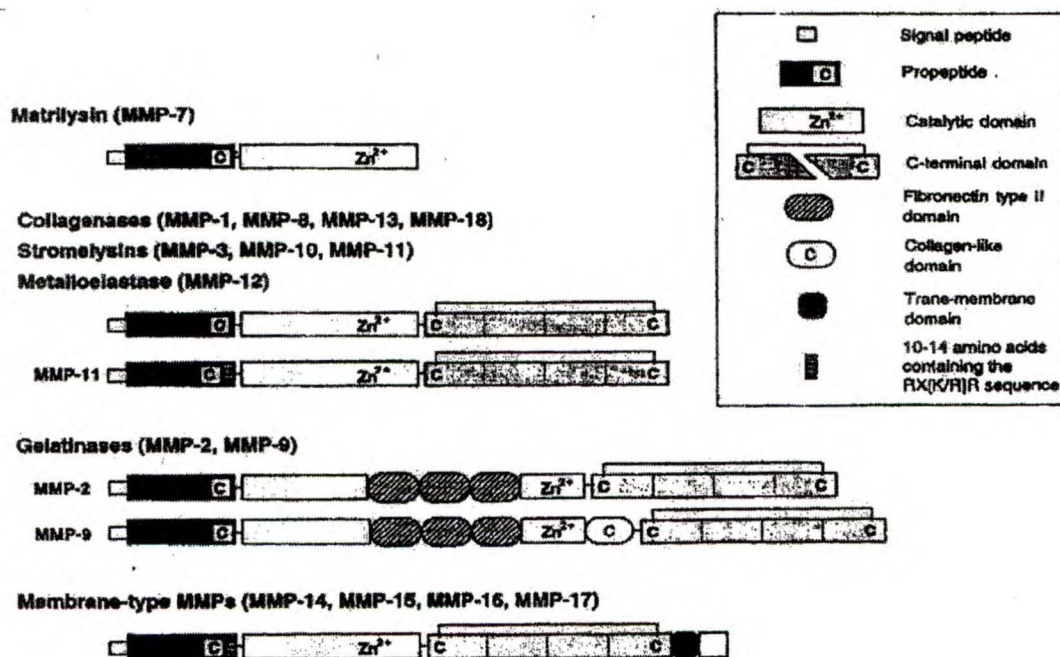


Figure 6 : Structure primaire de certaines MMPs (NAGASE, 1997).

#### 4.1.2 Classes des MMPs

Les MMPs peuvent être regroupées en 5 différentes classes selon leurs substrats et leurs fonctions. La première classe est celle des collagénases. Elle regroupe les MMP-1, -8, -13 et 18. Comme leur nom l'indique, ces MMPs dégradent préférentiellement les différents types de collagène. La seconde classe est composée des gélatinases. Elle comprend les MMP-2 et -9. Leur substrat principal est la gélatine mais elles peuvent également dégrader certains types de collagène de même que la fibronectine et la laminine (NAGASE, 1997). Dans la troisième classe formée des stromélinases nous retrouvons les MMP-3 et -10 dont leur principal substrat est l'aggrecan. Les MMPs de type membranaires (MT-MMPs) forment la quatrième classe. Les MMP-14, -15, -16 et -17 se retrouvent dans cette classe. Elles semblent surtout être impliquées dans l'activation d'autres MMPs. Finalement, la dernière classe de MMPs ne porte pas de nom particulier puisqu'elle regroupe les autres MMPs, celles qui ne sont pas classées dans les quatre premières classes (NAGASE, 1997). La figure 7 montre un tableau des différentes classes de MMPs de même que leurs substrats ou fonctions.

Enzyme	MMP No.	Matrix substrates or functions
<b>Collagenases</b>		
Interstitial collagenase (EC 3.4.24.7)	MMP-1	Collagens I, II, III, VII, and X, gelatins, entactin, aggrecan, link protein
Neutrophil collagenase (EC 3.4.24.34)	MMP-8	Collagens I, II and III, aggrecan, link protein
Collagenase 3	MMP-13	Collagens I, II, III
Collagenase 4 ( <i>Xanopus</i> )	MMP-18	Collagen I
<b>Gelatinases</b>		
Gelatinase A (EC 3.4.24.24)	MMP-2	Gelatins, collagens I, IV, V, VII, X, and XI, fibronectin, laminin, aggrecan, elastin, large tenascin C, vitronectin, $\beta$ -amyloid protein precursor ( $\beta$ -secretase-like activity)
Gelatinase B (EC 3.4.24.35)	MMP-9	Gelatins, collagens IV, V, XIV, aggrecan, elastin, entactin, vitronectin
<b>Stromelysins</b>		
Stromelysin 1 (EC 3.4.24.17)	MMP-3	Aggrecan, gelatins, fibronectin, laminin, collagens III, IV, IX and X, large tenascin-C, vitronectin
Stromelysin 2 (EC 3.4.24.22)	MMP-10	aggrecan, fibronectin, collagen IV
<b>Membrane-type MMPs</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Collagens I, II, III, fibronectin, laminin-1, vitronectin, dermatan sulfate proteoglycan; activates proMMP-2 and proMMP-13
MT2-MMP	MMP-15	Not known
MT3-MMP	MMP-16	Activates proMMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Not known
<b>Others</b>		
Matrilysin (EC 3.2.24.23)	MMP-7	Aggrecan, fibronectin, laminin, gelatins, collagen IV, elastin, entactin, small tenascin-C, vitronectin
Stromelysin 3	MMP-11	Weak activity on fibronectin, laminin, collagen IV, aggrecan, gelatins
Metalloelastase	MMP-12	Elastin
(Unnamed)	MMP-19	Not known

Figure 7 : Tableau des différentes classes de MMPs de vertébrés de même que leurs substrats ou fonctions (NAGASE, 1997). Les MMPs sont regroupées sous 5 différentes classes, soit les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les MMPs de type membranaires et les autres MMPs.

#### 4.1.3 Activation des MMPs

En général, les MMPs sont sécrétées sous forme de proenzymes et nécessitent une modification structurale afin d'exposer leurs sites catalytiques. L'activation des MMPs peut s'effectuer par des protéases comme la plasmine ou certaines MMPs comme les MT-MMPs. Le passage de la forme latente à la forme active peut également être accompli par des agents non-protéolytiques tels que l'acétate de 4-aminophénylmercurique (APMA), l'hypochlorite (HOCl), le glutathion oxydé (GSSG), des composés dénaturants (urée, sodium dodécyle

sulfate (SDS)) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (NAGASE, 1997; ITOH et al., 1995). L'activation des MMPs débute par une rupture de l'interaction entre l'atome de zinc et le groupement SH de la cystéine par des protéases ou des agents non-protéolytiques pour former une MMP intermédiaire. Le propeptide est toujours présent mais n'est plus lié à l'atome de zinc. Le propeptide est alors suffisamment déstabilisé pour qu'il y ait ensuite autoclivage de la MMP et former une MMP active (figure 8).

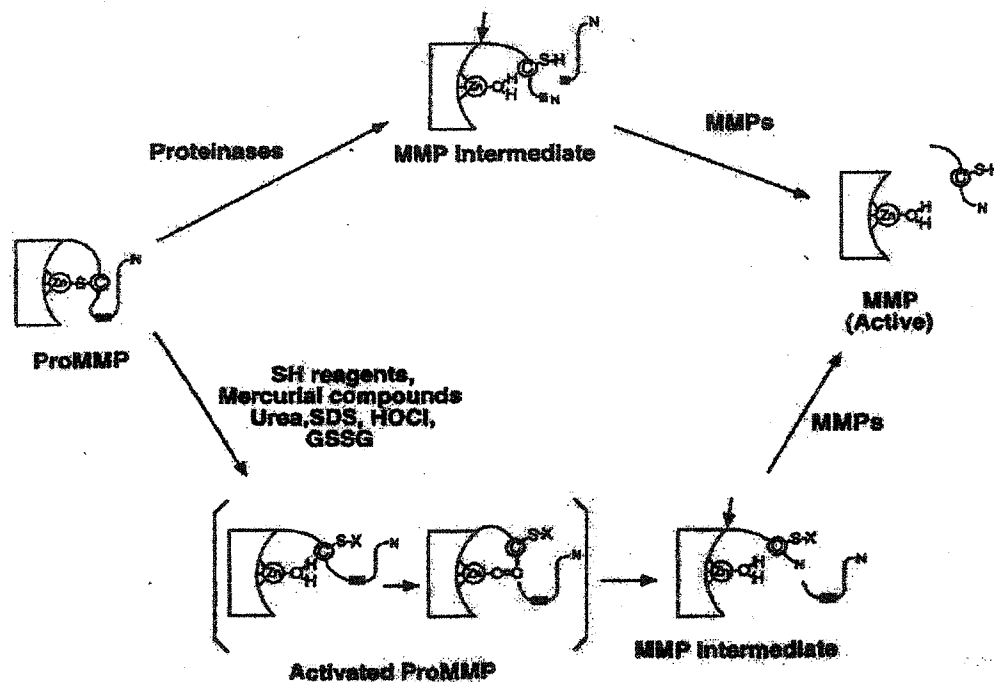
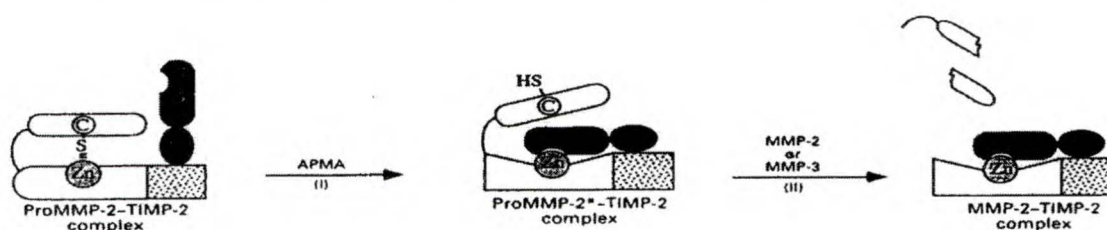


Figure 8 : Activation en cascade des MMPs par des protéases ou des agents non-protéolytiques (NAGASE, 1997).

#### 4.1.4. Régulation des MMPs

La régulation des MMPs peut se faire au niveau post-traductionnel et au niveau transcriptionnel. Au niveau post-traductionnel, le fait que la plupart des MMPs soient

sécrétées sous une forme latente est déjà, en soi, une forme de contrôle. D'autre part, il existe des inhibiteurs des MMPs nommés inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs). Les TIMPs se lient dans un rapport 1 : 1 sur les MMPs actives afin de bloquer le site catalytique comme le ferait le propeptide. Les TIMPs peuvent également se lier à la forme latente des MMPs et empêcher leur activation (figure 9) (ITOH et al., 1995).



**Figure 9 : Inhibition de l'activité de la MMP-2 par la TIMP-2 (ITOH et al., 1995).** La TIMP-2 peut se fixer à la forme latente de la MMP-2 (pro-MMP-2) et former un complexe. Si un activateur de la MMP-2 est ajouté, ici l'APMA, le lien entre le groupement SH d'une cystéine du propeptide et l'atome de zinc du site catalytique est rompu, exposant alors partiellement le site catalytique. La protéine TIMP-2 étant déjà présente sur la MMP-2, elle bloque instantanément le site catalytique. Bien que le fragment propeptidique de la MMP-2 soit protéolysé, la MMP-2 demeure inactive, la TIMP-2 bloquant le site catalytique.

Le contrôle des MMPs s'effectue aussi au niveau transcriptionnel (CLARK, 2001). En effet, plusieurs facteurs régulent l'expression des MMPs. Le PPAR $\gamma$  activé pourrait en outre jouer sur l'expression de certaines MMPs. Des études ont démontré que l'expression de la MMP-9 pouvait être diminuée chez des cellules épithéliales de bronches humaines par deux ligands synthétiques du PPAR $\gamma$ , le rosiglitazone et le pioglitazone (HETZEL et al., 2003) et chez des monocytes humains par un ligand synthétique (GW7845) et un ligand naturel (15d-PGJ<sub>2</sub>) (WORLEY et al., 2003). L'effet du CLA, aussi ligand du PPAR $\gamma$ , sur l'expression des MMPs chez des cellules cancéreuses n'a jamais été étudié.

## 5. Hypothèse et objectifs de l'étude

Plusieurs altérations sont présentes dans le génome des cellules cancéreuses du sein. Ces altérations affectent l'efficacité des traitements anticancéreux, notamment la radiothérapie, puisque les cellules cancéreuses du sein sont relativement réfractaires à l'induction de l'apoptose. Cette radiorésistance serait en partie responsable de la récurrence de ce type de cancer. De plus, le cancer du sein est reconnu pour être très invasif. En effet, les cellules cancéreuses du sein ont souvent la propriété d'être métastatique et donc d'aller se loger dans d'autres organes. La première hypothèse de cette étude est qu'il est possible d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie en ajoutant un inducteur de l'apoptose aux cellules traitées aux rayons gamma. La seconde hypothèse est qu'il est également possible de diminuer la dissémination des cellules tumorales en incubant les cellules avec un inhibiteur de l'expression de certaines MMPs.

L'objectif principal de cette étude est d'étudier le potentiel anticancéreux du CLA et de trois de ses isomères soit le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis. Le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis ont été choisis parce que leur potentiel anticancéreux avait déjà été démontré pour certaines lignées cellulaires mais également parce qu'ils sont les principaux constituants du CLA-mixte. Quant au CLA-9cis 11cis, le fait que très peu d'études portent à son sujet et qu'il soit disponible commercialement en ont fait un isomère de choix. La capacité des CLAs d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie chez les cellules cancéreuses du sein sera tout d'abord évaluée. Par la suite, l'aptitude des CLAs à diminuer l'invasion dans le ECM des cellules cancéreuses sera examinée *in vivo* et *in vitro*.

## PREMIÈRE PARTIE

### **Effet radiosensibilisateur de l'acide linoléique conjugué chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231**

G. Drouin, A. Douillette, P. Lacasse et B. Paquette

Article accepté le 13 janvier 2004 par le *Canadian Journal of  
Physiology and Pharmacology*

**Effet radiosensibilisateur de l'acide linoléique conjugué chez les cellules  
cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231**

Geneviève Drouin, Annie Douillette, Pierre Lacasse, Benoit Paquette

**G. Drouin, A. Douillette et B. Paquette<sup>1</sup>.** Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, 3001, 12<sup>ième</sup> Avenue Nord, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

**P. Lacasse.** Centre de recherche et développement sur le bovin laitier et le porc, CP 90, Lennoxville, Québec, J1M 1Z3, Canada.

