



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Christelle Colin-Cassin**

**Activité PPAR γ -indépendante des ligands de PPAR γ : une piste pour le
traitement des cancers du sein ?**

Le 07 novembre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :	Madame Marie-Christine RIO	Directrice de recherche, IGBMC / Inserm U 964, Illkirch
	Monsieur Pierre FORMSTECHE	Professeur, Université Lille 2 / INSERM U 837, Lille
Examineurs :	Madame Brigitte BOIZET-BONHOURE	Directrice de recherche, CNRS UPR 1142, Montpellier
	Madame Odile SERGENT	Professeur, Université Rennes 1 / INSERM 1085, Rennes
	Monsieur Marc DIEDERICH	Professeur, Directeur du LBMCC, Luxembourg
	Madame Catherine-Laure TOMASETTO	Directrice de recherche, IGBMC / Inserm U 964, Illkirch
	Madame Isabelle GRILLIER-VUISSOZ	Docteur, Université de Lorraine / CRAN UMR 7039, directeur de thèse (HDR)
	Madame Sandra KUNTZ	Docteur, Université de Lorraine / CRAN UMR 7039, co-directeur de thèse
Membre invité :	Madame Claudia CERELLA	Docteur, LBMCC, Luxembourg

Remerciements

J'exprime tout d'abord tous mes remerciements aux membres du jury, Mme Marie-Christine Rio, Directrice de Recherches INSERM, Mr Pierre Formstecher, Directeur de recherche à l'Université de Lille 2, Mme Brigitte Boizet-Bonhoure, Directrice de recherche CNRS, Mme Odile Sergent, Professeur à l'Université de Rennes 1, Mr Marc Diederich, Professeur et Responsable du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire des cancers, Mme Catherine-Laure Tomasetto, Directrice de Recherches INSERM, pour avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et de juger mon travail.

Je tiens à remercier Mr le Professeur Stéphane Flament, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour mon Master et pour ma thèse. Vos avis et vos interventions lors de mes présentations ont toujours été d'un grand renfort.

A mes encadrantes détonantes, les Docteurs Isabelle Grillier-Vuissoz et Sandra Kuntz, je tiens à vous remercier non seulement pour vos conseils scientifiques, techniques et professionnels, mais aussi pour votre soutien dans les moments de doutes. En effet, j'ai beaucoup apprécié vos qualités humaines, votre bonne humeur mais aussi vos bougonnements... La confiance que vous m'avez accordée m'a permis d'arriver à ce jour. Et encore merci à vous deux pour l'aide fournie dans la rédaction de ce manuscrit et notamment à toi Isabelle pour l'« écueil » des TZD et à toi Sandra pour cette fabuleuse phrase sortie de ta thèse !

Je tiens également à remercier les personnes qui ont collaboré à ma thèse :

-à l'équipe de chimiste du Docteur Yves Chapleur (UMR CNRS 7565, UHP) et plus particulièrement au Docteur Michel Boisbrun pour sa rapidité à répondre à mes mails et à mes questions mais aussi pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

-aux membres du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire des cancers (LBMCC). Au Docteur Marc Diederich pour son accueil et ses conseils et au Docteur Claudia Cerella pour sa disponibilité, sa gentillesse et son humanité.

Ma reconnaissance va aussi aux Docteurs Hélène Dumond, Amand Chesnel, Sabine Mazerbourg et Dominique Chardard, pour leur sympathie prodiguée autour d'un café, leurs conseils scientifiques ainsi que les remarques constructives faites lors de mes présentations.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire, ajointe-technique et étudiants notamment Imane et Hussein pour les conversations passées dans notre bureau. Merci également à Sylvie Laine pour sa sympathie et sa bonne humeur. Je tiens aussi à remercier Gauthier pour les moments de pauses que nous faisons quand tout paraissait impossible. Je regrette que tu ne sois pas resté plus longtemps.

Un grand merci à notre technicienne number 1, Alexandra Kleinclauss, car même si nous n'avons pas beaucoup manipulé ensemble, nos discussions et nos fous-rires ont rendus ma thèse bien plus agréable. Une belle amitié s'est dessinée au fur et à mesure de ces quelques années, une amitié qui m'est précieuse. Il faut aussi dire que nos sorties, soirées et restos n'y sont pas pour rien. Je t'ai d'ailleurs choisi pour être témoin de mon mariage. Je te souhaite « tout le bonheur du monde », tu le mérites ! J'espère que nous ne laisserons pas cette amitié s'évanouir.

∞ A ma famille ∞

∞ Je tiens à remercier mon mari pour son amour, sa patience et sa compréhension. Merci pour la chaleur de tes yeux et de ton cœur. Bien qu'avec des hauts et des bas, tu me remontes le moral et me motives à avancer. Un grand merci pour ta présence à mes côtés pendant ces 11 années alors que tu aurais pu prendre tes jambes à ton cou à maintes reprises. Notre amour nous a mené jusqu'au mariage même s'il nous a également fait souffrir par moments. À l'heure où nous avons fêté les noces de coton, et ça ce n'est pas du coton, notre amour est manifestement plus fort. Pour la confiance que tu me portes, les sourires que tu m'offres...
Merci !

Je t'aime.

∞ A mes parents qui m'ont élevé et aimé et ne m'ont jamais forcé à faire un choix plutôt qu'un autre, ce qui m'a d'ailleurs permis d'en arriver là. Même si vous n'avez pas toujours compris ce que je faisais, votre soutien et vos encouragements m'ont permis de ne jamais baisser les bras.

∞ La protection de mes grands frères m'a toujours fourni un grand réconfort. Un grand merci à eux et à ma belle-sœur, car malgré les questions angoissantes à savoir « Tu déposes bientôt ? »

et « Quand est-ce que tu passe ton oral ? », et j'imagine déjà les « Et maintenant tu fais quoi ? », vous avez toujours été présents pour moi. Nos petites soirées et réunions de famille m'ont permis de m'évader et de me remotivé dans les moments de doutes. Merci pour les bons moments passés ensemble.

☞ Je tiens également à remercier ma belle-famille pour sa présence et son soutien.

A tous merci d'être là, à mes côtés...

Tous ceux qui me connaissent bien savent que je n'exprime pas souvent mes émotions. Ceci parce que tous les mots que j'écris ou que je prononce ne seront jamais assez fort et ne pourrons pas refléter ce que je ressens. Alors quoi dire d'autre que...

Merci et je vous aime !

A tous ceux que j'oublie surement.

Merci !

Table des matières

<u>Abréviations</u>	1
CHAPITRE 1 : Introduction bibliographique	6
<u>Partie 1 : Le cancer du sein</u>	7
I. Le sein : architecture et développement	7
II. Le cancer du sein	8
1. Incidence et facteurs de risque	8
2. Classification des cancers du sein	9
a. La classification TNM (Tumor Node Metastasis)	10
b. La classification histologique	10
➤ Les carcinomes non infiltrants	10
➤ Les carcinomes infiltrants	11
c. La classification moléculaire	11
III. Stratégies thérapeutiques	13
1. Chirurgie	13
2. Radiothérapie	14
3. Chimiothérapie	14
4. Thérapies ciblées	15
a. Hormonothérapie	15
b. Autres thérapies ciblées	17
<u>Partie 2 : Les ligands de PPARγ</u>	20
I. Le récepteur PPAR γ	20
1. Distribution tissulaire	21
2. Organisation fonctionnelle du récepteur PPAR γ	21
a. Organisation génomique du récepteur PPAR γ	21
b. Structure du récepteur PPAR γ	23
➤ Les domaines A/B	23
➤ Le domaine C	23
➤ Le domaine D	24
➤ Les domaines E/F	24
3. Mécanismes d'action du récepteurs PPAR γ	25
4. Régulation post-transcriptionnelle du récepteur PPAR γ	26
II. Les ligands de PPAR γ	28
1. Les ligands naturels	28
2. Les ligands synthétiques de PPAR γ	28

a. Les ligands synthétiques appartenant à la famille des thiazolidinediones (TZD)	29
b. Les agonistes duaux	30
c. Les pan-agonistes	30
d. Les SPPARM γ (Modulateurs Sélectifs de PPAR γ)	31
e. Les composés anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	31
f. Les dérivés des triterpenoides	31
g. Les antagonistes de PPAR γ	31
III. Effets physiologiques du récepteur PPAR γ	32
1. Métabolisme lipidique et glucidique	32
2. Inflammation et Arthérosclérose	33
3. Reproduction	34
4. Effets anti-cancéreux des TZD	34
a. Etudes pré-cliniques	34
➤ Effets sur la différenciation	35
➤ Effets sur la prolifération et l'apoptose	35
➤ Effets sur la migration cellulaire	36
➤ Effet sur l'angiogenèse	37
b. Essais cliniques	37
<u>Partie 3 : Effets PPARγ-indépendants</u>	41
I. Découverte des effets PPAR γ -indépendants	41
II. Effets sur la mort cellulaire	43
1. Voies de signalisation de l'apoptose	43
a. Les caspases : effecteurs de l'apoptose	43
b. Mécanismes d'activation des caspases	44
➤ Voie extrinsèque	44
➤ Voie intrinsèque	45
c. Régulation des caspases	48
2. L'effet des ligands sur l'apoptose	49
III. Effets PPAR γ -indépendants des TZD sur le réticulum endoplasmique	53
1. Voies de signalisation UPR	54
a. Inhibition de la traduction <i>via</i> la voie PERK	54
b. Activation de la transcription de gènes cibles de la voie UPR <i>via</i> IRE1 et ATF6	55
➤ IRE1	55
➤ ATF6	55
2. Apoptose médiée par le stress du réticulum endoplasmique	56
a. Apoptose induite par la voie de signalisation IRE1	56
b. Apoptose induite par CHOP	57
c. Apoptose induite par la voie de signalisation calcique	58
3. Stress du réticulum endoplasmique et autophagie	59
4. Effets des ligands sur le réticulum endoplasmique	61

IV. Amélioration des composés TZD	63
1. Relation structure-toxicité	63
2. Relation structure-activité	66
<u>OBJECTIFS DE THESE</u>	69
CHAPITRE 2 : Résultats	71
I. Compréhension des mécanismes PPAR γ -indépendants	72
1. Effet de la biotinylation de la $\Delta 2$ -TGZ	72
a. Introduction	72
b. Principaux résultats	73
c. Conclusion	75
2. Etude des mécanismes de mort cellulaire induit par la $\Delta 2$ -TGZ	76
a. Introduction	76
b. Principaux résultats	77
c. Conclusion	78
3. Effet de la biotinylation du ligand naturel 15d-PGJ2	79
a. Introduction	79
b. Principaux résultats	79
c. Conclusion	81
II. Vers la conception de nouvelles molécules : interface Chimie-Biologie	82
1. Etude de l'activité anti-proliférative de nouveaux dérivés de TGZ sur les cellules cancéreuses mammaire	82
a. Introduction	82
b. Principaux résultats	83
c. Conclusion	84
2. Synthèse de nouveaux dérivés : optimisation du composé $\Delta 2$ -TGZ	85
a. Introduction	85
b. Principaux résultats	85
c. Conclusion	86
CHAPITRE 3 : Discussion et Perspectives	88
I. Synthèse de nouveaux dérivés à effets PPAR γ -indépendants : piste prometteuse dans le traitement du cancer du sein	89
II. Meilleure compréhension des mécanismes d'action PPAR γ -indépendants impliqués dans la diminution de la prolifération	92
III. Augmentation de l'efficacité du ligand naturel prostaglandine 15d-PGJ2 par biotinylation	94
CHAPITRE 4 : Références bibliographiques	96

Abréviations

15d-PGJ2 : 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂
2-APB : 2-aminoethoxydiphenyl borate
2-deoxyglucose : 2-DG
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AF: Activating Fonction
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AIP1 : ASK1 Interacting Protein 1
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : AMP activated protein Kinase
AP : Activating Protein
ARNm : Acise RiboNucléique messenger
ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
AT: Ataxia Telangiectasia
ATF3 : Activating Transription Factor 3
ATF4 : Activating Transription Factor 4
ATF6 : Activating Transcription Factor 6
Atg : Autophagic related proteins
 β -TrCP : β -Transducin repeat Containing Protein
Bad : Bcl-2 Associated Death protein
BADGE : Bisphenol Acid Diglycide Ether
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax : Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins
Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large
BH : Bcl-2 Homology
BI-1 : Bax Inhibitor 1
Bid : BH3-interacting domain death agonist
Bik : Bcl-2-interacting killer
Bim : Bcl-2-interacting mediator of cell death
BIP : Immunoglobulin-Binding Protein
BIR : Baculoviral IAP Repeat
BRCA1 et 2: BReast Cancer 1 et 2
Bsep : Bile salt export pump
CaMKII : Calcium/calModulin-dependent protein Kinase II
CaMKK β : Ca²⁺/calModulin-dependent Kinase Kinase β
CARM1 : Coactivator-Associated arginine Methyltransferase 1
CDDO: 2-Cyano-3, 12-Dioxoolean-1, 9-Dien-28-Oic acid
cdk: cyclin-dependent kinase

CGZ : ciglitazone
CHOP : C/EBP HOmologous Protein
CTE : C-Terminal Extension
DBD : DNA Binding Domain
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DMSO : diméthylsulfoxyde
DMT : Dose Maximale Tolérée
dNTP : Désoxynucléoside triphosphate
DOC : Downstream Of CHOP
DR : Direct Repeat
DRIP : vitamin D Receptor Interacting Protein
DTT : Dithiotréitol
EBCTCG: Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
EC₅₀ : Effective Concentration 50 : Dose nécessaire pour obtenir 50% de l'effet
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
eIF2 : Eukaryotic Initiation Factor 2
EMA : European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ER : Endoplasmic Réticulum
ER : Estrogen Receptor
ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ERMAs : Energy Restriction-Mimetic Agents
ERO1 α : ER Oxidation 1 α
ERSE : Élément de Réponse au Stress du réticulum Endoplasmique
FADD : Fas-Associated Death Domain
FATP : Fatty Acid Transport Protein
FDA : Food and Drug Administration
FGF: Fibroblast Growth Factor
FLIP : FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory
FSH : Follicle-Stimulating Hormone
FSH : hormone folliculostimulante lutéinisante
GADD34 : Growth Arrest and DNA-damage-inducible protein 34
GATA: GATA-binding protein
GLUT 4 : GLUcose Transporter 4
GPR40 : G Protein Coupled Receptor 40
GRP : Glucose-Regulated Protein
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 de type β
HAT : Histone Acétyl-Transférase
hCG : human Chorionic Gonadotropin
HDAC : Histone DeAcetylase
HER : Human Epidermal growth factor Receptor
HODE : acide hydroxyoctadécadiénoïque

hTERT : human TElomerase Reverse Transcriptase
IAPs : Inhibitor of Apoptosis Protein
IBM : IAP-Binding Motif
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1
IGF-1R : Insulin Growth Factor 1 Receptor
Il : Interleukine
INCa : Institut National du Cancer
InVS : Institut de Veille Sanitaire
IP3R : Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor
IRE1 : Inositol-Requiring Enzyme 1
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
Kb : Kilobases
Kd : Constante de dissociation
KDa : KiloDalton
KLF-6 : Kruppel-Like Factor 6
KO : Knock Out
LBD : Ligand Binding Domain
LC3: Light Chain 3
LH-RH : Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
LPL : LipoProtéine Lipase
LTB4 : Leucotriène B4
mA : Milliampère
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF : Michigan Cancer Foundation
Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1
MDA-MB : Medical Doctor Anderson-Metastatic Breast
MDR1 : Multi Drug Resistance
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
MEK : MAPK/ERK Kinase
mLST8 : Lethal with Sec Thirteen 8
mM : Millimolaire
mm3 : millimètre cube
MMLV : Moloney murine leukemia virus
MMP : Matrix MetalloProtease
mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
NCoR : Nuclear receptor Co-Repressor
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
NGFR/p75: Nerve Growth Factor Receptor/p75
NLS : Nuclear Localization Signal
nM : nanomolaire
OATP-C : Organic Anion Transporting Polypeptide-C
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frame
p : bras court du chromosome
PARP: Poly [ADP-Ribose] Polymerase

Pb : Paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction : réaction de polymérisation en chaîne
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PERK : Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase
PGC : PPAR Gamma Coactivator
PGE2 : Prostaglandine E2
PGZ : Pioglitazone
PI3K : PhosphoInositol-3-Kinase
PKA : Protein Kinase A
PKC : Protein Kinase C
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PP2A: Protein Phosphatase 2A
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE : PPAR-Responsive Element
PR : Progesterone Récepteur
PRMT1 : Protein arginine Methyl Transferase 1
PSA : Prostate-Specific Antigen
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
PUMA: P53 Upregulated Mediator of Apoptosis
q : Bras long du chromosome
QSP : Quantité suffisante Pour
Rb : Retinoblastoma
RGZ : Rosiglitazone
RING : Really Interesting New Gene
RIP140 : Receptor Interacting Protein 140
RNase : Ribonucléase
ROS : Reactive Oxygen Species
RPLPO : Human acidic ribosomal phosphoprotein
RXR : Retinoid X Receptor ou 9-cis retinoic acid receptor
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec : seconde
SERD : Selective Estrogen Receptor Degradation
SERM: Selective Estrogen Receptor Modulators
siRNA : small interfering RNA
SMRT : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor
SOCs : Store Operated Channel
Sp1 : GC-box binding protein: Specificity protein 1
SPARM γ : Selective PPAR modulators γ : Modulateurs sélectifs de PPAR γ
SRA : Steroid Receptor RNA Activator
SRC : Steroid Receptor Co-activator
SRE : Stress du Réticulum Endoplasmique
SUMO : Small Ubiquitin-like MODifier
SVF : Sérum de veau foetal

SWI/SNF : SWItch/Sucrose NonFermentable
TAE : Tris acétate EDTA
Taq : Thermus aquaticus
TGF: Transforming Growth Factor
TGZ : Troglitazone
TMBIM : TransMembrane Bax Inhibitor Motif containing
TNF : Tumor necrosis factor
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TNM : Tumor Node Metastasis
TNT : Tris-HCL, NaCl, Tween
TR: Thyroid Receptor
TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAP : Thyroid hormone Receptor Associated Protein
TSM : Taux Standardisé Monde
TZD : Thiazolidinedione
UBA : Ubiquitin-Associated Domain
UICC : Union Internationale Contre le Cancer
UPR : Unfolded Protein Response
UV : Ultraviolet
V : Volt
v : Volume
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
XBP1 : X-box Binding Protein 1

Chapitre 1



Introduction bibliographique

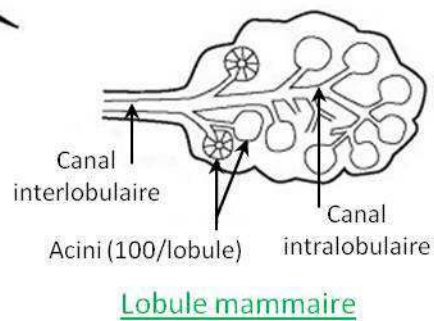
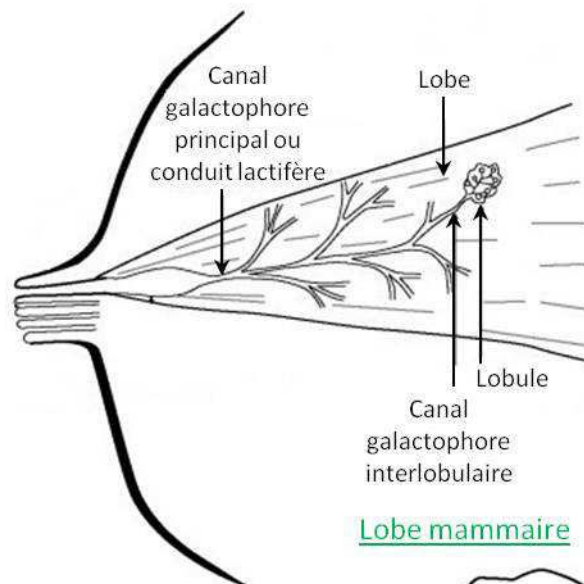


Figure 1 : Anatomie du sein et structure du réseau lobulo-alvéolaire. Coupes schématiques d'un lobe (en haut) et d'un lobule (en bas) mammaire. La glande est une structure en grappe composée d'acini regroupés en lobules, eux-mêmes regroupés en lobes. Les sécrétions des acini sont récupérées par un réseau de canaux intralobulaires qui s'associent pour former un canal interlobulaire drainant un lobule. Le canal galactophore principal ou conduit lactifère réunit les canaux interlobulaires et converge vers le mamelon. Modifié d'après Serfaty D. 2011.

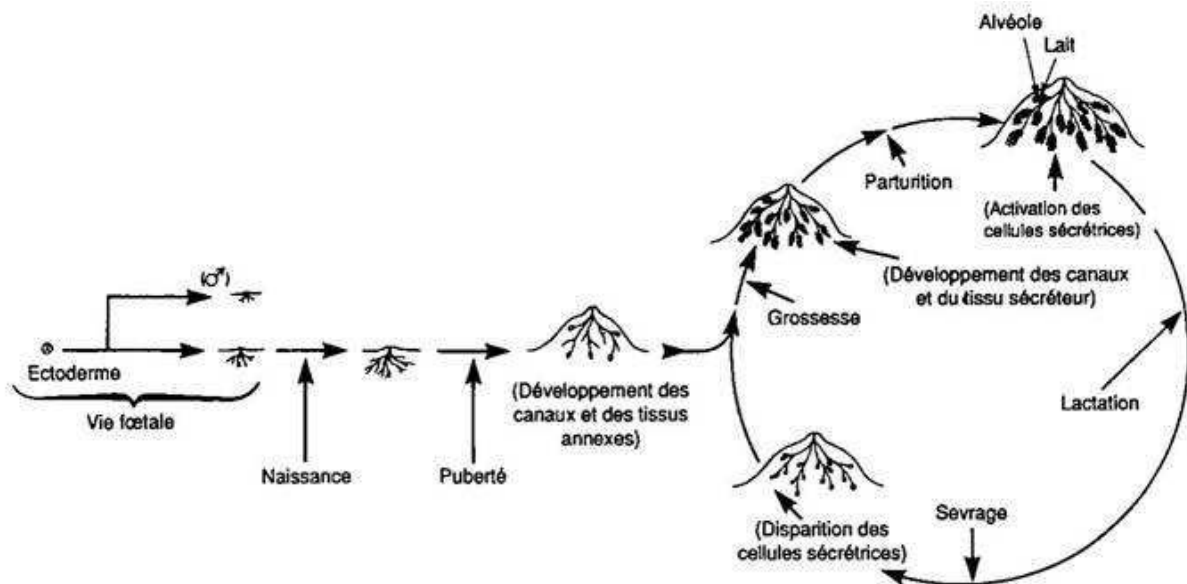


Figure 2 : Schéma général de l'évolution de la glande mammaire depuis l'embryon jusqu'à la lactation. Chez le fœtus mâle et femelle, le sein se développe à partir de l'ectoderme. A la naissance, les ébauches des canaux galactophores et des bourgeons terminaux sont formées. Chez le fœtus mâle, le bourgeon mammaire cesse de se développer tandis que chez la femelle le développement de la glande mammaire continue lentement jusqu'à la puberté puis s'accélère avec la formation de bourgeons alvéolaires formant les lobules. La grossesse met en place un cycle de développement de la glande mammaire où elle atteint un stade de différenciation maximal puis la parturition induit l'activation des cellules sécrétrices. A la fin de la lactation, les cellules sécrétrices disparaissent avec le sevrage. Un nouveau cycle peut alors recommencer avec une nouvelle grossesse. Modifié d'après Martinet J. et Houdebine L.M., 1993.

Partie 1 : Le cancer du sein

I. Le sein : architecture et développement

Chez la femme, le sein est une glande exocrine assurant la production de lait après l'accouchement. Situé sur la partie antérieure du thorax, il est de forme conique ou hémisphérique. L'extrémité du sein se termine par un disque cutané pigmenté de taille variable appelé l'aréole. Celle-ci entoure un relief cylindrique appelé le mamelon.

Sur le plan interne, la glande mammaire est constituée de deux compartiments cellulaires séparés par une membrane basale : un compartiment mésenchymateux, richement vascularisé et innervé, et un compartiment épithélial. Ce dernier renferme une structure en grappe composée d'alvéoles ou acini correspondant à la partie sécrétrice de la glande (**Figure 1**). Les alvéoles sont regroupées au sein de lobules, eux-mêmes regroupés en lobes. La glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes. Cette structure comprend également un réseau de canaux permettant l'évacuation des sécrétions. Les alvéoles sont ainsi réparties autour de canaux alvéolaires ou canaux intralobulaires qui s'associent pour former un canal galactophore interlobulaire drainant un lobule. Plusieurs canaux interlobulaires se réunissent à leur tour pour former un canal galactophore principal ou conduit lactifère qui converge vers le mamelon. Chaque lobe est donc drainé par un canal galactophore qui débouche individuellement au niveau du mamelon.

Le sein se développe tout au long de la vie de la femme, du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogène et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance. Dès la quatrième semaine de la vie fœtale, le sein se développe à partir de l'ectoderme chez le fœtus mâle et femelle mais la différenciation de celui-ci est effectuée lors du troisième trimestre de la grossesse sous l'influence des hormones maternelles (**Figure 2**). Chez le fœtus mâle, le bourgeon mammaire cesse de se développer sous l'effet inhibiteur des androgènes produits par le testicule embryonnaire. Chez les femelles, les ébauches des canaux galactophores sont formées et des bourgeons terminaux se différencient à la naissance. Jusqu'à la puberté, la glande mammaire se développe lentement sous l'influence des hormones de croissance. A la puberté, le développement s'accélère avec principalement une augmentation du tissu graisseux et la ramification de bourgeons alvéolaires à partir des bourgeons terminaux. Les changements hormonaux dus à la mise en place des cycles menstruels induisent la formation de lobules. Au cours des cycles et ce jusqu'à l'âge de 35 ans, les lobules évolueront lentement en lobules de plus en plus complexes avec une augmentation du nombre d'alvéoles. Néanmoins la différenciation totale de ces

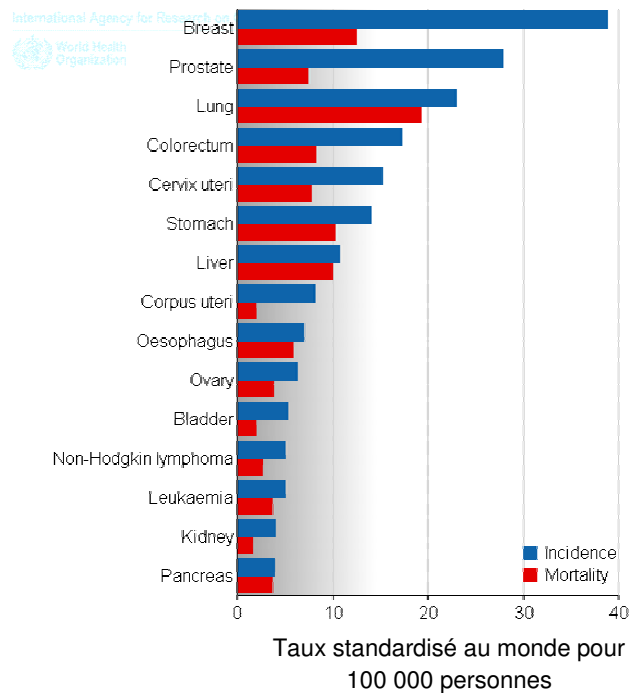


Figure 3 : Taux standardisé monde (sur 100 000 personnes) de l'incidence et de la mortalité par cancers chez homme et femme confondus. Les histogrammes bleus et les histogrammes rouges représentent respectivement l'incidence et la mortalité de chaque cancer. Le cancer du sein possède l'incidence la plus élevée et correspond au deuxième cancer le plus meurtrier derrière le cancer du poumon. D'après GLOBOCCAN. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2008.

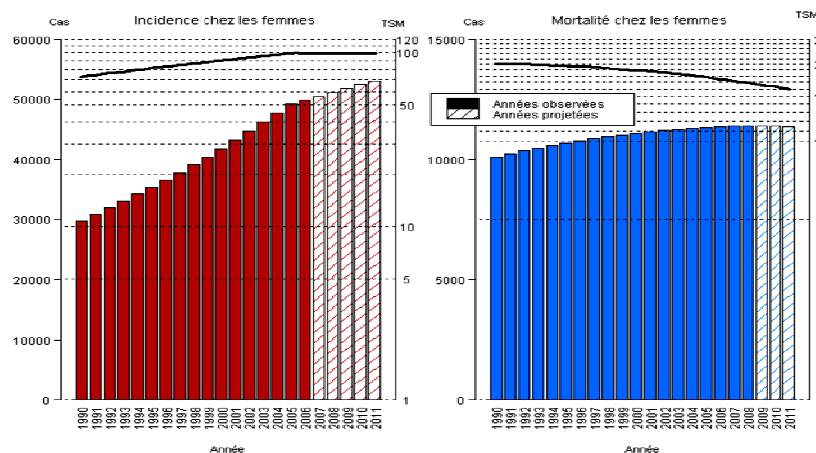


Figure 4 : Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du sein chez la femme de 1990 à 2011 en France et des taux standardisés monde (TSM) correspondants. Les histogrammes représentent l'incidence (à gauche) et la mortalité (à droite) du cancer du sein en France. Le taux standardisés monde (TSM) correspondent à la courbe noire en échelle logarithmique. Les données représentées après 2006 correspondent à des projections puisque seules les données antérieures à cette date sont disponibles. D'après InVS (Institut national de veille sanitaire) .2011.

lobules ne pourra être atteinte si aucune gestation ne survient (Russo J & Russo IH. 2004). La gestation et la lactation entraînent des modifications importantes du sein. Sous l'influence notamment des hormones œstrogène/progestérone et des facteurs de croissance tels que le TGF α (Transforming Growth Factor de type α), les lobules atteignent leur différenciation maximale avec une augmentation du nombre et de la taille des acini (Lamote I., *et al.* 2004). Les changements hormonaux qui surviennent lors de la parturition induisent la lactogénèse. Durant 2 à 3 jours après l'accouchement, la glande mammaire va sécréter un liquide riche en protéines et en anticorps, c'est le colostrum. Par la suite la sécrétion grasseuse augmente et il se transformera en lait. Ainsi la glande mammaire n'achève son développement qu'avec la première lactation. A la fin de celle-ci, le tissu alvéolaire est détruit et est remplacé par du tissu adipeux dans lequel se développera une nouvelle masse glandulaire au cours d'un nouveau cycle de reproduction. A la ménopause, les alvéoles régressent mais les canaux galactophores sont maintenus.