<sup>1</sup>Auteur correspondant (e-mail: benoit.paquette@USherbrooke.ca, téléphone: 819-346-1110 poste 14767, Fax: 819-564-5442)



## Résumé

Les voies apoptotiques sont fréquemment altérées chez les cellules cancéreuses du sein diminuant l'efficacité de la radiothérapie. L'acide linoléique conjugué (CLA), connu pour déclencher l'apoptose, a été testé comme radiosensibilisateur chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Le CLA-mixte, constitué des isomères le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis, a été comparé à trois isomères purifiés, soit le CLA-9cis 11cis, CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis. À l'aide du marqueur apoptotique YO-PRO®-1, le CLA-9cis 11cis à 50  $\mu$ M s'est avéré le meilleur inducteur d'apoptose conduisant à des niveaux 10 fois plus élevés chez les cellules MCF-7 et 2.5 fois plus élevés chez les cellules MDA-MB-231, comparativement au CLA-mixte. Contrairement aux études effectuées avec des lignées de cancer colorectal et de prostate, le CLA-10trans 12cis n'induit pas d'apoptose chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Nos résultats suggèrent aussi que les deux principaux constituants du CLA-mixte, soit le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis ne sont pas impliqués dans l'induction de l'apoptose chez les carcinomes du sein étudiés. Une dose de 5 Gy n'a pas induit d'apoptose chez les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. L'addition du CLA-9cis 11cis ou du CLA-mixte a permis d'observer une apoptose radio-induite, le CLA-9cis 11cis étant environ 8 fois supérieure au CLA-mixte. Le CLA-9cis 11cis s'est aussi avéré être le meilleur radiosensibilisateur, bien que les isomères CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis ont aussi réduit la survie cellulaire après irradiation, mais en empruntant un mécanisme non relié à l'apoptose. En conclusion, l'effet radiosensibilisateur du CLA-9cis 11cis supporte son potentiel comme adjuvant combiné à la radiothérapie pour traiter les carcinomes du sein.

Mots clés: Cancer du sein, CLA, radiothérapie, apoptose

## Abstract

Apoptotic pathways in breast cancer cells are frequently altered reducing the efficiency of radiotherapy. Conjugated linoleic acid (CLA), known to trigger apoptosis, was tested as radiosensitizer in breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. The CLA-mix, made up of the isomers CLA-9cis 11trans and CLA-10trans 12cis, was compared to three purified isomers, i.e. the CLA-9cis 11cis, CLA-9cis 11trans and CLA-10trans 12cis. Using the apoptotic marker YO-PRO®-1, the CLA-9cis 11cis at 50  $\mu$ M turned out to be the best apoptotic inducer leading to a 10-fold increase in MCF-7 cells and a 2.5-fold increase in MDA-MB-231 cells, comparatively to the CLA-mix. Contrary to previous studies on colorectal and prostate cancer cells, the CLA-10trans 12cis don't lead to an apoptotic response on breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. Our results also suggest that the main components of the CLA-mix (CLA-9cis 11trans and CLA-10trans 12cis) are not involved in the induction of apoptosis in the breast cancer cells studied. A dose of 5 Gy didn't induced apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The addition of CLA-9cis 11cis or CLA-mix has allowed to observe a radiation-induced apoptosis, the CLA-9cis 11cis being about 8-fold better than the CLA-mix. The CLA-9cis 11cis turned out to be the best radiosensitizer, although the isomers CLA-9cis 11trans and CLA-10trans 12cis have also reduced the cell survival following irradiation, but using a mechanism not related to apoptosis. In conclusion, the radiosensitizing property of the CLA-9cis 11cis supports its potential as agent to improve radiotherapy against breast carcinoma.

Key words: Breast cancer, CLA, radiotherapy, apoptosis

## **Introduction**

Le cancer du sein représente le cancer le plus souvent diagnostiqué chez les femmes en Amérique du Nord (Weir et al. 2003). En plus, celui-ci peut réapparaître jusqu'à 15 ans après les traitements de chimiothérapie et radiothérapie. Cette récurrence prend forme de nodules loco-régionaux ou de métastases à distance (Langstein et al. 2003; Abram Recht 1996). Bien que la radiothérapie soit reconnue pour réduire l'incidence des récurrences de cancer du sein, 48% des femmes traitées avec les radiations et la chimiothérapie en meurent (Overgaard et al. 1997; Overgaard 1999). Ces données justifient les efforts déployés pour développer de nouvelles modalités de traitements anticancéreux.

Suite à une exposition aux radiations, différents types de mort cellulaire peuvent être induite, dont l'apoptose, la nécrose, la mort mitotique et la mort reproductive (Hall 2000). L'apoptose est induite par des doses relativement faibles, alors que la nécrose apparaît préférentiellement suite à l'exposition à des doses élevées (10 à 20 Gy). Les séances de radiothérapie étant caractérisées par l'exposition quotidienne à une dose de 2 Gy, ce type de mort cellulaire ne serait pas fréquemment rencontré en clinique. Concernant la mort mitotique, celle-ci signifie que la cellule irradiée meurt lors de la mitose. Cette mort mitotique survient soit dès la première division cellulaire suivant l'irradiation, ou jusqu'à 5 divisions plus tard. D'autre part, une cellule exposée aux radiations peut aussi perdre sa capacité de se reproduire, phénomène appelé mort reproductive. Ces dernières cellules conservent un certain niveau d'activité métabolique, mais elles perdent leur capacité de se diviser (Hall 2000).

Initialement, la mort reproductive était perçue comme étant irréversible et par conséquent les cellules affectées ne pouvaient pas être impliquées dans la récurrence du cancer. Or, les travaux de Schmidt-Ullrich nous amènent à repenser ce concept (Schmidt-Ullrich et al. 1992). Cette équipe a démontré qu'in vitro une exposition à une dose totale de 20 à 60 Gy fractionnée à 2 Gy par jour conduit à un arrêt de prolifération chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7. La majorité de ces cellules entraînent en mort mitotique ou mort reproductive, alors qu'une reprise de prolifération cellulaire a été observée de 30 à 45 jours post-irradiation chez une petite fraction des cellules irradiées. Cette reprise de la prolifération cellulaire pourrait donc en partie expliquer la récurrence des cancers du sein. Par conséquent, il serait souhaitable de développer une modalité thérapeutique qui augmenterait le nombre de cellules qui meurent par d'autres voies que la mort reproductive, soit par l'apoptose. En plus, la mortalité cellulaire induite par les radiations est plus élevée lorsque les cellules entrent facilement en apoptose après irradiation (Hall 2000).

Cependant, l'apoptose radio-induite est fréquemment altérée chez les cancers du sein. L'estradiol, de concert avec d'autres hormones, contribue à la croissance et la différenciation des cellules épithéliales du sein. Une baisse des concentrations d'estradiol à la fin du cycle menstruel et spécialement durant la ménopause conduisent à une régression par apoptose des structures épithéliales et du stroma. Cependant, chez les cellules cancéreuses du sein, les voies de l'apoptose sont très fréquemment altérées conduisant à une prolifération incontrôlée des tumeurs du sein (Chadderton et al. 2000; Yang et al. 2001). Ces altérations affectent aussi l'efficacité des traitements puisque les cellules cancéreuses du sein sont relativement réfractaires à l'induction de l'apoptose en réponse à des modalités thérapeutiques visant à endommager l'ADN, comme les radiations ionisantes (Gewirtz 2000).

Afin d'améliorer les traitements contre les cancers du sein et de diminuer les risques de récurrence, de nouvelles modalités thérapeutiques doivent être développées. Le but de cette étude est donc d'explorer l'utilisation de nouveaux agents capables d'augmenter la radiosensibilité des cellules cancéreuses du sein, de préférence en stimulant l'apoptose radio-induite. Dans des travaux subséquents, l'impact sur la diminution de la récurrence sera étudié.

Certains ligands du récepteur nucléaire peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) pourraient s'avérer des options intéressantes. Ce récepteur PPAR $\gamma$  une fois activé par un ligand forme un hétérodimère avec un récepteur rétinoïde X (RXR) pour ensuite modifier l'expression de plusieurs gènes en se liant à l'élément de réponse du PPAR (PPRE) (Shimada et al. 2002). Selon le ligand utilisé, l'activation du PPAR $\gamma$  peut induire l'apoptose chez plusieurs types de cancer comme le cancer colorectal (Shimada et al. 2002), le cancer du foie (Yoshizawa et al. 2002; Li et al. 2003), et également le cancer du sein (Clay et al. 2001; Yin et al. 2001; Elstner et al. 2002). Cette apoptose serait associée à une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bak (Yoshizawa et al. 2002; Li et al. 2003; Chen et al. 2002; Elstner et al. 1998).

Parmi les ligands naturels du PPAR $\gamma$ , l'acide linoléique conjugué (CLA) a déjà démontré son potentiel anticancéreux lors d'études au niveau cellulaire ainsi que chez les animaux (Ip et al. 1999; Cunningham et al. 1997; Ip et al. 1996; Ip et al. 1994; Cesano et al. 1998). Le CLA est un terme regroupant un mélange d'isomères géométriques et de positions.

Le CLA est synthétisé dans le rumen de la vache par des bactéries. Conséquemment, les produits laitiers et la viande bovine représentent des sources naturelles et privilégiées de CLA (Ip et al. 1999). En se liant au récepteur PPAR $\gamma$ , le CLA peut diminuer l'expression de Bcl-2 chez différentes lignées cellulaires (Miller et al. 2002; Liu et al. 2002; Majumder et al. 2002).

Dans cette étude, le mélange d'isomères du CLA (CLA-mixte) de même que trois isomères purifiés, le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis ont été testés. Leurs capacités d'augmenter la radiosensibilité ont été étudiées chez les cellules cancéreuses du sein humaines MCF-7 et MDA-MB-231 qui représentent respectivement des cellules faiblement et fortement métastatique.

## **Matériel et méthodes**

### **Matériel**

L'acide octadécadiénoïque conjugué (CLA-mixte) (Sigma, St. Louis, MO) et les isomères acide 9(cis),11(trans)-octadécadiénoïque (CLA-9cis 11trans), acide 9(cis),11(cis)-octadécadiénoïque (CLA-9cis 11cis) et acide 10(trans),12(cis)-octadécadiénoïque (CLA-10trans 12cis) (Matreya, Bellefonte, PA) ont été solubilisés dans l'éthanol 100% à une concentration de 100 mM et conservés sous atmosphère d'azote à -20°C. Pour la solubilisation dans le milieu de culture, une solution de 1 mM a été préparée dans du Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma) contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma). Après agitation d'une heure à 37°C, les CLAs ont été dilués aux concentrations voulues dans le milieu de culture MEM. Le CLA-mixte a été analysé par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Kemestrie, Sherbrooke, Qc) et est composé principalement de 2 isomères, soit le CLA-9cis 11trans à 52% et le CLA-10trans 12cis à 48%. Pour l'essai d'apoptose, le YO-PRO®-1 a été obtenu de Molecular Probes (Eugene, OR).

### **Culture cellulaire**

Les cellules cancéreuses du sein MCF-7 (American Type Culture Collection : HTB-22) et MDA-MB-231 (American Type Culture Collection : HTB-26) ont été cultivées dans du MEM (Sigma) contenant 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma), 2 mM de L-glutamine (Sigma), 1 µg streptomycine/ml (Sigma), 1 U pénicilline G/ml (Sigma), 0.25 µg amphotéricine β/ml (Sigma) et enrichi de 10% sérum fœtal bovin (Gibco BRL, Grand Island, NY) à 37°C sous un atmosphère humide contenant 5% CO<sub>2</sub>.

### Détermination de la viabilité cellulaire par test de formation de colonies

Les cellules MCF-7 (500) et les cellules MDA-MB-231 (800) ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre et incubées pendant 4 h. Le CLA-mixte, le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans ou le CLA-10trans 12cis ont été ajoutés individuellement aux cellules aux concentrations indiquées. Comme contrôle, des boîtes de Pétri supplémentaires ont été incubées avec 0.2% d'éthanol. Après 14 jours d'incubation, les colonies ont été fixées à l'éthanol puis colorées au cristal violet. Les colonies contenant 50 cellules et plus ont été comptées.

Lorsque mentionné, les cellules ont été irradiées 24 h après l'addition des CLAs ou de l'éthanol. Des doses de 2 et 5 Gy ont été données à l'aide d'une source de  $^{60}\text{Co}$  équipant une GammaCell 220 (MDS Nordion, Ottawa, Canada) et ayant un débit de dose de 3.8 Gy/min.

La capacité radiosensibilisante des diverses préparations de CLA a été déterminée en calculant le ratio suivant:

(Survie cellules irradiées traitées avec le CLA/Survie cellules non-irradiées traitées avec le CLA)

---

(Survie cellules irradiées non-traitées/Survie cellules non irradiées non-traitées)

Un ratio d'une valeur inférieure à 1 révèle un effet radiosensibilisateur. Un ratio égal à 1 indique que l'effet est additif; c'est-à-dire que l'effet toxique des radiations s'additionne



à celui induit par les CLAs. Finalement, un ratio supérieur à 1 indique que la toxicité cellulaire mesurée en combinant les CLAs aux radiations est inférieure à la somme des toxicités obtenues individuellement par ces deux modalités.

### **Détection de l'apoptose**

2500 cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits noires à fond clair (Corning Incorporated, Acton, MA). 24 h après l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec le CLA-mixte, le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans, le CLA-10trans 12cis ou l'éthanol (contrôle) aux concentrations indiquées. Pour déterminer le niveau d'apoptose induite par les CLAs, l'essai tel que décrit par Wronski et al. (2002) a été effectué 36 h après le traitement des cellules.

La détermination de l'augmentation de l'apoptose causée par les radiations a été effectuée de la façon suivante: après une pré-incubation de 24 h avec l'un des CLAs, les cellules ont été exposées à une dose de 5 Gy et l'essai d'apoptose a été exécuté 24 h plus tard. Brièvement, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 50 µl d'une solution colorante composée de 5.6 µg YO-PRO®-1/ml dans du PBS. Après une incubation sur glace de 30 min, les plaques ont été lues par le dessous à l'aide d'un fluorimètre à microplaque Synergy HT (Bio-tek, Winooski, VT) ajusté aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 530 nm.

### **Statistiques**

La valeur significative des résultats a été validée en effectuant le test t de Student. Les résultats rapportés représentent la moyenne de 3 à 5 essais.

## **Résultats**

### **Diminution de la viabilité cellulaire par les CLAs**

L'effet du CLA-mixte et des 3 isomères sur la viabilité cellulaire, sans exposition aux radiations, a été déterminé par test de formation de colonies pour les cellules MCF-7 (Fig. 1A) et MDA-MB-231 (Fig. 1B). À une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , la survie des cellules MCF-7 est demeurée élevée se situant à environ 80 % suite à une incubation avec le CLA-mixte, le CLA-9cis 11cis et le CLA-10trans 12cis. Avec ces CLAs, la survie cellulaire a diminuée de façon dose-dépendante se situant entre 20 % et 46 % à 100  $\mu\text{M}$ . Inversement, aucun effet toxique n'a été mesuré avec le CLA-9cis 11trans à 50  $\mu\text{M}$ . Ce même isomère démontrait encore peu d'effet sur la survie cellulaire à une concentration aussi élevée que 200  $\mu\text{M}$ .

Les cellules MDA-MB-231 se sont avérées plus sensibles aux CLAs que les cellules MCF-7. Déjà à 10  $\mu\text{M}$ , la survie cellulaire a été affectée par l'addition des 3 isomères et le CLA-mixte. Pour tous les CLAs, la survie a diminuée de façon dose-dépendante. Le CLA-mixte et surtout l'isomère CLA-9cis 11cis ont été les plus toxiques pour les cellules MDA-MB-231 avec des baisses marquées de survie cellulaire mesurées à 50  $\mu\text{M}$ . Contrairement aux résultats obtenus avec les cellules MCF-7, l'isomère CLA-9cis 11trans a cette fois-ci démontré un effet cytotoxique comparable aux autres préparations de CLA.

### **Induction de l'apoptose par les CLAs**

Contrairement aux cellules épithéliales normales du sein, les cellules malignes du sein sont réfractaires à l'induction de l'apoptose ce qui peut contribuer à diminuer l'efficacité

des traitements anticancéreux. Afin de pallier à ce manque d'induction de l'apoptose, une nouvelle approche thérapeutique consiste à ajouter un inducteur de l'apoptose durant les séances de radiothérapie. Un bon candidat pourrait être le CLA ou l'un de ses isomères dont les propriétés d'inducteur de l'apoptose ont été observées chez les cellules de cancer colorectal HT-29 (Cho et al. 2003), MIP-101 (Palombo et al. 2002) et Caco-2 (Kim et al. 2002). Par conséquent, nous avons déterminé si le CLA-mixte de même que les 3 isomères de CLA pouvaient induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Le niveau d'induction de l'apoptose par les CLAs a été déterminé par un test de fluorescence en microplaque utilisant le marqueur d'apoptose YO-PRO®-1. Ce marqueur d'acides nucléiques a la propriété de traverser la membrane cytoplasmique que lorsque les cellules entrent en apoptose (Idziorek et al. 1995). Ces essais ont été effectués suite à une incubation de 36 h avec les CLAs à des concentrations de 50, 100 et 200  $\mu\text{M}$ .

Pour les cellules MCF-7, seul l'isomère CLA-9cis 11cis a conduit à une forte induction de l'apoptose (Fig. 2A) qui est proportionnelle à l'augmentation de la cytotoxicité induite par cet isomère du CLA (Fig. 1A). Une légère accumulation du marqueur apoptotique YO-PRO®-1, mais statistiquement significative, a aussi été observée pour le CLA-mixte ( $p < 0.03$  à  $0.0002$ , selon la concentration de CLA-mixte ajoutée). Néanmoins, l'induction de l'apoptose demeurait faible même à 200  $\mu\text{M}$ , concentration où l'effet cytotoxique du CLA-mixte était déjà très important. Concernant les isomères CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis, aucune induction de l'apoptose telle que mesurée avec l'essai YO-PRO®-1 n'a été observée. Ces résultats démontrent que la baisse de survie cellulaire induite par le CLA-mixte ainsi que les isomères CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis n'était pas causée par le déclenchement de l'apoptose.

Chez les cellules MDA-MB-231, des résultats semblables à ceux obtenus avec les cellules MCF-7 sont rapportés à la figure 2B. Encore une fois, le CLA-9cis 11cis a causé une forte induction de l'apoptose dont le niveau augmentait selon la concentration de CLA-9cis 11cis ajoutée et qui s'accompagnait d'une baisse de la survie cellulaire (Fig. 1B). Contrairement aux cellules MCF-7, les cellules MDA-MB-231 expriment la caspase-3 (Janicke et al. 1998). Malgré l'expression de cette importante caspase effectrice, une induction très faible de l'apoptose a été observée chez les cellules MDA-MB-231 exposées aux CLA-mixte, CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis.

Les changements morphologiques associés à l'apoptose se manifestent entre autre par une perte d'adhésion cellulaire. Afin de s'assurer que l'induction de l'apoptose n'a pas été sous évaluée lors de notre essai, les plaques de 96 puits ont été centrifugées afin de précipiter les cellules apoptotiques non adhérentes avant l'incubation avec le marqueur YO-PRO®-1. Ces essais ont démontré que le nombre de cellules en suspension était insuffisant pour modifier la quantification de l'apoptose par le YO-PRO®-1 36 h après l'addition des CLAs (résultats non rapportés).

#### **Effet radiosensibilisateur des CLAs**

Avant de déterminer si les CLAs pouvaient agir en tant que radiosensibilisateurs, les niveaux de radiosensibilité des lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 ont été déterminés (Fig. 3). Après une incubation de 24 h suite à l'ensemencement, les cellules ont reçu une dose unique de 2 ou 5 Gy à l'aide d'une source de  $^{60}\text{Co}$  et leur niveau de survie cellulaire a été mesuré par essai de formation de colonies. Cet essai a été utilisé parce qu'il

tient compte de la mort mitotique induite par les radiations, phénomène cellulaire non détectable par des essais métaboliques comme le test MTT.

Pour les cellules MCF-7, une survie cellulaire de 80.5 % a été obtenue à 2 Gy et diminuait à 34 % après exposition à une dose de 5 Gy. Les cellules MDA-MB-231 se sont avérées plus radiosensibles puisque leur survie se situait à 52.4 % pour une dose de 2 Gy et à 13.4 % après une exposition de 5 Gy.

La capacité des CLAs d'augmenter la toxicité induite par 5 Gy de radiations ionisantes a été déterminée en irradiant les cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 24 h après l'addition des CLAs. Le calcul de la capacité radiosensibilisatrice a été effectué comme mentionné dans la section « Matériel et Méthodes ». Un ratio inférieur à 1 indique que le CLA sensibilisait les cellules aux radiations et démontre un effet synergique entre le CLA et l'irradiation. Un ratio calculé égale à 1 signifie que l'effet combiné du CLA avec les radiations n'avait été qu'additif. Finalement, un ratio supérieur à 1 indique que la toxicité cellulaire mesurée en combinant les CLAs aux radiations est inférieure à la somme des toxicités obtenues individuellement par ces deux modalités.

Pour les cellules MCF-7 (Fig. 4A), l'effet radiosensibilisateur le plus prononcé a été obtenu avec l'isomère CLA-9cis 11cis avec lequel des ratios de 0.53 à 50  $\mu$ M et de 0.27 à 100  $\mu$ M ont été calculés. Le CLA-mixte et le CLA-10trans 12cis se sont également avérés de bons radiosensibilisateurs obtenant des ratios calculés en dessous de 1, alors que seul l'isomère CLA-9cis 11trans n'a démontré aucun effet radiosensibilisateur pour la lignée MCF-7.

Chez les cellules MDA-MB-231 (Fig. 4B), tous les CLAs ont démontré un effet radiosensibilisateur à des concentrations de 50 et 100  $\mu$ M. Le meilleur isomère pour sensibiliser les cellules MDA-MB-231 aux radiations a encore été le CLA-9cis 11cis. Le CLA-mixte, le CLA-10trans 12cis et le CLA-9cis 11trans ont aussi radiosensibilisé les cellules MDA-MB-231 mais à un moindre degré que le CLA-9cis 11cis. Le ratio de 0 obtenu à 100  $\mu$ M pour le CLA-9cis 11cis a été causé par une survie nulle des cellules traitées au CLA-9cis 11cis puis irradié. Par conséquent, l'ampleur de la radiosensibilité du CLA-9cis 11cis à 100  $\mu$ M n'a pu être déterminée.

#### **Augmentation de l'apoptose en combinant radiations et CLA**

La résistance à l'induction de l'apoptose par les radiations chez les cellules cancéreuses du sein est bien connue. Ayant démontré que certains CLAs pouvait induire l'apoptose, leur capacité d'augmenter le niveau d'apoptose radio-induite a été déterminée par l'essai YO-PRO®-1. Les cellules ont été incubées pendant 24 h avec l'une des préparations de CLAs puis exposées à une dose d'irradiation de 5 Gy. Après une seconde incubation de 24 h, l'essai YO-PRO®-1 a été effectué. La figure 5 représente les niveaux d'apoptose induits par l'un des CLA incubé seul (rectangle blanc) qui sont superposés au niveau d'apoptose obtenu en combinant CLA et radiation (rectangle noir). Pour les cellules MCF-7 (Fig. 5A), une dose de 5 Gy n'a occasionné aucune augmentation de la fluorescence en l'absence de CLA (contrôle éthanol), appuyant l'absence d'apoptose radio-induite chez ces cellules. En ajoutant l'isomère CLA-9cis 11cis, des augmentations considérables d'apoptose radio-induite ont été notées. D'autre part, le CLA-mixte a induit qu'une faible augmentation

de l'apoptose radio-induite, alors qu'une pré-incubation avec le CLA-9cis 11trans et le CLA-10tran 12cis n'a eu aucun effet d'amplification de l'apoptose (Fig. 5A).

Chez les cellules MDA-MB-231, la même tendance a été observée (Fig. 5B). Bien que le CLA-mixte augmentait légèrement le niveau d'apoptose radio-induite, seul l'isomère CLA-9cis 11cis a conduit à de fortes stimulations de l'apoptose en combinaison avec les radiations.

## Discussion

Le but de cette étude était de déterminer si le CLA et en particulier certains de ses isomères pouvaient exercer un effet radiosensibilisateur sur deux lignées de cancer du sein, soit les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Pour ce faire, le CLA-mixte contenant principalement les isomères CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis a été comparé à 3 isomères purifiés du CLA, soit le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis.

Un test de formation de colonies a permis de déterminer que la survie des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 était diminuée par le CLA-mixte de même que par les isomères CLA-9cis 11cis et CLA-10trans 12cis. Des résultats opposés ont cependant été obtenus avec l'isomère CLA-9cis 11trans. Celui-ci a démontré un effet cytotoxique faible chez les cellules MCF-7, alors que la survie chez les cellules MDA-MB-231 était fortement diminuée. Ces résultats suggèrent que des voies d'induction de mortalité différentes peuvent être utilisées chez les cellules MCF-7 comparativement aux cellules MDA-MB-231. En plus, ces résultats démontrent que les réponses cellulaires peuvent grandement varier selon le type d'isomère de CLA étudié.

D'autres équipes ont déjà rapporté qu'une exposition au CLA-mixte diminuait la prolifération des cellules MCF-7 (Cunningham et al. 1997; Shultz et al. 1992; Durgam et Fernandes 1997; Park et al. 2000; O'Shea et al. 2000). Notre étude supporte ces résultats et met en plus en évidence l'effet toxique qui serait surtout associé à l'isomère CLA-10trans 12cis qui constitue environ 50 % du CLA-mixte. Nos résultats semblent cependant différés de ceux obtenus par Durgam et Fernandes (1997). Ceux-ci ont observé que le CLA-mixte à



35  $\mu$ M diminuait que faiblement la prolifération des cellules MDA-MB-231, alors que l'inhibition était plus marquée chez les cellules MCF-7. Les cellules MCF-7 étant estrogène-récepteur positives et les cellules MDA-MB-231 estrogène-récepteur négatives, les auteurs suggéraient que le CLA-mixte interfère avec une voie mitogénique régulée par l'estrogène. Notre essai de formation de colonies qui mesure le niveau de toxicité cellulaire démontre cependant que les cellules MDA-MB-231 sont plus sensibles au CLA-mixte que les cellules MCF-7. Nous suggérons que l'effet à long terme du CLA-mixte, tel que mesuré par le test de formation de colonies, conduirait à une mortalité cellulaire indépendant de l'expression des récepteurs d'estrogènes.

Les cellules cancéreuses du sein ont fréquemment perdu leur capacité d'entrer facilement en apoptose, limitant ainsi l'efficacité des traitements anticancéreux. À la recherche d'un bon inducteur de l'apoptose, la capacité du CLA-mixte et des 3 isomères à induire l'apoptose chez les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 a été déterminé à l'aide du marqueur apoptotique YO-PRO®-1. L'équipe de Majumder a déjà démontré que le CLA-mixte pouvaient augmenter ou diminuer l'expression de certains gènes reliés à l'apoptose tels que p53, bcl-2 et bax chez les cellules MDA-MB-231 (Majumder et al. 2002). Nos résultats avec le marqueur YO-PRO®-1 confirment que le CLA-mixte peut induire l'apoptose chez les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, mais que l'induction est environ 10 fois plus élevée avec l'isomère CLA-9cis 11cis. Quant aux deux autres isomères, soit le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis, une induction faible ou nulle de l'apoptose n'a été notée. Les isomères CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis étant les principaux constituants du CLA-mixte, nos résultats suggèrent que ces derniers ne sont pas impliqués

dans l'induction de l'apoptose chez les cellules étudiées. L'induction de l'apoptose observée avec ce CLA-mixte serait causée par un isomère minoritaire non identifié.

Nos résultats indiquent aussi que l'induction de l'apoptose peut varier énormément selon le type de cellules cancéreuses étudiées. Ainsi, l'isomère CLA-10trans 12 cis qui s'est avéré être un bon inducteur de l'apoptose chez des cellules cancéreuses colorectales MIP-101 ainsi que PC-3 de la prostate n'a pas déclenché d'apoptose chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Les différentes réponses apoptotiques obtenues avec les CLAs démontrent que le déclenchement de l'apoptose est étroitement lié à l'isomère de CLA et au type de cancer étudiés.

Comme prévu, une dose de 5 Gy n'a induit aucune apoptose chez les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, telles que mesurées avec le marqueur YO-PRO®-1. Les essais de formation de colonies démontrent cependant qu'une dose de 5 Gy diminue la survie de ces deux lignées cellulaires. Ces résultats suggèrent que la mort mitotique habituellement attribuée aux radiations n'est pas reliée à une apoptose radio-induite dans les 24 h suivant l'exposition aux radiations. Parmi les préparations de CLA testées, seul l'isomère CLA-9cis 11cis a conduit de façon marquée à l'augmentation de l'apoptose radio-induite chez les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Cette propriété du CLA-9cis 11cis s'est traduite par une forte augmentation de la radiosensibilité des cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Bien que les préparations CLA-mixte et CLA-10trans 12cis ne stimulaient pas le déclenchement de l'apoptose radio-induite, une augmentation de la radiosensibilité était mesurée. Cette augmentation de la radiosensibilité par ces CLAs démontre que leur effet radiosensibilisateur associe à d'autre type de mort cellulaire.

L'induction de l'apoptose induite par l'isomère CLA-9cis 11cis et amplifiée en réponse à une exposition aux radiations ne semble pas dépendante de la caspase-3. Un niveau d'apoptose environ 1,5 fois plus élevé a été mesuré chez les cellules MCF-7 déficientes en caspase-3 comparativement aux cellules MDA-MB-231 qui expriment la caspase-3. Ces résultats suggèrent que chez ces cellules cancéreuses du sein, l'expression de la caspase-3 ne serait pas essentielle pour induire une apoptose avec l'isomère CLA-9cis 11cis.

D'autre part, l'induction de l'apoptose chez ces cellules semble fortement stéréospécifique puisqu'une exposition au CLA-mixte ainsi qu'aux isomères CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis n'entraînait pas d'accumulation du marqueur apoptotique YO-PRO®-1.

Les radiations ionisantes peuvent induire une mort mitotique ou un arrêt de prolifération permanent ou temporaire. Suite à une dose cumulative de 20 à 60 Gy, un retour de la prolifération a déjà été observé chez les cellules MCF-7. Ce phénomène pourrait en partie expliquer la récurrence des cancers du sein observée en clinique suite aux traitements de radiothérapie et chimiothérapie. Par conséquent, l'addition d'un inducteur de l'apoptose durant les séances de radiothérapie pourrait s'avérer un outil puissant pour inhiber la récurrence des cancers du sein.