II. Le cancer du sein

1. Incidence et facteurs de risque

Le cancer du sein représente un problème majeur de santé publique. En effet, il s'agit du cancer le plus fréquent dans les pays occidentaux et constitue le premier cancer féminin dans le monde avec 1 384 155 nouveaux cas et 458 503 décès en 2008. Tous sexes confondus, il présente l'incidence la plus élevée avec 38,9/100 000 personnes touchées et il constitue le second cancer le plus meurtrier (12,4/100 000) derrière le cancer du poumon (Globocan, **Figure 3**). En 2011, l'Institut National de Veille Sanitaire a publié son rapport de projection de l'incidence et de la mortalité des cancers en France. Le cancer du sein reste aujourd'hui le cancer le plus diagnostiqué chez la femme avec 53 000 nouveaux cas estimés en 2011 devant le cancer colorectal (19 000 cas) et le cancer du poumon (12 000 cas) : il représente 33,4% des cancers. Il est aussi le plus meurtrier avec 11 500 décès estimés pour l'année 2011 (InVS, **Figure 4**). Cependant, le taux de mortalité par cancer du sein dans le monde (TSM pour « Taux Standardisé Monde ») diminue depuis 15 ans et l'hypothèse d'une stabilisation de l'incidence à été retenue dans les projections réalisées. Cette diminution pourrait être liée à la diminution des prescriptions des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause. L'hypothèse couramment admise est que ces traitements pourraient favoriser la croissance des tumeurs pré-existantes mais n'auraient pas d'effet initiateur (Ringa V. & Fournier A. 2008). Néanmoins, les données actuelles ne permettent pas de conclure et cette hypothèse reste à confirmer.

Le risque de développer un cancer mammaire peut être influencé par différents facteurs : génétiques, hormonaux et environnementaux.

6 à 10% des cancers du sein sont associés à des prédispositions génétiques. Une incidence accrue dans certaines familles a permis de mettre en évidence la présence de mutations d'un petit nombre de gènes. Les principaux sont BRCA1 et 2 (BReast CAncer), p53, PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) et AT (Ataxia Telangiectasia) (Dumitrescu RG. & Cotarla I. 2005).

Le plus connu des facteurs de risque est une exposition prolongée aux œstrogènes. Ces derniers jouent un rôle important dans le développement normal de la glande mammaire et ils pourraient agir notamment en stimulant la croissance des tumeurs pré-existantes. Ainsi une ménarche précoce (<2 ans) et une ménopause tardive (>54 ans) sont associés à un risque accru de cancers mammaires. De plus, un lien entre apport d'œstrogènes exogènes et apparition de cancer est évoqué de manière récurrente (Yue W., *et al.* 2013 ; INCa 2012). Les dernières données de l'INCa montrent que la prise prolongée (5 ans ou plus) d'un traitement hormonal substitutif multiplie par 1,2 à 2 le risque de développer un cancer du sein (INCa. 2012). Les œstrogènes se fixent sur leurs récepteurs nucléaires ER (Estrogen Receptor) qui agissent comme des facteurs de transcription inductibles. Comme nous le détaillerons dans la partie classification moléculaire, la présence du récepteur ER α (Green S. *et al.* 1986 ; Greene GL., *et al.* 1986) sert de marqueur moléculaire pour la classification des cancers mammaires.

Les facteurs environnementaux sont également impliqués dans le développement de ce type de cancer. Par exemple des facteurs alimentaires ont été mis en cause, ainsi il a été démontré qu'une consommation élevée d'acides gras *trans* augmente le risque de développer un cancer du sein (Chajès V., *et al.* 2008). De même, une consommation journalière d'alcool provoque une augmentation du risque de 10% (Testino G. 2011). L'exposition prolongée à des polluants agissant souvent en tant que perturbateurs endocriniens augmente aussi le risque de développer un cancer mammaire. L'effet de différents types de polluants a été décrit, par exemple l'insecticide (dichlorodiphényltrichloroéthane), ou encore des constituants du plastique tels que le 4-nonylphénol, le bisphénol A et les phtalates (Cravedi JP., *et al.* 2007).

2. Classification des cancers du sein

Le choix d'une stratégie thérapeutique adaptée à chaque patiente est basé sur la caractérisation détaillée des tumeurs mammaires. L'évaluation tumorale au cas par cas permet une prise en charge optimale tout en évitant l'utilisation de traitements inutiles et potentiellement délétères. Plusieurs classifications sont actuellement utilisées dans ce but.

A.

T	Extension locale
TX	Détermination de la tumeur primitive impossible
T0	Pas de signe de la tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur ≤ 2cm dans sa plus grande dimension
T2	Tumeur > 2cm et ≤ 5cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur > 5cm dans sa plus grande taille
T4	Tumeur de toutes tailles avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau
N	Envahissement des ganglions
NX	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire
N0	Absence de signes d'envahissement ganglionnaire régional
N1	Ganglions axillaires cliniquement suspects homolatéraux mobiles
N2	Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures
N3	Ganglions mammaires internes homolatéraux
M	Développement de métastases
MX	Détermination impossible de l'extension métastatique
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

B.

	Extension locale	Envahissement des ganglions	Développement de métastases
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
Stade IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stade IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stade IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stade IIIC	Tous T	N3	M0
Stade IV	Tous T	Tous N	M1

Figure 5 : Classification simplifiée TNM (Tumor Node Metastasis) des cancers du sein.
A. Caractéristiques morphologiques des tumeurs correspondantes aux lettres chiffrées de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC). **B.** Classification par stade des tumeurs par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

a. La classification TNM (Tumor Node Metastasis)

La classification clinique dite TNM pour Tumor Node Metastasis (tumeur ganglion métastases) de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) est la plus communément utilisée. Elle permet de caractériser une tumeur selon trois critères : la masse tumorale en place et son extension locale (T), son extension locorégionale avec l'envahissement des ganglions (N) et à distance avec le développement de métastases (M). Chaque critère est associé à un chiffre dont la valeur augmente avec la gravité (**Figure 5A**). Lorsque la détermination est impossible, la lettre X est associée au critère TNM. Ces tumeurs ainsi caractérisées sont ensuite regroupées par stade : du stade 0 pour les cancers *in situ* au stade IV pour les cancers métastatiques (**Figure 5B**).

Il existe d'autres critères intervenant dans la détermination de la gravité de la tumeur ; par exemple la présence d'emboles vasculaires et la mesure de la marge d'exérèse sont pris en compte afin d'assurer une qualité d'exérèse optimale et de réduire le risque de rechute.

b. La classification histologique

Les tumeurs malignes les plus fréquentes sont les adénocarcinomes (98%). Pour ce type de tumeurs, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a proposé une classification basée sur leur aspect morphologique. Elle classe donc les tumeurs en deux types distincts en fonction de leur nature anatomopathologique.

➤ Les carcinomes non infiltrants

Ces tumeurs épithéliales non infiltrantes peuvent envahir les canaux (carcinome intracanaux ou canalaire) ou les lobules (carcinome lobulaire). Le premier représente 4% des cancers et montre le plus souvent des microcalcifications mammographiques et une multicentricité. Le second correspond à une prolifération de cellules de petite taille au niveau des canalicules intra-lobulaires. Il représente environ 2,5% des cancers et se caractérise par son caractère multicentrique et sa tendance à la bilatéralisation. Ces deux carcinomes non infiltrants sont caractérisés par un non-envahissement du tissu conjonctif voisin.

A

Profils moléculaires	Fréquence	Status ER/HER		
Luminal A	50-60 %	ER+	PR+	HER2-
Luminal B	10-20 %	ER+/-	PR+/-	HER2-/+
HER2+	10-15 %	ER-	PR-	HER2+
Basal-like	10-20 %	ER-	PR-	HER2-
Claudin-low	12-14 %	ER-	PR-	HER2-
Normal-like	5-10 %	ER-/+	PR-	HER2-

B

Profils moléculaires	Status ER/AR		Status prolifération
LumA	ER+	AR+	Faible
LumB	ER+	AR+	Forte
LumC	ER+/-	AR+	Forte
normL	ER+	AR+	Faible
mApo	ER-	AR+	Forte
BasL	ER-	AR-	forte

Figure 6 : Tableaux récapitulatifs des profils moléculaires des tumeurs mammaires.
A. Profils moléculaires basés sur la classification de Perou et Sorlié (Perou CM., *et al.* 2000 ; Herschkowitz JI., *et al.* 2007). La fréquence observée de ces différents profils est présentée dans la deuxième colonne. La troisième colonne montre leurs statuts ER (Récepteur des œstrogènes), PR (Récepteur de la Progestérone), HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2). **B.** Profils moléculaires déterminés par Guedj M et ses collègues (Guedj M., *et al.* 2012). Les statuts ER et AR (Récepteur aux Androgènes) ainsi que le statut lié aux gènes de prolifération sont respectivement indiqués dans la deuxième et troisième colonne.

➤ Les carcinomes infiltrants

Contrairement aux précédents, ce type de carcinome se distingue par la capacité des cellules cancéreuses à envahir le tissu conjonctif voisin. Ce groupe est constitué de plusieurs entités. Le premier type est le carcinome canalaire infiltrant. Il est le plus fréquent des tumeurs malignes soit environ 70% des cancers du sein. L'autre type est le carcinome lobulaire infiltrant représentant 5 à 15% des cancers. De nombreux autres carcinomes plus rares sont également décrits.

Cette classification des tumeurs mammaires est actuellement remise en question par des études transcriptomiques à haut débit. En effet, les cancers du sein représentent une pathologie complexe et hétérogène, résultant de multiples altérations moléculaires. L'étude de cette hétérogénéité est cruciale pour le développement de thérapies plus efficaces ciblant spécifiquement la tumeur de chaque patiente.

c. La classification moléculaire

L'hétérogénéité transcriptomique des tumeurs est actuellement étudiée et a conduit à l'établissement d'une troisième classification dite « intrinsèque » ou « moléculaire ». C'est en 2000 que Perou et Sorlié ont proposé le premier modèle de taxonomie permettant de catégoriser les cancers du sein. Les variations de profil d'expression de 1 753 gènes humains ont été obtenues par une étude transcriptomique à haut débit réalisée sur 65 échantillons prélevés sur 42 patients (Perou CM., *et al.* 2000). Cette analyse a mis en évidence différents profils basés sur l'expression des gènes ER, PR (récepteur à la progestérone), HER2 (récepteur au facteur de croissance épidermique humain de type 2). Par ailleurs, ces profils d'expression sont maintenus après 16 semaines de traitement à la doxorubicine ainsi que dans les métastases, ce qui démontre leur stabilité. Ainsi, Perou et Sorlié ont publié la première classification moléculaire des cancers mammaires. Elle est la base fondatrice de la biologie moléculaire des cancers du sein. Dès lors de nombreuses études ont été menées dans le but de toujours mieux caractériser les profils d'expression des tumeurs mammaires. En 2007, un nouveau groupe de tumeurs nommé « claudin-low » à été isolé par Perou et ses collègues (Herschkowitz JI., *et al.* 2007). Cette étude a été réalisée à la fois sur des échantillons de tumeurs mammaires humaines (n=232) et murines (n=108).

Depuis la publication de la première classification moléculaire des cancers du sein, il est maintenant établi que les cancers du sein se répartissent en six groupes bien définis (**Figure 6A**): les tumeurs luminales A et B, les tumeurs surexprimant HER2, les tumeurs « basal-like », les tumeurs « claudin low » ainsi que les tumeurs « normal-like ».

Le profil luminal est caractérisé par une forte réceptivité aux hormones corrélée avec une forte expression du récepteur ER α . Il possède également une expression relativement forte de nombreux gènes des cellules luminales telles que les cytokératines 8, 18 et 19 ainsi que GATA3, un gène impliqué dans le développement et la différenciation des tumeurs ER+. Dans cette catégorie, deux sous-types sont observés : les profils luminaux A et B représentant respectivement une fréquence de 50-60% et 10-20% des tumeurs mammaires. Les tumeurs luminales A n'expriment pas HER2. Les tumeurs luminales du groupe B se distinguent par une expression plus faible du récepteur ER α et une prolifération plus forte. De plus, il existe des sous-types HER2+ et HER2-. Les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et ZR-75-1 sont de type luminal A (Subik K., *et al.* 2010).

Le profil tumoral HER2+ est diagnostiqué dans 10 à 15% des cancers du sein. Il montre une amplification du gène HER2 (erb-B2) ainsi qu'une prolifération forte (forte expression du Ki67). HER2 est un récepteur du facteur de croissance épidermique et joue un rôle dans la stimulation des cellules à se diviser de manière incontrôlable. Ces tumeurs peuvent aussi exprimer faiblement le récepteur hormonal ER α . Elles présentent également l'expression de marqueurs de cellules basales comme les cytokératines 5/6, 17 et 14, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), c-kit, la myosin, la caveolin et NGFR/p75 (Nerve Growth Factor Receptor/p75).

Le profil « basal-like » correspond à des tumeurs dites « triple négative » c'est-à-dire qui n'expriment pas les trois marqueurs ER α , PR et HER2. Ce type de tumeurs est le plus agressif et présente un phénotype invasif. Ces tumeurs expriment les marqueurs des cellules épithéliales basales comme les tumeurs de type HER2+. La lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 est de type basal-like (Kao J., *et al.* 2009).

Le profil « claudin-low » correspond à des tumeurs triples négatives présentant une faible expression de marqueurs luminaux tels qu'ER, PR et HER2 ainsi que GATA3 et les cytokératines 18/19. Elles diffèrent des tumeurs basal-like du fait de la faible expression de l'occludine et des claudines 3, 4, 7 qui sont impliquées dans les jonctions cellulaires de type serré. Ce groupe présente également une faible expression de l'E-cadhérine, et une forte expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules (Prat A., *et al.* 2010). L'ensemble de ces données classe ce type de profil comme un cancer de mauvais pronostic (Eroles P., *et al.* 2012).

Le profil « normal-like » correspond à des tumeurs dont l'expression est similaire à celle de cellules normales.

En 2011, une analyse transcriptomique sur 537 tumeurs mammaires a permis de définir des profils d'expression partiellement divergeant de la classification de Perou et Solié. Elle découle de l'étude de

gènes liés (i) au récepteur aux œstrogènes (ii) au récepteur aux androgènes (AR) et (iii) aux gènes de prolifération. Ainsi six profils d'expression ont été déterminés. Les profils LumA et NormL sont les seuls à présenter une prolifération faible et un profil ER+ alors que LumB (ER+) et LumC (ER+/-) présente une prolifération forte. Ces quatre profils expriment le récepteur AR. Les deux profils restants mApo et BasL (prolifération forte et ER-) se distinguent par l'expression d'AR qui n'est détectée que dans le profil mApo. De manière surprenante le gène HER2 est surexprimé dans 40% des profils LumC et 72% des BasL (**Figure 6B**). Cette étude a ensuite été validée sur plus de 3 000 tumeurs (Guedj M., *et al.* 2012).

Toutes ces études permettent de mieux caractériser les tumeurs. Cependant, les marqueurs ciblés par les stratégies thérapeutiques actuelles sont principalement ER et HER2. La classification de Perou et Sorlié restent donc la plus couramment utilisée.

III. Stratégies thérapeutiques

Le but du traitement du cancer du sein est non seulement d'éliminer la tumeur primaire, mais aussi les métastases. Pour cela plusieurs stratégies sont utilisées et sont souvent associées. Elles reposent sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie ainsi que des thérapies plus ciblées.

1. Chirurgie

La chirurgie reste encore aujourd'hui un traitement principal pour les carcinomes mammaires *in situ*. Pour les tumeurs de taille inférieure à 3 cm, une chirurgie conservatrice ou partielle appelée tumorectomie est réalisée. Une tumeur de taille plus importante nécessite l'ablation totale de la glande mammaire appelée mastectomie (Houssami N., *et al.* 2006). Dans ce cas, de nombreuses femmes choisissent de réaliser une reconstruction mammaire. L'exérèse d'une tumeur impose souvent d'enlever une marge de tissu sain pouvant être contaminé par des cellules cancéreuses. Lorsque cette marge d'exérèse est contaminée ou dans le cas de carcinomes infiltrants voir métastatiques, la chirurgie est complétée par d'autres thérapies telles que la radiothérapie ou bien encore la chimiothérapie.

Substance	Nom commercial	Catégorie	
capécitabine	Xeloda®	Antimétabolite	Inhibiteur synthèse ac.nucléique
gemcitabine	Gemzar®		
topotécan	Hycamtin®		
méthotrexate	Méthotrexate®		
fluoro-uracile	Fluoro-Uracile®		
6-mercaptopurine	Purinéthol®		
irinotécan	Campto®	Inhibiteur Topoisomérase I	
etoposide	VePesid	Inhibiteur Topoisomérase II	
doxorubicine	Adriamycin/Doxil®	Anthracycline	Substances réagissant /ADN
épirubicine	Ellence®		
cyclophosphamide	Cytoxan/Endoxan®	Agent électrophile	
cisplatine	Cisplatyl®		
bléomycine	Bléomycine	Agent scindant	
docétaxel	Taxotere®	Inhibiteur microtubules	Substances réagissant /protéines
paclitaxel	Taxol®		
vinblastine	Velbé®		
vinorelbine	Navelbine®		

Figure 7 : Tableau récapitulatif des principaux médicaments utilisés en chimiothérapie. Le nom de la substance, le nom commercial du médicament ainsi que la catégorie de classement des médicaments sont indiqués.

2. Radiothérapie

En complément de la chirurgie, la radiothérapie est un traitement locorégional souvent utilisé sur les tumeurs mammaires (plus de 50% des patients). Elle utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. On distingue la curiethérapie et la radiothérapie externe. La curiethérapie correspond à l'irradiation après injection de radioisotope dans la région du sein opéré. La radiothérapie externe consiste à une irradiation transcutanée, c'est-à-dire que les rayons traversent la peau pour atteindre la zone ciblée. Selon le stade du cancer et l'organe touché, différents rayons peuvent être utilisés (photons, rayons X, électrons). Avant le traitement, la tumeur doit être repérée et mesurée. Ainsi les rayons délivrés sont distribués sur le volume de la tumeur ce qui permet de limiter l'atteinte des tissus sains avoisinants. Néanmoins, certains effets secondaires sont observés tels que la fatigue, des réactions inflammatoires, des œdèmes,...

La radiothérapie est couramment utilisée sur les carcinomes *in situ* et les carcinomes infiltrants. Elle peut aussi être utilisée sur des cancers métastatiques. Dans ce cas, elle a pour effet de ralentir la maladie mais ne constitue pas un traitement efficace contre la formation de métastases (Brennan M., *et al.* 2005).

3. Chimiothérapie

Les traitements locaux tels que la chirurgie et la radiothérapie ne sont pas efficaces contre la propagation des cellules cancéreuses. La chimiothérapie est basée sur l'utilisation de médicaments ayant une action sur l'ensemble des cellules de la patiente. Elle ne sera donc généralement pas prescrite pour des cancers *in situ* dont la marge d'exérèse est saine. Elle sera plutôt utilisée pour les carcinomes infiltrants avant ou après la chirurgie où elle est considérée comme adjuvante. De nombreux médicaments sont utilisés seuls ou en association car leurs mécanismes d'action sont différents. Il existe trois grandes catégories de médicaments en chimiothérapie elles-mêmes découpées en sous-catégories (**Figure 7**):

- les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques comprenant principalement les antimétabolites comme le 6-mercaptopurine, le 5-fluoro-uracile et le méthotrexate et inhibiteurs de topoisomérase I et II comme l'irinotécan et l'étoposide;
- les substances réagissant avec l'ADN comprenant les substances intercalantes avec deux antracyclines comme la doxorubicine et l'épirubicine, les agents électrophiles comme le cyclophosphamide et le cisplatine et les agents scindants comme la bléomycine ;

- les substances réagissant avec les protéines, essentiellement avec la tubuline, comme la vinblastine et le paclitaxel.

L'ensemble de ces thérapies ont pour but de détruire les cellules cancéreuses ou d'empêcher leur multiplication. La chimiothérapie est relativement efficace puisqu'elle possède un taux de réponse de l'ordre de 70 à 90% (Brain EG., *et al.* 1999). Cependant, la chimiothérapie conduit à une toxicité importante due à un manque de sélectivité. De toute évidence, cette thérapie touche les tissus sains et conduit à des effets secondaires provoquant à court terme la chute des cheveux, des nausées et vomissements, de la fatigue, la baisse des globules blancs et rouges ainsi que des plaquettes, des douleurs musculaires ou articulaires, etc. A plus long terme des troubles cardiaques peuvent également être observés. Par conséquent, la recherche de nouveaux traitements à effets plus ciblés est nécessaire.

4. Thérapies ciblées

L'existence de marqueurs spécifiques permet le développement de thérapies ciblées.

a. Hormonothérapie

Elle est la première des thérapies ciblées, elle s'adresse à des cancers hormono-dépendants. Elle a cependant été développée avant même la découverte des œstrogènes. Ce traitement est donc devenu une thérapie ciblée à posteriori.

C'est en 1896 que Sir George Thomas Beatson découvre les bases de l'hormonothérapie. Il observe que deux femmes atteintes d'un cancer du sein montrent une rémission après une castration des ovaires (Beatson GT. 1896). L'implication des œstrogènes sur le développement du cancer du sein a ensuite été démontrée chez la souris en 1932 par Antoine Lacassagne (Lacassagne A. 1936). Depuis ces découvertes, des traitements visant à supprimer les effets des hormones ont été développés. Ces traitements sont efficaces sur les tumeurs de type luminal exprimant les récepteurs hormonaux ER et PR. En effet, 80% des patientes avec une tumeur ER+/PR+ répondent positivement à l'hormonothérapie alors que seulement 30% des patientes répondent lorsque la tumeur est caractérisée ER+/PR- ou ER-/PR+ (Delozier T. 2010). L'hormonothérapie est notamment prescrite pour les carcinomes infiltrants et métastatiques hormono-sensibles, et est souvent associée à la chirurgie et à la chimiothérapie. On distingue 2 principaux types d'hormonothérapie : l'hormonothérapie suppressive et additive.

L'hormonothérapie suppressive vise à supprimer la production des hormones comme les œstrogènes. Une première approche est une thérapie non médicamenteuse consistant à supprimer par castration l'organe synthétisant les hormones : les ovaires. Ceci peut être réalisé chirurgicalement ou par irradiation ce qui induit l'installation définitive de la ménopause. Dans ce cas, la production hormonale des ovaires est stoppée dans les 3 mois suivant la radiothérapie. Quant aux effets de l'ablation chirurgicale, ils sont immédiats mais plus délétères. En effet les patientes présentent fréquemment des bouffées de chaleur accompagnées de sueurs ainsi que de douleurs articulaires au repos. Elles peuvent aussi présenter une fragilité osseuse. La seconde approche correspond à une thérapie médicamenteuse inhibitrice consistant à empêcher la production des œstrogènes par les ovaires. Les ovaires secrètent cette hormone après stimulation par l'hormone folliculostimulante lutéinisante (FSH) libérée par l'hypophyse. On distingue donc l'hormonothérapie inhibant la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires. Ainsi les ovaires ne sont plus stimulés et ne secrètent plus d'hormones. Les molécules sont des analogues de la LH-RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) qui est un facteur produit par l'hypothalamus induisant la libération de la FSH par l'hypophyse. Ce traitement induit tout d'abord une stimulation de la sécrétion puis une désensibilisation avec une diminution de la production d'œstrogènes. Il existe plusieurs substances prescrites dans ce but telles que la Leuproréline, Goséréline, Triptoréline. On peut aussi bloquer la biosynthèse des œstrogènes en inhibant l'aromatase, l'enzyme qui permet la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes. On distingue ainsi l'hormonothérapie inhibant l'action de l'aromatase. Les inhibiteurs d'aromatase actuellement utilisés sont l'anastrozole, le létrozole et l'exémestane uniquement prescrits pour les femmes ménopausées. Un des effets secondaires le plus délétère est un risque important de décalcification osseuse, voire d'ostéoporose et de fractures osseuses. Ces thérapies sont généralement utilisées dans le traitement des cancers du sein avancés ou métastatiques.

L'hormonothérapie dite « additive » consiste à l'addition soit d'hormones sexuelles, soit de composés non stéroïdiens. Dans ce deuxième cas, l'hormonothérapie est qualifiée de compétitive car son but est d'empêcher la fixation des œstrogènes au niveau de son récepteur ER. En effet, ils ne stoppent pas la production des œstrogènes mais bloquent leur action au niveau des cellules cibles. Ainsi les cellules cancéreuses situées au niveau de la glande mammaire et qui expriment le récepteur ER ne sont pas stimulées. On utilise des composés appelés « anti-œstrogènes ». Il en existe deux types :

-Les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators). Ils présentent une activité agoniste partielle en fonction du tissu et de la concentration. Ces anti-œstrogènes entrent en compétition avec les œstrogènes en se fixant à la place de ces derniers sur leur récepteur ER. Dans le cas du cancer du

sein, le SERM utilisé depuis plus de 30 ans est le tamoxifène. D'autres SERM ont été synthétisés tels que le raloxifène et le torémifène. Le premier est utilisé pour traiter et prévenir l'ostéoporose chez la femme ménopausée. Il n'est pas prescrit dans le traitement des cancers par manque de données. Le second est aussi utilisé chez la femme ménopausée dans le traitement de certains cancers du sein. Le tamoxifène reste donc l'hormonothérapie de choix dans le traitement des cancers hormono-dépendants chez la femme non ménopausée. Il réduit le risque de récurrence d'environ 25 %.

- Les SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation). La molécule commercialisée en France s'appelle le Faslodex (ICI182780 - fulvestrant). Il est un analogue des œstrogènes qui non seulement se fixe sur l'ER mais le dégrade. Il a très peu d'effets secondaires mais son injection par voie intramusculaire limite son utilisation. Il est ainsi prescrit dans le traitement des cancers, souvent métastatiques, pour lesquels les SERM n'ont plus ou peu d'effets (Howell A. 2005). Par ailleurs, son activité est plus élevée en présence de cellules exprimant les deux antigènes : cytokératines CK8 et CK18 (profil de type luminal).

L'hormonothérapie additive utilise également des hormones sexuelles (œstrogènes, androgènes, progestérone) ou des progestatifs. Elle est utilisée dans les cancers métastatiques, après échec des hormonothérapies précédemment citées (anti-œstrogènes ou des inhibiteurs d'aromatase). Leur mode d'action n'est pas clairement défini, mais des études montrent qu'ils diminuent le taux d'ER et d'œstrogènes circulants. Le taux de réponse est d'environ 30% avec une rémission complète chez 5% de ces patientes (Benghiat A., *et al.* 1986). Ces agents présentent cependant des effets secondaires rares mais non négligeables dont une prise de poids importante, une hypertension et des risques thrombo-emboliques.

b. Autres thérapies ciblées

La chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie apportent des résultats positifs dans le traitement des cancers. Il reste cependant des avancées à faire. En effet, ces stratégies thérapeutiques ne sont pas efficaces à 100% et impliquent de nombreux effets secondaires car ils n'agissent pas uniquement sur la tumeur. Dans cette optique, de nouvelles thérapies ciblées sont mises au point. Celles-ci correspondent à des médicaments qui freinent la croissance de la tumeur en agissant spécifiquement sur des mécanismes contrôlant le développement de la tumeur. Pour ce type de thérapie, il est donc important de connaître le profil d'expression de la tumeur.

Certaines d'entre-elles visent à interagir avec la voie de signalisation HER2. Le Trastuzumab commercialisé sous le nom de Herceptin est un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le

récepteur HER2. Cette protéine favorise la croissance des cellules et est surexprimée dans environ un quart des cancers du sein. Ainsi ce traitement bloque le processus de division cellulaire. Un second médicament à été mis sur le marché en 2008 visant aussi la voie HER2, le Lapatinib. Commercialisée sous le nom de Tyverb, il est un inhibiteur de protéines kinases. Celles-ci sont situées du côté cytoplasmique et sont impliquées dans la voie de signalisation de HER2. Ce médicament bloque donc l'activité de ces enzymes ce qui inhibe la voie HER2 et empêche ainsi la prolifération cellulaire. Les effets indésirables du Lapatinib sont mineurs en comparaison de ceux du Trastuzumab qui entraîne une diminution du nombre de neutrophiles dans le sang, une instabilité de la tension artérielle, un rythme cardiaque irrégulier...