En conclusion, contrairement aux précédentes études effectuées sur des lignées de cancer colorectal ou de prostate, l'induction de l'apoptose n'est pas induite par le CLA-mixte et le CLA-10trans 12cis chez les lignées de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Parmi

les CLAs étudiés, seul l'isomère CLA-9cis 11cis a déclenché une apoptose dont la réponse s'amplifiait suite à une combinaison avec les radiations ionisantes. Bien que très peu étudié, cet isomère CLA-9cis 11cis pourrait donc s'avérer un bon candidat pour augmenter la radiosensibilité de cellules cancéreuses du sein résistantes au déclenchement de l'apoptose en réponse aux traitements de radiothérapie.

## **Remerciements**

Les auteurs remercient les Producteurs Laitiers du Canada pour leur support financier. C.R.D. contribution # 814.

## Légendes des figures

**Fig. 1.** Diminution de la survie cellulaire par le CLA-mixte (◆), le CLA-9cis 11 cis (■), le CLA-9cis 11trans (▲) et le CLA-10trans 12cis (●) déterminée par test de formation de colonies. Cellules MCF-7 (A) et cellules MDA-MB-231 (B).

**Fig. 2.** Effet des CLAs sur l'induction de l'apoptose. Après une incubation de 36 h avec l'un des CLAs, le niveau d'apoptose a été mesurée à l'aide du marqueur apoptotique YO-PRO®-1 chez les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B). CLA-mixte (▣), du CLA-9cis 11cis (▤), du CLA-9cis 11trans (▥) et du CLA-10trans 12cis (▦).

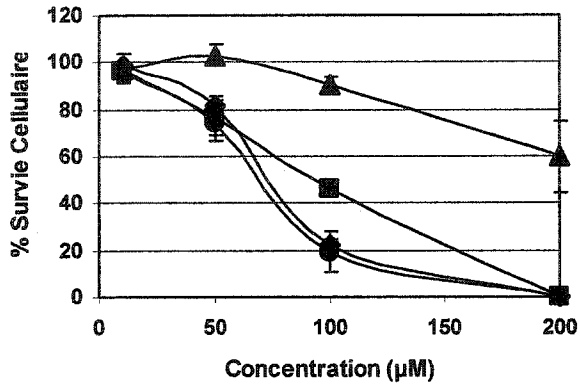
**Fig. 3.** Effet des radiations gamma sur la survie cellulaire en fonction de la dose pour les cellules MCF-7 (●) et MDA-MB-231 (■) déterminé par test de formation de colonies.

**Fig. 4.** Effet radiosensibilisateur du CLA-mixte, CLA-9cis 11cis, CLA-9cis 11trans et du CLA-10trans 12cis sur les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) suite à une dose d'irradiation de 5 Gy. Ratio < 1: radiosensibilisateur synergique; ratio = 1: radiosensibilisateur additif; ratio > 1: radiosensibilisateur non additif.

**Fig. 5.** Induction de l'apoptose chez les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) en combinant CLA et radiation. 0 Gy: □; 5 Gy: ■.

Figure 1

A



B

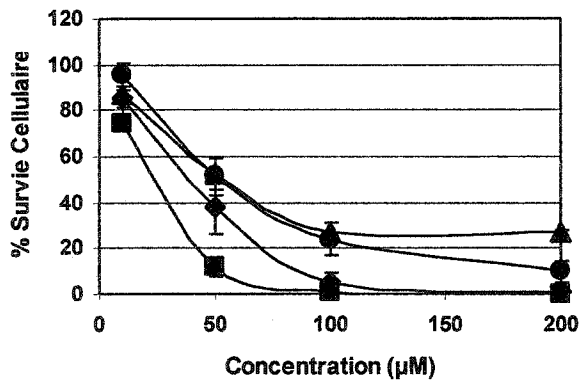
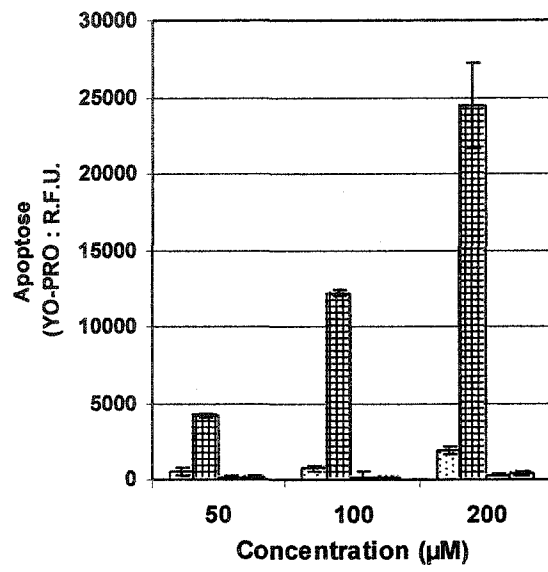


Figure 2

A



B

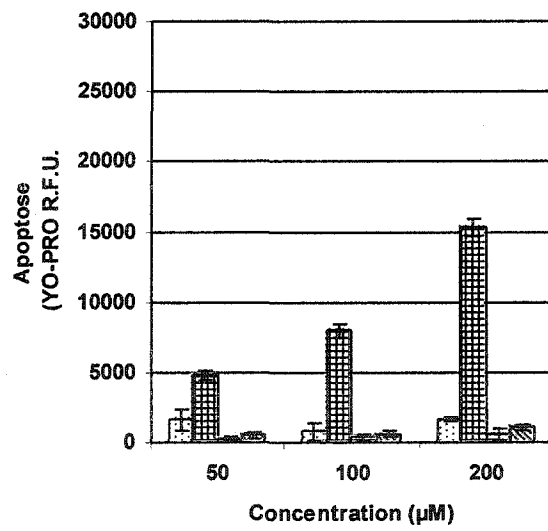




Figure 3

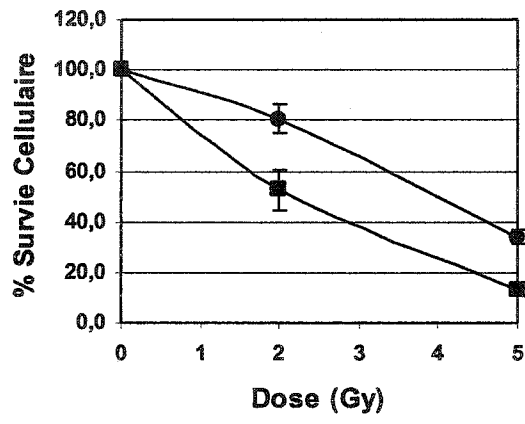


Figure 4

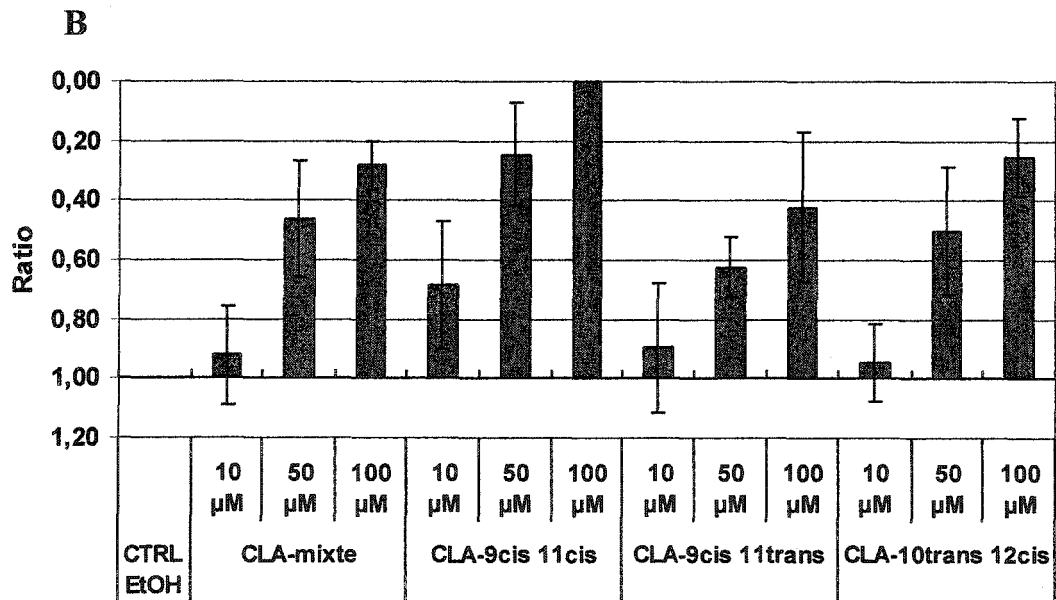
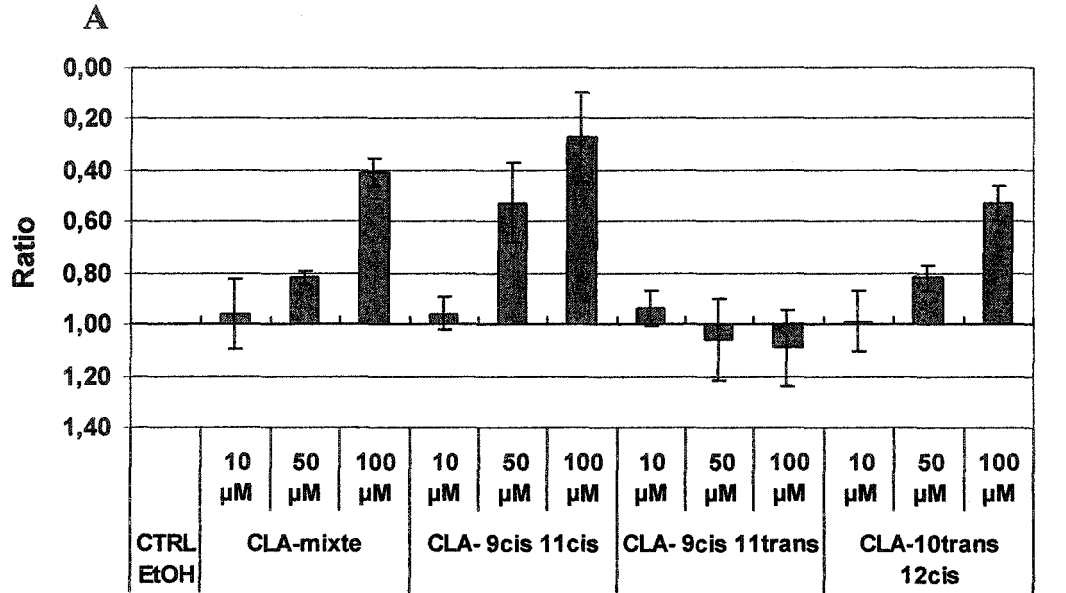
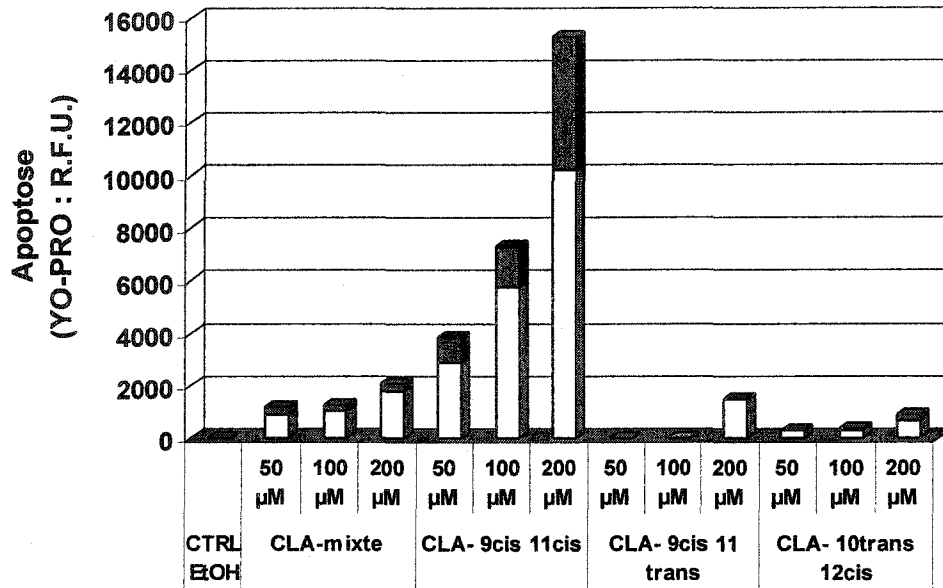
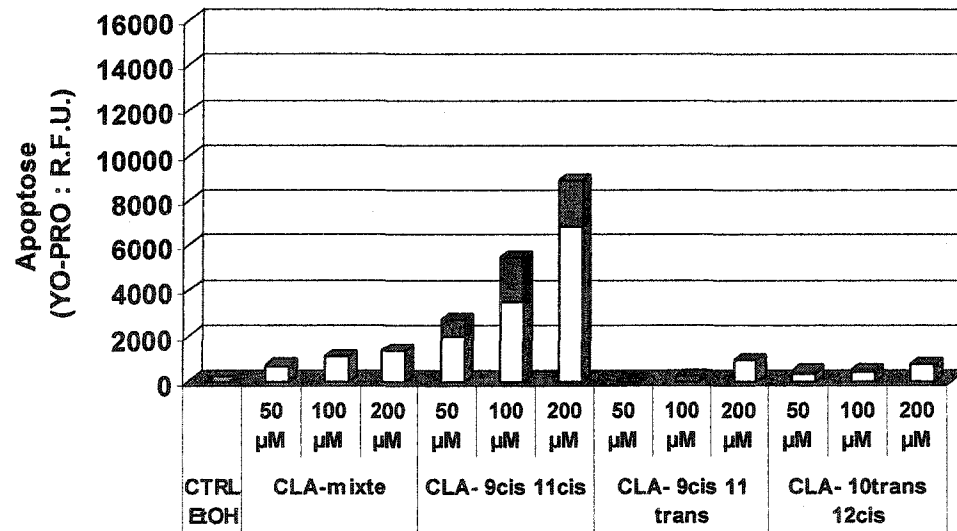


Figure 5

A



B



## Références

- Abram Recht D.F.H., Timothy J. Eberlein, Norman L. Sadowsky. 1996. Local-regional recurrence after mastectomy or breast conserving therapy. In: Jay R. Harris MEL, Monica Morrow, Samuel Hellman editor. Diseases of the breast Philadelphia: Lippincott-Raven. p 649-667.
- Cesano A., Visonneau S., Scimeca J.A., Kritchevsky D., Santoli D. 1998. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res.* **18**: 1429-1434.
- Chadderton A., Villeneuve D.J., Gluck S., Kirwan-Rhude A.F., Gannon B.R., Blais D.E., Parissenti A.M. 2000. Role of specific apoptotic pathways in the restoration of paclitaxel- induced apoptosis by valsopodar in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **59**: 231-244.
- Chen G.G., Lee J.F., Wang S.H., Chan U.P., Ip P.C., Lau W.Y. 2002. Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma is associated with Bcl-2 and NF-kappaB in human colon cancer. *Life Sci.* **70**: 2631-2646.
- Cho H.J., Kim W.K., Kim E.J., Jung K.C., Park S., Lee H.S., Tyner A.L., Park J.H. 2003. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **284**: G996-1005.
- Clay C.E., Atsumi G.I., High K.P., Chilton F.H. 2001. Early de novo gene expression is required for 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 47131-47135.

- Cunningham D.C., Harrison L.Y., Shultz T.D. 1997. Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res.* **17**: 197-203.
- Durgam V.R., Fernandes G. 1997. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett.* **116**: 121-130.
- Elstner E., Muller C., Koshizuka K., Williamson E.A., Park D., Asou H., Shintaku P., Said J.W., Heber D, Koeffler HP. 1998. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 8806-8811.
- Elstner E., Williamson E.A., Zang C., Fritz J., Heber D., Fenner M., Possinger K., Koeffler H.P. 2002. Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **74**: 155-165.
- Gewirtz D.A. 2000. Growth arrest and cell death in the breast tumor cell in response to ionizing radiation and chemotherapeutic agents which induce DNA damag. *Breast Cancer Res. Treat.* **62**: 223-235.
- Hall J.E. 2000. *Radiobiology for the radiologist.* 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Idziorek T., Estaquier J., De Bels F., Ameisen J.C. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* **185**: 249-258.
- Ip C., Scimeca J.A., Thompson H.J. 1994. Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer* **74**: 1050-1054.

- Ip C., Briggs S.P., Haegele A.D., Thompson H.J., Storkson J., Scimeca J.A. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* **17**: 1045-1050.
- Ip M.M., Masso-Welch P.A., Shoemaker S.F., Shea-Eaton W.K., Ip C. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp. Cell Res.* **250**: 22-34.
- Janicke R.U., Sprengart M.L., Wati M.R., Porter A.G. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 9357-9360.
- Kim E.J., Holthuisen P.E., Park H.S., Ha Y.L., Jung K.C., Park J.H. 2002. Trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **283**: G357-367.
- Langstein H.N., Cheng M.H., Singletary S.E., Robb G.L., Hoy E., Smith T.L., Kroll S.S. 2003. Breast cancer recurrence after immediate reconstruction: patterns and significance. *Plast. Reconstr. Surg.* **111**: 712-720.
- Li M.Y., Deng H., Zhao J.M., Dai D., Tan X.Y. 2003. PPARgamma pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World J. Gastroenterol.* **9**: 1220-1226.
- Liu J.R., Li B.X., Chen B.Q., Han X.H., Xue Y.B., Yang Y.M., Zheng Y.M., Liu R.H. 2002. Effect of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid on cell cycle of gastric adenocarcinoma cell line (SGC-7901). *World J. Gastroenterol.* **8**: 224-229.
- Majumder B., Wahle K.W., Moir S., Schofield A., Choe S.N., Farquharson A., Grant I., Heys S.D. 2002. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *Faseb. J.* **16**: 1447-1449.

- Miller A., Stanton C., Devery R. 2002. Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res.* **22**: 3879-3887.
- O'Shea M., Devery R., Lawless F., Murphy J., Stanton C. 2000. Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res.* **20**: 3591-3601.
- Palombo J.D., Ganguly A., Bistrain B.R., Menard M.P. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett.* **177**: 163-172.
- Park Y., Allen K.G., Shultz T.D. 2000. Modulation of MCF-7 breast cancer cell signal transduction by linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res.* **20**: 669-676.
- Overgaard M., Hansen P.S., Overgaard J., Rose C., Andersson M., Bach F., Kjaer M., Gadeberg C.C., Mouridsen H.T., Jensen M.B., Zedeler K. 1997. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N. Engl. J. Med.* **337**: 949-955.
- Overgaard M. 1999. Overview of randomized trials in high risk breast cancer patients treated with adjuvant systemic therapy with or without postmastectomy irradiation. *Semin. Radiat. Oncol.* **9**: 292-299.
- Shultz T.D., Chew B.P., Seaman W.R. 1992. Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res.* **12**: 2143-2145.

- Shimada T., Kojima K., Yoshiura K., Hiraishi H., Terano A. 2002. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* **50**: 658-664.
- Schmidt-Ullrich R.K., Valerie K., Chan W., Wazer D.E., Lin P.S. 1992. Expression of oestrogen receptor and transforming growth factor-alpha in MCF-7 cells after exposure to fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **61**: 405-415.
- Weir H.K., Thun M.J., Hankey B.F., Ries L.A., Howe H.L., Wingo P.A., Jemal A., Ward E., Anderson R.N., Edwards B.K. 2003. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**: 1276-1299.
- Yang X.H., Sladek T.L., Liu X., Butler B.R., Froelich C.J., Thor A.D. 2001. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* **61**: 348-354.
- Yin F., Wakino S., Liu Z., Kim S., Hsueh W.A., Collins A.R., Van Herle A.J., Law R.E. 2001. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**: 916-922.
- Yoshizawa K., Cioca D.P., Kawa S., Tanaka E., Kiyosawa K. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer* **95**: 2243-2251.



## **DEUXIÈME PARTIE**

**Inhibition du potentiel métastatique par les CLAs**

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 1. Matériel

L'acide octadécadiénoïque conjugué (CLA-mixte) (Sigma, St. Louis, MO) et les isomères acide 9(cis),11(trans)-octadécadiénoïque (CLA-9cis 11trans), acide 9(cis),11(cis)-octadécadiénoïque (CLA-9cis 11cis) et acide 10(trans),12(cis)-octadécadiénoïque (CLA-10trans 12cis) (Matreya, Bellefonte, PA) ont été solubilisés dans l'éthanol 100% à une concentration de 100 mM et conservés sous atmosphère d'azote à -20°C. Pour la solubilisation dans le milieu de culture, une solution de 1 mM a été préparée dans du Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma) contenant 1 % d'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma). Après agitation d'une heure à 37 °C, les CLA ont été dilués aux concentrations voulues dans le milieu de culture MEM. Le CLA-mixte est composé de divers isomères. Son analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Kemestrie, Sherbrooke, Qc) a démontré la présence de 2 principaux isomères, soit le CLA-9cis 11trans à 52% et le CLA-10trans 12cis à 48%.

## 2. Culture cellulaire

Les cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7 (American Type Culture Collection : HTB-22), MDA-MB-231 (American Type Culture Collection : HTB-26) ainsi que les cellules cancéreuses mammaires de souris 4T1 (don du Dr Fred Miller, Michigan Cancer

Foundation, Wayne State University School of Medicine, Detroit, Michigan) ont été cultivées dans du MEM (Sigma) contenant 1 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 1 µg streptomycine/ml, 1 U pénicilline G/ml, 0.25 µg amphotéricine β/ml et enrichi de 10% sérum foetal bovin (FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY) à 37°C sous un atmosphère humide contenant 5% CO<sub>2</sub>.

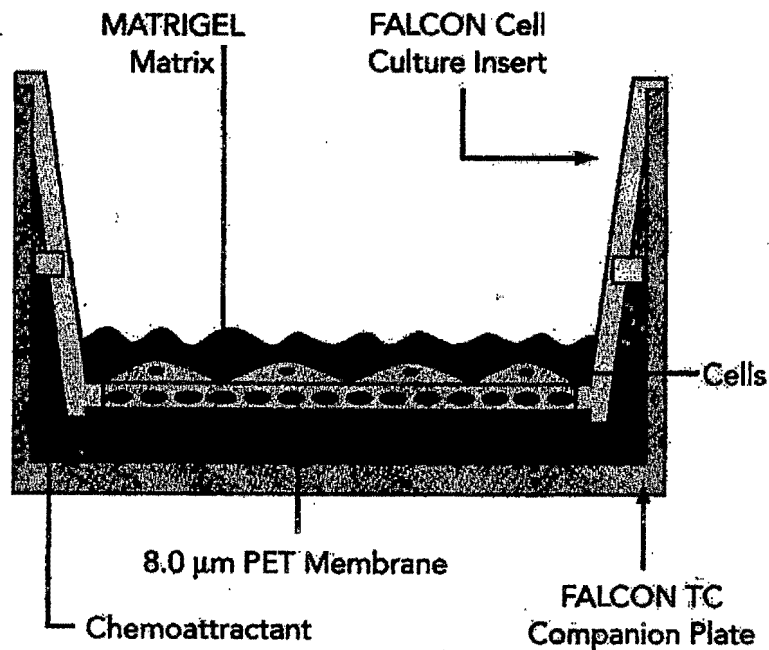
### **3. Modulation du potentiel métastatique in vivo**

Les cellules 4T1 ont été incubées pendant 48 heures dans du MEM enrichi de 10% FBS contenant 50 ou 100 µM de CLA-mixte, CLA-9cis 11cis, CLA-9cis 11trans ou de CLA-10trans 12cis. Les cellules contrôles ont été incubées dans du MEM contenant 0.1% d'éthanol. Suite à l'incubation, les cellules ont été décollées du Pétri à l'aide de la solution Cell Dissociation (Sigma) comme décrit par le fournisseur. Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 2 ml de MEM sans FBS et 50 µl de cellules ont été colorées avec 50 µl de Trypan Bleu 0.4 % afin de ne compter que les cellules vivantes. Une solution de  $1 \times 10^6$  cellules/ml a été préparée dans du MEM sans FBS. Un volume de 0.1 ml, soit  $1 \times 10^5$  cellules, ont été injectées par intraveineuse dans la queue de souris Balb/c (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Chaque groupe était composé de 5 souris. L'expérience a été répétée 4 fois pour un total de 20 souris par condition. Après 18 jours d'incubation, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les poumons récoltés. Les poumons ont été conservés dans du formaldéhyde 10% jusqu'au décompte des nodules pulmonaires. La présence de nodules pulmonaires a été comptabilisée à l'aide d'un microscope optique avec un facteur grossissant 4 X.

#### 4. Détermination du potentiel invasif par chambre de Boyden

Le potentiel invasif des cellules MDA-MB-231 a été déterminé grâce aux chambres d'invasion de Boyden. Ces chambres, comme illustrées à la figure 10, sont formées de 2 compartiments, le compartiment supérieur et le compartiment inférieur. Les deux compartiments sont séparés par une membrane de polyéthylène téréphtalate (PET) contenant des pores de 8  $\mu\text{M}$  recouverte d'une mince couche de Matrigel. Le Matrigel est en fait une reconstitution artificielle de la matrice extracellulaire. Les chambres d'invasion de Boyden permettent ainsi de déterminer s'il y a augmentation ou diminution du potentiel invasif suite à un traitement. Les chambres d'invasion de Boyden (BD Biosciences, Mississauga, Ont.) ont tout d'abord été réhydratées avec 500  $\mu\text{l}$  de MEM contenant 0.1% BSA (Sigma) pendant 2 heures à 25°C. Les cellules MDA-MB-231 ont été décollées du Pétri à l'aide de la solution Cell Dissociation (Sigma). Le milieu MEM dans la chambre d'invasion a été retiré et 500  $\mu\text{l}$  d'une solution contenant  $1 \times 10^4$  cellules MDA-MB-231 dans du MEM supplémenté de 0.1 % BSA et de CLA-mixte, CLA-9cis 11cis, CLA-9cis 11trans ou CLA-10trans 12cis à une concentration finale de 10 ou 100  $\mu\text{M}$  a été ajouté à la chambre. Pour le contrôle, de l'éthanol 0.1 % a été ajouté à la chambre d'invasion avec les cellules MDA-MB-231 au lieu des CLAs. Dans le compartiment du bas de la chambre d'invasion, 500  $\mu\text{l}$  de MEM contenant 10 % FBS a été ajouté comme chimioattractant. Les chambres ont alors été incubées pendant 36 heures à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 %  $\text{CO}_2$ . Suite à cette incubation, les cellules de la surface supérieure de la chambre ont été retirées à l'aide d'un coton tige. Les cellules collées à la surface inférieure de la membrane ont été fixées à l'éthanol 70 % et colorées au cristal violet 0.1 %. La membrane a alors été retirée de la

chambre à l'aide d'une lame de rasoir et les cellules ayant passé de la surface supérieure à la surface inférieure de la membrane ont été comptées au microscope.



**Figure 10 : Représentation schématique d'une chambre d'invasion de Boyden.**  
(Catalogue de Becton Dickinson Labware (1997/98) p99)

## 5. Culture cellulaire sur Matrigel

Le Matrigel ne contenant pas de rouge phénol (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) a été dilué 1 : 1 dans du Mammary Epithelium Basal Medium (MEBM) (Cambrex, Walkersville, MD). Dans chaque puits d'une plaque 6 puits, 500 µl du Matrigel dilué a été ajouté et uniformément étendu. La plaque a été incubée pendant 1 heure à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub> afin de laisser figer le Matrigel. Suite à l'incubation, 6 X 10<sup>5</sup> cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 ont étéensemencées par puits dans 3 ml de MEBM contenant 156 µg bovine pituitary

extract (BPE)/ml, 10 ng human recombinant epidermal growth factor (hEGF)/ml, 5 µg insuline/ml, 0.5µg hydrocortisone/ml, 50 µg gentamicine/ml et 50 µg amphotéricine B/ml (Cambrex). Après une incubation de 4 heures à 37 °C permettant l'adhésion des cellules, le milieu de culture a été retiré et 3 ml de MEBM complet auquel le CLA-mixte, CLA-9cis 11cis, CLA-9cis 11trans ou le CLA-10trans 12cis à des concentrations finales de 50 et 100 µM ont été ajoutés. Pour le contrôle, 0.1 % d'éthanol a été ajouté au milieu. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>.