Il existe aussi des thérapies ciblant la voie de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Le Cetuximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR. Cette fixation inhibe l'activation de kinases nécessaires à la croissance tumorale. Il est utilisé dans le traitement des cancers de la tête et du cou mais aussi des cancers colorectaux. Il n'existe qu'une seule étude portant sur des patients présentant un cancer du sein métastatique de type basal ou triple négative. Celle-ci a révélée que le traitement avec le Cetuximab utilisé seul ou en association induit un taux de réponse faible et une progression de la maladie rapide (taux de survie d'environ deux mois) (Carey LA., *et al.* 2012).

Une autre thérapie ciblée utilise un anticorps monoclonal se fixant au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor). Les cellules tumorales ont besoin d'un apport important en nutriments et en oxygène pour leur développement. Pour cela, elles ont la capacité d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins grâce à la production de VEGF. Le Bévacicumab (Avastin) a pour but d'empêcher cet effet et de limiter la croissance tumorale (European Medicines Agency. 2012 ; Miller K., *et al.* 2007 ; Robert NJ., *et al.* 2011). Mis sur le marché en 2005, il a montré une augmentation de la survie des patientes sans progression tumorale. Néanmoins, de nombreux effets secondaires sont observés : diminution du nombre de globules, de plaquettes dans le sang, hypertension, diarrhée, nausées, vomissements...

De nouvelles thérapies ciblées sont constamment en cours de développement. Récemment, des résultats encourageants sur les tumeurs métastatiques du sein ont été observés avec un traitement par des inhibiteurs d'une enzyme impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, PARP1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1), utilisés en association avec une chimiothérapie (Eroles P., *et al.* 2012).

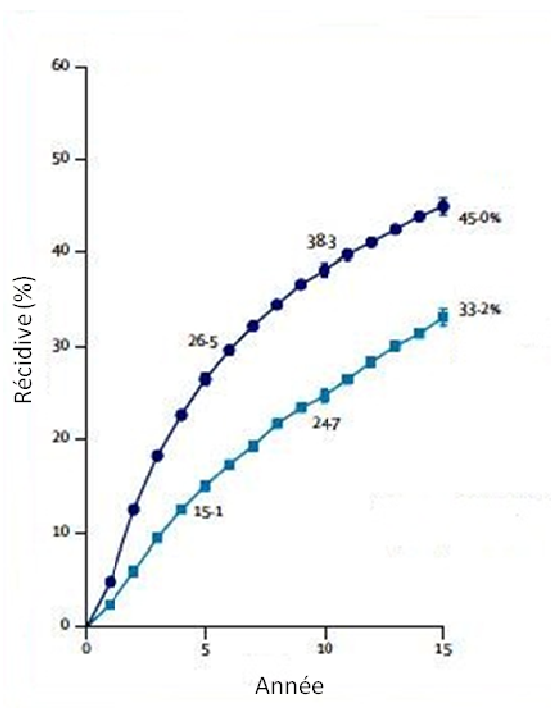


Figure 8 : Taux de récurrence d'un cancer du sein traité par hormonothérapie. Pourcentage de femmes présentant une récurrence de leur cancer après 15 ans pour un traitement de 5 ans à l'hormonothérapie (bleu clair) ou sans hormonothérapie (bleu foncé). D'après Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005.

Malgré des résultats cliniques prometteurs, le développement de thérapies ciblées est à améliorer, les effets secondaires restent importants et les phénomènes de résistances sont nombreux. Ainsi, plus de 33% des femmes touchées par un cancer du sein ER+ et traitées au Tamoxifène pendant 5 ans présentent une récurrence au bout de 15 ans contre 45% des femmes n'ayant pas été traitées (**Figure 8**) (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG. 2005). De même, la majorité des patientes atteintes de cancer du sein métastatique répondant à un traitement au trastuzumab deviennent résistantes 1 an après l'initiation du traitement (Nahta R. & Esteva FJ. 2006). De plus, il n'existe pas de traitements ciblés dirigés contre les tumeurs triples-négatives pour lesquelles les ressources thérapeutiques sont encore très limitées. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules demeure essentielle pour le traitement du cancer du sein.

Partie 2 : Les ligands de PPAR γ

Les ligands des PPARs ont été découverts avant même de connaître leurs récepteurs et leurs mécanismes d'action. Ce sont principalement des acides gras à longue chaîne. Leur mécanisme d'action le plus connu nécessite leur fixation à des récepteurs nucléaires. Ceux-ci ont été nommés PPARs (Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes) pour leur capacité à activer la prolifération des peroxysomes. Les peroxysomes sont de petits organites présents dans toutes les cellules eucaryotes où se produisent des réactions de détoxifications essentielles à la survie de ces cellules. Les PPARs ont une fonction de facteurs de transcription contrôlant la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, le catabolisme et la mise en réserve des lipides. Ces régulations sont donc soumises à l'activation des récepteurs PPARs par leurs ligands, majoritairement des acides gras. En effet, les PPARs sont capables de fixer un grand nombre de ligands avec une affinité relativement faible par rapport à d'autres types de récepteurs hormonaux (Desvergne B. & Wahli W., 1999). Ils sont définis de « senseurs lipidiques » car ils sont capables d'adapter l'expression de leurs gènes cibles en fonction du type et de la concentration du ligand fixé notamment dans le but de réguler l'homéostasie. Certains ligands sont fixés plus spécifiquement par les isotypes alpha (α), beta/delta (β), ou gamma (γ) des récepteurs PPARs.

I. Le récepteur PPAR γ

Le récepteur PPAR γ est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Les récepteurs PPARs furent tout d'abord classés parmi les récepteurs orphelins, c'est-à-dire les récepteurs pour lesquels aucuns ligands endogènes spécifiques n'ont été identifiés. Trois sous-types de PPARs ont été identifiés et nommés PPAR α , β , γ . PPAR α a été découvert en premier chez les rongeurs en 1990 par Issemann & Green (Issemann I. & Green S. 1990). Deux ans plus tard, deux isotypes supplémentaires PPAR β et PPAR γ ont été isolés chez le Xénope (Dreyer C., *et al.* 1992). Lorsqu'il a été identifié chez les mammifères, la séquence de PPAR β n'était pas hautement homologue à celle du Xénope : il a été nommé PPAR δ . Ils possèdent un profil d'expression et des réponses pharmacologiques aux ligands semblables même s'ils ne sont pas clairement homologues. En réalité PPAR δ est l'orthologue de PPAR β ce qui donna une nouvelle nomenclature proposant la dénomination PPAR β/δ . Il a ensuite été établi que chaque isotype PPAR α , β/δ , γ , nommé



Figure 9 : Organisation fonctionnelle du récepteur PPAR γ . Le récepteur nucléaire PPAR γ est constitué de six domaines fonctionnels. Les domaines A/B portent un site de transactivation ligand-indépendant nommé AF-1 (Activating Fonction-1). La fixation du récepteur sur l'ADN est permise grâce à la structure en doigt de zinc du domaine C. Le domaine D est la région charnière. Le second site de transactivation, nommée AF-2 (Activating Fonction-2), se situe au niveau des domaines E/F de la partie COOH terminale du récepteur. Il assure l'activation du récepteur de manière dépendante de la fixation de son ligand.

respectivement NR1C1, NR1C2, NR1C3, sont codés par des gènes distincts et ont une distribution différente au sein de l'organisme.

1. Distribution tissulaire

Le récepteur PPAR α est principalement exprimé au niveau du foie, des reins et du tissu adipeux. Le récepteur β/δ est ubiquitaire. L'isotype γ est principalement exprimé au niveau du tissu adipeux, et plus faiblement dans d'autres tissus tels que le colon, le système immunitaire et les cellules musculaires lisses de l'aorte (Rieusset J., *et al.* 2001). Chez l'Homme, il existe deux isoformes de la protéine PPAR γ : PPAR γ 1 et 2. Ces isoformes résultent de l'utilisation de promoteurs alternatifs conduisant à la transcription de quatre ARN messagers qui seront détaillés par la suite dans la partie organisation génomique du récepteur PPAR γ . Les transcrits hPPAR γ 1, 3 et 4 codent pour la même protéine PPAR γ 1, alors que le transcrit hPPAR γ 2 code pour une protéine plus longue de 28 acides aminés PPAR γ 2 (Bruedigam C., *et al.* 2008). L'isoforme PPAR γ 1 est principalement exprimée dans l'intestin et le tissu adipeux et plus faiblement dans les reins, le foie et l'intestin grêle. L'isoforme PPAR γ 2 est limitée au tissu adipeux et au foie (Nwankwo JO & Robbins MEC., 2001).

2. Organisation fonctionnelle du récepteur PPAR γ

Les récepteurs PPARs comportent six domaines modulaires fonctionnels caractéristiques des récepteurs nucléaires dont les rôles sont bien conservés. Dans la partie N-terminale, les domaines A/B possèdent un rôle dans la transactivation du récepteur de manière indépendante du ligand, alors que les domaines E/F situés en C-terminal sont impliqués dans la transactivation du récepteur de manière dépendante du ligand. Les domaines E/F jouent également un rôle dans la liaison avec le ligand. Le domaine C correspond à la région permettant la fixation du récepteur à l'ADN. Enfin, le domaine D constitue une région charnière provoquant le changement de conformation du récepteur (**Figure 9**).

a. Organisation génomique du récepteur PPAR γ

Des études phylogéniques mettent en évidence que la sous-famille des récepteurs nucléaires dont les PPARs ainsi que d'autres possèdent un gène ancestral datant de plus de 500 millions d'années. Pendant l'évolution, une première duplication du gène a donné l'isotype γ , ce qui explique que celui-

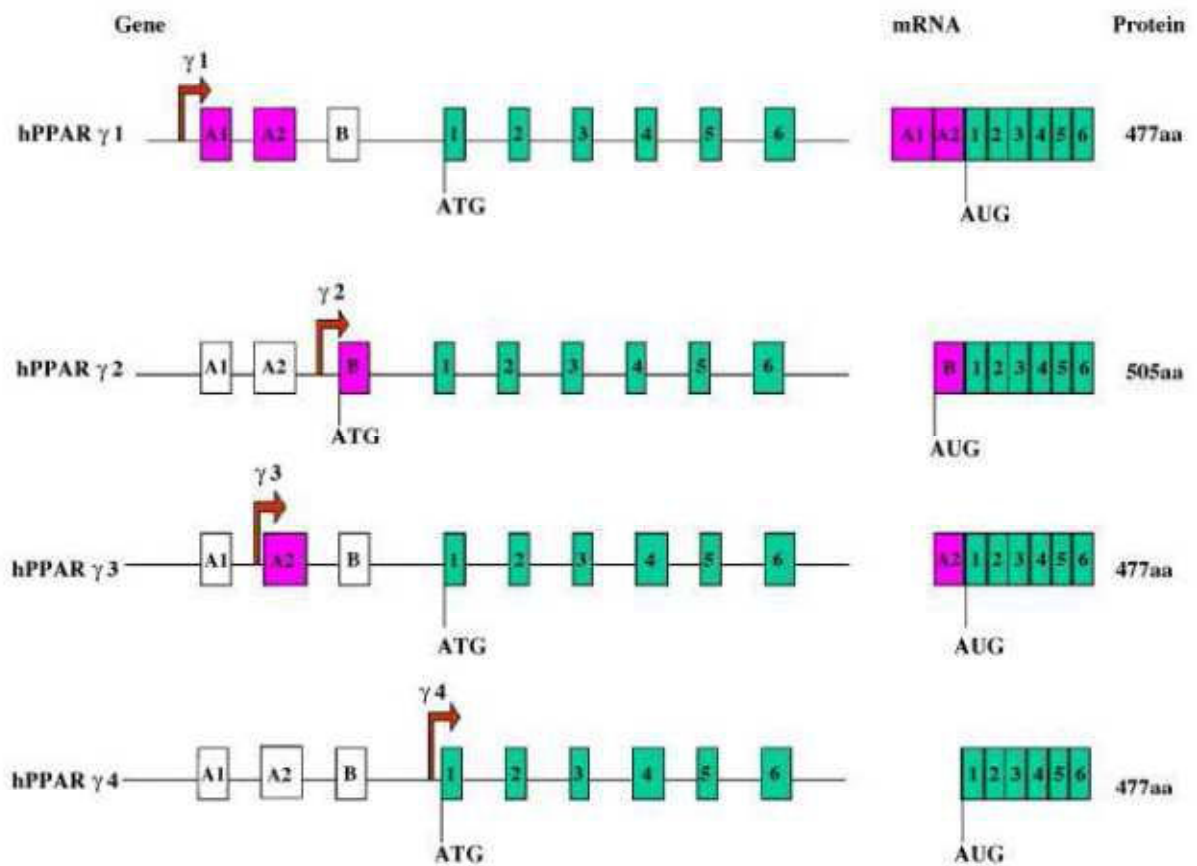


Figure 10 : Organisation du gène PPAR γ et de ces messagers chez l'Homme. Les transcrits du gène PPAR γ sont au nombre de quatre : hPPAR γ 1, hPPAR γ 2, hPPAR γ 3 et hPPAR γ 4 et conduisent à la production de deux isoformes PPAR γ 1 et PPAR γ 2 de 477 et 505 acides aminés respectivement. Le gène codant pour PPAR γ contient les six exons représentés en vert ainsi que trois exons supplémentaires, A1, A2 et B, situés dans la partie 5'. Les quatre transcrits hPPAR γ proviennent de l'utilisation de promoteurs alternatifs γ 1, γ 2, γ 3, γ 4 ce qui conduit à une différence de composition de leur partie 5'. Les exons transcrits dans chaque condition sont représentés en rose. L'exon B est transcrit uniquement avec l'utilisation du promoteur γ 2 car il est habituellement épissé de manière alternative lorsque l'exon A2 est transcrit. La protéine PPAR γ 2 ainsi formée contient 28 acides aminés supplémentaires avec l'apparition d'un autre codon d'initiation. D'après Wang T., *et al.* 2006.

ci est le plus divergent. Une duplication plus tardive a donné les deux isotypes PPAR α et β/δ qui sont relativement plus proche phylogénétiquement (Laudet V. 1997). Le séquençage du génome murin et humain révèle que les trois isotypes de PPARs sont codés par trois gènes répartis sur des chromosomes différents.

Chez l'Homme, les isotypes α , β/δ et γ sont localisés respectivement au niveau des chromosomes 22 (région 22q12-q13.1), 6 (région 6p21.1-p21.2) et 3 (région 3p25) (Sher T., *et al.* 1993 ; Yoshikawa T., *et al.* 1996 ; Greene ME., *et al.* 1995). Les gènes des PPARs sont caractérisés par une organisation commune des ORFs (Open Reading Frame) qui sont composées de six exons codants. Le premier exon code pour les domaines A/B, les deux exons suivants codent pour le domaine C de fixation à l'ADN. Chacun de ces exons code pour un des deux doigts de zinc de ce domaine. La région charnière D du récepteur est codée par le quatrième exon. Les deux derniers exons codent pour les domaines E/F de liaison au ligand (Desvergne B. & Wahli W. 1999).

Alors que les gènes codant pour les isotypes α et β/δ sont relativement courts, le gène codant pour l'isotype γ s'étend sur plus de 100kb : il contient, en plus des six exons, trois exons supplémentaires situés dans la partie 5' : A1, A2 et B (**Figure 10**). Le gène PPAR γ peut être transcrit en 3 ARN messagers nommés hPPAR γ 1, hPPAR γ 2 et hPPAR γ 3. Ils conservent tous en commun les exons 1 à 6 mais ils diffèrent entre eux par la constitution de leur extrémité 5'. Effectivement, ces transcrits proviennent de l'utilisation de promoteurs alternatifs γ 1, γ 2, γ 3. L'utilisation du promoteur γ 1 et γ 3 code pour la même protéine PPAR γ de 477 acides aminés (**Figure 10**). Le premier promoteur se situe en amont des trois exons supplémentaires alors que le second se trouve après l'exon A1. Ainsi, le transcrit hPPAR γ 1 contient les exons A1 et A2 et le transcrit hPPAR γ 3 possède uniquement l'exon A2 puisque l'exon B est épissé alternativement quand l'exon A2 est codé.

Le promoteur γ 2 est localisé après l'exon A2 et conduit à un ARNm contenant l'exon B en plus des six autres exons. L'utilisation de ce promoteur provoque un décalage du cadre de lecture faisant apparaître un autre codon d'initiation avant l'exon B (**Figure 10**). La protéine ainsi synthétisée contient 28 acides aminés supplémentaires et compte 505 acides aminés. Plus récemment, un quatrième promoteur γ 4 a été découvert (Sundvold H. & Lien S. 2001). Il est situé juste avant les six exons codants. La protéine synthétisée est identique à celle codée par hPPAR γ 1 et 3 sans les exons A1, A2 et B (**Figure 10**).

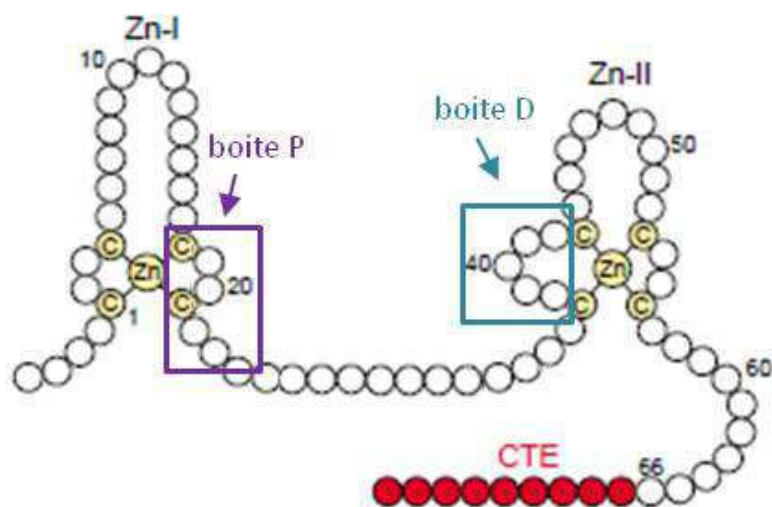


Figure 11 : Structure en doigt de zinc du domaine de liaison à l'ADN. Le domaine C de liaison à l'ADN est composé de deux structures en doigt de zinc. Un atome de zinc est retrouvé au sein de chaque structure. Il est lié à quatre cystéines conservées ce qui stabilise ces structures. Les acides aminés constituant les boîtes conservées P et D sont encadrés. Les acides aminés composant l'extension C-terminale (CTE) sont marqués en rouge. Modifié d'après Khorasanizadeh S. & Rastinejad F. 2001.

b. Structure du récepteur PPAR γ

L'isoforme PPAR γ 1 comporte 477 acides aminés alors que PPAR γ 2 plus longue est constituée de 505 acides aminés. Son organisation modulaire reprend les six domaines fonctionnels caractéristiques de la famille des récepteurs nucléaires.

➤ Les domaines A/B :

Ces domaines sont situés dans la partie N-terminale et contiennent une séquence appelée AF-1 (Activating Fonction-1) impliquée dans la transactivation du récepteur de manière indépendante du ligand (Werman A., *et al.* 1997).

Ces domaines peuvent être phosphorylés ce qui permet de moduler l'activité transcriptionnelle de PPAR γ . Des sites de phosphorylations spécifiques aux MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et aux ERK/JNK (Extracellular signal-Regulated Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase) ont été identifiés (Devergne B. & Wahli W. 1999). Par exemple, la phosphorylation de la sérine 112 de PPAR γ 2 par des MAPK induit un changement de conformation du récepteur ce qui diminue son activité transcriptionnelle (Feige JN., *et al.* 2006 ; Van Beekum O., *et al.* 2009). La phosphorylation de la sérine 82 de PPAR γ 1, correspondant à la sérine 112 de PPAR γ 2, par des MAPK ou par la JNK conduit aussi à la répression de l'activité de PPAR γ (Burns KA. & Vanden Heuvel JP. 2007).

➤ Le domaine C :

Le domaine C est le mieux conservé : il correspond au domaine de liaison à l'ADN ou DBD (DNA Binding Domain) et compte environ 65 acides aminés. Il est composé de deux structures en doigt de zinc. Chacune est stabilisée par un atome de zinc lié à quatre cystéines conservées. Deux boîtes conservées ont été identifiées. La première est une hélice alpha, appelée boîte P, située dans la partie C-terminale du premier doigt de zinc. Sa séquence (CEGCKG) détermine l'affinité du récepteur pour son élément de réponse sur l'ADN. La seconde est également une hélice alpha appelée boîte D. Elle est, quant à elle, impliquée dans la dimérisation des récepteurs. Il a aussi été décrit que le domaine de liaison à l'ADN possède, à l'extrémité C-terminale des doigts de zinc, une extension CTE (C-Terminal Extension) (**Figure 11**). Cette séquence attribue à PPAR une forte affinité pour son élément de réponse puisqu'elle reconnaît spécifiquement son extrémité 5' (Hsu MH., *et al.* 1998).

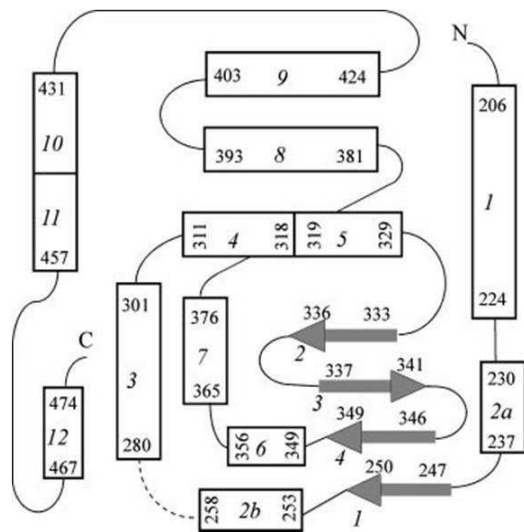
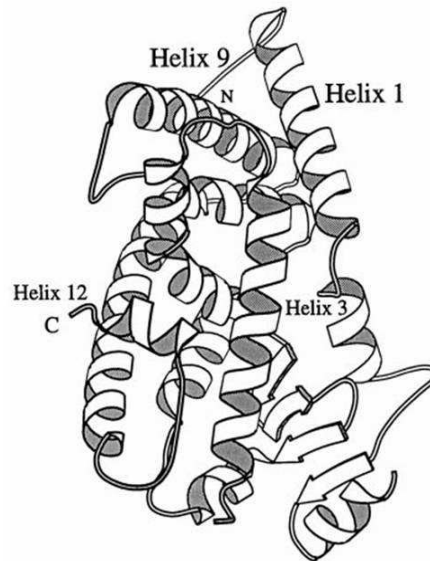
A.**B.**

Figure 12 : Structure du domaine de liaison au ligand. Le domaine E/F correspond au domaine de liaison au ligand qui forme une poche hydrophobe. **A.** En 2 dimension, de la partie N-terminale à la partie C-terminale, cette poche est constituée de 12 hélices α représentée par les cadres, numérotés de 1 à 12, et d'un feuillet beta à quatre brins représenté par les flèches, numérotés de 1 à 4. A l'extrémité de chaque structure est inscrit le numéro des acides aminés qui les délimitent. **B.** En 3 dimension. D'après Uppenberg J., *et al.* 1998.

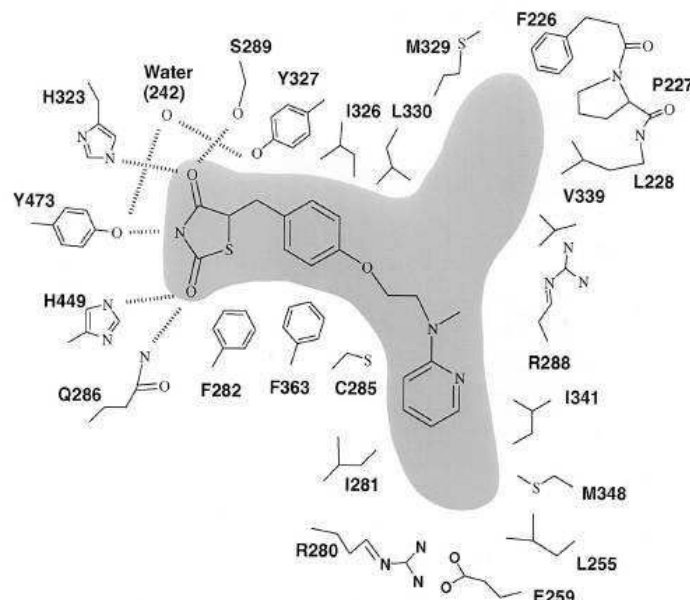


Figure 13 : Représentation schématique de l'interaction de la rosiglitazone dans la poche du LBD de PPAR γ . La partie grisée correspond au site actif du LBD de PPAR γ en forme de Y. L'atome d'azote du cycle thiazolidinedione de la RGZ forme une liaison hydrogène avec le résidu Tyrosine 473 (Y473) de l'hélice 12. D'après Iwata Y., *et al.* 2001.

➤ **Le domaine D :**

Le domaine D est une région charnière conférant une flexibilité au récepteur. Il a été décrit qu'il peut également interagir avec des régulateurs. Une séquence de localisation nucléaire (NLS) est retrouvée à la jonction des domaines D et C et est démasquée lorsque le récepteur est activé. Cette séquence a été identifiée pour le récepteur PPAR α (Iwamoto F., *et al.* 2011). Aucune donnée de la littérature ne décrit la présence de cette séquence NLS pour PPAR γ mais il est fortement probable qu'elle soit également présente.

➤ **Les domaines E/F :**

Les domaines C-terminaux E/F contiennent le domaine de liaison au ligand ou LBD (Ligand Binding Domain). L'analyse de la structure du LBD par cristallographie montre que la structure tertiaire du LBD est composée de 12 hélices alpha organisées en trois couches anti-parallèles et d'un feuillet bêta à quatre brins (**Figure 12**). La cavité est majoritairement de nature hydrophobe. Ceci est en accord avec le type de ligands naturels qui s'y fixent: acides gras polyinsaturés, prostaglandines.

Le rôle de l'hélice H12 est central dans l'activation du récepteur. Elle contient la seconde séquence de transactivation appelée AF-2 (Activating Fonction-2). Cette hélice est douée d'une grande mobilité, lors de la fixation d'un agoniste elle effectue un basculement ce qui conduit comme nous le verrons par la suite au démasquage du site de fixation aux co-activateurs. La fixation de l'agoniste permet sa stabilisation dans une conformation active dans laquelle AF-2 est compactée contre l'hélice H3, H4 et H10/11 (Berger JP., *et al.* 2003 ; Cronet P., *et al.* 2001 ; Gani OABSM. & Sylte I.2008). Une des particularités de la poche de liaison au ligand est sa grande taille, environ 1300 Å³, les ligands occupent seulement 30 à 40% de la cavité (Uppenberg J., *et al.* 1998 ; Michalik L., *et al.* 2006). Ceci explique la grande diversité de ligands pouvant se fixer sur ces récepteurs. Les hélices 3, 7 et 10 confèrent au site actif une structure en forme de Y. De nombreux ligands agonistes totaux, partiels ou antagonistes ont été co-cristallisés avec PPAR γ et leur position dans la poche de liaison au ligand a été modélisée. Le mode de fixation va déterminer leur activité. Les agonistes totaux vont stabiliser l'hélice 12 en interagissant directement avec la Tyr473 (**Figure 13**) (Xu HE., *et al.* 2001 ; Nolte RT., *et al.* 1998 ; Gampe RT., *et al.* 2000 ; Iwata Y., *et al.* 2001), alors que les agonistes partiels vont interagir avec d'autres régions que l'hélice H12, telles que la Gln286 de l'hélice H3 (Oberfield JL., *et al.* 1999 ; Aci-Sèche S., *et al.* 2011). Enfin certains ligands comme le ligand naturel 15d-PGJ2 établissent des liaisons covalentes avec la Cys285 qui semblent importantes dans la fixation du ligand (Waku T., *et al.* 2009).

Ces domaines E/F sont également impliqués dans la dimérisation avec le récepteur RXR (Retinoid X Receptor ou 9-cis retinoic acid receptor) qui se situe à l'interface avec les hélices H10/H11 (Nolte RT., *et al.* 1998).

3. Mécanismes d'action du récepteur PPAR γ

Les récepteurs PPARs s'hétérodimérisent avec l'un des trois sous-types de récepteur RXR (Feige JN., *et al.* 2005). L'hétérodimère RXR-PPAR γ formé peut alors se lier à l'élément de réponse de PPAR appelé PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) situé dans la région 5' des gènes cibles de PPAR. Cet élément de réponse est de type DR1 (Direct Repeat 1). Il s'agit d'une séquence répétée directe de six nucléotides séparée par un nucléotide aléatoire (n) dont la séquence consensus est 5' AGGTCA n AGGTCA 3' (Dreyer C., *et al.* 1992 ; Kliewer SA., *et al.* 1992 ; Tugwood JD., *et al.* 1992). PPAR et RXR se fixent respectivement sur les parties 5' et 3' des demi-sites (Ijpenberg A., *et al.* 1997).

L'activité transcriptionnelle des récepteurs PPARs est réprimée par l'interaction à des co-répresseurs qui se lient généralement au niveau des domaines C- et N-terminaux des récepteurs. Parmi les plus importants citons N-CoR (Nuclear receptor CoRepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor). N-CoR, qui a été initialement cloné comme co-répresseur des récepteurs TR (Thyroid hormone Receptor) et RXR, est capable de se fixer sur les trois isotypes de PPAR (Lim HJ., *et al.* 2004). SMRT est capable d'interagir avec un grand nombre de récepteurs nucléaires dont PPARs. La séquence permettant la liaison des co-répresseurs au récepteur est portée par un motif LXXI/HIXXXI/L (L pour leucine, X pour un acide aminé quelconque, I pour isoleucine et H pour histidine) (Nagy L. & Schwabe JWR. 2004). Ces co-répresseurs agissent en recrutant des facteurs impliqués dans la déacétylation des histones nommées HDAC (Histone DeACetylase), ce qui permet de maintenir la chromatine dans un état condensé. Certains de ces co-répresseurs peuvent également s'associer pour former un complexe de répression. Dès 1997, Nagy et ses collègues ont mis en évidence que SMRT interagit fortement avec Sin3A, un autre répresseur, formant avec l'histone déacétylase HDAC1 un complexe ternaire (Nagy L., *et al.* 1997). Par contre en présence de ligands, une autre classe de co-répresseurs peut agir. Ils contiennent un motif LXXLL qui permet normalement aux co-activateurs de se fixer à PPAR γ . De ce fait, ils agissent par compétition avec les co-activateurs et recrutent à leur tour des HDAC. La protéine RIP140 (receptor interacting protein 140), est l'un de ces co-répresseurs, elle a été décrite pour être capable d'interagir avec les isotypes α et γ (Treuter E., *et al.* 1998).