## **6. Préparation de milieux conditionnés**

Après l'incubation de 24 heures des cellules sur le Matrigel avec ou sans les CLAs, le milieu de culture a été récupéré. Ce milieu conditionné a été centrifugé à 1400 RPM pendant 15 minutes à 4 °C afin de retirer les cellules qui pourraient se trouver dans le milieu. Le milieu conditionné a ensuite été concentré 10 fois à l'aide des colonnes Centricon YM-30 (Millipore, Nepean, Ont.). La purification de la MMP-2 et/ou de la MMP-9 a été effectuée à l'aide d'une suspension de gelatine-agarose (Sigma). Brièvement, 200 µl de la solution saline de gelatine-agarose ont été ajoutés aux 300 µl de milieu conditionné concentré. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 1 heure à 4 °C avec agitation constante. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés pendant 2 minutes à 10 000g à 4 °C. Le surnageant a été retiré et le culot a été resuspendu dans 1 ml de tampon d'équilibration (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> et 0.02 % Brij-35). Après une incubation de 10 minutes à 4 °C avec agitation constante, les échantillons ont été centrifugés à 10 000g. Le surnageant a été retiré et le culot lavé deux autres fois avec 1 ml de tampon d'équilibration. Après le

troisième lavage, le culot a été resuspendu dans 300 µl de tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02 % Brij-35 et 10 % DMSO) afin de permettre la libération des MMPs de la gélatine-agarose. Les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes à 4 °C et centrifugés pendant 2 minutes à 10 000g. Les surnageants ont été récupérés et conservés. Le culot a été resuspendu une seconde fois dans le tampon d'élution afin de récupérer le maximum de MMP-2 et/ou MMP-9. Les surnageants des première et deuxième éluions ont été regroupés. Afin de diluer au maximum le DMSO contenu dans les échantillons, ces derniers ont été dilués au moins 10 fois et concentrés à l'aide de colonnes Centricon YM-30 (Millipore) jusqu'à un volume final de 100 µl. Les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

## **7. Zymographie**

L'étude de l'activité enzymatique des gélatinases MMP-2 et/ou MMP-9 a été faite par gel de zymographie. Le principe de la zymographie est que le substrat protéique des enzymes étudiées, la gélatine dans le cas présent, est ajouté dans le gel séparateur. Après la migration, le gel est incubé pendant une nuit, permettant ainsi la dégradation de la gélatine par la MMP. Suite à la coloration du gel au bleu de Coomassie, la MMP-2 et/ou la MMP-9 pourront être visualisées sur le gel sous la forme de zones claires correspondant à la protéolyse du substrat sur un gel coloré en bleu. Un gel séparateur contenant 12 % d'acrylamide, 375 mM Tris pH 8.8 et 2 mg gélatine/ml et un gel concentrateur contenant 4 % d'acrylamide et 125 mM Tris pH 6.8 ont tout d'abord été préparés. Une pré-migration de 15 minutes à 150 V et 4 °C a été effectuée dans le tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-base, 200 mM glycine et 0.1 %

SDS). Les échantillons ont été préparés en ajoutant 10 µl de tampon d'échantillon (125 mM Tris pH 6.8, 4 % SDS, 0.005 % bleu de bromophénol et 20 % glycérol) à 10 µl d'échantillon. Un contrôle positif de MMP-2 a été préparé en activant de la proMMP-2 (Calbiochem, San Diego, CA). Brièvement, 17 ng de proMMP-2 ont été incubés 2 heures à 37 °C dans un tampon contenant 0.05 M borate pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 % glycérol, 0.005 % Brij-35 et 0.01 mM de ZnCl<sub>2</sub> auquel 1 mM d'acétate 4-aminophénylmercurique (APMA) (Sigma) a été ajouté. 1 ng de MMP-2 activée a été chargée dans le gel en même temps que les échantillons. Une migration de 4 heures à 150 V et 4 °C a été effectuée. Le gel a ensuite été incubé pendant 30 minutes à température ambiante dans 2.5 % Triton X-100 afin de renaturer les MMPs. Par la suite, le gel a été incubé toute la nuit à 37 °C avec agitation dans le tampon de développement (50 mM Tris pH 7.6, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> et 0.02 % Brij-35) permettant alors aux MMPs de digérer la gélatine emprisonnée dans le gel d'acrylamide. Finalement, le gel a été coloré pendant 1 heure dans une solution colorante contenant 0.1 % bleu de Coomassie, 40 % méthanol et 10 % acide acétique. Le gel a été scellé dans un sac de plastique et numérisé à l'aide d'un numériseur Scanjet 4400c (Hewlett Packard).

## **8. Extraction de l'ARN total**

Suite à l'incubation des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 avec les CLAs sur le Matrigel, les cellules ont tout d'abord été retirées du Matrigel avec la solution Matrisperse Cell Release (Becton Dickinson Labware) tel que décrit par le fabricant. L'ARN a ensuite été extrait des



cellules à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc. Mississauga, Ont.) comme décrit par le fabricant. L'ARN a ensuite été dosé par spectrophotométrie.

#### **9. Transcription inverse (RT) pour la synthèse de cDNA**

L'ARNm extrait des cellules a été transformé en cDNA par transcription inverse. 1 µg d'ARN total a été ajouté au tampon M-MLV reverse transcriptase (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM DTT) (Promega) contenant 1 mM dNTPs (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qué.), 20 unités de RNAGuard porcine (Amersham Biosciences), 10 µM pd (N)<sub>6</sub> random hexamer (Amersham Biosciences), 200 unités de M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) pour un volume final de 20 µl. Les tubes ont été placés dans un thermocycler Px2 (Thermo Hybaid, Franklin, MA) pour un cycle de 10 minutes à 20 °C, 50 minutes à 42 °C et 5 minutes à 95 °C. Les cDNAs nouvellement synthétisés ont été conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

#### **10. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

La quantification des niveaux d'ARNm de la MMP-2 et de la MMP-9 a été effectuée par réaction de polymérisation en chaîne. La MMP-9 (fragment de 455 pb) (sens : 5' TGG ACG ATG CCT GCA ACG TG 3') (antisens : 5' GTC GTG CGT GTC CAA AGG CA 3') a été coamplifiée avec la GAPDH (fragment de 307 pb) (sens : 5' CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT 3') (Antisens : 5' AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC 3') alors que

pour la MMP-2 (fragment de 474 pb) (sens : 5' GGC CCT GTC ACT CCT GAG AT 3') (antisens : 5' GGC ATC CAG GTT ATC GGG GA 3') la coamplification était impossible à cause d'un problème de compétition. La MMP-2 et la GAPDH ont donc été amplifiées dans des tubes séparés. 2 µl de cDNAs ont été ajoutés à une solution contenant 80 µM dNTPs, 0.4 µM d'amorces sens (MMP-2 ou MMP-9), 0.4 µM d'amorces antisens (MMP-2 ou MMP-9), 2.5 unités de Taq DNA polymérase (Fisher Scientific, Nepean, Ont.) et le tampon de Taq polymérase (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) dans un volume final de 50 µl. Les tubes ont été placés dans un thermocycler Px2. Un premier chauffage de 30 secondes à 94 °C a été effectué. Ensuite, 35 cycles ont été faits de la façon suivante : 1 minute à 94 °C, 30 secondes à 55 °C et 1 minute à 72 °C. Lorsqu'il restait 22 cycles une pause a été effectuée afin d'ajouter à des concentrations finales 0.4 µM d'amorce GAPDH sens et antisens. Après les cycles d'amplification, une élongation finale de 5 minutes à 72 °C a été faite. Les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

## **11. Quantification des niveaux d'ARNm de la MMP-2 et MMP-9**

Le dosage des fragments de MMP-2, MMP-9 et GAPDH amplifiés par PCR a été effectué dans un gel de 60 ml de 1.8 % d'agarose dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate et 1 mM éthylènediaminetétraacétate (EDTA)) auquel 6 µl de colorant d'acides nucléiques SYBR Green I (Sigma) ont été ajoutés afin d'obtenir une concentration finale de 1X de SYBR Green I. Les échantillons ont été préparés de sorte que 4 µl de tampon de chargement 3X (7.5 % Ficoll, 0.125 % bleu de bromophénol, 0.125 % xylène cyanol et 1.5 X TAE) et 2 µl de SYBR Green I 100X (dilué dans de l'eau à partir du 10 000X) ont été ajoutés à 6 µl

d'échantillon. Le marqueur de poids moléculaire 1 Kb ladder (GibcoBRL) a été utilisé à raison de 0.5 µg par puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante les échantillons ont été chargés dans le gel et une migration de 5 minutes à 100V suivie de 45 minutes à 80V ont été effectuées. Le gel a ensuite été rincé à l'eau et numérisé à l'aide d'un scanner laser STORM (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Les bandes ont été quantifiées à l'aide du programme ImageQuant (Molecular Dynamics). L'intensité des bandes de GAPDH a été normalisée entre chacun des puits et un facteur de correction a été déterminé. Les niveaux de MMP-2 et MMP-9 ont été déterminés en corrigeant l'intensité des bandes de MMP-2 et MMP-9 par le facteur de correction précédemment déterminé.

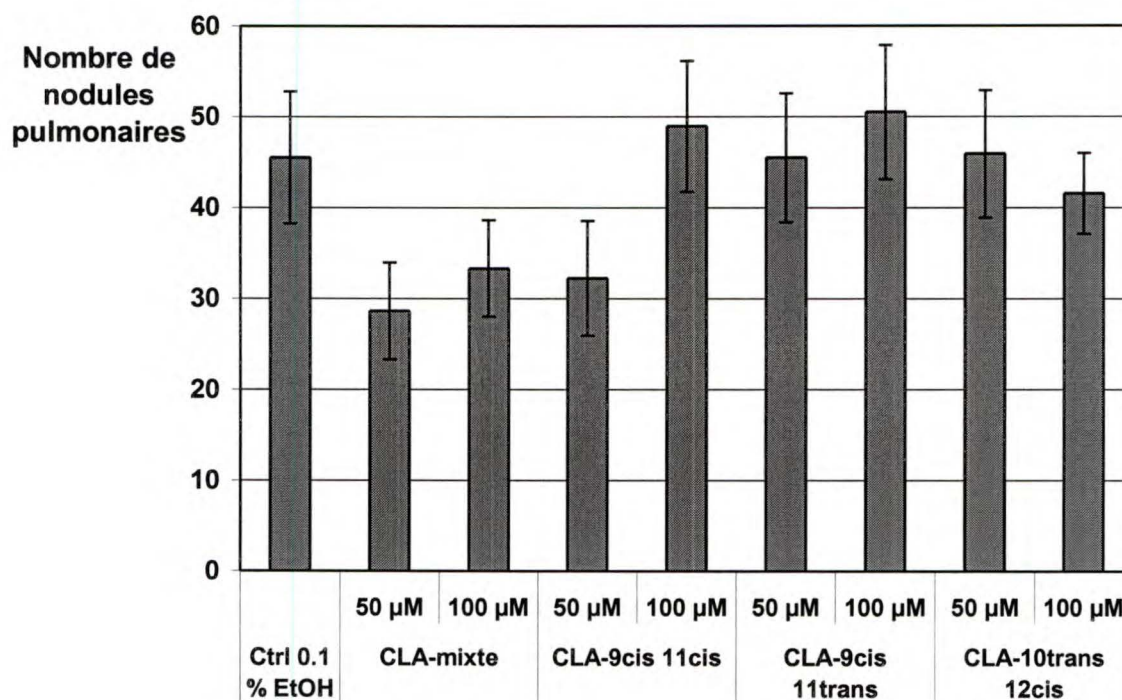
# RÉSULTATS

## 1. Modulation in vivo du potentiel métastatique

Les dernières étapes de l'invasion cellulaire sont principalement l'extravasation (sortie de la circulation sanguine), la migration jusqu'à un organe cible, le déplacement des cellules dans la membrane basale et la matrice extracellulaire et la formation de nodules métastatiques. La capacité des cellules cancéreuses à exécuter ce parcours peut être mesurée in vivo à l'aide d'un modèle expérimental d'induction de métastases pulmonaires. Cet essai a permis de déterminer l'effet du CLA et de 3 de ses isomères sur les étapes finales du processus métastatique. L'habileté des cellules 4T1 à former suffisamment de nodules métastatiques permettant d'observer une hausse ou une baisse du nombre de nodules selon le traitement en a fait des cellules de choix pour cet essai. Les cellules 4T1 ont d'abord été préincubées pendant 48 heures avec le CLA ou les isomères. Suite à l'incubation, les cellules ont été récupérées, comptées et finalement injectées par voie intraveineuse dans la queue de souris Balb/c. Après 18 jours les souris ont été sacrifiées et les nodules pulmonaires dénombrés.

Le CLA-mixte à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  a été le plus efficace pour diminuer le nombre de nodules pulmonaires (figure 11). En effet, suite à une préincubation de 48 heures des cellules 4T1 avec le CLA-mixte à 50  $\mu\text{M}$ , la moyenne du nombre de nodules métastatiques est passée de  $45.5 \pm 7.3$  pour le contrôle à  $28.7 \pm 5.3$ , soit une diminution de 37 %. Le CLA-mixte à 100  $\mu\text{M}$  et le CLA-9cis 11cis à 50  $\mu\text{M}$  ont également diminués le nombre de métastases pulmonaires, mais de façon moins prononcée. Un test de student a permis de

constater que tous les autres isomères n'ont eu aucun effet significatif sur le nombre de nodules pulmonaires.



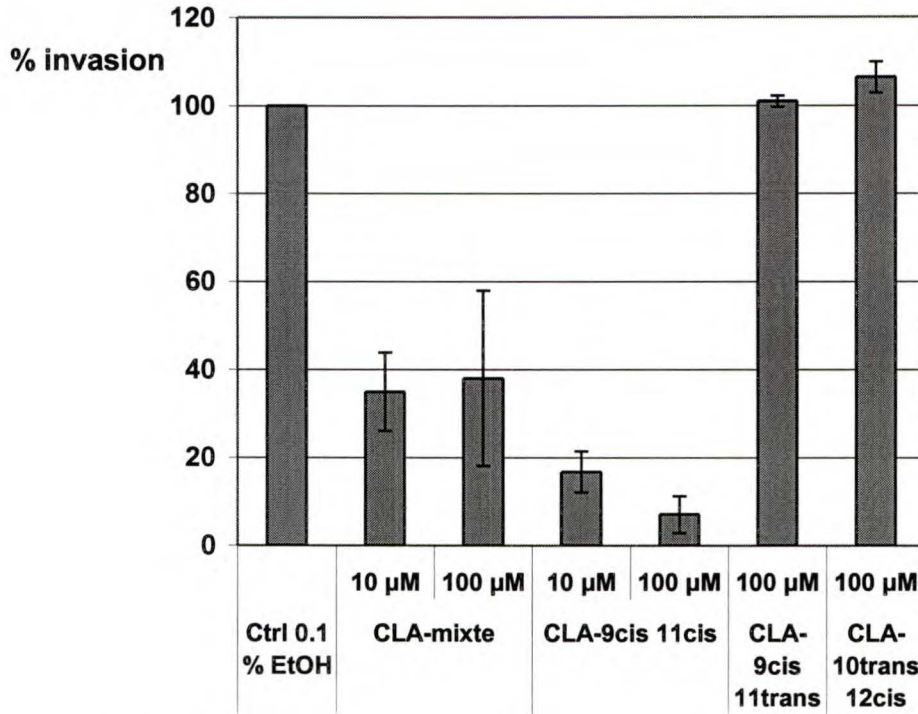
**Figure 11 : Modulation in vivo du nombre de nodules pulmonaires suite à un prétraitement de 48 heures avec le CLA et trois de ses isomères.** Les cellules 4T1 ont été incubées 48 heures avec le CLA-mixte, le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans ou le CLA-10trans 12cis à 50 ou 100 µM ou avec de l'éthanol 0.1 % pour le contrôle.

## 2. Modulation in vitro du potentiel métastatique

Le passage des cellules cancéreuses de la tumeur primaire à la circulation sanguine peut être possible grâce à la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. Afin de vérifier l'effet du CLA-mixte et de trois de ses isomères sur la capacité d'invasion, des chambres d'invasion ont été utilisées. Ces chambres sont composées d'une membrane poreuse recouverte d'une couche de Matrigel. Les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 ont

été déposées dans le compartiment supérieur de la chambre dans du milieu contenant l'un des CLAs. Après une incubation de 36 heures, les cellules ayant réussies à traverser la couche de Matrigel et la membrane poreuse ont été dénombrées. Malheureusement, le potentiel métastatique n'a pu être vérifié *in vivo* et *in vitro* avec le même type cellulaire. Effectivement, l'utilisation des cellules MDA-MB-231 *in vivo* aurait demandé de développer un modèle chez la souris nude environnement où les lignées de cancer du sein ne prolifèrent généralement pas bien. D'autre part, les 4T1 peuvent être utilisées en chambre d'invasion, mais les rendements sont faibles et la reproductibilité pas très bonne.

Le CLA-9cis 11trans de même que le CLA-10trans 12cis n'ont eu aucun effet sur la capacité invasive des cellules MDA-MB-231. Par contre, le CLA-mixte et le CLA-9cis 11cis ont eu un effet important sur le potentiel d'invasion. En effet, lorsqu'incubées avec le CLA-mixte à une concentration aussi faible que 10  $\mu\text{M}$ , le pourcentage d'invasion des cellules MDA-MB-231 n'est que de 35 % comparativement au contrôle normalisé à 100 %. À 100  $\mu\text{M}$  le CLA-mixte a un effet semblable à celui observé à 10  $\mu\text{M}$  suggérant une saturation de son effet anti-métastatique. L'isomère le plus efficace s'est avéré être le CLA-9cis 11cis avec un pourcentage d'invasion de 16.8 % à 10  $\mu\text{M}$  et 7.1 % à 100  $\mu\text{M}$  (figure 12).



**Figure 12 : Modulation in vitro du potentiel d'invasion des cellules MDA-MB-231 par le CLA-mixte et trois de ses isomères.** Les cellules MDA-MB-231 ont été déposées dans une chambre d'invasion de Boyden dans du milieu contenant l'un des CLAs. Après 36 heures, les cellules ayant traversées la couche de Matrigel ont été dénombrées.

### 3. Détermination des niveaux protéiques de MMP-2 et MMP-9 par gel de zymographie

La dégradation de la matrice extracellulaire permettant le passage des cellules cancéreuses de la tumeur primaire vers la circulation sanguine est effectuée par des enzymes protéolytiques nommées MMPs. Les MMPs sont sécrétées par les cellules cancéreuses. Les niveaux protéiques de MMP-2 et de MMP-9 suite à une incubation de 24 heures avec le CLA-mixte, le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans ou le CLA-10trans 12cis ont été évalués par zymographie. Les cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 ont été tout d'abordensemencées dans des plaques contenant une couche de Matrigel permettant une meilleure expression des

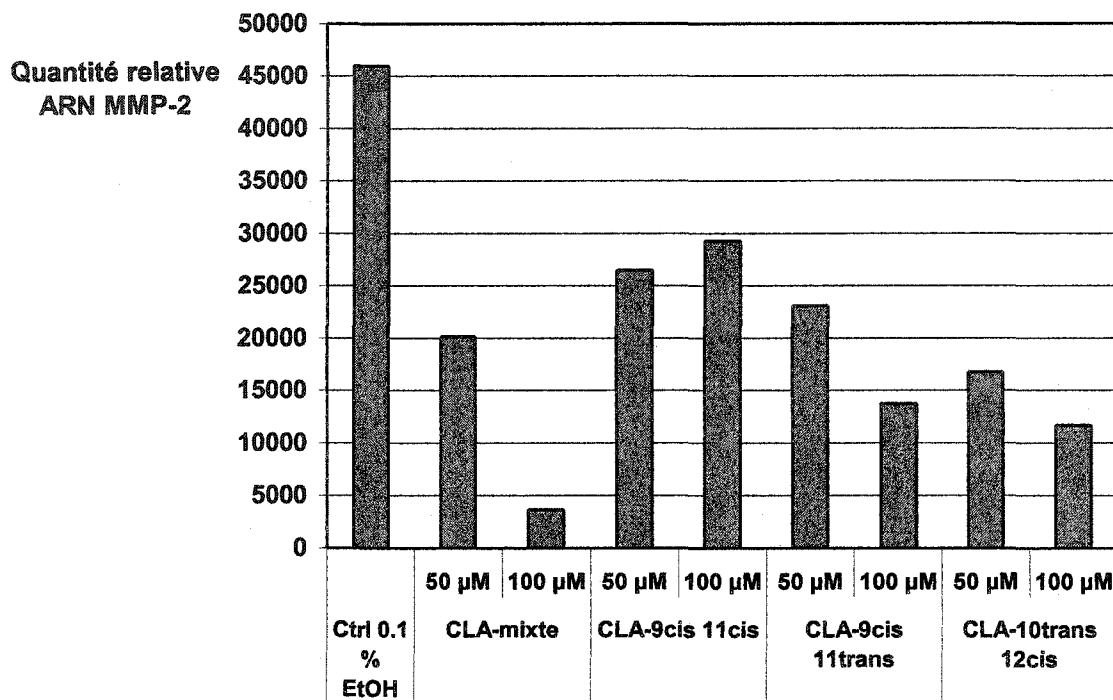
MMP-2 et MMP-9. Les CLAs ont ensuite été ajoutés pour une période de 24 heures. Les milieux de culture ont été récoltés, purifiés sur colonne de gélatine-agarose et concentrés avant d'effectuer la zymographie.

Dans la présente étude, les niveaux protéiques de MMP-2 et de MMP-9 n'ont pu être déterminé par gel de zymographie. Le passage des échantillons dans une colonne de gélatine-agarose a occasionné de bonnes pertes de MMP-2 et -9. Puisque ces MMPs sont déjà faiblement présentes dans les milieux conditionnés les niveaux étaient alors trop faibles pour être détectés par gel de zymographie (résultats non-illustrés).

#### **4. Détermination des niveaux d'ARNm de MMP-2 et MMP-9 par RT-PCR**

La présence de BSA dans les milieux conditionnés ajoutant une étape de purification des milieux causant alors une perte importante de MMP-2 et MMP-9, le dosage de ces MMPs par RT-PCR a été tenté. Après une incubation de 24 heures des cellules MDA-MB-231 sur Matrigel avec les CLAs, l'ARN a été extrait, transformé en ADNc par transcription inverse puis amplifié par réaction de polymérisation en chaîne. Les fragments amplifiés ont été migrés sur gel d'agarose puis dosés. Les résultats préliminaires obtenus sont présentés à la figure 13. Bien que cette expérience devrait être répétée, une baisse de la quantité de MMP-2 peut tout de même être notée pour le CLA-mixte de même que pour les trois isomères testés et ce à 50 et 100  $\mu$ M. La baisse la plus importante a été constatée chez les cellules ayant été incubées avec le CLA-mixte à une concentration de 100  $\mu$ M. L'isomère le moins efficace s'est avéré être le CLA-9cis 11cis à 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M.





**Figure 13 : Quantité relative d'ARN de MMP-2 dosée par RT-PCR chez les cellules MDA-MB-231 suite à une incubation avec les CLAs.** Les cellules MDA-MB-231 ont étéensemencées sur une mince couche de Matrigel puis le CLA-mixte, le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans ou le CLA-10trans 12cis a été ajouté aux concentrations indiquées pour une période de 24 heures. Les cellules contrôles ont été incubées dans de l'éthanol 0.1 %.

Les niveaux d'ARNm de la MMP-9 suite à l'incubation des cellules MDA-MB-231 n'ont pu être déterminée par RT-PCR. En effet, l'expression de la MMP-9 semble être plutôt faible chez ces cellules. Afin de vérifier si l'absence d'amplification de la MMP-9 n'était pas due à des conditions d'amplification inadéquates, les cellules MDA-MB-231 ont été incubées 24 heures en présence de 0.3 µM de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un agent reconnu pour augmenter notamment l'expression de la MMP-9 et -2. L'incubation des cellules MDA-MB-231 avec le PMA a permis de détecter la MMP-9 par RT-PCR, suggérant alors que la MMP-9 est normalement trop faiblement exprimée chez les MDA-MB-231 pour être visualisée par RT-PCR.

## DISCUSSION

Le premier but de cette étude était de déterminer si le CLA et trois de ses isomères pouvaient tout d'abord exercer un effet radiosensibilisateur sur deux lignées humaines de cancer du sein, soit les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Le second but de l'étude était de vérifier si ces CLAs pouvaient inhiber le potentiel métastatique des cellules MDA-MB-231 mais, également d'une lignée de cellules cancéreuses mammaires de souris, soit les cellules 4T1. Pour ce faire, le CLA-mixte contenant précisément les isomères CLA-9cis 11trans à 52 % et CLA-10trans 12cis à 48 % a été comparé à 3 isomères purifiés du CLA, soit le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis.

Le potentiel anticancéreux du CLA-mixte a déjà été étudié par d'autres équipes. Plusieurs études ont démontrées une diminution de la prolifération des cellules MCF-7 suite à une incubation avec le CLA-mixte (CUNNINGHAM et al., 1997; SHULTZ et al., 1992; DURGAM et FERNANDES, 1997; PARK et al., 2000; O'SHEA et al., 2000). Dans la présente étude, un test de formation de colonies a permis de déterminer que la survie des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 était diminuée par le CLA-mixte mais également par les isomères CLA-9cis 11cis et CLA-10trans 12cis. Le CLA-9cis 11trans a eu un effet opposé chez les deux lignées. Le CLA-9cis 11trans a diminué faiblement la survie des cellules MCF-7, alors que les cellules MDA-MB-231 ont été très affectées, la survie ayant déjà chuté de moitié à 50  $\mu$ M. Ces résultats démontrent que les réponses cellulaires varient selon le type d'isomère de CLA étudié mais qu'il existe aussi une variabilité des voies d'induction de mortalité dépendamment du type de cellules.

L'effet anticancérigène du CLA-mixte a également été démontré par une induction de l'apoptose chez différentes lignées cellulaires comme des cellules cancéreuses mammaires de rat (IP et al., 2000). La capacité du CLA et des trois isomères à induire de l'apoptose a été déterminée par test de fluorescence en microplaque. Les résultats obtenus lors de la présente étude démontrent que le CLA-mixte peut induire l'apoptose mais que l'induction est 10 fois plus importante avec l'isomère CLA-9cis 11cis chez les cellules MCF-7 et 2.5 fois chez les MDA-MB-231. Quant aux deux autres isomères, soient le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis, aucune induction d'apoptose n'a été notée. Puisque le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis sont les constituants principaux du CLA-mixte, l'induction de l'apoptose observée avec ce CLA-mixte serait causée par un isomère minoritaire non identifié. Les résultats obtenus dans la présente étude avec le CLA-10trans 12cis diffèrent de ceux obtenus par l'équipe de Miller (MILLER et al., 2002) chez des cellules tumorales de colon, suggérant alors que l'induction de l'apoptose par les différents CLAs dépendrait du type cellulaire.

L'effet radiosensibilisateur des CLAs a ensuite été vérifié. Sans CLAs, aucune apoptose chez les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 n'a été mesurée suite à une exposition de 5 Gy. Cependant, les résultats de tests de formation de colonies démontrent qu'une dose de 5 Gy diminue la survie de ces deux lignées cellulaires. Ces résultats suggèrent que la mort mitotique et la mort reproductive habituellement attribuée aux radiations n'est pas reliée à une apoptose radio-induite dans les 24 heures suivant l'exposition aux radiations.

En combinant CLAs et radiation, seul l'isomère CLA-9cis 11cis a conduit de façon marquée à l'augmentation de l'apoptose radio-induite chez les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Cette propriété du CLA-9cis 11cis s'est traduite par une forte augmentation de la radiosensibilité des cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Bien que les autres préparations de CLA n'augmentaient pas le niveau d'apoptose radio-induite, une augmentation de la radiosensibilité a été mesurée, sauf pour le CLA-9cis 11trans qui semble légèrement radioprotecteur pour les cellules MCF-7. Les mécanismes de radiosensibilisation pour le CLA-mixte, le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis demeurent inconnus.

Le CLA-mixte, mais surtout le CLA-9cis 11cis, se sont avérés être deux bons inducteurs d'apoptose chez les cellules cancéreuses du sein en plus d'augmenter leur radiosensibilité. Il pourrait être intéressant de déterminer si ces CLAs diminuent la mort reproductive temporaire observée chez les cellules MCF-7 par l'équipe de Schmidt-Ullrich (SCHMIDT-ULLRICH et al. 1992) ainsi que la récurrence des cancers du sein. Il serait aussi intéressant de vérifier chez les cellules étudiées traitées aux CLAs les niveaux de protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bax et Bak.

Le potentiel anticancéreux du CLA se traduirait également par une diminution de l'extravasation de cellules cancéreuses de la tumeur primaire vers d'autres organes. À ce jour, seulement quelques études rapportent l'effet du CLA-mixte sur la formation de métastases. L'équipe de Hubbard (HUBBARD et al., 2000) a analysé l'effet du CLA, ajouté à la diète de la souris, sur la formation de métastases spontanées mais aussi de métastases formées suite à l'injection intraveineuse de cellules cancéreuses. La formation spontanée de nodules pulmonaires métastatiques a diminué de près de 50 % pour les souris sous une diète

contenant 0.1 % CLA. Quant à la formation de nodules pulmonaires, suite à l'injection intraveineuse de cellules tumorales, cette étude de Hubbard (HUBBARD et al., 2000) ne rapporte aucune différence entre le groupe ayant eu une diète de 0.1 % CLA et le groupe contrôle.

Dans la présente étude, la formation de nodules pulmonaires a également été vérifiée suite à l'injection intraveineuse de cellules cancéreuses mais ayant préalablement été incubées in vitro avec le CLA-mixte ou l'un des trois isomères. Contrairement à l'étude de Hubbard (HUBBARD et al., 2000), les souris n'ont pas été soumises à une diète riche en CLAs. Le CLA-mixte et le CLA-9cis 11cis ont réduit significativement le nombre de nodules pulmonaires comparativement au contrôle. Un fait intéressant est à noter, bien que le CLA-9cis 11cis à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  ait diminué de façon significative le nombre de nodules pulmonaires, aucune baisse n'a été observée pour ce même isomère à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Ce résultat pourrait s'expliquer par un effet biphasique du CLA-9cis 11cis mais cette hypothèse devrait être vérifiée en reprenant les essais tout en ajoutant des concentrations plus faibles à celles préalablement testées.

Le potentiel métastatique de cellules cancéreuses du sein a également été vérifié in vitro grâce aux chambres d'invasion de Boyden. Pour des raisons techniques, expliquées dans la partie résultats, les cellules 4T1 n'ont pas été utilisées pour ces essais mais plutôt les cellules MDA-MB-231. Les résultats obtenus démontrent que le CLA-mixte et surtout l'isomère CLA-9cis 11cis diminuent de façon marquée l'invasion des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 à travers le Matrigel. Aucune diminution de l'invasion n'a été observée avec les isomères CLA-9cis 11trans ainsi que CLA-10trans 12 cis. Puisque ces deux isomères

sont les principaux constituants du CLA-mixte, les résultats suggèrent que l'inhibition de l'invasion par le CLA-mixte serait causée par un autre isomère faiblement présent mais non-identifié.