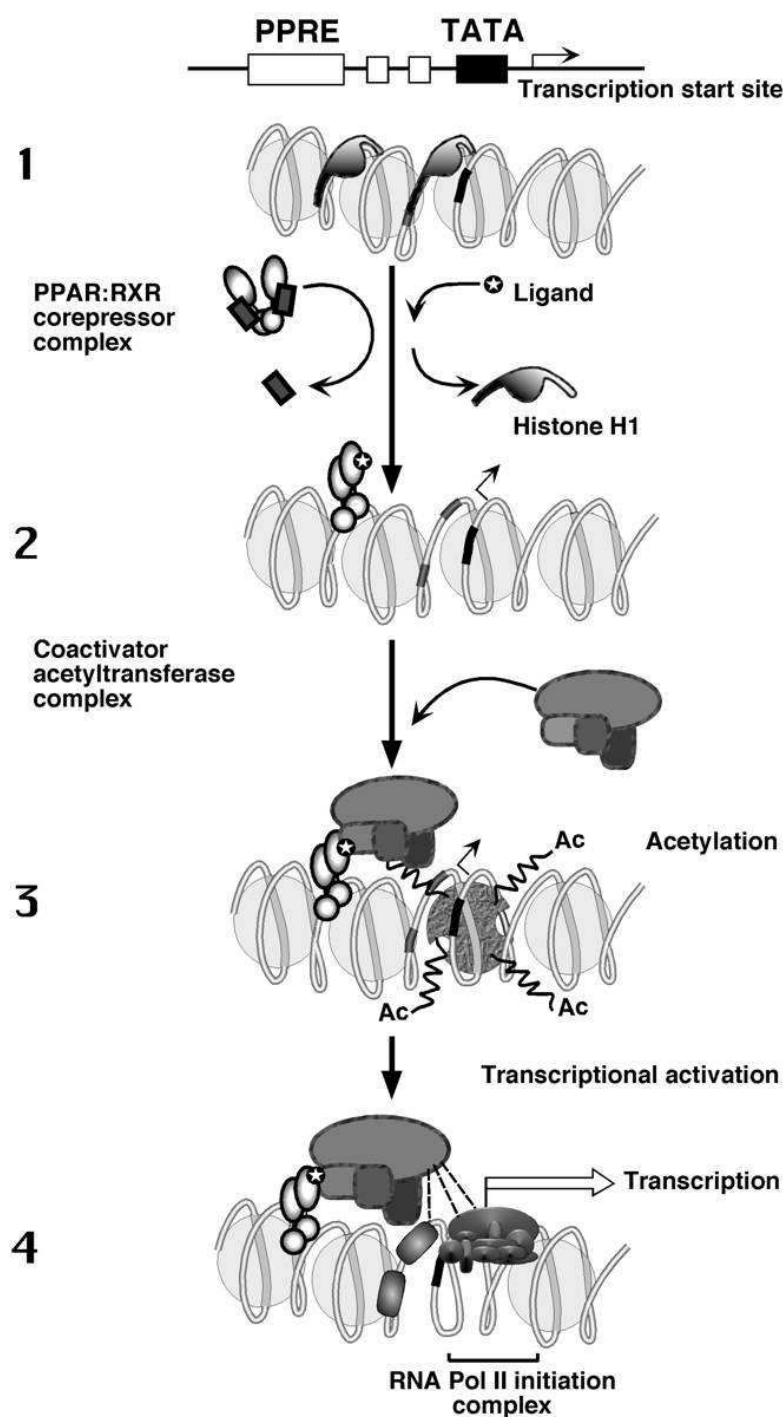


Figure 14 : Mécanisme d'activation transcriptionnelle de PPAR γ . 1. Le complexe PPAR:RXR est activé par la fixation d'un ligand causant la libération des co-répresseurs. 2. L'hétérodimère actif se fixe sur son élément de réponse PPRE, ce qui induit la dissociation des histones H1 de l'ADN. Le complexe co-activateurs/acétyltransférase est recruté au niveau du promoteur suite à la fixation de l'hétérodimère sur le PPRE. 3. Ce complexe réalise l'acétylation (Ac) des histones sur lesquels est enroulée la chromatine ainsi elle possède une conformation appropriée pour la transcription. 4. Le complexe d'initiation de la transcription est alors recruté au niveau du promoteur accessible et la transcription est initiée. D'après Desvergne B. & Wahli W. 1999.

Lorsque les PPARs sont activés, le basculement de l'hélice H12 modifie la conformation tridimensionnelle du domaine de liaison au ligand et démasque un site de fixation pour les co-activateurs. Les co-répresseurs sont libérés et remplacés par des co-activateurs (**Figure 14**).

Les co-activateurs vont permettre un remodelage de la chromatine facilitant l'accès aux différents composants de la machinerie transcriptionnelle (Perissi V. & Rosenfeld MG. 2005). Plus de 100 co-activateurs ont été dénombrés. Ils peuvent être classés principalement en trois groupes. Le premier groupe de co-activateurs comprend des protéines possédant une activité modifiant les histones de manière covalente : acétylation, méthylation, phosphorylation ou ubiquitination. Parmi ce groupe, la première famille à avoir été identifiée est la famille p160 aussi dénommée SRC (Steroid Receptor Co-activator). Elle comprend SRC1, SRC2 (GRIP1/TIF2) et SRC3 (pCIP/TRAM1/RAC3/ACTR). Des analyses structurales montrent qu'ils interagissent *via* une structure hautement conservée LXXLL avec le domaine de liaison au ligand E/F. SRC1 pourrait également interagir avec le domaine A/B (Westin S., *et al.* 1998). Ces co-activateurs ont une faible activité histone acétyl transférase (HAT) et agissent en recrutant d'autres histones acétyl transférase comme le co-activateur CBP/p300. Ils permettent également le recrutement d'histones arginine méthyle transférase comme CARM1 (Coactivator-Associated arginine Methyltransferase 1) et PRMT1 (Protein arginine Methyl Transferase 1) (Xu W., *et al.* 2004). Le deuxième groupe comprend des éléments de l'ensemble SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) qui produisent un remodelage de la chromatine de façon ATP-dépendante. Le troisième groupe comprend les médiateurs : protéines TRAP (Thyroid hormone Receptor Associated Protein) et DRIP (vitamin D Receptor Interacting Protein) qui ne possèdent pas d'activité enzymatique mais favorisent le recrutement de composantes de la machinerie de transcription au niveau du promoteur, dont l'ARN polymérase.

4. Régulation post-traductionnelle des récepteurs PPAR γ

La phosphorylation constitue un mode de régulation post-traductionnelle, positive ou négative, importante. Les phosphorylations décrites pour PPAR γ sont majoritairement réalisées par les ERK et MAPK. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 82 du PPAR γ 1 murin par ces kinases, elles-mêmes activées par la voie du PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), induit une répression de son activité transcriptionnelle. De plus, la substitution de cette sérine induit la perte de cette répression. Chez l'Homme, la phosphorylation de la sérine correspondante, S84, inhibe les fonctions de transactivation dépendante et indépendante du ligand mais sa substitution augmente son activité transcriptionnelle indépendante du ligand (Adams M., *et al.* 1997). L'activité de PPAR γ peut être

régulée par la phosphorylation de la sérine 112 de PPAR γ 2 chez la souris (sérine 114 chez l'Homme). Il a été décrit que cette phosphorylation est réalisée par les MAPK activées par la voie du TGF β . Cette phosphorylation diminue l'activité transcriptionnelle de PPAR γ induite par la liaison de ligands tels que les thiazolidinediones (Shao D., *et al.* 1998). Plus récemment, il a été montré que la phosphorylation de PPAR γ par les ERK induit la dégradation protéasome-dépendante du récepteur PPAR dans des cellules cancéreuses de colon sous l'action de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Chang AJ., *et al.* 2006). Il a également été observé que les MAPK et MEK (MAPK/ERK Kinase) sont capables d'interagir avec PPAR γ et d'induire son exportation nucléaire (Burgermeister E., *et al.* 2007). Ce résultat a également été constaté après une phosphorylation par la Casein-kinase-II-dépendant (Von Knethen A., *et al.* 2010).

D'autres régulations liées à des phosphorylations semblent être induites par les PKA (Protein Kinase A), PKC (Protein Kinase C) et AMPK (AMP activated protein Kinase) (Burns KA. & Vanden Heuvel JP. 2007). Cependant, il a été décrit récemment que l'AMPK inhibe PPAR γ de manière indépendante de son activité kinase. Cette inhibition est liée à la conformation de l'AMPK, les mécanismes précis restent à élucider (Sozio MS., *et al.* 2011).

Il existe des procédés permettant la régulation des PPARs tels que l'ubiquitinylation et la SUMOylation. L'ubiquitine est une petite protéine de 8kDa qui est additionnée aux protéines qui ne sont plus nécessaires à la cellule. L'ubiquitine est ajoutée par une enzyme à activité ubiquitine ligase. Ce phénomène est généralement ligand-dépendant et conduit à la dégradation du récepteur. Ainsi le protéasome reconnaît le récepteur ubiquitinylé et le dégrade rapidement. Pour exemple, la demi-vie du récepteur PPAR γ est de deux heures. Mais s'il est activé par un ligand, il joue son rôle dans la transcription puis il est directement ubiquitinylé provoquant sa dégradation (Floyd ZE. & Stephens JM. 2002 ; Hauser S., *et al.* 2000). p300 est un régulateur connu possédant cette activité ubiquitine ligase. Contrairement à l'ubiquitination, la SUMOylation permet de réguler l'activité transcriptionnelle du récepteur sans le dégrader. Il s'agit de l'addition de protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur le récepteur. Cet ajout se fait au niveau de sites consensus contenant des résidus lysines 77 et 365 pour PPAR (Pascual G., *et al.* 2005). La SUMOylation régule différents mécanismes comme la stabilité des protéines, la translocation nucléaire et la transcription (Seeler JS. & Dejean A. 2003). Dans le cas de PPAR, ce phénomène affecte la stabilité et l'activité transcriptionnelle du récepteur mais pas sa localisation nucléaire. La SUMOylation de PPAR γ permet d'induire son interaction avec des co-répresseurs tels que NCoR/HDAC et ainsi de réprimer son activité transcriptionnelle (Pascual G., *et al.* 2005).

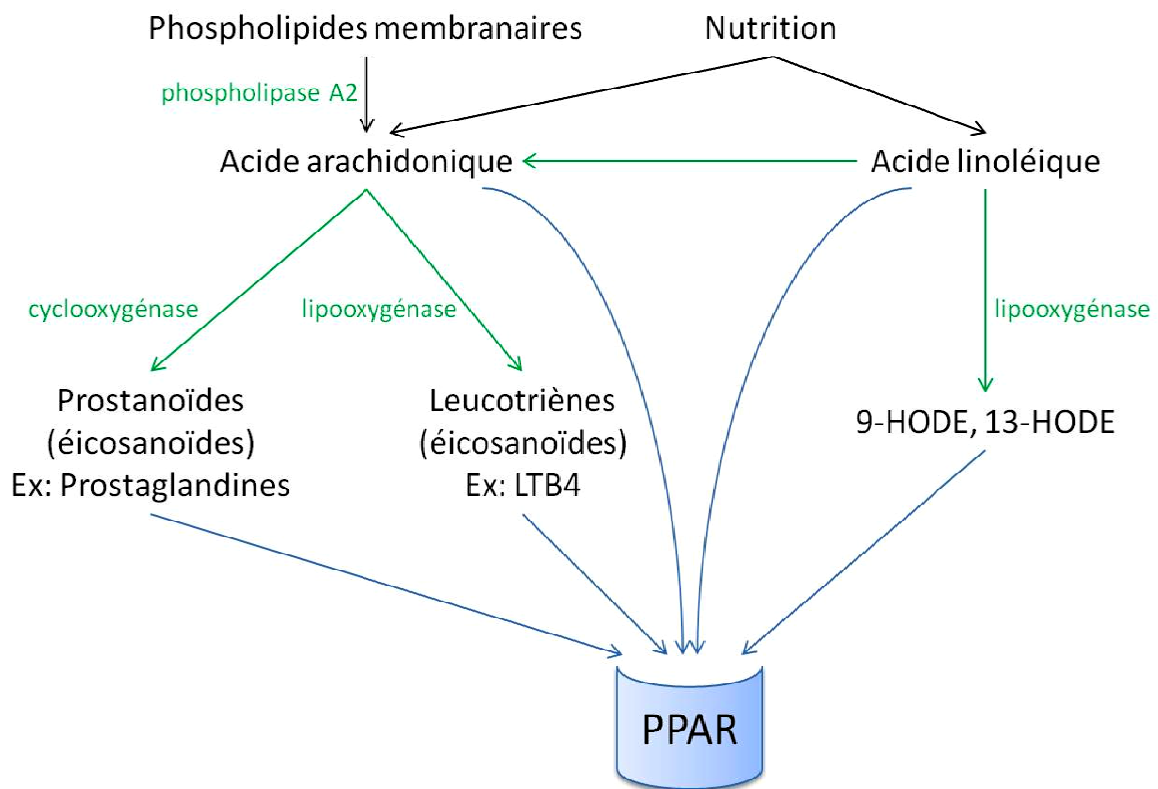


Figure 15 : Ligands naturels de PPAR. Les acides linoléiques sont fournis par la nutrition alors que les acides arachidoniques sont également libérés des phospholipides membranaires par une enzyme, la phospholipase A2. Ces deux acides gras sont des ligands de PPAR ainsi qu'un certain nombre de leurs métabolites. L'acide arachidonique est métabolisé par deux enzymes : la cyclooxygénase et la lipooxygénase qui produisent les prostanoïdes et les leucotriènes respectivement. Les prostanoïdes tels que les prostaglandines et les leucotriènes tels que LTB4 (Leucotiène B4) sont des ligands des PPARs. Les acides hydroxyoctadécadiénoïque comme le 9-HODE et 13-HODE sont des métabolites de l'acide linoléique suite à l'action d'une lipooxygénase et activent également PPAR.

II. Les ligands de PPAR γ

Une large gamme de ligands se fixant à PPAR γ est décrite : les ligands naturels et les ligands de synthèse dont les thiazolidinediones (TZD).

1. Les ligands naturels

De nombreux acides gras à chaîne longue, plus particulièrement ceux étant polyinsaturés, sont capables de lier les récepteurs PPARs, tels que les acides arachidoniques et linoléiques. Göttlicher M. *et al.* ont mesuré la capacité de plusieurs composés naturels à activer un récepteur chimérique de PPAR. Cette étude a montré qu'à une dose de 150 μ M, l'acide arachidonique et l'acide linoléique sont capables d'activer ce récepteur alors que le cholestérol ne le peut pas (Göttlicher M., *et al.* 1992).

L'acide arachidonique est un acide gras généralement incorporé dans la membrane cellulaire sous forme de phospholipides et est libéré de la membrane par l'enzyme Phospholipase A2. L'acide arachidonique peut être dégradé par deux voies enzymatiques : la voie des cyclooxygénases et la voie des lipooxygénases menant à la formation d'écosanoïdes de deux types : les prostanoïdes et les leucotriènes (LT) respectivement. L'ensemble de ces dérivés sont des activateurs des PPARs (**Figure 15**). Parmi les prostanoïdes, les prostaglandines des séries A, D, J sont des ligands puissants des différents isotypes du récepteur PPAR lorsqu'elles sont utilisées à forte concentration. Certains de ces ligands sont spécifiques : par exemple la 15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 (15d-PGJ2) est un activateur spécifique de l'isotype gamma de PPAR. L'affinité de ces ligands est relativement basse avec un Kd situé entre 325 nM et 2,5 μ M (Forman BM., *et al.* 1995 ; Kliewer SA., *et al.* 1995).

L'acide linoléique provient également de la nutrition et il est métabolisé par la voie des lipooxygénases. Il conduit à la formation des dérivés 9(S)- et 13(S)-acide hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE et 13-HODE) qui sont des activateurs endogènes des PPARs. Une dose de 20 μ M de 9-HODE et 13-HODE induisent respectivement une augmentation de l'activation de PPAR γ de 12 et 7,5 fois (Nagy L., *et al.* 1998). Ces dérivés correspondent à des LDL (Low Density Lipoprotein) oxydés jouant un rôle dans le développement d'athérosclérose.

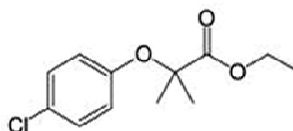
2. Les ligands synthétiques de PPAR γ

Il existe plusieurs catégories de ligands synthétiques activant le récepteur PPAR γ dont les plus connus sont les thiazolidinediones.

A.

Ligand synthétique de la famille des fibrates

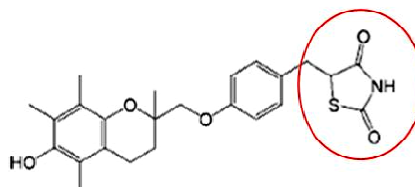
➤ Clofibrate



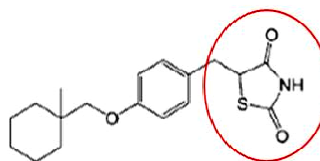
B.

Ligands synthétiques de la famille des thiazolidinediones (TZD)

➤ Troglitazone



➤ Ciglitazone



➤ Rosiglitazone

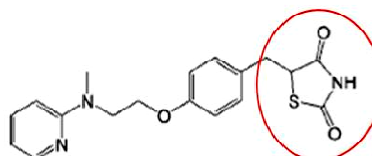


Figure 16 : Structure des ligands synthétiques de PPAR γ . A. Structure d'un ligand de synthèse appartenant à la famille des fibrates, le clofibrate. Il constitue la base structurale des molécules de type thiazolidinedione (TZD). B. Structure de trois thiazolidinediones les plus connues dont la première synthétisée, la ciglitazone. Les structures des TZD sont très similaires en particulier au niveau de la partie NH₂ des molécules. En effet, ces molécules possèdent en commun un cycle « thiazolidinedione » (cercle rouge) comprenant cinq liaisons avec un atome de soufre et un atome d'azote substitué par deux cétones.

a. Les ligands synthétiques appartenant à la famille des thiazolidinediones (TZD)

Les thiazolidinediones ont été synthétisées sur la base structurale des fibrates qui sont également des ligands des PPARs, plus particulièrement de PPAR α . Les premiers fibrates ont été synthétisés dans le milieu des années 50 par une équipe française alors que leur mécanisme d'action n'était alors pas connu. Les chercheurs observent alors un effet hypolipémiant de leurs composés chez les rats et l'Homme (Mathivat A. & Cottet J. 1953). D'autres fibrates dérivés ont été synthétisés dans les années qui suivirent afin de développer un médicament permettant de diminuer le taux sanguin de cholestérol. Découvert par Thorp et Waring, le premier fibrate à avoir été approuvé à la distribution dans le traitement de l'hyperlipidémie est le clofibrate (Thorp JM. & Waring WS. 1962) (**Figure 16A**). Plusieurs études cliniques ont été réalisées montrant une diminution du taux de lipides chez des patients hyperglycémiques traités par le clofibrate (Lalloyer F. & Steals B. 2010). Dans les années 80, des chercheurs japonais ont synthétisé de nombreux analogues du clofibrate afin d'obtenir d'autres composés possédant potentiellement une activité hypolipémiante. De manière surprenante, ces analogues ont aussi montré une activité hypoglycémiant chez des souris diabétiques. Le clofibrate a donné naissance à une nouvelle classe de composés : les thiazolidinediones.

En 1982, les industries chimiques Takeda ont développé la première molécule de type thiazolidinedione, la **ciglitazone** (CGZ) (Sohda T., *et al.* 1982) (**Figure 16B**). Elle montre une activité antidiabétique tout en réduisant la résistance à l'insuline chez plusieurs modèles d'animaux obèses ou diabétiques (Fujita T., *et al.* 1983). En effet, une administration de CGZ par nourriture induit une diminution de la glycémie, de l'insuline et du taux de triglycérides dans le sang accompagnée d'une réduction de la résistance à l'insuline chez des souris yellow obèse-diabétiques (30-186 mg/kg/jour de CGZ). Elle induit aussi une augmentation de la tolérance au glucose accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à la prise orale de glucose chez des rats obèses Zucker fatty (5-100 mg/kg/jour de CGZ). L'effet d'un traitement à la CGZ exerce également un effet antidiabétique chez de jeunes animaux. Par exemple, l'administration chronique de CGZ pendant 12 semaines empêche l'augmentation âge-dépendante du taux de glucose et de triglycérides dans le sang sans effet sur l'obésité chez de jeunes souris yellow présentant un stade précoce de diabète et d'obésité. Devant l'efficacité de ce nouveau composé, d'autres chercheurs ont développé une deuxième molécule de type thiazolidinedione, la **troglitazone** (TGZ) (**Figure 16B**). Synthétisée en 1988, sa structure conserve le cycle thiazolidinedione de la CGZ ce qui permet de conserver son activité insulino-sensibilisante. A cela est ajouté un groupement chromane provenant de l' α -tocophérol qui confère à la molécule une activité anti-oxydante des LDL souvent élevée chez les personnes atteintes de diabète (Tack CJ., *et al.* 1998). La TGZ est la première thiazolidinedione approuvée pour l'utilisation clinique aux Etats-Unis. De nombreuses thiazolidinediones ont été

développées dans les années suivantes telles que la **pioglitazone** (PGZ) (Takeda) (Ikeda H., *et al.* 1990), l'**englitazone** (Pfizer) (Stevenson RW., *et al.* 1990), la **darglitazone** (Pfizer) (Zhang B., *et al.* 1994), la **rosiglitazone** (RGZ) (SmithKline-Beecham) (Cantello BC., *et al.* 1994), l'**isaglitazone** (MCC-555, Mitsubishi) (Liu LS., *et al.* 1998) (**Figure 16B**). La TGZ, la PGZ et la RGZ ont été utilisées avec succès pour le traitement de certains diabètes de type 2. Malgré leur efficacité dans le traitement du diabète, la plupart des thiazolidinediones ont été progressivement retirées du marché. L'utilisation clinique de la TGZ a été arrêtée en raison de sa toxicité hépatique sévère. Les causes de cette toxicité sont multifactorielles, et seront détaillées dans la partie 3 structure-toxicité.

De plus, les TZD (RGZ, PGZ) causent un gain de poids à travers l'augmentation de l'adipogénèse et la rétention d'eau. Ces effets secondaires induisent un accroissement du risque d'insuffisance cardiaque congestive. La RGZ, mais pas la PGZ, augmente également les risques d'infarctus du myocarde. Finalement, les TZD augmentent la mortalité en les comparants aux autres hypoglycémisants oraux (Lipscombe LL., *et al.* 2007). Les modulateurs sélectifs des PPAR (SPPARMs) représentent l'espoir thérapeutique en générant une hypoglycémie mais ne générant pas de gain de poids.

b. Les agonistes duaux

Deux types d'agonistes ont été développés afin d'obtenir des molécules pharmaceutiques agissant par les isotypes α ou δ en plus d'activer PPAR γ . Les agonistes duaux α/γ sont nommés glitazar et combinent l'effet insuliniémiant de PPAR γ et hypolipidémiant de PPAR α . Muraglitazar, tesaglitazar, ragaglitazar, TAK 559, JTT 501, KRP-297 sont des exemples d'agonistes dual PPAR α/γ (Shearer BG. & Billin AN. 2007). Des agonistes duaux γ/δ alliant l'action commune de ces deux isotypes sur le diabète sont également synthétisés (Gonzales IC., *et al.* 2007).

c. Les pan-agonistes

Un pan-agoniste est capable d'activer les 3 isotypes α , β et γ des récepteurs PPARs. Ils sont actuellement en essais pré-cliniques sur des rongeurs dans le traitement du diabète de type II. Ce sont par exemple : GW677954 et LY465608 (Shearer BG. & Billin AN. 2007).

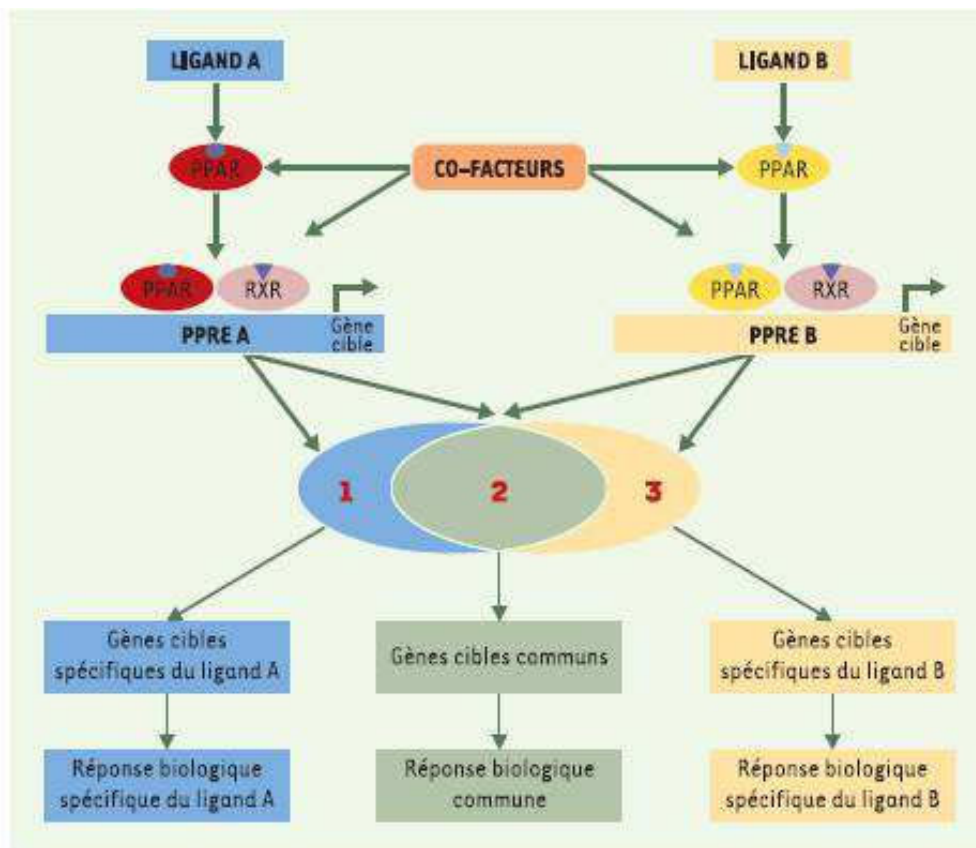


Figure 17 : Mécanisme transcriptionnel différentiel de PPAR γ activé par les SPPARMs (selective PPAR modulator). Des ligands différents, A et B, possèdent une affinité différente pour le domaine de liaison au ligand de PPAR γ ce qui peut entraîner une conformation tridimensionnelle différente du complexe PPAR-ligand. Ce phénomène peut alors résulter en une interaction différentielle de co-facteurs lors de son hétérodimérisation avec le récepteur nucléaire RXR (Retinoid X Receptor ou 9-cis retinoic acid receptor). Ceci va conditionner sa fixation sur différents éléments de réponse PPRE A ou B (Peroxisome Proliferator Response Elements) en fonction du type de ligand fixé sur PPAR. Ainsi, le récepteur PPAR γ induit une transcription de gènes cibles communs mais également d'un ensemble de gènes cibles spécifiques de chaque ligand. D'après Duran-Sandoval D., *et al.* 2003.

d. Les SPPARM γ (Modulateurs Sélectifs de PPAR γ)

Il a été décrit que chaque TZD possède une affinité différente pour le domaine de liaison au ligand de PPAR γ induisant une conformation tridimensionnelle spécifique du complexe récepteur/ligand. Il en résulte une interaction différentielle avec les co-facteurs ce qui se traduit par la transcription d'un ensemble de gènes cibles spécifiques du ligand en plus des gènes communément régulés (**Figure 17**). Le but de la synthèse de SPPARM est de développer des molécules qui conserveraient l'efficacité sur le métabolisme du glucose des TZD mais qui ne présenteraient pas leurs effets secondaires (Higgins LS. & Depaoli AM. 2010). Pour exemple, Le S26948 augmente la sensibilité à l'insuline mais, contrairement aux TZD classiques, il ne déclenche pas l'adipogénèse ce qui n'aboutit pas à la prise de poids habituellement observée avec des molécules de type TZD (Carmona MC., *et al.* 2007).

e. Les composés anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les composés anti-inflammatoires non stéroïdiens ont été identifiés comme des activateurs de PPAR γ . Parmi eux, l'indométhacine, utilisée pour la recherche sur la différenciation adipocytaire, active PPAR γ . Il en est de même pour d'autres AINS comme l'ibuprofène et le fénoprofène. Les AINS activent PPAR γ à des concentrations de l'ordre du μ M (Lehmann JM., *et al.* 1997).

f. Les dérivés des triterpénoïdes

Les triterpénoïdes appartiennent à une famille de molécules synthétisées par les plantes qui sont traditionnellement utilisées en médecine asiatique. En effet, certains triterpénoïdes tels que les acides oléanolique et ursolique sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires et anti-carcinogéniques. Des dérivés synthétiques de ces triterpénoïdes ont été synthétisés : le plus efficace est le CDDO (acide 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oïque acid), dérivé de l'acide oléanolique. Ce dérivé, capable d'activer le récepteur PPAR γ , montre une activité anti-proliférative, anti-inflammatoire et induit la différenciation cellulaire (Suh N., *et al.* 1999).

g. Les antagonistes de PPAR γ

Utilisés en premier lieu pour inhiber la différenciation adipocytaire, les antagonistes de PPAR γ les plus utilisés sont le GW9662, le T0070907 et le BADGE (Bisphénol A diglycidyl ether). Le GW9662 est

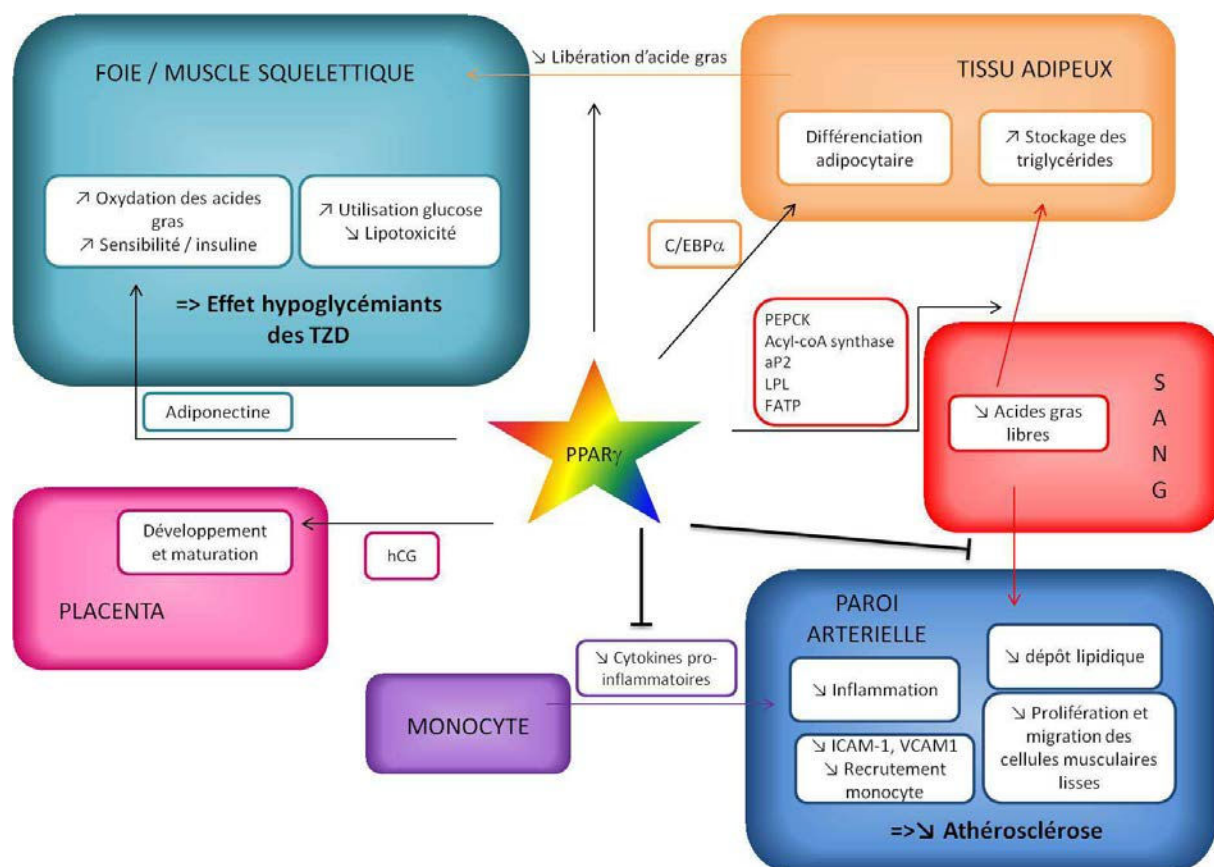


Figure 18 : Effets physiologiques de PPAR γ . Plusieurs rôles physiologiques sont attribués à PPAR γ . Il intervient dans le métabolisme lipidique et glucidique en augmentant le stockage des lipides sanguins sous forme de triglycérides par le tissu adipeux. Ceci est également favorisé par l'augmentation du nombre d'adipocytes grâce à leur différenciation. PPAR γ diminue la libération d'acides gras par le tissu adipeux et favorise l'utilisation du glucose par les muscles squelettiques et le foie ce qui diminue la lipotoxicité due à ces acides gras. La réduction du taux de lipides sanguins diminue leur accumulation dans les vaisseaux sanguins qui est un des facteurs de l'athérosclérose. De plus, PPAR γ inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et l'adhésion de ceux-ci au niveau des vaisseaux.

le plus puissant de ces antagonistes et se fixe par liaison covalente sur le résidu Cys285 du domaine LBD de PPAR γ (Leesnitzer LM., *et al.* 2002). L'antagoniste T0070907 se fixe par liaison covalente au résidu Cys313 de PPAR γ (Lee G., *et al.* 2002). BADGE est l'antagoniste ayant le moins d'affinité pour PPAR γ (Wright HM., *et al.* 2000).

III. Effets physiologiques du récepteur PPAR γ

De nombreux rôles physiologiques de PPAR γ ont été mis en évidence grâce à l'étude de l'effet de ses ligands. Des rôles dans le métabolisme lipidique, l'athérosclérose et l'inflammation, la maturation du placenta sont décrits dans la littérature à ce jour.

1. Métabolisme lipidique et glucidique

Nous avons vu dans la partie 2.1 que PPAR γ est fortement exprimé dans le tissu adipeux. Ce tissu est composé d'adipocytes qui gèrent la balance énergétique de l'organisme : ils mettent en réserve les lipides sous forme de triglycérides ou libèrent ceux-ci sous forme d'acides gras en fonction du besoin énergétique. De manière générale l'action de PPAR γ promeut le stockage des lipides au sein des adipocytes.

PPAR γ intervient dans le processus de différenciation adipocytaire précoce. Ainsi la surexpression de PPAR γ induit la différenciation de fibroblastes en adipocytes (**Figure 18**). De plus, il contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'adipogenèse comme le facteur de transcription C/EBP α (Tontonoz P., *et al.* 1994). L'étude de souris knock-out déléetées pour PPAR γ a permis de confirmer son rôle dans la différenciation adipocytaire. Une première étude montra que l'inactivation de PPAR γ était létale *in utero* par un défaut du placenta et les foetus décédés ne contenaient pas de tissu adipeux (Barak Y., *et al.* 1999). L'inactivation de PPAR γ chez la souris a pu être obtenue par agrégation des cellules ES PPAR γ -/- avec des cellules tétraploïdes pour permettre la formation du placenta. Le phénotype obtenu montre aussi une absence de tissu adipeux (Rosen ED., *et al.* 1999). Enfin l'élaboration de souris transgéniques PPAR γ -/- ciblant spécifiquement et de manière inducible le tissu adipeux confirme ces résultats. En effet, les adipocytes déplétés pour PPAR γ meurent et sont remplacés par de nouveaux adipocytes exprimant PPAR γ (Metzger D., *et al.* 2005).

De plus, PPAR γ favorise la capture des acides gras sanguins et leur stockage dans les adipocytes sous forme de triglycérides (**Figure 18**) (Schoonjans K., *et al.* 1996 ; Glorian M., *et al.* 2001). Les gènes cibles induits sont impliqués dans la mise en réserve des lipides et leur métabolisme comme la

phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) qui intervient dans la néoglucogenèse, l'acyl-CoA synthase qui joue un rôle dans la première étape de la β -oxydation des acides gras, la protéine de liaison des acides gras (aP2), la lipoprotéine lipase (LPL) qui permet l'hydrolyse des lipoprotéines au niveau des cellules endothéliales et la FATP (Fatty Acid Transport Protein) qui permet le transport des acides gras (Semple RK., *et al.* 2006 ; Cariou B., *et al.* 2012).

PPAR γ est également impliqué dans le contrôle de la glycémie. Les ligands de PPAR γ , notamment les thiazolidinediones, présentent des effets hypoglycémiants et insulinémiants. Ils exercent leurs effets antidiabétiques par une action au niveau des organes cibles de l'insuline: les muscles squelettiques, le foie et le tissu adipeux. La stimulation de PPAR γ entraîne une augmentation du transporteur de glucose GLUT 4 (GLucose Transporter 4) (Ciaraldi T. & Henry RR. 1997, Liao W., *et al.* 2007). Il induit la formation de nouveaux adipocytes plus petits et plus sensibles à l'insuline (**Figure 18**) (Spiegelman BM. 1998). De plus, l'activation de PPAR γ favorise le flux de triglycérides libres vers le tissu adipeux, ils réservent l'utilisation du glucose par le cerveau, le foie et les muscles. Ils diminuent ainsi la libération d'acides gras par les adipocytes ce qui baisse la lipotoxicité pour les muscles et le foie (Chao L., *et al.* 2000). Ceci conduit à une diminution de la production de glucose hépatique, une augmentation de l'utilisation du glucose par les muscles et le foie et aux effets hypoglycémiants des TZD. Enfin, PPAR γ augmente aussi la concentration en adiponectine dans le sang, une hormone essentielle dans l'effet insulinémiant des TZD (Yamauchi T., *et al.* 2003). Les souris KO adiponectine -/- ne répondent pas aux effets antidiabétiques des TZD (Nawrocki AR., *et al.* 2006). En fait, l'adiponectine augmente l'oxydation des acides gras dans le foie et les muscles et améliore donc la sensibilité à l'insuline dans les organes.

2. Inflammation et Athérosclérose

L'athérosclérose se caractérise par un dépôt de lipides à l'intérieur des artères, de fibres musculaires lisses et de cellules inflammatoires, ce qui va entraîner la lésion des parois artérielles. La production de cytokines pro-inflammatoires par l'infiltration de monocytes différenciés en macrophages déclenche une inflammation chronique. Des cellules musculaires migrent à travers la paroi artérielle et prolifèrent au niveau du dépôt favorisant la formation de caillots sanguins. Les TZD présentent un intérêt dans le traitement de l'athérosclérose puisque PPAR γ régulent le taux de lipides circulants. De plus, PPAR γ possède une activité anti-inflammatoire. Dans les monocytes humains, les ligands de PPAR γ bloquent la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL1 et l'IL6 (Il pour « Interleukine ») (**Figure 18**) (Jiang C., *et al.* 1998). *In vivo*, des patients atteints de diabète et traités à la RGZ présentent une diminution de marqueurs de l'inflammation (Haffner SM., *et al.* 2002).

D'autres preuves du bénéfice des TZD dans le traitement de l'athérosclérose ont été avancées telle que l'inhibition de l'adhésion des monocytes sur la paroi de l'endothélium due à une diminution de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) (**Figure 18**) (Duan SZ., *et al.* 2008). La TGZ et le ligand naturel 15d-PGJ2 inhibent également la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (Marx N., *et al.* 1998).

3. Reproduction

PPAR γ a un rôle important dans l'implantation de l'embryon, le développement et le fonctionnement placentaire (Barak Y., *et al.* 1999). PPAR γ est fortement exprimé dans le trophoctoderme et la masse cellulaire interne du blastocyste (Mohan M., *et al.* 2002). L'inactivation de PPAR γ induit un défaut de vascularisation du placenta ce qui conduit à la mort de l'embryon pendant la gestation. Chez la femme, PPAR γ est aussi exprimé dans le tissu placentaire (trophoblaste). Son activation stimule l'expression et la sécrétion d'hormones nécessaires à la grossesse et au développement du fœtus telles que l'hCG (human Chorionic Gonadotropin) et les hormones syncytiotrophoblastiques (hormones lactogènes, hormone de croissance placentaire, leptine) (Tarrade A., *et al.* 2001). L'ensemble de ces résultats montre que PPAR γ est essentiel pour la maturation d'un placenta fonctionnel.

La mise en évidence du rôle de PPAR γ dans la différenciation adipocytaire a permis d'envisager une autre application thérapeutique des TZD : le traitement des cancers. En effet, il est prometteur d'induire la différenciation des cellules cancéreuses connues pour présenter un phénotype indifférencié.

4. Effets anti-cancéreux des TZD

a. Etudes pré-cliniques

L'effet anti-cancéreux des thiazolidinediones a été démontré *in vitro* sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses. Ils sont capables de cibler différents processus impliqués dans la cancérogenèse comme la différenciation, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration et l'angiogenèse (Blanquicett C., *et al.* 2008).

➤ Effet sur la différenciation

Plusieurs études *in vitro* ont montré que les ligands de PPAR γ induisent la différenciation des cellules cancéreuses. La différenciation de cellules de liposarcomes et de cancers du sein, révélée par l'observation d'une accumulation de lipides colorés au rouge huileux, est induite après un traitement avec 10 μ M de PGZ ou de TGZ (Tontonoz P., *et al.* 1997 ; Mueller E., *et al.* 1998). Cette induction de la différenciation est associée à un arrêt de la prolifération cellulaire et à une modification du profil d'expression. Dans les liposarcomes, les gènes de la différenciation adipocytaire comme aP2 sont induits (Tontonoz P., *et al.* 1997). Dans le cancer du sein, les gènes contrôlant la malignité de la tumeur, comme la kératine 19, sont réprimés (Mueller E., *et al.* 1998).

➤ Effet sur la prolifération cellulaire et l'apoptose

Les ligands de PPAR γ inhibent également la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, la 15d-PGJ2 et la TGZ inhibent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 en corrélation avec la diminution du nombre de cellules en phase S (Clay CE., *et al.* 1999). Dans différentes lignées cancéreuses ovariennes, la TGZ et la CGZ diminuent l'incorporation de BrdU (Al-Alem L., *et al.* 2011). Plusieurs études ont montré que la diminution de la prolifération induite par les ligands de PPAR γ est associée à un arrêt du cycle cellulaire. En effet, la TGZ inhibe la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et bloque les cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Yin F., *et al.* 2001). Il en est de même dans les cellules de carcinomes mammaires MDA-MB-231 (Yu HN., *et al.* 2008), rénaux (Yang FG., *et al.* 2005), pancréatiques (Motomura W., *et al.* 2000), ovariens (Al-Alem L., *et al.* 2011) et des lignées leucémiques (Sugimura A., *et al.* 1999). Le blocage du cycle cellulaire s'accompagne de la dégradation de la protéine cycline D1 et de la phosphorylation de la protéine Rb (Retinoblastoma), toutes deux impliquées dans la transition G1/S et l'induction des inhibiteurs de cdk p21 et p27 (Yu HN., *et al.* 2008, Yang FG., *et al.* 2005). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, la surexpression de la cycline D1 inverse partiellement l'effet inhibiteur de la TGZ et les cellules entrent en phase S du cycle cellulaire (Yin F., *et al.* 2001). Dans les carcinomes pancréatiques, p27 est une protéine clé dans l'inhibition de prolifération cellulaire induite par la TGZ puisque cet effet est bloqué par un oligonucléotide antisens p27 (Motomura W., *et al.* 2004). De même, dans des cellules de carcinomes pulmonaires, un oligonucléotide antisens p21 bloque l'inhibition de croissance cellulaire induite par la 15d-PGJ2 et la CGZ (Han S., *et al.* 2004). Une étude récente montre que l'inactivation de la voie NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) *via* la suppression de l'expression de GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 de type β) induite par la TGZ est impliquée

dans l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses de prostate PC3 et LNCaP (Ban JO., *et al.* 2011). L'efatutazone, ou CS-7017, est une TZD de troisième génération : elle est un agoniste fortement sélectif de l'isotype PPAR γ qui possède des effets inhibiteurs de la prolifération à faibles doses. En effet, en étude pré-clinique l'efatutazone a montré une efficacité remarquable sur des cellules cancéreuses thyroïdiennes DRO. Son EC50 a été calculée à environ 0,8nM alors que celle de la RGZ et TGZ sont de 75nM et 1,4 μ M respectivement (Copland JA., *et al.* 2006). De plus, l'efatutazone inhibe la croissance tumorale des cellules de cancer anaplasique de la thyroïde et de cancer colorectal dans les souris nude xénogreffées (Copland JA., *et al.* 2006 ; Shimazaki N., *et al.* 2008).

La diminution de la prolifération induite par les TZD ne semble pas uniquement corrélée à un arrêt du cycle cellulaire puisque des études montrent une place importante de la mort cellulaire dans ce processus. Dans les cellules cancéreuses de poumon, la diminution de la prolifération est corrélée à un arrêt du cycle cellulaire mais également à une induction de l'apoptose. Après 72 heures de traitement, la CGZ induit une fragmentation de l'ADN (Han S., *et al.* 2004). De même, dans des cellules de carcinomes mammaires, la TGZ augmente le nombre de cellules marquées à l'annexine V et induit une condensation nucléaire (Yu HN., *et al.* 2008). Ceci a également été démontré dans des lignées cellulaires de carcinomes rénaux ou pulmonaires (Yang FG., *et al.* 2005 ; Han S., *et al.* 2004). Récemment, une étude montre que la TGZ inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de prostate par un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 avec une diminution de l'expression de la cycline D1 et une induction de l'apoptose avec une augmentation de l'expression des protéines Bax et un clivage de la caspase 3 (Ban JO., *et al.* 2011).

➤ **Effet sur la migration cellulaire**

Les TZD montrent des effets anti-invasifs sur un grand nombre de lignées cancéreuses. La RGZ et la PGZ inhibent l'invasion de cellules cancéreuses pancréatiques PANC-1 et HPAC de manière dose-dépendante (Galli A., *et al.* 2004). La RGZ inhibe également l'invasion et la migration de cellules d'hépatocarcinomes BEL-7404 et de gliomes U-87MG (Zhang W., *et al.* 2006 ; Jan HJ., *et al.* 2009). La TGZ présente le même effet sur des cellules cancéreuses pancréatiques (PK1 et PK9), leucémiques (HL-60 et K562), ovariennes (ES-2) et mammaires T47D et MDA-MB-231 (Motomura W., *et al.* 2004 ; Liu J., *et al.* 2005 ; Yang YC., *et al.* 2007, Wang PS., *et al.* 2008). Dans les cellules cancéreuses mammaires, il a été décrit qu'un traitement avec la PGZ, la RGZ, ou la 15d-PGJ2 induit une inhibition significative de la capacité invasive des cellules très agressives MDA-MB-231 liée à une diminution de l'activité de MMP (Matrix MetalloProtease) de type 9 (Liu H., *et al.* 2003). Dans les cellules

leucémiques, la TGZ diminue aussi leur capacité invasive et l'expression de MMP2 et MMP9 (Liu J., *et al.* 2005). Dans les cellules cancéreuses pancréatiques et de gliomes, la RGZ diminue uniquement l'activité de MMP2 (Galli A., *et al.* 2004 ; Jan HJ., *et al.* 2009). La TGZ diminue la motilité des cellules pancréatiques PK1 et PK5 et mammaires MDA-MB-231 et T47D. Ceci est associé à un changement de la morphologie des cellules et à une modification de la structure des filaments d'actine (Motomura W., *et al.* 2004 ; Wang PS., *et al.* 2008). La protéine PTEN semble être également importante dans le contrôle de la migration des cellules d'hépatocarcinomes et de carcinome ovarien en réponse à la RGZ et TGZ (Zhang W., *et al.* 2006 ; Yang YC., *et al.* 2007). *In vivo*, les TZD inhibent également l'invasion cellulaire. Un traitement à la RGZ diminue le développement de métastases pulmonaires chez des souris présentant une tumeur primaire mammaire (Magenta G., *et al.* 2008). De même, une observation histologique réalisée sur des coupes de striatum de rats ayant subi une injection de cellules de gliomes montre une diminution de l'invasion des cellules cancéreuses après 21 jours de traitement à la PGZ avec une baisse de l'expression de MMP9 (Grommes C., *et al.* 2006).

➤ Effet sur l'angiogenèse

Il a également été décrit que l'angiogenèse, un phénomène important dans le développement d'une tumeur, est inhibée par les ligands de PPAR γ . En effet, la différenciation des cellules endothéliales induite par le VEGF est inhibée *in vitro* par un traitement à la 15d-PGJ2 (Xin X., *et al.* 1999). Des résultats similaires ont été observés avec la TGZ (Murata T., *et al.* 2000). La 15d-PGJ2 bloque l'expression de gènes impliqués dans le processus angiogénique comme les récepteurs aux VEGF (Xin X., *et al.* 1999). De même, la RGZ inhibe l'angiogenèse par la diminution de la production de VEGF dans les cellules tumorales (Panigrahy D., *et al.* 2002). L'effet inhibiteur des ligands de PPAR γ sur l'angiogenèse a également été démontré *in vivo*. En effet, la TGZ inhibent la néovascularisation choroïdale chez des rats (Murata T., *et al.* 2000). De même, la 15d-PGJ2 inhibe l'angiogenèse d'une cornée de rat induite par le VEGF (Xin X., *et al.* 1999). la RGZ bloque l'angiogenèse de différentes tumeurs primaires *in vivo* (Panigrahy D., *et al.* 2002). De même, La TGZ et la PGZ inhibe la croissance de tumeurs pulmonaires chez des souris xénotreffées en diminuant l'expression d'un facteur endothélial et en diminuant de 60% la densité de vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur (Keshamouni VG., *et al.* 2005).

b. Etudes cliniques

Un essai clinique correspond à une étude scientifique planifiée réalisée en thérapeutique médicale humaine pour évaluer l'innocuité et l'efficacité d'une méthode diagnostique ou d'un traitement. L'essai clinique constitue une étape obligatoire et systématique du développement d'un médicament. On distingue quatre phases dans les essais cliniques :

-La première phase est dite « phase I ». Elle est généralement réalisée chez des volontaires sains afin d'évaluer les effets secondaires du composé chez l'Homme. Elle permet de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) du médicament en développement mais aussi de définir son devenir au sein de l'organisme en fonction de son mode d'administration (absorption, diffusion, métabolisme et excrétion). Parfois ces essais peuvent être proposés à des patients en impasse thérapeutique, pour lesquels le traitement étudié représente la seule chance de survie. Les groupes étudiés sont le plus souvent de petite taille.

-La phase II a pour objectif de déterminer la posologie optimale du produit en terme d'efficacité et de tolérance sur une population limitée et homogène de patients (quelques centaines). Les interactions médicamenteuses ainsi que la pharmacocinétique font parfois l'objet d'études dès cette phase.

-La phase III consiste à des essais comparatifs entre le nouveau composé et un traitement efficace déjà commercialisé ou un placebo. Ces essais sont de plus grandes envergures puisqu'ils concernent plusieurs milliers de patients. Ceci vise à démontrer l'intérêt thérapeutique du médicament et à en évaluer son rapport bénéfice/risque. C'est à l'issue de cette phase III que les résultats peuvent être soumis aux autorités européennes de santé (EMA pour European Agency for the Evaluation of Medicinal products) pour l'obtention de l'autorisation de commercialisation appelée AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

-Les essais de phase IV permettent d'approfondir la connaissance du médicament dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer à grande échelle sa tolérance. Ils sont réalisés lorsque le médicament est commercialisé. Pour cette phase, un nombre de patients très important est évalué soit jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de personnes.

Des études cliniques des TZD sur le cancer ont été engagées après la découverte de leurs effets prometteurs *in vitro*. La plupart des essais thérapeutiques ne montrent pas de bénéfices clairs pour les patients. Les premiers essais cliniques ont été réalisés sur 3 patients atteints de liposarcomes de grade intermédiaire ou de haut grade qui, traités à la TGZ, ont montré une différenciation adipocytaire des cellules tumorales (Demetri GD., *et al.* 1999). Malheureusement ces résultats encourageants ne furent pas confirmés dans l'étude de phase II menée sur 12 patients : aucun signe de différenciation claire ne fut observé (Debrock G., *et al.* 2003). L'effet de la TGZ a été évalué pour

des patients atteints de cancers du colon métastatiques et résistants à la chimiothérapie. Cette étude de phase II incluant 25 patients montra l'absence d'efficacité de la TGZ (Kulke MH., *et al.* 2002). Cependant une étude clinique de phase II, portant sur 41 patients atteints d'une forme avancée de cancer de la prostate mais non métastatique, apparaît plus encourageante. Un traitement par la TGZ a abouti à une stabilisation des concentrations du marqueur PSA (Prostate-Specific Antigen), qui reflète l'évolution de la maladie. De plus, un des patients a présenté une forte diminution de son taux de PSA jusqu'à devenir quasiment indétectable (Mueller E., *et al.* 2000). Enfin, un effet modeste de la RGZ a été observé lors d'une étude de phase II portant sur 10 patients atteints d'un cancer de la thyroïde (Kebebew E., *et al.* 2006). Confortant ces dernières données, deux études rétrospectives sur des patients traités par la RGZ pour un diabète de type II montrent une plus faible incidence de cancers par rapport au groupe témoin (Home PD., *et al.* 2009, Monami M., *et al.* 2008).

Concernant le cancer du sein, les résultats sont là encore assez ambivalents. Une étude utilisant la TGZ en monothérapie sur 22 patientes atteintes d'un cancer du sein réfractaire à au moins une thérapie anti-cancéreuse classique, ne montre pas d'amélioration après 6 mois. Seules 3 patientes ont vu une évolution de leur cancer stabilisée. Cette étude a cependant dû être écourtée puisque la TGZ a été retirée du marché en 2000 suite à un rapport de la FDA (Food and Drug Administration, USA) révélant l'hépatotoxicité de la TGZ (Burstein HJ., *et al.* 2003). Une autre tentative de monothérapie utilisant des TZD englobait 38 femmes atteintes d'un cancer du sein ganglion lymphatique-négatif. Cette intervention était courte (2-6 semaines) puisque l'administration de la RGZ s'est faite entre la période de la biopsie diagnostique et l'opération. Aucun effet significatif sur la prolifération des cellules tumorales n'a été observé en analysant l'expression du marqueur Ki67 (protéine nucléaire exprimée dans les cellules en prolifération) (Yee LD., *et al.* 2007).

Ces premiers essais cliniques ne sont donc pas concluants. Ces données ambivalentes pourraient être dues à la sélection de cancers pré-traités réfractaires, qui ne répondent plus aux thérapies anti-cancéreuses. Plusieurs études sur les TZD ont conclu à des effets récepteur-indépendants à cause des concentrations élevées (jusqu'à 100µM) nécessaires pour observer une action efficace. Ceci soulève la question de la dose à utiliser en thérapeutique. En effet, les doses utilisées lors des essais cliniques varient de 400µg à 4mg/jours (Grommes C., *et al.* 2004 ; Yee LD., *et al.* 2007). Chez l'Homme, la concentration sérique maximale après une dose unique de 30mg de PGZ est d'environ 900ng/ml (soit 2,2µM) ; pour la TGZ, la concentration sérique maximale peut atteindre 7-8µM. Dans les études chez l'animal, des taux plus élevés ont été atteints, avec un niveau sérique en PGZ entre 18 et 145µM. Les valeurs AUC (Area Under the Curve ; index d'exposition totale à la molécule) peuvent atteindre 20µM pour la PGZ et 55µM pour la TGZ. Les valeurs AUC donnent une mesure de la quantité de molécules et du temps où elles restent dans le corps. Ceci met l'accent sur le fait qu'une longue exposition à de

faibles concentrations pourrait avoir un meilleur effet qu'une courte exposition à de fortes concentrations. Par conséquent, il est probable que des concentrations sériques maximales de TZD puissent être atteintes après une administration de doses approuvées actuellement (Feinstein DL., *et al.* 2005). Des études de phase I ont également été réalisées récemment avec la TZD de troisième génération l'efatutazone. La première porte sur une cohorte de 31 patients atteints de cancers en échec thérapeutique. Parmi les patients traités avec des concentrations comprises entre 0,10 et 1,15mg deux fois par jour, 1 patient présente une réponse partielle et 10 patients présentent une stabilisation de la maladie (Pishvaian MJ., *et al.* 2012). De plus, dans le cadre du cancer de la thyroïde aplasique, une étude de toxicité menée sur 15 patients montre une faible toxicité puisque en présence d'une prise de 0,3 mg/deux fois par jour la dose maximale tolérée n'a pas été atteinte (Smallridge RC., *et al.* 2013).

D'une part, il apparaît nécessaire de bien comprendre le mécanisme d'action des TZD. En effet, l'étude clinique portant sur le cancer de la thyroïde ne montre pas de corrélation entre le niveau d'expression de PPAR γ et la réponse à la RGZ ce qui suggère un mécanisme d'action PPAR γ -indépendant (Kebebew E., *et al.* 2006). Cette hypothèse est confirmée par les résultats d'une autre étude clinique de phase I qui ne montre pas de bénéfice dans le cas d'un co-traitement avec le Bexarotène, un ligand spécifique de RXR (Read WL., *et al.* 2008).

D'autre part, les effets secondaires des TZD ont conduit à leur retrait progressif du marché pour des raisons multiples comme la TGZ en raison de son hépatotoxicité (Chojkier M. 2005). Malgré cette toxicité et les observations *in vivo*, la voie de signalisation de la TGZ reste extrêmement étudiée par de nombreuses équipes de recherche de part ses effets *in vitro*. De plus, les autres TZD ne présentent pas cette même toxicité malgré leur structure très similaire. En effet, La RGZ présente des effets délétères sur le système cardiovasculaire et la PGZ accroît le risque de cancer de la vessie chez les hommes (Chen X., *et al.* 2012 ; Zhu Z., *et al.* 2013). Les causes sont mal connues et seront discutées dans la partie 3.