Afin de déterminer par quel mécanisme le CLA exerce son effet antimétastatique, les niveaux de MMP-2 et MMP-9 chez les cellules MDA-MB-231 ont été mesurés suite à une incubation avec le CLA-mixte ou l'un des trois isomères. Le CLA-mixte de même que les trois isomères ont occasionnés une diminution de l'expression de la MMP-2 tel que déterminé par RT-PCR. La différence entre les résultats obtenus dans les chambres d'invasion et le RT-PCR s'expliquerait par le fait que le RT-PCR ne mesure pas l'activité de la MMP-9 mais seulement son niveau d'ARNm alors que les cellules ont besoin de MMP-2 active pour traverser la couche de Matrigel. La zymographie n'a pas permis de mesurer l'activité de la MMP-2. Quant à la MMP-9, son expression n'a pu être déterminée puisqu'elle semble trop faiblement exprimée pour être détectée par RT-PCR. Cependant, il pourrait être intéressant de tenter de vérifier la diminution de son expression par les CLAs en augmentant tout d'abord son expression à l'aide du PMA. L'ajout de PMA a permis à l'équipe de Worley (WORLEY et al., 2003) de doser les niveaux d'ARNm de MMP-9 chez des monocytes, de même qu'à l'équipe de Hetzel (HETZEL et al., 2003) chez des cellules épithéliales de bronches, suite à une incubation de ces cellules avec différents ligands du PPAR $\gamma$ .

## CONCLUSION

L'objectif principal de la présente étude était d'évaluer le potentiel anticancéreux du CLA et de trois isomères, le CLA-9cis 11cis, le CLA-9cis 11trans et le CLA-10trans 12cis. Le premier but était de déterminer si les CLAs avaient un effet radiosensibilisateur sur deux lignées de cellules tumorales du sein, ce qui permettrait de contrer la radio-résistance des cellules cancéreuses du sein lors de traitement de radiothérapie. Le cancer du sein étant un cancer où l'on retrouve fréquemment une dissémination des cellules de la tumeur primaire pour former des métastases, le second but de l'étude était de vérifier si les CLAs pouvaient inhiber le potentiel métastatique des cellules tumorales.

La plupart des CLAs ont démontré un effet radiosensibilisateur, mais à des niveaux différents. Chez les cellules MCF-7, les résultats sont semblables à ceux obtenus avec les MDA-MB-231 à l'exception du CLA-9cis 11trans qui a eu un effet légèrement radioprotecteur. L'isomère CLA-9cis 11cis a été le CLA démontrant le meilleur effet radiosensibilisateur pour les deux lignées cellulaires étudiées. La radiosensibilisation des cellules par le CLA-9cis 11cis a été causée par une augmentation de l'apoptose radio-induite, alors que les mécanismes radiosensibilisateurs des CLA-mixte, CLA-9cis 11trans et CLA-10trans 12cis demeurent inconnus.

L'évaluation *in vivo* et *in vitro* du potentiel antimétastatique des CLAs a permis de constater que seuls le CLA-mixte et le CLA-9cis 11cis, tous deux à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , avaient diminué le nombre de nodules pulmonaires chez la souris et le pourcentage

d'invasion dans les chambres d'invasion Boyden. Cependant, des résultats préliminaires ont permis de mesurer que tous les CLAs avaient diminué l'expression de la MMP-2. Pour des raisons techniques, le gel de zymographie ne nous a pas permis de mesurer si les CLAs affectaient les niveaux de MMP-2 et MMP-9 actifs. Les résultats de RT-PCR obtenus devront être reconfirmés et l'activité des MMP-2 et -9 évaluée afin de déterminer les mécanismes par lesquels le CLA-mixte et le CLA-9cis 11cis inhibent le potentiel métastatique.

En terminant, le CLA-9cis 11cis pourrait s'avérer très prometteur comme adjuvant à la radiothérapie de cancer du sein mais aussi en empêchant l'extravasation des cellules de la tumeur primaire et la formation de métastases.



## REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier le Dr Benoit Paquette pour m'avoir tout d'abord permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire, de même que pour son excellente supervision et son soutien scientifique. Je remercie aussi les membres de mon jury, Dr Darel Hunting et Dr André Cantin de même que le Dr Pierre Lacasse pour sa collaboration à ce projet. Mes remerciements vont également aux membres du laboratoire, Rosalie Lemay, Catherine Baptiste, Hélène Thériault, Martine Bisson, et anciens membres, Mélanie Paré et Paul Thibodeau ainsi que les stagiaires ayant participées à ce projet, Annie Douillette, Marie-Ève Stébenne et Marianne Durand. Merci à tous les membres du département, particulièrement Sonia Girouard, Nicole Cauchon et Sylvain Cecchini pour leur support scientifique et Daniel Robillard pour son soutien informatique.

Je ne pourrais terminer sans remercier mes amis et ma famille qui ont toujours été là pour partager mes joies et mes peines et qui ont su m'écouter et me reconforter. Merci à mes parents, Jacques et Louise, qui m'ont encouragé dans mes études et appris à donner le meilleur de moi-même. Merci à mon frère Dominic et ma sœur Kristine, qui m'ont permis de forger mon caractère! Un immense merci à mon conjoint, Charles, pour être encore là, malgré mon sal caractère et pour m'avoir donné le plus bel être au monde, mon fils Rémi, qui rend la vie plus belle, jour après jour.

## BIBLIOGRAPHIE

AWWAD, H.K. Radiation oncology: radiobiological and physiological perspectives (1990).  
*Klumer Academic publishers*, Dordrecht, Netherlands, 682 p.

BARRET, J.C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment.  
*Environ. Health Perspect.*, 100: 9-20, 1993.

BELURY, M.A. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J. Nutr.*, 132: 2995-2998, 2002.

BENNETT, I.C., GATTAS, M. ET B.T. TEH. The management of familial breast cancer. *Breast*, 9: 247-263, 2000.

BIOLA, A. ET M. PALLARDY. L'apoptose. *Cholé-Doc*, 67, 2001. ([www.cerin.org](http://www.cerin.org))

CHADDERTON, A., VILLENEUVE, D.J., GLUCK, S., KIRWAN-RHUDE, A.F., GANNON, B.R.,  
BLAIS, D.E. ET A.M. PARISENTI. Role of specific apoptotic pathways in the restoration of  
paclitaxel- induced apoptosis by valsopodar in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer  
cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 59: 231-244, 2000.

CHEN, G.G., LEE, J.F., WANG, S.H., CHAN, U.P., IP, P.C. ET W.Y. LAU. Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma is associated with Bcl-2 and NF-kappaB in human colon cancer. *Life Sci.*, 70: 2631-2646, 2002.

CLARK, I.M. Matrix metalloproteinase protocols (2001) *Humana Press inc.*, Totowa, USA, 545 p.

CLAY, C.E., ATSUMI, G.I., HIGH, K.P. ET F.H. CHILTON. Early de novo gene expression is required for 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 276: 47131-47135, 2001.

CUNNINGHAM, D.C., HARRISON, L.Y. ET T.D. SHULTZ. Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res.*, 17: 197-203, 1997.

DLAMINI, Z., MBITA, Z. ET M. ZUNGU. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol. Ther.*, 101: 1-15, 2004.

DURGAM, V.R. ET G. FERNANDES. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett.*, 116: 121-130, 1997.

ELSTNER, E., MULLER, C., KOSHIZUKA, K., WILLIAMSON, E.A., PARK, D., ASOU, H., SHINTAKU, P., SAID, J.W., HEBER, D. ET H.P. KOEFFLER. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce

apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8806-8811, 1998.

ELSTNER, E., WILLIAMSON, E.A., ZANG, C., FRITZ, J., HEBER, D., FENNER, M., POSSINGER, K. ET H.P. KOEFFLER. Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 74: 155-165, 2002.

GRINARI, J.M., CORL, B.A., LACY, S.H., CHOUINARD, P.Y., NURMELA, K.V., ET D.E. BAUMAN. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.*, 130: 2285-2291, 2000.

HALL, E.J. Radiobiology for the radiologist Fifth Edition (2000). *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphie, USA, 588 p.

HARMS-RINGDAHL, M., NICOTERA, P ET I.R. RADFORD. Radiation induced apoptosis. *Mutat. Res.*, 366: 171-179, 1996.

HARRIS, J.R., LIPPMAN, M.E., MORROW, M. ET C.K. OSBORNE. Diseases of the breast Second Edition (2000). *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphie, USA, 1152 p.

HENDERSON, B.E., ROSS, R. ET L. BERNSTEIN. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.*, 48: 246-253, 1988.

HETZEL, M., WALCHER, D., GRÜB, M., BACH, H., HOMBACH, V. ET N. MARX. Inhibition of MMP-9 expression by PPAR $\gamma$  activators in human bronchial epithelial cells. *Thorax*, 58:778-783, 2003.

HUBBARD, N.E., LIM, D., SUMMERS, L. ET K.L. ERICKSON. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Lett.*, 150: 93-100, 2000.

HUNAKOVA, L., CHORVATH, M., DURAJ, J., BARTOSOVA, Z., SEVCIKOVA, L., SULIKOVA, M., CHOVANCOVA, J., SEDLAK, J., CHORVATH, B. ET B. BOLJESIKOVA. Radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest alterations in human carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Neoplasma*, 47: 25-31, 2000).

HUYNH, H.T. ET R.W. TEEL. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by pycnogenol. *Anticancer Res.*, 20: 2417-2420, 2000.

INSTITUT NATIONAL DU CANCER DU CANADA. Statistiques canadiennes sur le cancer 2003.  
[www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)

IP, C., BRIGGS, S.P., HAEGELE, A.D., THOMPSON, H.J., STORKSON, J. ET J.A. SCIMECA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, 17: 1045-1050, 1996.

IP, C., CHIN, S.F., SCIMECA, J.A. ET M.W. PARIZA. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.*, 51: 6118-6124, 1991.

IP, C., IP, M.M., LOFTUS, T., SHOEMAKER, S. ET W. SHEA-EATON. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9: 689-696, 2000.

IP, C. ET J.A. SCIMECA. Conjugated linoleic acid are distinctive modulators of mammary carcinogenesis. *Nutr. Cancer*, 27: 131-135, 1997.

ITOH, Y., BINNER, S. ET H. NAGASE. Steps involved in activation of the complex of pro-matrix metalloproteinase 2 (progelatinase A) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 by 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochem. J.*, 308: 645-51, 1995.

JOHNSON, C., SUNG, H.J., LESSNER, S.M., FINI, M.E. ET Z.S. GALIS. Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularisation of ischemic tissues. Potential role in capillary branching. *Circ. Res.*, 2003.

KELLY, G.S. Conjugated linoleic acid: a review. *Altern. Med. Rev.*, 6: 367-382, 2001.

KUMAR, V., COTRAN, R.S. ET S.L. ROBBINS. Basic Pathology Sixth Edition (1997). *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, USA, 775 p.

LANGSTEIN, H.N., CHENG, M.H., SINGLETARY, S.E., ROBB, G.L., HOY, E., SMITH, T.L. ET S.S. KROLL. Breast cancer recurrence after immediate reconstruction: patterns and significance. *Plast. Reconstr. Surg.*, 111: 712-720, 2003.

LEE DAVIS, D. ET L. BRADLOW. Estrogènes et cancer. *Pour la science*, 218: 74-80, 1995.

LI, M.Y., DENG, H., ZHAO, J.M., DAI, D. ET X.Y. TAN. PPARgamma pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World J. Gastroenterol.*, 9: 1220-1226, 2003.

LIU, J.R., CHEN, B.Q., YANG, Y.M., WANG, X.L., XUE, Y.B., ZHENG, Y.M., ET R.H. LIU. Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid. *World J. Gastroenterol.*, 8: 999-1004, 2002.

MAJUMDER, B., WHALE, K.W., MOIR, S., SCHOFIELD, A., CHOE, S.N., FARQUHARSON, A., GRANT, I., ET S.D. HEYS. Conjugated linoleic acid (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *FASEB J.*, 16: 1447-1449, 2002.

MANDAL, M., MANDAL, A., DAS, S., CHAKRABORTI, T. ET C. SAJAL. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell Biochem.*, 252: 305-329, 2003.

MARCHETTI, P., CANNITA, K., RICEVUTO, E., DE GALITIS, F., DI ROCCO, Z.C., TESSITORE, A., BISEGNA, R., PORZIO, G., DE RUBEIS, G.P., VENTURA, T., MARTINOTTI, S. ET C. FICORELLA. Prognostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cancer. *Ann. Oncol.*, 14: 704-708, 2003.

MILLER, A., STANTON, C., ET R. DEVERY. Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res.*, 22: 3879-3887, 2002.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.*, 378: 151-160, 1997.

NWANKWO , J.O. ET M.E.C. ROBBINS. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  expression in human malignant and normal brain, breast and prostate-derived cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 64: 241-245, 2001.

OLOPADE, O.I., ADEYANJU, M.O., SAFA, A.R., HAGOS, F., MICK, R., THOMPSON, C.B. ET W.M. RECENT. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J. Sci. Am.*, 3: 230-237, 1997.

O'SHEA, M., DEVERY, R., LAWLESS, F., MURPHY, J. ET C. STANTON. Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res.*, 20: 3591-3601, 2000.

PAQUETTE, B., CANTIN, A.M., KOCSIS-BÉDARD, S., BARRY, S., LEMAY, R. ET J.P. JAY-GÉRIN. In vitro generation of peroxynitrite by 2- and 4- hydroxyestrogens in the presence of nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 14:547-554, 2001.



PARK, Y., ALLEN, K.G. ET T.D. SHULTZ. Modulation of MCF-7 breast cancer cell signal transduction by linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res.*, 20: 669-676, 2000.

RAINALDI, G., FERRANTE, A., INDOVINA, P.L. ET M.T. SANTINI. Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependant in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids. *Anticancer Res.*, 23: 2505-2518, 2003.

SCHMIDT-ULLRICH, R.K., VALERIE, K., CHAN, W., WAZER, D.E. ET P.S. LIN. Expression of oestrogen receptor and transforming growth factor- $\alpha$  in MCF-7 cells after exposure to fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61: 405-415, 1992.

SHIMADA, T., KOJIMA, K., YOSHIURA, K., HIRAISHI, H. ET A. TERANO. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*, 50: 658-664, 2002.

SHULTZ, T.D., CHEW, B.P. ET W.R. SEAMAN. Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res.*, 12: 2143-2145, 1992.

THIBODEAU, P.A. ET B. PAQUETTE. DNA damage induced by catecholestrogens in the presence of copper(II) : generation of reactive oxygen species and enhancement by NADH. *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 1367-1377, 1999.

VERRELLE, P. L'apoptose radio-induite. *Revue de l'ACOMEN*, 4: 315-324, 1998.

WOLF, B.B., SCHULER, M., LI, W., EGGERS-SEDLET, B., LEE, W., TAILOR, P., FITZGERALD, P., MILLS, G.B. ET D.R. GREEN. Defective cytochrome c-dependant caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activatig factor-1 activity. *J. Biol. Chem.*, 276: 34244-34251, 2001.

WORLEY, J.R., BAUGH, M.D., HUGHUES, D.A., EDWARDS, D.R., HOGAN, A., SAMPSON, M.J. ET J. GAVRILOVIC. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonists and 9-cis-retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 278: 51340-51346, 2003.

YIN, F., WAKINO, S., LIU, Z., KIM, S., HSUEH, W.A., COLLINS, A.R., VAN HERLE, A.J. ET R.E. LAW. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 916-922, 2001.

YANG, X.H., SLADEK, T.L., LIU, X., BUTLER, B.R., FROELICH, C.J. ET A.D. THOR. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 61: 348-354, 2001.

YOSHIZAWA, K., CIOCA, D.P., KAWA, S., TANAKA, E. ET K. KIYOSAWA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer*, 95: 2243-2251, 2002.