Les perspectives thérapeutiques s'orientent actuellement dans trois directions :

- La mise au point de nouveaux protocoles d'administration pourrait permettre de limiter leur toxicité.
- L'association avec d'autres molécules afin de potentialiser les effets des TZD.
- Mais surtout le développement de molécules à effets plus ciblés.

Pour cela, il est essentiel de mieux comprendre leur mode d'action notamment PPAR γ -indépendant.

Partie 3 : Effets PPAR γ -indépendants des TZD

I. Découverte des effets PPAR γ -indépendants

Depuis plusieurs années, il a été démontré qu'un nombre croissant d'effets anti-cancéreux des TZD ne sont pas liés à l'activation du récepteur PPAR γ . Outre les résultats de certaines études cliniques, plusieurs arguments sont en faveur d'effets PPAR γ -indépendants. Tout d'abord, l'action anti-cancéreuse des TZD dépend de leur structure et non de leur capacité à transactiver PPAR γ . En effet, la TGZ et la CGZ sont plus actives sur l'induction de l'apoptose de différentes lignées de cellules cancéreuses comparé à la RGZ, qui est pourtant l'un des plus puissants activateurs de PPAR γ . Par ailleurs, différentes études ont montré l'absence de corrélation entre la sensibilité des cellules cancéreuses aux effets anti-tumoraux des TZD et leur niveau d'expression de PPAR γ . Une des premières études montre qu'un traitement à la TGZ inhibe de manière similaire la prolifération des cellules ES PPAR γ +/+ et PPAR γ -/. Ceci a été confirmé *in vivo*, en effet, la TGZ diminue la croissance tumorale induite par l'injection de cellules ES PPAR γ +/+ et ES PPAR γ -/-. (Palakurthi SS., *et al.* 2001). Par ailleurs, les cellules MCF-7 qui expriment faiblement PPAR γ sont plus sensibles à la dégradation de la cycline D1 induite par la TGZ et CGZ que les cellules MDA-MB-231 qui expriment fortement PPAR γ (Huang JW., *et al.* 2005). Des résultats similaires ont été décrits sur des cellules cancéreuses de prostate (Shiau CW., *et al.* 2005). Une récente étude montre que la TGZ inhibe l'expression de la télomérase hTERT (human TELOmerase Reverse Transcriptase) et l'analyse d'une cohorte de patients montre qu'il n'existe aucune corrélation entre l'expression de PPAR γ et de hTERT (Rashid-Kolwear F., *et al.* 2010). Toutes ces observations suggérant une action PPAR γ -indépendante des TZD ont été confirmées par différentes méthodes.

- Par l'utilisation d'antagonistes du récepteur PPAR γ comme le GW9662. Différentes protéines du cycle cellulaire comme la cycline D1, ER α ou c-myc sont toujours dégradées après un co-traitement par les TZD en présence de GW9662 (Huang JW., *et al.* 2005 ; Lecomte J., *et al.* 2008 ; Akinyeke TO. & Stewart LV. 2011).

- L'utilisation de siRNA (small interfering RNA) dirigés contre PPAR γ n'empêche pas la dégradation du récepteur aux œstrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Lecomte J., *et al.* 2008). De même, la protéine c-myc est toujours dégradée dans les cellules cancéreuses de prostate C4-2 après un traitement avec la TGZ (Akinyeke TO. & Stewart LV. 2011).

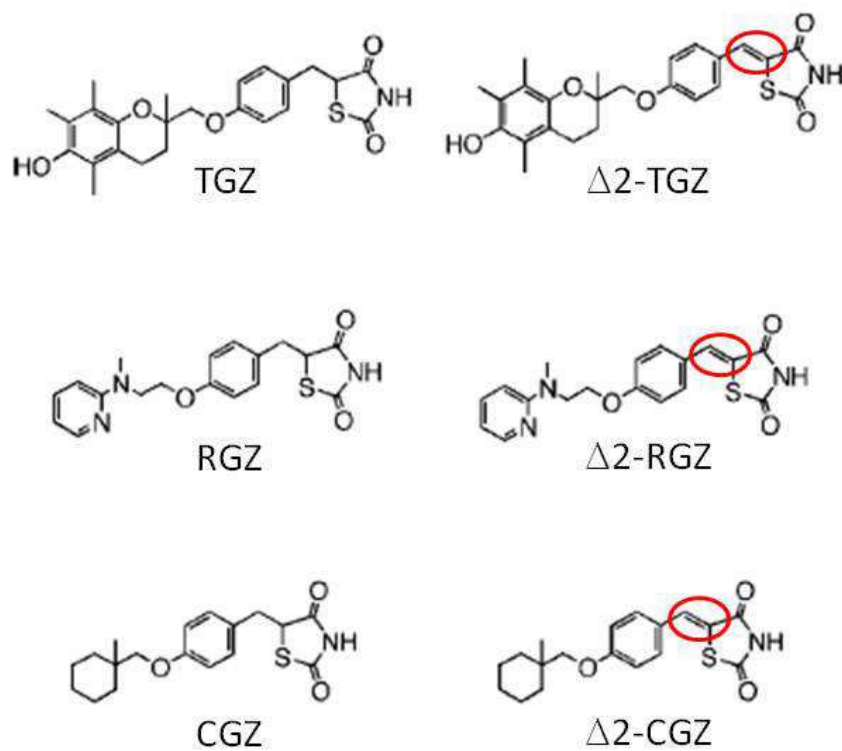


Figure 19 : Structure des dérivés Δ^2 et de leur composé parental. La structure des composés parentaux TGZ, RGZ et CGZ est indiquée à gauche. La structure de leur équivalent Δ^2 est indiquée à droite : ces composés présentent une double liaison apposée au cycle TZD (entourée en rouge).

- L'utilisation d'analogues inactifs des TZD incapables d'activer le récepteur PPAR γ . Les dérivés $\Delta 2$ des TZD font partie de ces analogues inactifs. Ils présentent une double liaison apposée au cycle thiazolidinedione ce qui rigidifie la structure de la molécule et l'empêche d'activer PPAR γ (**Figure 19**). Ces composés inhibent la prolifération de différentes lignées cancéreuses de prostate (Shiau CW., *et al.* 2005). L'un des mécanismes est la dégradation de protéines importantes pour la prolifération et la survie cellulaire. Ainsi, ils induisent la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 ou du récepteur ER α comme leurs composés parents dans des cellules cancéreuses mammaires (Huang JW., *et al.* 2005 ; Lecomte J., *et al.* 2008). Par ailleurs, les composés $\Delta 2$ semblent être plus efficaces puisque la dose nécessaire à la dégradation de la protéine cycline D1 est de 40 μ M pour la TGZ et de 30 μ M pour la $\Delta 2$ -TGZ (50 μ M et 30 μ M respectivement pour la CGZ et la $\Delta 2$ -CGZ) (Huang JW., *et al.* 2005). La β -caténine est également dégradée par la $\Delta 2$ -TGZ et le STG28, un dérivé de la $\Delta 2$ -TGZ, dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP (Wei S., *et al.* 2007). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la dégradation de la β -caténine est régulée par la protéine β -TrCP (β -Transducin repeat Containing Protein). En effet, la $\Delta 2$ -TGZ et le STG28 induisent l'expression de la protéine β -TrCP et l'inhibition de son expression par interférence ARN bloque la dégradation de la β -caténine induite par le STG28. A l'inverse, l'expression ectopique de la protéine β -TrCP augmente la capacité du STG28 à dégrader la β -caténine (Wei S., *et al.* 2007). La cycline D1 et Sp1 (Specificity protein 1) sont également des cibles de la protéine β -TrCP (Wei S., *et al.* 2008 ; Wei S., *et al.* 2010). La protéine β -TrCP joue donc un rôle clé dans les effets anti-tumoraux des TZD puisqu'elle régule la protéolyse de protéines cibles du cycle cellulaire et de l'apoptose. L'augmentation transitoire de l'expression de Sirt1 (Silent information regulator 1), une lysine déacétylase, est essentielle dans la régulation de l'expression de la protéine β -TrCP puisqu'un dominant négatif Sirt1 bloque l'induction de β -TrCP et le clivage de PARP induit par un dérivé de la CGZ, OSU-CG12 (Wei S., *et al.* 2010).

La découverte des effets PPAR γ -indépendants a été une avancée cruciale pour le développement de traitements anti-cancéreux puisque la majorité des effets cytotoxiques des TZD semblait passer par une activation du récepteur PPAR γ . Ceci a relancé l'intérêt des TZD dans le traitement des cancers. De nombreuses études ont depuis montré que l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses par les TZD est un mécanisme PPAR γ -indépendant (Grillier-Vuissoz I., *et al.* 2013). Les mécanismes à la base de l'inhibition de la prolifération sont multiples. L'un des mieux caractérisés est la voie pro-apoptotique.

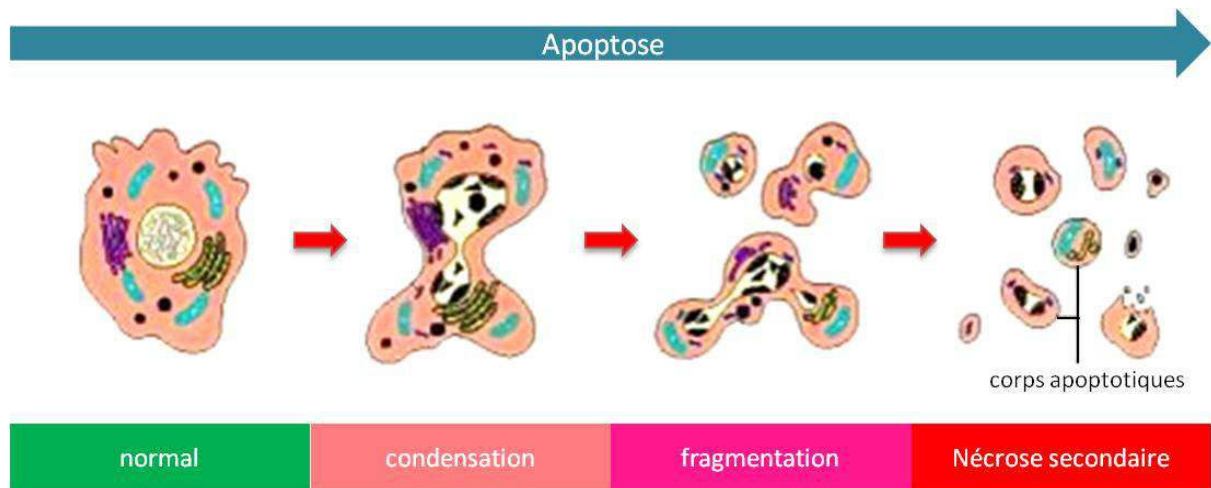


Figure 20 : Modifications morphologiques des cellules en apoptose. La cellule en apoptose présente une condensation du cytoplasme et de la chromatine puis la fragmentation de cette dernière. Le résultat de l'apoptose est la formation de corps apoptotiques. D'après lecerveau.mcgill.ca

II. Effets PPAR γ -indépendants des TZD sur la voie pro-apoptotique

L'apoptose, également appelée « mort cellulaire programmée », joue un rôle crucial dans l'embryogenèse ainsi que dans l'homéostasie cellulaire. En effet, elle correspond à un phénomène physiologique d'élimination des cellules surnuméraires ou anormales. Par exemple, au cours du développement, la régression des canaux de Wolff chez la femme ou des canaux de Müller chez l'homme est due à une mort programmée des cellules par apoptose.

Les premières observations ont été faites en 1842 par Carl Vogt qui décrit une disparition des cellules de la chorde dorsale lors du développement chez un amphibien anoure (Vogt C., 1842). Il montre une capacité des cellules à s'autodétruire en quelques heures mais à ce moment ce type de mort n'était pas encore caractérisé. Ce n'est que 30 ans plus tard que le mot apoptose est introduit par Kerr JF et ses collègues qui ont décrit, dans de nombreux tissus adultes, les caractéristiques morphologiques d'un phénomène de mort cellulaire actif et programmé (Kerr JF., *et al.* 1972). La cellule en apoptose se caractérise par le bourgeonnement de la membrane plasmique, un rétrécissement cellulaire, la condensation de la chromatine (pyknosis) suivie de sa fragmentation (karyorrhexis). L'ensemble de ces changements aboutit à la formation de corps apoptotiques essentiellement éliminés par phagocytose (**Figure 20**).

Les recherches moléculaires sur l'apoptose et plus particulièrement les travaux pionniers menés par l'équipe d'Horvitz sur le nématode *Caenorhabditis elegans* ont permis d'identifier un programme moléculaire déclenchant la mort cellulaire programmée (Horvitz HR. 1999). Des homologues des protéines essentielles du programme de mort cellulaire sont exprimés chez les mammifères et forment un réseau complexe de signalisation conduisant à l'apoptose.

1. Voies de signalisation de l'apoptose

a. Les caspases : effecteurs de l'apoptose

Les caspases sont des protéases à cystéines appartenant à la famille des « cysteinyl aspartate-specific protéases » impliquées dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Actuellement, 14 caspases ont été identifiées. Ces endo-protéases possèdent un site catalytique comprenant un résidu cystéine essentiel à l'activité enzymatique localisé dans un motif QACXG. Ces enzymes reconnaissent et clivent des chaînes polypeptidiques : elles reconnaissent quatre acides aminés nommés S4-S3-S2-S1 et clivent après le résidu en C-terminal S1 qui est généralement une asparagine. Elles sont présentes dans le cytoplasme sous forme de pro-caspases inactives (zymogène) et doivent être clivées pour être actives. Les pro-caspases possèdent une structure similaire : un pro-domaine situé dans la partie

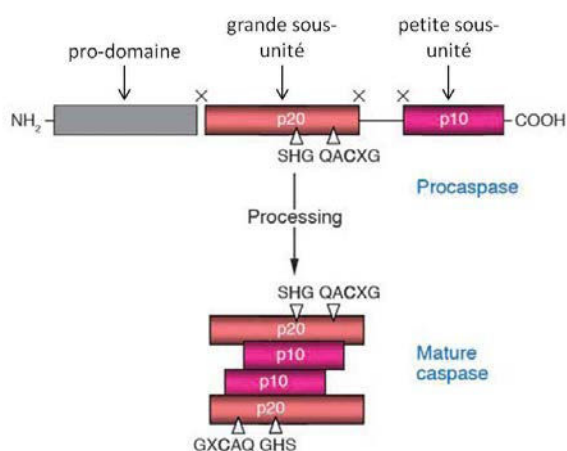
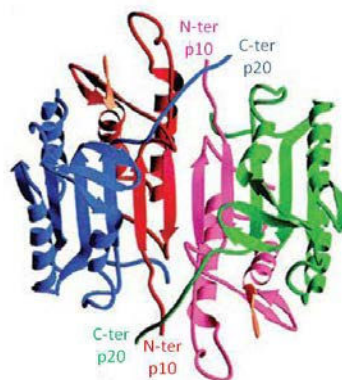
A.**B.**

Figure 21: Modèle d'activation des caspases. (A) Les caspases possèdent trois domaines : un pro-domaine dans la partie N-terminale, un domaine de 20kDa (p20) correspondant à la grande sous-unité qui contient les deux sites catalytiques SHG et QACXG et un domaine court de 10kDa (p10) correspondant à la petite sous-unité. Les caspases sont activées après un double clivage libérant dans un premier temps la petite sous-unité puis dans un deuxième temps la grande sous-unité (les x correspondent aux sites de clivage). Les deux sous-unités s'associent pour former un tétramère qui comprend alors 4 sites catalytiques. (B) Structure 3D du tétramère caspase 3 actif. Modifié d'après Lavrik IN., *et al.*2005.

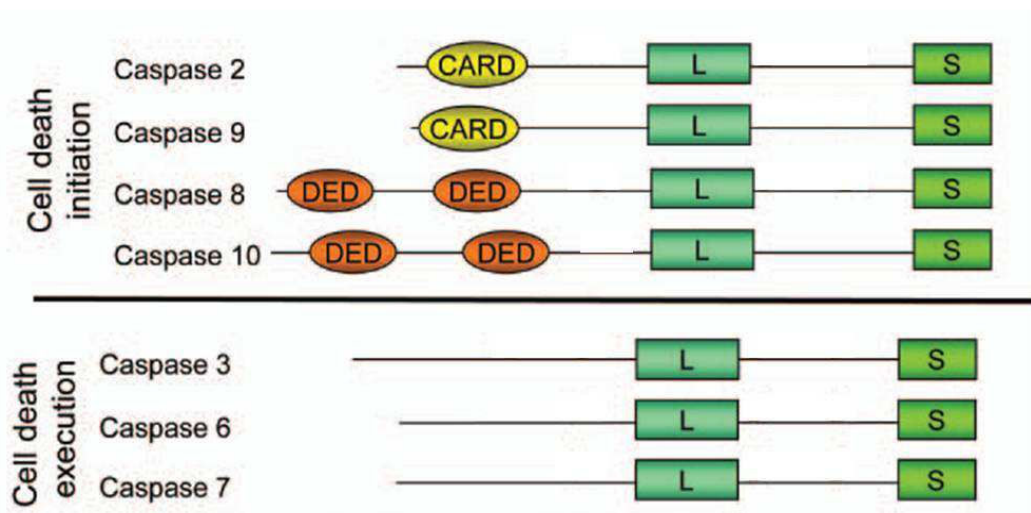


Figure 22: Classification des caspases chez l'Homme. Les caspases initiatrices possèdent un pro-domaine long. Celui-ci contient un domaine DED pour « Death Effector Domain » (caspases 8 et 10) ou un domaine CARD pour « Caspase Activation and Recruitment Domain » (caspases 2 et 9) impliqués dans les interactions protéine-protéine. Les caspases effectrices possèdent un pro-domaine court (10 à 40 résidus). Les grandes sous-unités (L) et les petites sous-unités (S) sont indiquées. Modifié d'après Jin Z. & El-Deiry W.S., 2005.

N-terminale suivi d'un domaine long de 20kDa correspondant à la grande sous-unité contenant les sites catalytiques, et d'un domaine court de 10kDa correspondant à la petite sous-unité. L'activation des caspases passe par un double clivage : le premier libère la petite sous-unité puis le deuxième la grande sous-unité. Ces clivages conduisent à la forme active de l'enzyme : les deux sous-unités se dimérisent pour former un hétérodimère qui comprend alors 4 sites catalytiques (**Figure 21**).

Les caspases se classent en caspases initiateuses telles que les caspases 2, 8, 9, 10 et en caspases effectrices telles que les caspases 3, 6, 7. Les caspases initiateuses et effectrices se différencient par leur pro-domaine. Les caspases à pro-domaine court (10 à 40 résidus) sont effectrices. Elles sont activées à la suite de leur clivage par une autre caspase. Les caspases à pro-domaine long sont initiateuses. Elles contiennent des domaines d'interaction protéine-protéine, un domaine DED pour « Death Effector Domain » pour les caspases 8 et 10, ou un domaine CARD pour « Caspase Activation and Recruitment Domain » pour les caspases 2 et 9 (**Figure 22**). Au cours de l'apoptose, l'activation des caspases est un événement précoce conduisant au clivage de protéines diverses à l'origine des changements biochimiques et morphologiques des cellules. En effet, les caspases initiateuses activent les caspases effectrices qui à leur tour clivent des substrats impliqués dans la survie et le maintien de l'intégrité cellulaire ; citons PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) impliquée dans la réparation de l'ADN et les kératines et les laminines, l'actine... Bien que les caspases 3 et 7 agissent de concert, la première aurait une affinité pour la fragmentation de l'ADN et les modifications morphologiques du noyau, la seconde serait plutôt impliquée dans la diminution de la viabilité cellulaire. Ceci expliquerait l'observation faite sur des lignées déficientes en caspases 3 telles que les MCF-7 qui ne présentent pas de modifications morphologiques du noyau et de fragmentation de l'ADN (Kagawa S., et al. 2001).

b. Mécanismes d'activation des caspases

Deux grandes voies de signalisation moléculaires conduisent à l'activation des caspases : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque ou mitochondriale.

➤ **Voie extrinsèque**

La voie extrinsèque passe par l'activation de récepteurs transmembranaires appartenant à la super-famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) connus sous le nom de « récepteur de mort ». Ces récepteurs contiennent un domaine de mort nommée DD (Death Domain) du côté

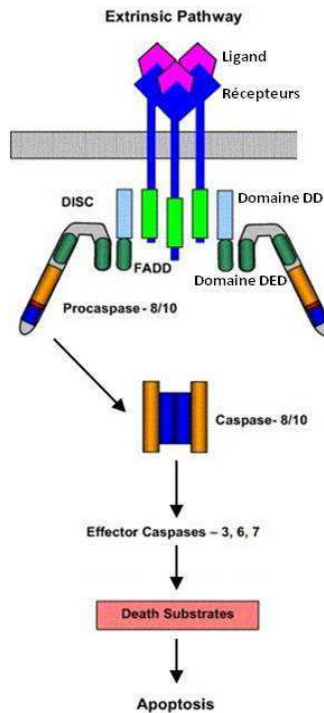


Figure 23: Voie de signalisation extrinsèque. Lorsque les récepteurs de mort sont activés par la liaison de leur ligand, ils se trimèrisent et recrutent les protéines adaptatrices FADD (Fas-Associated Death Domain) grâce à leur domaine DD (Death Domain). FADD comporte également un domaine nommé DED pour « Death Effector Domain » qui permet recrutement et le clivage des pro-caspases initiatrices 8 et 10. Ces dernières clivent à leur tour les caspases effectrices -3, -6, -7 pour induire l'apoptose. Modifié d'après Regula KM. & Kirshenbaum LA. 2005.

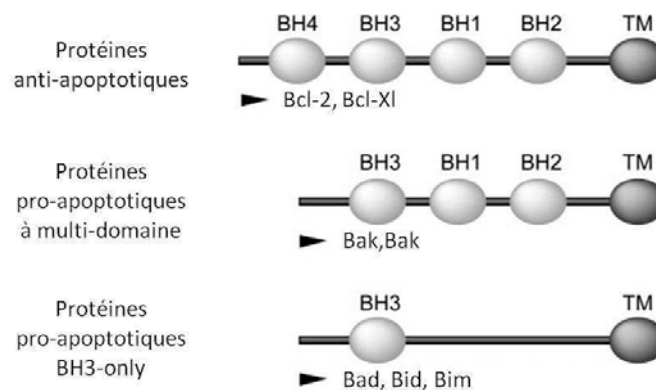


Figure 24 : Structure des protéines de la famille Bcl-2. Les membres de la famille Bcl-2 possèdent au moins une des 4 régions fortement conservées appelées domaines BH pour « Bcl-2 Homology ». Ils sont divisés en 3 groupes : les protéines anti-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques à multi-domaine et les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-only. Généralement, les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-XI contiennent les domaines BH1, 2, 3, 4 alors que les protéines pro-apoptotiques à multi-domaine telles que Bax et Bak contiennent les domaines BH1, 2, 3. Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-only telles que Bad, Bid et Bim contiennent uniquement le domaine BH3. L'ensemble de ces protéines, à part Bid, possèdent un domaine transmembranaire (TM). Modifié d'après Shibue, T. & Taniguchi, T., 2006.

cytoplasmique. Ce domaine de 80 acides aminés est nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs. On distingue plusieurs membres faisant partie des récepteurs de mort : le récepteur de TRAIL comme DR5, le récepteur au ligand Fas ou le récepteur au TNF. La liaison de leur ligand provoque la trimérisation des récepteurs et permet le recrutement de la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain) (**Figure 23**). FADD est une protéine cytoplasmique ubiquitaire qui contient dans sa partie C-terminale un domaine DD impliqué dans la liaison au récepteur. Le complexe ainsi formé est appelé DISC pour « Death Inducing Signaling Complex ». La partie N-terminale de FADD contient un autre domaine nommée DED. Ce dernier est impliqué dans le recrutement et le clivage des pro-caspases initiatrices 8 et 10 ce qui conduit à la libération de leur forme active dans le cytoplasme. Une fois les caspases activées, elles peuvent activer les caspases effectrices 3, 6, 7 et induire l'apoptose (**Figure 23 et 25**).

➤ Voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou mitochondriale est caractérisée par une perméabilisation des membranes mitochondriales aboutissant à la libération de protéines dans le cytoplasme comme :

- l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G, qui migrent dans le noyau et induisent la condensation et la fragmentation de l'ADN.
- le cytochrome c, initialement lié à la chaîne respiratoire mitochondriale, qui interagit avec la protéine cytoplasmique Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1). Celle-ci possède un domaine CARD et permet ainsi le recrutement et l'activation de la pro-caspase 9. Le complexe multi-protéique ainsi formé est appelé « apoptosome » et est à l'origine du clivage et de l'activation de la caspase 9. Cette dernière active à son tour les caspases effectrices 3, 6, 7 et induit l'apoptose (**Figure 25**).

Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins) sont essentielles pour la régulation de la voie intrinsèque en contrôlant la perméabilité des membranes mitochondriales. Cette famille de protéines comprend une vingtaine de membres caractérisés par la présence d'au moins une des 4 régions fortement conservées appelée domaine BH pour « Bcl-2 Homology ». L'ensemble des membres de la famille Bcl-2 contiennent tous le domaine BH3 ce qui leur permet d'interagir entre elles. Ces protéines sont classées en trois groupes (**Figure 24**) :

- Les protéines pro-apoptotiques qui ne possèdent que le domaine BH3 appelées protéines BH3-only ou protéines à « domaine BH3 seulement » telles que les protéines Bim (Bcl-2-

interacting mediator of cell death), Bid (BH3-interacting domain death agonist) et Bad (Bcl-2 Associated Death protein).

- Les protéines pro-apoptotiques qui contiennent les domaines BH1, 2 et 3. Les deux protéines les plus connues sont Bax (Bcl-2 associated x protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer).
- Les protéines anti-apoptotiques caractérisées par la présence du domaine BH4. Elles interagissent entre elles et forment des homo ou hétérodimères ancrés dans la membrane mitochondriale. On y trouve notamment les protéines Bcl-2, Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large).

Les protéines Bax et Bak sont les deux principaux effecteurs de la régulation de la perméabilité mitochondriale. Lorsqu'elles sont activées, ces protéines sont les seules capables de directement perméabiliser la membrane mitochondriale. Pour ce faire, elles s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent pour former des pores dans la membrane mitochondriale externe provoquant une perte du potentiel membranaire mitochondrial, la libération des protéines mitochondriales de l'apoptose (cytochrome c, AIF, endonucléase G) et l'activation des caspases. Des fibroblastes dérivés de souris déficientes pour ces deux protéines Bax et Bak sont résistantes à de nombreux stimuli apoptotiques montrant le rôle critique de ces deux protéines dans la voie mitochondriale de l'apoptose (Wei MC., *et al.* 2001).

La formation de pores par les protéines Bax et Bak est stimulée par les protéines BH3-only. Ces dernières jouent un rôle clé dans l'initiation de l'apoptose et l'activation de Bax/Bak. Cependant, le mécanisme par lequel elles activent Bax/Bak n'est pas encore élucidé. Actuellement, deux modèles d'activation des protéines Bax et Bak sont décrits (Kaufmann T., *et al.* 2012, Giam M. *et al.* 2008) :

- Le modèle direct

Dans ce modèle, les protéines BH3-only sont classées en deux groupes :

- Les protéines dites activatrices qui peuvent directement se lier aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et induire leur dimérisation, comme les protéines Bid et Bim.
- Les protéines dites « sensitizers » ou inactivatrices qui bloquent la capacité des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL à séquestrer les protéines BH3 activatrices mais sont incapables d'induire l'activation des protéines Bax et Bak. La liaison de ces protéines BH3 « sensitizer » décroche les protéines BH3 activatrices de leur association avec les protéines anti-apoptotiques. Dans ce groupe, on trouve les protéines Bad et Bik (Bcl-2-interacting killer).

Le modèle direct propose que les protéines BH3-only activatrices activent directement Bax et Bak. Lors d'un stimulus apoptotique, les protéines BH3-only « sensitizer » sont activées et se lient sur les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-Xl pour libérer les protéines BH3 activatrices, qui sont alors capables d'interagir avec Bax et Bak et induire l'apoptose.

- Le modèle indirect

Ce modèle n'exige aucune interaction entre les protéines BH3-only et les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Dans ce modèle, les protéines Bcl-2 et Bcl-Xl protègent les cellules de l'apoptose en séquestrant Bax et Bak plutôt que les protéines BH3 activatrices proposé par le modèle direct. Les protéines BH3-only activent l'apoptose en se liant et neutralisant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-Xl permettant ainsi la dimérisation de Bax et Bak et la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

La voie intrinsèque de l'apoptose est modulée par le ratio de protéines pro et anti-apoptotiques. Dans une cellule saine, la protéine pro-apoptotique Bak est localisée dans la membrane externe des mitochondries où elle est associée aux protéines anti-apoptotiques. Bax est une protéine cytosolique dans une conformation inactive. Lors de l'induction de l'apoptose, Bak est libéré de son interaction avec les protéines anti-apoptotiques et la protéine Bax subit un changement de conformation et s'insère dans la membrane mitochondriale externe. La transcription de Bax est aussi induite par la protéine p53. Cette dernière, impliquée dans la reconnaissance des dommages à l'ADN, s'accumule dans le noyau et régule la transcription de gènes cibles de l'apoptose notamment ceux codant des protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bid (Miyashita T., *et al.* 1994 ; Sax JK., *et al.* 2002). Néanmoins, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-Xl peuvent séquestrer les protéines Bax qui s'insèrent dans la membrane mitochondriale et ainsi bloquer la formation de pores. Les protéines BH3-only sont essentielles pour neutraliser l'effet des protéines anti-apoptotiques et favoriser la dimérisation de Bax. Ces protéines BH3-only sont principalement régulées par des mécanismes de phosphorylation.

- Bad est phosphorylée lorsqu'elle est inactive, elle s'associe alors à la protéine 14-3-3 ce qui la séquestre dans le cytoplasme. Cette inactivation de Bad libère les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-Xl qui peuvent s'associer à Bax et Bak et séquestrer les protéines BH3-only activatrices. La déphosphorylation de Bad la libère de la protéine 14-3-3 et la transloque vers la mitochondrie où elle se fixe aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-Xl ce qui libère Bak (Willis SN. & Adams JM. 2005).

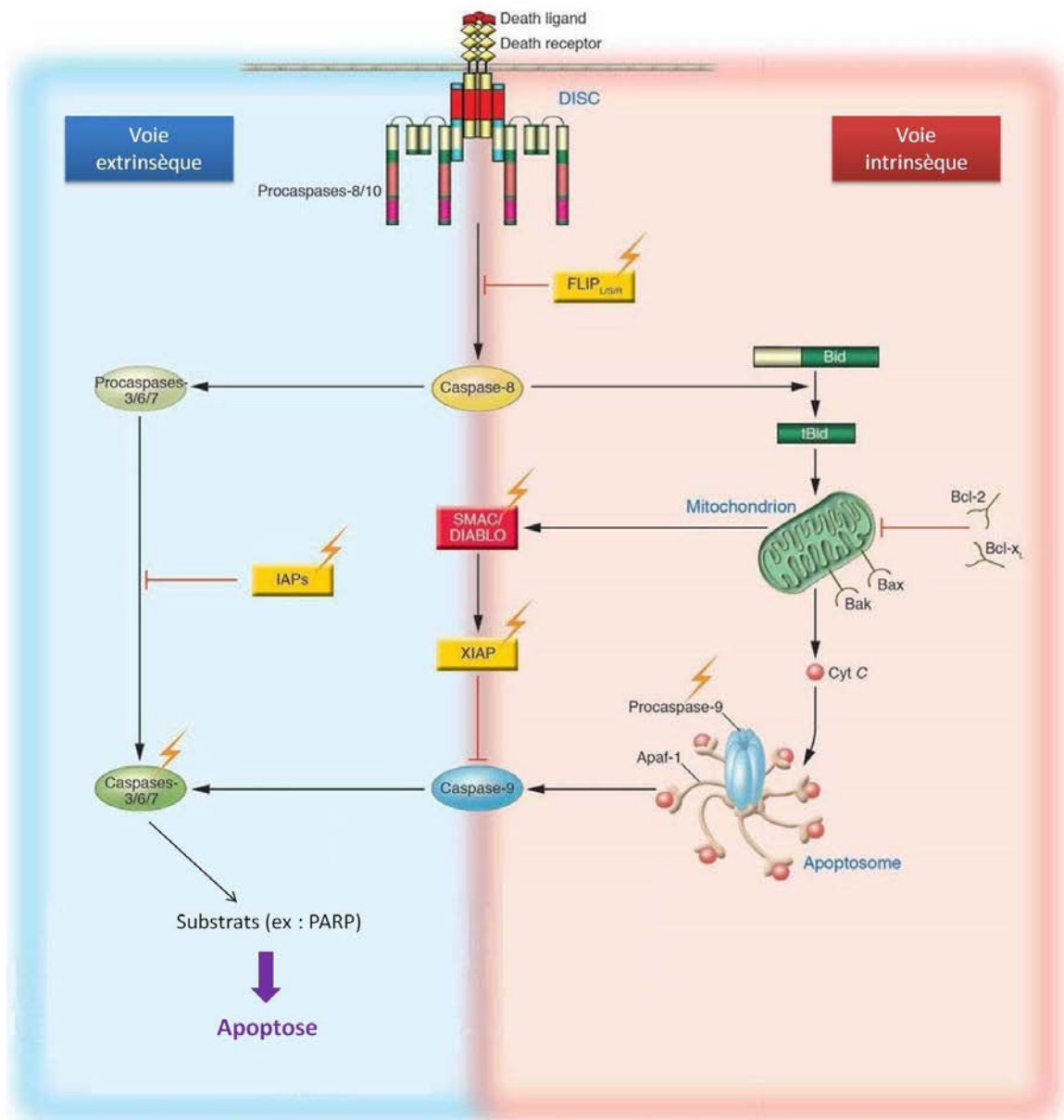


Figure 25 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. L'activation de la caspase 8 induite par le complexe DISC est régulée par la protéine c-FLIP (The FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory). Cette protéine contient deux domaines DED. Par conséquent, elle peut entrer en compétition avec la pro-caspase 8 pour son recrutement au niveau du DISC et ainsi empêcher l'activation de la caspase initiatrice. Il existe également des inhibiteurs de caspases nommés IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein). Ils régulent négativement les caspases de deux manières. Ils contiennent au moins un domaine BIR (Baculoviral IAP Repeat) permettant de lier et d'inhiber les caspases exécutrices. Ils sont donc capables de bloquer les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Les IAPs peuvent aussi induire la dégradation de ces caspases par l'ubiquitine ligase 3 recrutée grâce à la présence d'un domaine RING (Really Interesting New Gene 1). Modifié d'après Lavrik IN., *et al.* 2005.

- Bim est également une protéine cytoplasmique séquestrée par les microtubules. JNK est impliquée dans la phosphorylation de Bim ce qui la libère du cytosquelette et lui permet de s'insérer dans la membrane mitochondriale en se liant aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak.

- Bid est une protéine inactive dans le cytoplasme. La caspase 8 est capable de cliver spécifiquement la protéine Bid libérant la forme activée tBid. La forme clivée tBid expose ainsi son domaine BH3 qui permet son insertion dans la membrane mitochondriale et sa liaison à d'autres protéines pro-apoptotiques, notamment Bax (Li H et al., 1998).

c. Régulation des caspases

c-FLIP (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory) est une protéine recrutée au niveau du DISC qui régule l'activation des caspases 8 et 10. Bien qu'il existe différents variants transcriptionnels, seulement trois variants sont présents au niveau protéique, une forme longue c-FLIP_L (55 kDa) et deux formes courtes c-FLIP_S (26 kDa) et c-FLIP_R (24 kDa). Les trois isoformes contiennent deux domaines DED du côté N-terminal. La forme c-FLIP_L présente une similarité de séquence avec les pro-caspases 8 et 10, elle contient en plus du côté C-terminal un domaine « pseudo-caspase » inactif par perte des résidus critiques nécessaires à l'activité protéase. Bien qu'il soit bien établi que la protéine c-FLIP_S est un puissant inhibiteur de l'activation de la caspase 8, la forme c-FLIP_L est décrite comme pro et anti-apoptotique. Cette dernière peut inhiber ou activer l'apoptose en fonction de son niveau d'expression. Quand le niveau d'expression de c-FLIP_L est élevé, elle entre en compétition avec la pro-caspase 8 pour son recrutement au niveau du DISC et ainsi empêche l'activation de la caspase initiateur (**Figure 25**). Cependant, à un niveau physiologique, c-FLIP_L peut encore être ciblé par DISC mais il induit l'activation de la pro-caspase 8 et augmente le signal apoptotique (Yu JW. & Shi Y. 2008).

La formation de l'apoptosome est une cible des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein). Ces protéines sont des régulateurs négatifs des caspases. Les plus connus sont XIAP, cIAP1, cIAP2 et survivin. Les IAPs forment une famille de protéines conservées qui contiennent au moins un domaine BIR (Baculoviral IAP Repeat). XIAP, cIAP1, cIAP2 contiennent trois domaines BIR et survivin n'en contient qu'un seul. Ce domaine de 80 acides aminés joue un rôle important pour leur activité anti-apoptotique. C'est un domaine d'interaction protéique qui leur permet de lier et d'inhiber les caspases. L'ensemble de ces protéines sont des inhibiteurs des deux voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose puisqu'elles inhibent les caspases effectrices communes aux deux voies (**Figure 25**). Les IAPs possèdent également un domaine RING (Really Interesting New Gene) de 40

acides aminés dans la partie C-terminale qui est exigé pour la dimérisation et l'activité ubiquitine ligase 3. Les IAPs peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser permettant ainsi leur auto-ubiquitinylation ou une trans-ubiquitinylation. En plus, les IAPs peuvent contrôler l'ubiquitination d'un certain nombre de leur partenaire comme les caspases et induire leur dégradation. Par ailleurs, certaines possèdent un dernier domaine appelé UBA pour « Ubiquitin-Associated Domain ». Il s'agit d'un domaine conservé entre les domaines BIR et RING qui permet aux IAPs de lier l'ubiquitine (De Almagro MC. & Vucic D. 2012).

L'activité des IAPs est elle-même régulée par des antagonistes qui sont libérés lors de la perméabilisation de la membrane mitochondriale comme par exemple Smac/Diablo ou Omi/Htra2. Ces antagonistes possèdent des motifs de liaison IAP nommés IBM pour « IAP-Binding Motif » qui lient le domaine BIR3 de XIAP et c-IAP (Jin Z. & El-Deiry W. 2005). Ces protéines répriment l'action inhibitrice des IAPs et permettent aux caspases d'induire l'apoptose.

2. Effet des ligands sur l'apoptose

L'induction de l'apoptose par les ligands de PPAR γ a été décrite dans de nombreuses lignées cancéreuses. Ainsi, Clay et ses collègues ont montré que le ligand naturel 15d-PGJ2 induit une condensation de la chromatine des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 après 36 heures de traitement (Clay CE., *et al.* 1999). Une fragmentation de l'ADN est observée dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 après un traitement de 50 μ M à la TGZ (Bae MA & Song BJ, 2003). Des résultats similaires avec la TGZ ont été décrits sur des lignées de carcinomes pulmonaires (Satoh T., *et al.* 2002). La RGZ est aussi impliquée dans l'apoptose : une dose de 10 μ M de RGZ induit la fragmentation de l'ADN de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Kim KY., *et al.* 2006). Néanmoins, les effets de la RGZ sont différents en fonction des lignées cellulaires. En effet, elle n'induit pas l'apoptose de cellules cancéreuses de vessie contrairement à la TGZ et la CGZ (Plissonnier ML., *et al.* 2010, Plissonnier ML., *et al.* 2011).

Les effets pro-apoptotiques des ligands de PPAR γ sont en grande partie des mécanismes indépendants du récepteur PPAR. Les premières données ont été décrites en 2005 par l'équipe de Shiao et al. sur deux lignées cancéreuses de prostate, les cellules PC-3 exprimant PPAR γ et les cellules LNCaP déficiente pour ce récepteur (Shiao CW *et al.*, 2005). Les auteurs ont développé de nouveaux dérivés de TZD nommés $\Delta 2$ ne présentant plus d'activité PPAR γ . Les composés TGZ et CGZ et leurs dérivés $\Delta 2$ diminuent la prolifération cellulaire des deux lignées et induisent la libération du cytochrome c et la fragmentation de l'ADN. Néanmoins, aucun effet n'est observé avec les deux

composés RGZ et PGZ et leur dérivé $\Delta 2$ (Shiau CW *et al.*, 2005). Ce travail démontre que les TZD induisent l'apoptose de manière PPAR γ -indépendante. De nombreuses études ont ensuite confirmé que l'apoptose induite par les ligands de PPAR γ est indépendante du récepteur PPAR γ .

L'apoptose induite par les ligands de PPAR γ est généralement caspase-dépendante et active les deux voies de signalisation extrinsèque et intrinsèque. Par exemple, le composé TZD18, une molécule dérivée de la $\Delta 2$ -TGZ, induit l'apoptose de cellules leucémiques SD1 et BV173 en activant les caspases 9 et 8 et cet effet est bloqué par un inhibiteur de caspases Z-VAD-FMK (Liu H., *et al.* 2006). Ce ligand est aussi capable d'augmenter l'activité des caspases 8 et 9 des cellules leucémiques KU812 (Zang C., *et al.* 2006). De même, la TGZ induit le clivage des caspases 9, 8 et 3 ainsi que de PARP dans deux lignées cancéreuses de vessie T24 et RT4. Des inhibiteurs spécifiques des caspases 8 (Z-IETD-FMK) et 9 (Z-LEHD-FMK) bloquent l'apoptose induite par la TGZ (Plissonnier ML., *et al.* 2010). Des résultats similaires ont été décrits dans les cellules T24 après un traitement avec la CGZ (Plissonnier ML., *et al.* 2011). Dans des lignées de carcinomes rénaux, la TGZ augmente l'activité de la caspase 3 et diminue la viabilité cellulaire. Cet effet sur la prolifération est partiellement bloqué par le Z-VAD-FMK dans les cellules de carcinomes rénaux 786-O (Fujita M., *et al.* 2011). La majorité des études montrent que la RGZ n'induit pas l'apoptose comme par exemple dans des lignées de cancers pulmonaires, de vessie et de prostate (Zou W., *et al.* 2007 ; Plissonnier ML., *et al.* 2010 ; Shiau CW., *et al.* 2005). Néanmoins, la RGZ peut avoir un effet en association avec le ligand TRAIL. En effet, un co-traitement des cellules cancéreuses de vessie T24 et RT4 conduit à une fragmentation nucléaire accompagnée par le clivage de la caspase 3 et de PARP. Ces clivages sont aussi observés avec l'inhibiteur de PPAR γ GW9662, ce qui signifie une action PPAR γ -indépendante. L'action synergique sur l'apoptose induite par les co-traitements ligands de PPAR γ et TRAIL augmente de manière significative le clivage des caspases. Effectivement, dans des lignées de carcinomes pulmonaires, le clivage des caspases 8, 3 et 9 est faiblement détectable en présence uniquement de TGZ, CGZ ou TRAIL mais est fortement induit par un co-traitement (Zou W., *et al.* 2007). De même, dans des cellules de neuroblastomes, l'activité de la caspase 3 et le clivage des caspase 3 et 8 n'est pas induite par la TGZ seule, mais par un co-traitement avec TRAIL (Schultze K., *et al.* 2006). La 15d-PGJ2 combinée à TRAIL induit aussi le clivage des caspases 8, 10, 3 et de Bid dans les cellules cancéreuses de prostate PC3 et ce clivage et l'apoptose sont bloqués par un inhibiteur de caspases Z-VAD-FMK (Nakata S., *et al.* 2006). Dans des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435, un co-traitement avec la TGZ et TRAIL active également les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose puisqu'un clivage des caspases 8, 3 et de Bid est observé (Lu M., *et al.* 2005). Par contre, dans des cellules cancéreuses de vessie, un co-traitement RGZ et TRAIL ne touche que la voie extrinsèque puisqu'il ne clive pas les caspase 9 et Bid (Plissonnier ML. *et al.* 2010).

Les ligands de PPAR γ activent la voie extrinsèque de l'apoptose en induisant l'expression de DR5, le récepteur de TRAIL. En effet, la 15d-PGJ2 induit l'expression de DR5 en augmentant la stabilité de ces transcrits dans des cellules leucémiques de Jurkat et cancéreuses de prostate PC3 (Nakata S., *et al.* 2006). De même, la TGZ et la CGZ induisent l'expression de DR5 dans des cellules cancéreuses pulmonaires A549 (Zou W., *et al.* 2007) et la TGZ dans des cellules de neuroblastomes et cancéreuses de vessie (Schultze K., *et al.* 2006 ; Plissonnier ML., *et al.* 2010). Des résultats similaires ont été décrits avec la RGZ dans différentes lignées cancéreuses rénales (cellules Caki), de colon (HCT116), de prostate (PC3) et de sein (MDA-MB-231) (Kim YH., *et al.* 2008). L'augmentation de l'expression de ce récepteur à la surface permet de sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par son ligand TRAIL. En effet, le traitement combiné de TRAIL avec la 15d-PGJ2 augmente de manière synergique l'apoptose des cellules de Jurkat et PC3 et n'a aucun effet sur une lignée mononucléaire sanguine normale où l'induction de l'expression de DR5 n'est pas observée (Nakata S., *et al.* 2006). Il en est de même pour les cellules de neuroblastomes avec la TGZ et de carcinomes pulmonaires pour la CGZ et la TGZ (Zou W., *et al.* 2007 ; Schultze K., *et al.* 2006, Plissonnier ML., *et al.* 2010). L'induction de DR5 joue un rôle essentiel dans l'augmentation de la sensibilité des cellules à TRAIL puisqu'une interférence ARN DR5 atténue la réponse apoptotique induite par un co-traitement (Nakata S., *et al.* 2006 ; Zou W., *et al.* 2007). Ceci est confirmé par l'utilisation d'un récepteur chimérique DR5/Fc qui montre que l'induction de l'apoptose par un co-traitement TRAIL et 15d-PGJ2 nécessite une interaction entre TRAIL et son récepteur DR5 (Nakata S., *et al.* 2006). Dans des cellules cancéreuses de vessie, l'inactivation des récepteurs membranaires par des anticorps anti-DR5 bloque l'apoptose induite par un co-traitement TGZ et TRAIL. (Plissonnier ML., *et al.* 2010). Des résultats similaires ont été observés avec un co-traitement TRAIL et CGZ sur les cellules cancéreuses de vessie T24, résistantes à TRAIL. (Plissonnier ML., *et al.* 2011).

Les ligands de PPAR γ et leurs analogues inactifs induisent également l'apoptose en modulant l'expression des inhibiteurs de caspases comme c-FLIP ou survivin. Par exemple, le triterpénoïde, CDDO induit l'ubiquitination et la dégradation de la protéine c-FLIP par le protéasome (Kim Y., *et al.* 2002). De même, dans des cellules cancéreuses de vessie, la TGZ et la CGZ induisent la dégradation protéasome dépendante des protéines c-FLIP et survivin puisque leur niveau est restauré par un inhibiteur du protéasome MG132 (Plissonnier ML., *et al.* 2010 ; Plissonnier ML., *et al.* 2011). L'augmentation du niveau des protéines c-FLIP et survivin par le MG132 atténue l'effet apoptotique induit par le co-traitement CGZ et TRAIL. Dans les cellules de neuroblastomes, la TGZ diminue le niveau des protéines c-FLIP et survivin en parallèle de l'induction de DR5 ce qui sensibilise ces cellules à TRAIL (Schultze K., *et al.* 2006). Il en est de même dans des cellules de carcinomes pulmonaires où les ligands de PPAR γ diminuent le niveau de c-FLIP et induisent DR5 ce qui permet d'augmenter la

sensibilisation des cellules à TRAIL (Zou W., *et al.* 2007). Dans des cellules de carcinomes mammaires, la TGZ n'agit pas sur c-FLIP mais diminue le niveau de survivin (Lu M., *et al.* 2005).

Les ligands de PPAR γ modifient également le niveau d'expression des protéines pro et anti-apoptotiques. En effet, le composé TZD18 augmente l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax tandis que le niveau de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 n'est pas modifié dans des cellules leucémiques (Liu H., *et al.*, 2006 ; Zang C., *et al.* 2006). De même, la TGZ augmente le ratio de protéines pro-apoptotiques Bax par rapport aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 dans des cellules de carcinomes rénaux 786-O, Caki-2 et ACHN (Fujita M., *et al.* 2011). Dans des cellules de gliomes, la TGZ diminue l'expression de la protéine Bcl-2 de manière PPAR γ -indépendante et augmente l'expression de Bax *via* la phosphorylation de p53 par un mécanisme PPAR γ -dépendant. Ceci conduit à l'activation de la voie mitochondriale et à l'apoptose des cellules. De plus, la voie extrinsèque est également activée *via* une activation de la caspase 8 induite par une diminution de la protéine c-FLIP (Akasaki Y., *et al.* 2006). Dans des cellules de carcinome de prostate, le niveau d'expression des protéines Bcl-2, Bcl-XI et Bak n'est pas modifié mais les composés TGZ, CGZ et leurs dérivés $\Delta 2$ inhibent les interactions entre les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XI et la protéine pro-apoptotique Bak ce qui conduit à l'activation de la caspase 9 (Shiau CW *et al.*, 2005).

Le potentiel mitochondrial peut être modifié par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, la 15d-PGJ2 induit l'apoptose de cellules d'adénocarcinomes pulmonaires A549 par la formation rapide de ROS, niveau maximum après 4 heures de traitement. Le traitement avec un antioxydant, la quercétin, bloque l'effet pro-apoptotique de la 15d-PGJ2 (Wang JJ. & Mak OT. 2011). Une étude a montré que la RGZ induit la formation de ROS (Reactive Oxygen Species) et ces derniers sont capables d'induire l'activité transcriptionnelle du promoteur DR5. Le glutathion (GSH), un antioxydant, bloque l'induction de DR5 par la RGZ (Kim YH., *et al.* 2008). Un traitement combiné de la TGZ avec l'hereguline induit en partie l'apoptose des cellules MCF-7 par une modification du potentiel mitochondrial et la production de ROS. La N-acetylcystéine (NAC) protège les cellules de l'apoptose induite par le co-traitement (Park BH., *et al.* 2011). Récemment, il a été caractérisé une protéine mitochondriale MitoNETT capable de fixer certaines TZD dont la RGZ et la PGZ. Cette protéine dont le rôle n'est pas précisément connu pourrait être impliquée dans la régulation du système redox et le transport d'électrons. Elle est de plus évoquée comme cible des effets PPAR γ -indépendants des TZD sur le stress oxydant (Colca JR., *et al.* 2004, Bieganski RM. & Yarmush ML. 2011).

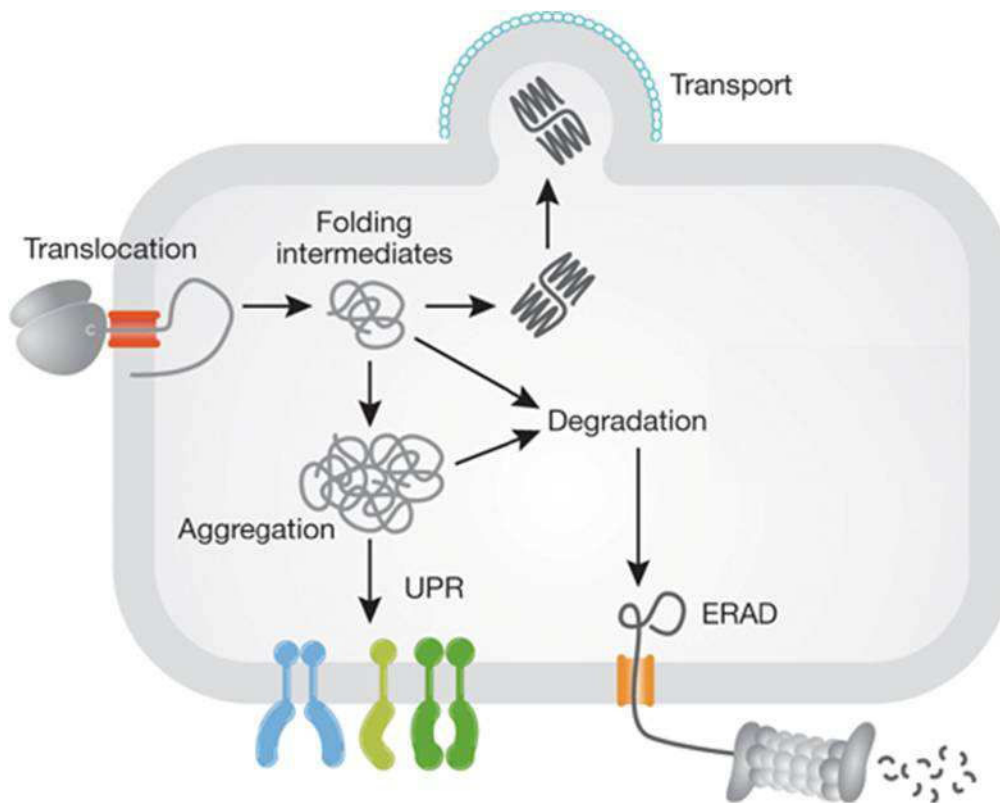


Figure 26 : Contrôle de la synthèse protéique au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les protéines nouvellement synthétisées qui possèdent une séquence de signal d'adressage au RE sont transloquées dans la lumière du RE afin d'être repliées avant d'être dirigées vers l'appareil de Golgi. Lorsque la conformation est incorrecte, les protéines peuvent s'accumuler dans le RE et devenir toxiques pour la cellule. Dans ce cas, les protéines sont prises en charge par les protéines chaperonnes, soit pour acquérir une nouvelle conformation, soit pour être dirigées vers le protéasome afin d'être dégradées par le système ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation). Lorsque le système est saturé, les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE ce qui déclenche un stress du RE : c'est la réponse UPR (Unfolded Protein Response). Modifié d'après Cyr DM. & Hebert DN. 2009.

III. Effets PPAR γ -indépendants des TZD sur le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organe où se produit la synthèse de la majorité des protéines sécrétées et membranaires. Il intervient également dans le début de la maturation des protéines qui se poursuit dans l'appareil de Golgi. Au cours de leur traduction, les protéines concernées possèdent une séquence signal d'adressage au RE qui leur permet de pénétrer dans la lumière du réticulum endoplasmique où elles vont être repliées avant d'être dirigées vers l'appareil de Golgi. Le bon repliement des protéines au sein du réticulum endoplasmique est contrôlé par des protéines chaperonnes comme BiP/GRP78 et GRP94 (BiP pour Immunoglobulin-Binding Protein ; GRP pour Glucose-Regulated Protein). Ces dernières interagissent avec les segments hydrophobes des protéines en cours de synthèse et préviennent les erreurs de repliement. Lorsque la conformation est incorrecte, les protéines sont retenues dans le RE et sont soit prises en charge par les protéines chaperonnes pour acquérir une nouvelle conformation, soit transportées dans le cytoplasme et dirigées vers le système ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) afin qu'elles soient dégradées par le protéasome. Lorsque la quantité de protéines mal conformées augmente, les protéines chaperonnes et le système de dégradation sont saturés et les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE. Ceci déclenche un « Stress du Réticulum Endoplasmique » (SRE) qui correspond à des systèmes de protection mis en place afin d'éliminer ces protéines incorrectes : c'est la réponse UPR (Unfolded Protein Response) (**Figure 26**). Différents facteurs peuvent contribuer au déclenchement d'un stress du RE comme un stress oxydant, une altération de l'homéostasie calcique, une demande soutenue de sécrétion protéique dans les cellules endocrines. En effet, ces stress ont des répercussions sur le repliement correct des protéines résultant en l'accumulation et l'agrégation de protéines mal conformées ce qui déclenche une réponse adaptative nommée UPR (Ron D. & Walter P. 2007 ; Shore GC., *et al.* 2011). Cette dernière repose sur l'activation de trois récepteurs ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique : PERK (Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1). Ces récepteurs ou senseurs détectent la présence de protéines mal repliées et induisent la voie de signalisation UPR (**Figure 27**). Ce système permet tout d'abord d'augmenter les capacités de la cellule à éliminer les protéines incorrectes par deux mécanismes : la répression rapide de la synthèse protéique afin d'éviter un afflux de nouvelles protéines dans le RE et une augmentation des capacités du RE par une biogenèse du RE et l'induction de la transcription de gènes codant les protéines chaperonnes et les protéines du système de dégradation ERAD. Si la réponse adaptative ne permet pas à la cellule de retrouver l'homéostasie protéique, une mort cellulaire par apoptose est déclenchée (Ron D. & Walter P. 2007).

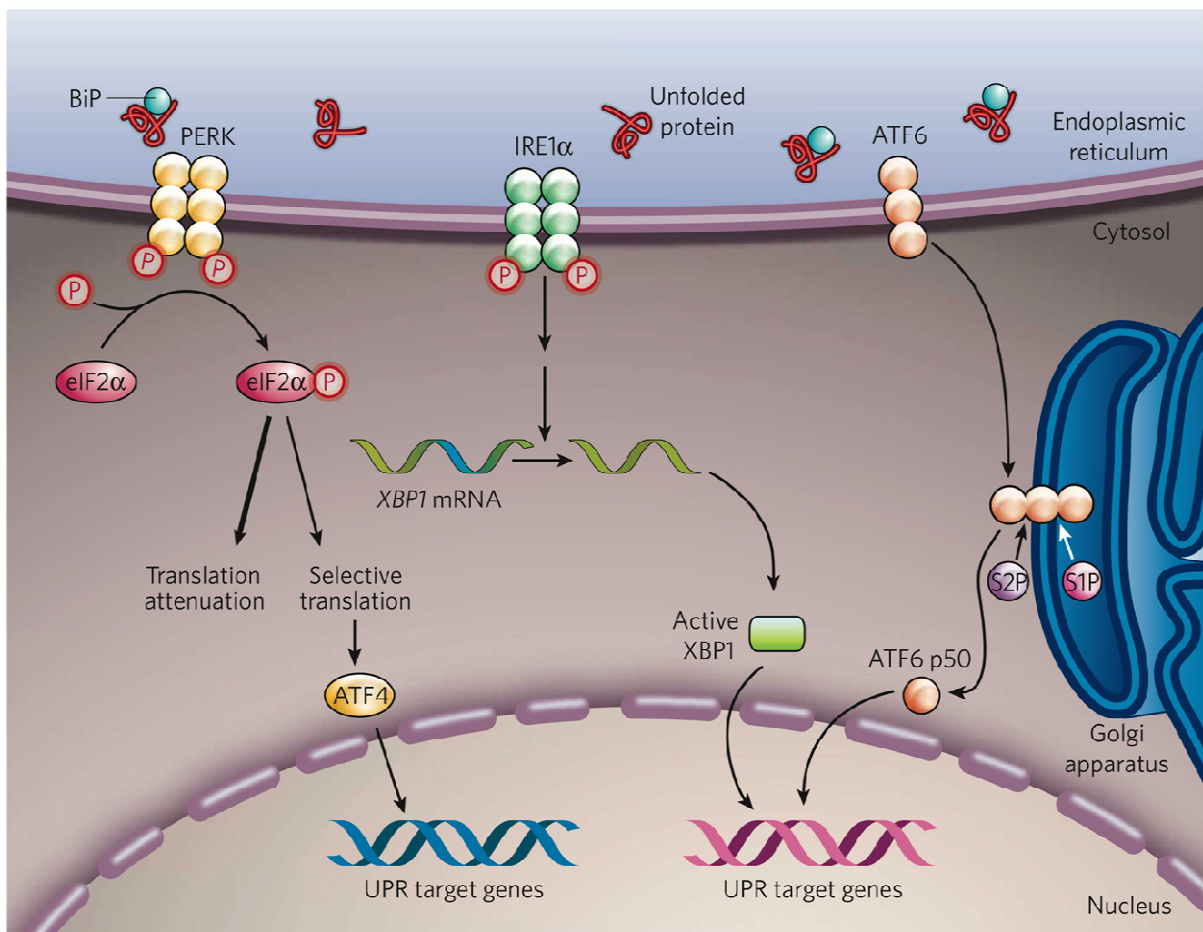


Figure 27 : voie de signalisation UPR. La voie UPR peut être activée par trois récepteurs présents au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique: PERK (Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1). Lors d'un stress du réticulum endoplasmique, les protéines mal conformées s'accumulent et sont prises en charge par les protéines chaperonnes BiP/GRP78 (Immunoglobulin-Binding Protein/Glucose-Regulated Protein 78) qui libèrent et activent les récepteurs. Le récepteur PERK s'autophosphoryle puis phosphoryle la sous-unité alpha du facteur de la traduction eIF2 (eukaryotic Inhibition Factor 2). Cette phosphorylation inhibe la synthèse protéique ce qui limite l'accumulation de nouvelles protéines mal conformées dans le RE. Certaines protéines comme ATF4 (Activated Trans Factor 4) sont synthétisées. Cette dernière joue un rôle dans la transcription de gènes cibles impliqués dans la réponse UPR. IRE1, activé par sa libération de BIP, s'autophosphoryle et clive l'ARN messager de XBP1 (X-box Binding Protein-1). La protéine produite est un facteur de transcription très actif qui régule de nombreux gènes cibles de la voie UPR. ATF6, libéré par les protéines chaperonnes BIP, est transloqué et clivé au niveau de l'appareil de Golgi par deux protéases, S1P et S2P. La protéine clivée, ATF6p50, est un facteur de transcription et active la transcription de gènes cibles de la voie UPR. D'après Zang K. & Kaufman RJ. 2008.

1. Voies de signalisation UPR

La réponse UPR consiste en l'activation de trois voies de signalisation *via* les trois récepteurs ou senseurs membranaires : PERK, IRE1 et ATF6. Dans les conditions physiologiques normales, la partie luminaire de ces trois protéines senseurs sont couplées à la protéine chaperonne BiP. Lors d'un stress du RE, la protéine BiP se lie aux protéines mal conformées ce qui libère et active les trois senseurs qui vont réguler le retour à l'homéostasie du RE par deux mécanismes : l'inhibition de la traduction *via* la voie PERK et l'activation de la transcription de gènes cibles de la voie UPR et ERAD *via* les voies IRE1 et ATF6 (Ron D. & Walter P. 2007). Par ailleurs, IRE1, PERK et ATF6 peuvent également interagir directement avec les protéines mal repliées (**Figure 27**) (Ron D. & Walter P. 2007).

a. Inhibition de la traduction *via* la voie PERK

PERK est une protéine kinase impliquée dans l'inhibition rapide et transitoire de la traduction ce qui permet de limiter l'afflux de nouvelles protéines dans le RE. Au cours d'un stress du RE, PERK est libéré de la protéine chaperonne BiP, qui lie les protéines mal repliées, ce qui induit sa dimérisation et son activation par auto-phosphorylation (**Figure 27**). PERK est une kinase, qui une fois activée, phosphoryle la sous-unité alpha du facteur de la traduction eIF2 (eukaryotic Inhibition Factor 2) sur le résidu sérine 51 (Ron D. & Walter P. 2007). Cette phosphorylation empêche la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et donc inhibe directement la synthèse protéique ce qui permet au RE et au système ERAD de prendre en charge les protéines mal conformées (Harding HP., *et al.* 1999). Néanmoins, eIF2 α ne bloque pas la traduction de certaines protéines telles qu'ATF4 (Activated Trans Factor 4) qui active des gènes impliqués dans la survie cellulaire et permet d'augmenter la biosynthèse, le transport des acides aminés et de lutter contre l'apparition d'un stress oxydant (Vattem KM. & Wek RC. 2004 ; Harding HP. *et al.*, 2003). ATF4 peut également activer l'expression de CHOP (C/EBP HOMologous Protein, aussi connu sous le nom de GADD153) (Ma Y., *et al.* 2002). Cette dernière joue un rôle dans le déclenchement de l'apoptose, dernière étape de la voie UPR, lorsque la cellule n'arrive pas à s'adapter. CHOP active l'expression de GADD34 (Growth Arrest and DNA-damage-inducible protein 34), une phosphatase qui forme un complexe avec la protéine PP1 (Protéine Phosphatase 1) et induit la déphosphorylation de eIF2 α (Novoa I., *et al.* 2001) (**Figure 28**). Cette boucle de rétrocontrôle permet de restaurer un taux de traduction normal ce qui est essentiel pour permettre l'expression des gènes cibles de la voie UPR (Novoa I. *et al.*, 2003).

b. Activation de la transcription de gènes cibles de la voie UPR *via* IRE1 et ATF6

➤ IRE1

Cette protéine contient un domaine cytosolique C-terminal qui possède deux activités enzymatiques, sérine/thréonine kinase et endo-ribonucléase (Shore GC., *et al.* 2011). Chez les mammifères, IRE existe sous deux formes IRE α qui est ubiquitaire et IRE β qui est spécifique de l'épithélium digestif. Lorsque des protéines mal repliées sont produites dans le RE, elles sont reconnues et liées par la protéine chaperonne BiP, ce qui libère IRE1 et permet sa dimérisation. Ceci stimule son activité kinase et conduit à son auto-phosphorylation en *trans* (**Figure 27**). Lorsqu'IRE1 est phosphorylé, il possède une activité endo-ribonucléasique qui contrôle le clivage de l'ARN messager de XBP1 (X-box Binding Protein 1) qui devient plus court de 26 nucléotides (Lee K., *et al.* 2002 ; Yoshida H., *et al.* 2001). Ce nouveau transcrit est traduit en un facteur de transcription XBP1 qui est capable d'activer la transcription de gènes cibles de la voie UPR en se fixant à des éléments de réponse ERSE (Elément de Réponse au Stress du réticulum Endoplasmique) (Yamamoto K., *et al.* 2007). Le clivage de l'intron de 26 nucléotides de XBP1 change le cadre de lecture et forme un domaine très actif de transactivation de la transcription (Shore GC., *et al.* 2011). Lorsque la quantité de protéines mal conformées diminue, l'ARNm de XBP1 n'est plus épissé et la forme immature est traduite ce qui réprime les gènes de la voie UPR (Yoshida H., *et al.* 2006). Par ailleurs, En plus de son activité RNase spécifique sur XBP1, IRE1 est impliqué dans un processus nommé RIDD (Regulated IRE1-Dependent Decay) qui consiste en la dégradation de plusieurs ARN messagers ce qui permet de limiter la synthèse de nouvelles protéines et ainsi de diminuer le stress du RE (Hollien J. & Weissman JS. 2006).

➤ ATF6

ATF6 est un facteur de transcription qui contient un motif basique leucine zipper dans la partie N-terminale cytosolique et possède deux séquences de localisation à l'appareil de Golgi qui sont masquées par la protéine chaperonne BiP (Shen J., *et al.* 2002). ATF6 est exprimé de manière constitutive sous forme d'un précurseur inactif de 90kDa lié à la membrane du RE par un domaine transmembranaire (**Figure 27**). Lors d'un stress du RE, ATF6 est dissocié de la protéine BiP, puis est transloqué au niveau de l'appareil de Golgi où il est clivé par les protéases (Ye J., *et al.* 2000). Le facteur de transcription ATF6 ainsi libéré de 50 kDa migre vers le noyau et active la transcription de gènes cibles de la voie UPR en se fixant à des éléments de réponse ATF/cAMP ou ERSE (Ron D & Walter P. 2007).

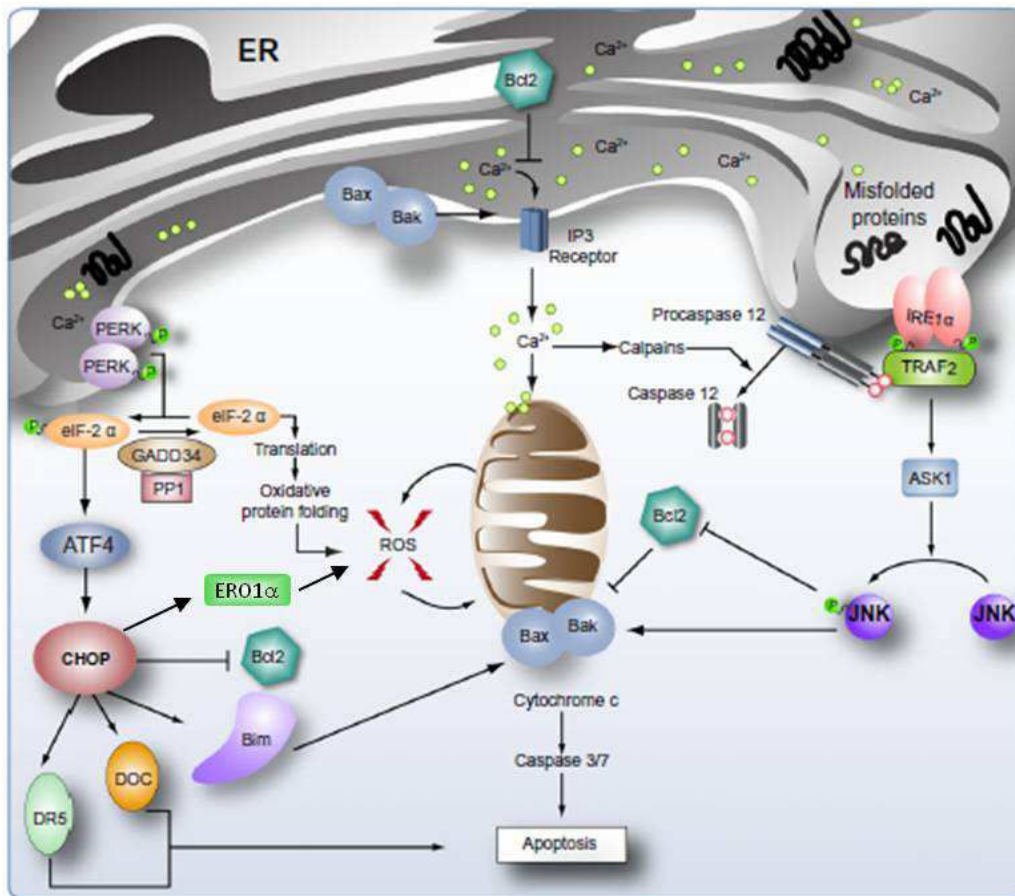


Figure 28 : Apoptose induite par un stress du RE prolongé. Trois voies majeures sont impliquées dans le déclenchement de l'apoptose lors d'un stress de RE prolongé. Lorsqu'IRE1 est phosphorylée, elle recrute la protéine adaptatrice TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2), conduit à la phosphorylation de la protéine ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) qui active ensuite la voie des JNK (c-Jun N-terminal Kinase). Les JNK activent les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bim et inhibe les membres anti-apoptotiques. TRAF2 peut également induire le recrutement et l'activation de la pro-caspase 12. Celle-ci peut également être clivée par les calpains activées par le calcium. L'activation du récepteur PERK conduit à l'expression de CHOP suite à la phosphorylation d'eIF2α et à l'expression d'ATF4. CHOP est un facteur de transcription qui diminue l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, induit l'expression de protéines pro-apoptotiques BH3-only comme Bim, augmente l'expression de DR5, induit d'autres gènes cibles regroupés sous le nom de Downstream Of CHOP (DOC). Il induit également la transcription d'ERO1α (ER Oxidation 1α) permettant l'oxydation de la lumière du RE *via* la formation de ROS. La dernière voie impliquée dans l'induction de l'apoptose est la voie calcique. En effet, lors d'un stress, Bak et Bax se dimérisent à la membrane du RE et induit un flux de calcium vers la mitochondrie. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 s'associent à IP3R (Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor) et diminuent son activité. L'ouverture des canaux IP3R est également induite par ERO1α. Modifié d'après Malhi H. & Kaufman RJ. 2011.

Les facteurs de transcription XBP1 et ATF6 peuvent s'hétérodimériser et activer la transcription de gènes cibles de la réponse UPR comme les protéines chaperonnes BiP ou GRP94, les protéines de la voie de dégradation ERAD mais aussi les enzymes impliquées dans la synthèse de composants lipidiques de la membrane du RE ce qui permet d'augmenter sa capacité (Yamamoto K., *et al.* 2007 ; Sriburi R., *et al.* 2004). XBP1 et ATF6 activent également l'expression de CHOP. Par ailleurs, Les deux voies IRE1 et ATF6 sont liées puisque ATF6 active la transcription de XBP1 (Yoshida H., *et al.* 2001).

L'activation de ces trois voies de signalisation est une réponse adaptative pour que la cellule retrouve son homéostasie protéique. Si la quantité de protéines mal conformées diminue, la réponse UPR s'atténue. Néanmoins, si le stress devient trop intense ou trop long, la cellule ne peut pas y faire face et la voie UPR induit l'apoptose. Cette induction de la mort cellulaire permet d'éliminer les cellules stressées (Tabas I. & Ron D. 2011).

2. Apoptose médiée par le stress du réticulum endoplasmique

L'apoptose peut être déclenchée par trois facteurs : JNK, CHOP ou la libération de calcium par le réticulum endoplasmique. Ils peuvent être induits par les différentes protéines senseurs de la voie UPR (**Figure 28**).

a. Apoptose induite par la voie de signalisation IRE1

Une activation prolongée du récepteur IRE1 et du système RIDD peut induire l'apoptose si le stress est trop intense. Dans ce cas, il dégrade des transcrits essentiels à la survie cellulaire, incluant XBP1 (Han D., *et al.* 2009). Par ailleurs, IRE1 interagit avec des protéines impliquées dans l'apoptose. En effet, Bax et Bak stabilisent IRE1 sous une forme active en créant un complexe protéique avec la partie cytosolique d'IRE1 ce qui potentialise son activité RNase (Hetz C., *et al.* 2006). Chez des souris double knock-out Bax et Bak, la trans-phosphorylation et la dimérisation d'IRE1 est bloquée et son association avec la protéine chaperonne BiP est stabilisée (Hetz C., *et al.* 2006). Lorsqu'IRE1 est phosphorylée, elle recrute la protéine adaptatrice TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) et conduit à la phosphorylation de la protéine ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1). Ce complexe active ensuite la voie des JNK (Urano F., *et al.* 2000). Cette kinase est impliquée dans la voie apoptotique : elle active les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bim et inhibe les membres anti-apoptotiques (Bogoyevitch MA. & Kobe B. 2006, Lei K. & Davis RJ. 2003). ASK1 interagit avec la protéine AIP1 (ASK1 Interacting Protein 1) qui joue un rôle important dans l'activation de la voie IRE1/JNK (Luo D., *et al.* 2008). Des souris déficientes pour AIP1 sont résistantes

à l'apoptose induite par la voie IRE1/JNK. Une étude récente suggère aussi que la voie IRE1/JNK peut aussi être activée par les protéines BH3-only Bim et PUMA (p53 Upregulated Mediator of Apoptosis) (Klee M., *et al.* 2009). BI-1 (Bax Inhibitor 1) aussi nommée TMBIM (TransMembrane Bax Inhibitor Motif containing) est un régulateur négatif d'IRE1 et inhibe l'apoptose (Lisbonna F., *et al.* 2009). IRE1 retrouve son état inactif en interagissant avec BI-1 et la protéine chaperonne BiP.

Dans certains cas, la caspase 12 est activée lors d'une apoptose induite par un stress du RE. Chez la souris, le complexe IRE1-TRAF2 induit le recrutement et l'activation de la pro-caspase 12 (Yoneda T., *et al.* 2001). La caspase 12 peut aussi être activée par la calpaïne, une protéase sensible à la libération de calcium dans le cytoplasme. Néanmoins, peu de données sont disponibles sur l'activation de la caspase 12 par la voie UPR. La caspase 12 ne jouerait qu'un rôle amplificateur de l'apoptose après son activation par la caspase 9. De plus, chez l'Homme, la caspase 12 présente des mutations et la protéine n'est pas fonctionnelle dans la majorité de la population (Fisher H., *et al.* 2002 ; Xue Y., *et al.* 2006).

b. Apoptose induite par CHOP

CHOP est un facteur de transcription qui est induit par ATF4, XBP1 et ATF6 dont la voie pro-apoptotique est la mieux caractérisée. Des souris déficientes pour CHOP sont protégées de l'apoptose induite par un stress du RE (Zinszner H., *et al.* 1998). De même, dans des modèles murins de diabète, la délétion de CHOP dans les cellules pancréatiques β les protègent de l'apoptose (Oyadomari S., *et al.* 2002).

CHOP induit l'apoptose en activant différentes voies.

CHOP est connu pour diminuer l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (McCullough KD., *et al.* 2001). Ceci a été démontré *in vivo* sur des modèles de cardiomyocytes de souris où l'expression de Bcl-2 ne diminue pas chez les souris délétées pour CHOP lors d'un stress de RE (Fu HY., *et al.* 2010). Par ailleurs, CHOP induit l'expression de protéines pro-apoptotiques BH3-only comme Bim (Puthalakath H., *et al.* 2007) ou PUMA (Cazanave SC., *et al.* 2010). L'activation des protéines BH3-only, Bim et PUMA conduit à la dimérisation de Bax et Bak à la mitochondrie, à la libération du cytochrome c et à l'apoptose caspase-dépendante (**Figure 28**). La protéine NOXA intervient également dans cette activation, elle est induite lors d'un stress du RE par les deux voies ATF4 et p53, indépendamment de CHOP et IRE1 (Li J., *et al.* 2006 ; Armstrong JL., *et al.* 2010). Par ailleurs, la voie intrinsèque de l'apoptose est aussi induite par Bid : lors d'un stress du RE, la caspase 2 est activée ce qui conduit au clivage de Bid (Upton JP., *et al.* 2008). Cependant le mécanisme d'activation de la

caspase 2 par la voie UPR n'est pas encore élucidé. La voie extrinsèque de l'apoptose semble également être activée puisque CHOP augmente l'expression de DR5 dans des lignées cellulaires de carcinomes humains (Yamaguchi H & Wang HG. 2004).

D'autres gènes cibles de CHOP regroupés sous le nom de Downstream Of CHOP (DOC) sont induits lors d'un stress du RE (Malhi H & Kaufman RJ. 2011). Parmi eux, la carbonic anhydrase VI a été identifiée. Elle est impliquée dans l'acidification du cytoplasme, phénomène associé à l'apoptose (Wang XZ., *et al.* 1998).

CHOP induit également l'apoptose par un stress oxydatif. Il induit une oxydation de la lumière du RE par l'induction de la transcription d'ERO1 α (ER Oxidation 1 α) (Marciniak SJ., *et al.* 2004). Ceci conduit au relargage de H₂O₂ dans le cytoplasme et induit la formation de ROS. Ce stress oxydant induit la mort cellulaire. Dans des cellules β de pancréas, la délétion de CHOP bloque l'apoptose et cet effet est associé à la diminution de l'expression d'ERO1 α et la suppression du stress oxydatif (Song B., *et al.* 2008). ERO1 α induit également la production de ROS par la voie de signalisation calcique. Dans les macrophages, CHOP induit l'apoptose par l'induction d'ERO1 α et la libération de calcium à partir du RE (Li G., *et al.* 2009). Les auteurs ont montré que la protéine ERO1 α stimule les canaux IP3R (Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor), essentiels pour le relargage du calcium du RE. CHOP active également la kinase CaMKII (Calcium/calModulin-dependent protein Kinase II), qui est sensible à la présence de calcium dans le cytoplasme et induit l'apoptose (Tabas I. & Ron D. 2011). La voie CHOP-ERO1 α -IP3R-CaMKII induit l'expression de la NADPH oxydase et la production de ROS. La NADPH oxydase active à son tour PERK et donc amplifie le signal CHOP (Li G., *et al.* 2010). La voie CHOP-CaMKII active aussi JNK, une voie essentielle dans l'apoptose induite lors d'un stress du RE (Tabas I. & Ron D. 2011).

c. Apoptose induite par la voie de signalisation calcique

Le flux de calcium intracellulaire peut aussi être à l'origine de la production de ROS par la mitochondrie et engendrer l'apoptose (Peng TI & Jou MJ. 2010). En effet, une majorité des canaux IP3R forment des liens entre les citernes du RE et les mitochondries et régulent le transfert d'ions calcium entre les deux compartiments (Csordas G., *et al.* 2010 ; Rizzuto R., *et al.* 2009). Dans un cas de stress intense, l'entrée massive d'ions calcium dans la mitochondrie conduit à la mort cellulaire d'une manière caspase-dépendante et indépendante (Rizzuto R., *et al.* 2009). Dans la voie caspase-dépendante, l'entrée de calcium dans la mitochondrie modifie le potentiel mitochondrial et conduit au relargage du cytochrome c.

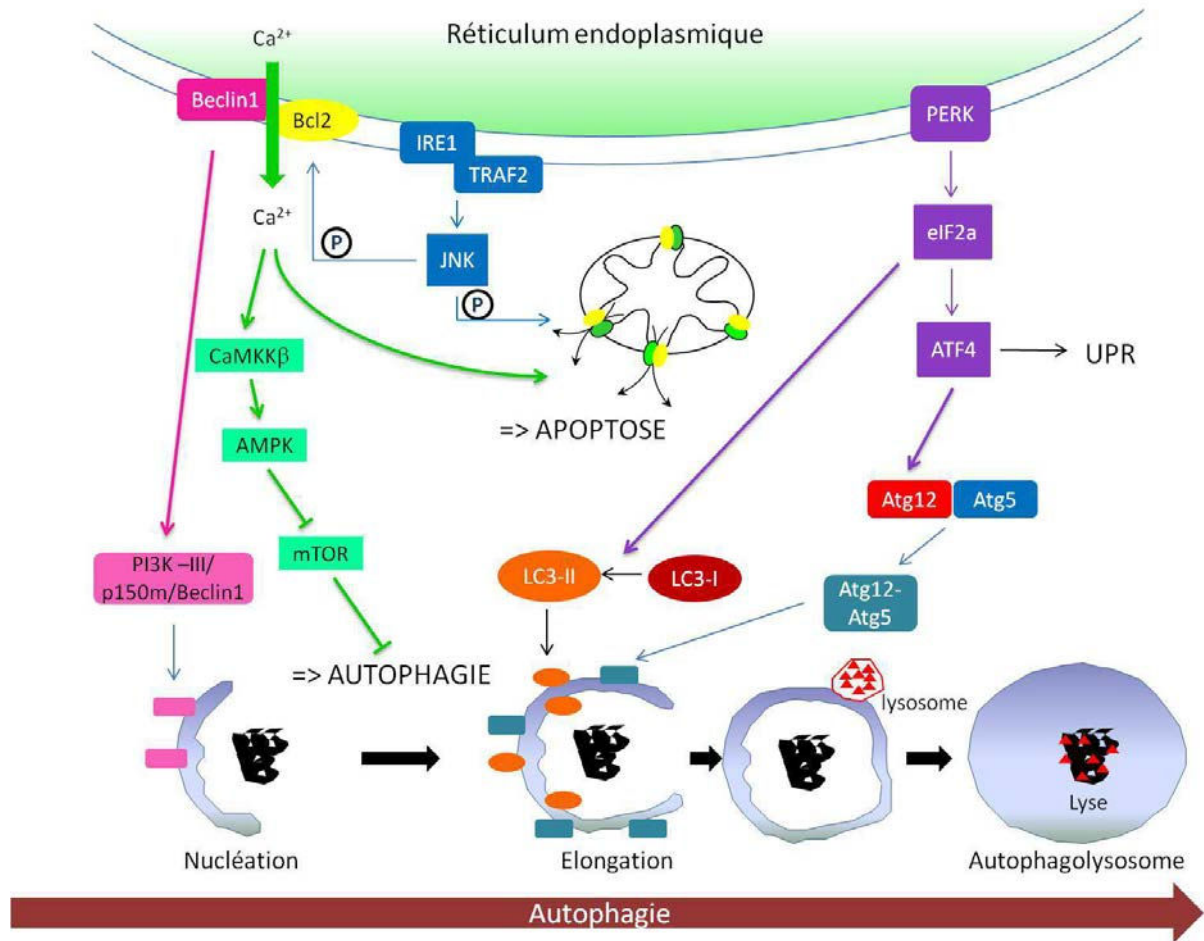


Figure 29 : Relation entre stress du RE, apoptose et autophagie. L'autophagie est un processus comprenant plusieurs étapes. L'étape de nucléation initiale consiste à la formation de la membrane primaire de l'autophagosome ce qui nécessite un complexe kinase composé de la PI3K-III (phosphatidylinositol 3-kinase de classe III), de la protéine kinase p150 myristylée et de la Beclin1. L'étape d'élongation de la membrane et de formation d'un autophagosome est contrôlée par deux systèmes de conjugaison ubiquitin-like : la conversion de protéine LC3 (Light Chain 3), la forme libre LC3-I se convertit en une forme conjuguée à des lipides LC3-II qui se lie à la membrane, et Atg5-Atg12. L'autophagosome fusionne ensuite avec les lysosomes formant ainsi un autolysosome dans lequel les composants intracellulaires sont dégradés. Le déclenchement d'un stress du RE induit l'autophagie à plusieurs niveaux. Lors d'un stress du RE, IRE1/TRAF2 active JNK qui phosphoryle Bcl-2. La phosphorylation des protéines Bcl-2 situées au niveau de la mitochondrie inhibe leur activité anti-apoptotique ce qui provoque l'apoptose. La phosphorylation des protéines Bcl-2 situées au niveau du RE inhibe son interaction avec la protéine Beclin1 ce qui induit la libération de calcium intracellulaire. Ceci cause à la fois la déstabilisation de la membrane mitochondriale, par conséquent l'apoptose, ainsi que l'activation de l'AMPK, *via* la CaMKK β (Ca²⁺/calModulin-dependent Kinase β), ce qui va inhiber mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), un inhibiteur de l'autophagie. La protéine Beclin1 libérée participe à la formation du complexe PI3KIII/p150m/Becline1. L'autre lien avec l'autophagie provient de PERK qui favorise à la fois la conversion de LC3-I en LC3-II et la formation d'Atg12-Atg5 en stimulant l'expression d'Atg12.

La balance entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques à la membrane du RE régule le flux du calcium. En effet, les protéines pro-apoptotiques, Bax et Bak peuvent se dimériser à la membrane du RE lors d'un stress (Zong WX., *et al.* 2003). Les pores ainsi formés augmentent la perméabilité de la membrane du RE (Wang X., *et al.* 2011 ; Scorrano L., *et al.* 2003). Différentes protéines BH3-only sont aussi localisées dans la membrane du RE lors d'un stress et modifient l'homéostasie calcique. Par exemple, lors d'un stress, BIK contrôle la dimérisation de Bak à la membrane du RE et induit un flux de calcium vers la mitochondrie (Mathai JP., *et al.* 2005). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) et Bcl-Xl s'associent à IP3R et diminuent son activité (Eckenrode EF., *et al.* 2010 ; Oakes SA., *et al.* 2005). La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 réduit le calcium libre dans le RE et l'apoptose (Foyouzi-Youssefi R., *et al.* 2000). La phosphorylation de Bcl-2 par JNK, inhibe son activité anti-apoptotique et sa capacité à contrôler le flux de calcium (Oakes SA., *et al.* 2006 ; Bassik MC., *et al.* 2004).

En conclusion, les différentes voies UPR sont complémentaires, elles peuvent induire différentes étapes ou voies de l'apoptose ou amplifier la réponse apoptotique. En effet, la plupart des études qui bloque une des trois voies de signalisation UPR ne conduit qu'à une inhibition partielle de l'apoptose.

3. Stress du réticulum endoplasmique et autophagie

Le stress du RE peut conduire à l'autophagie qui est un processus par lequel les composants intracellulaires sont recyclés *via* une dégradation lysosomique (Høyer-Hansen M. & Jäättelä M. 2007). Lorsque la capacité du système de dégradation ERAD est surchargée, l'autophagie permet d'éliminer les protéines mal conformées et joue un rôle protecteur en empêchant l'accumulation de ces protéines dans le RE (Ogata M., *et al.* 2006). Néanmoins, lorsque le stress est prolongé, il peut induire une mort cellulaire par autophagie (**Figure 29**).

L'autophagie est un processus comprenant plusieurs étapes qui sont contrôlées par une famille de protéines conservées Atg (Autophagic related proteins). La nucléation initiale et la formation de la membrane primaire de l'autophagosome nécessite un complexe kinase composé de la PI3K-III (phosphatidylinositol 3-kinase de classe III), de la protéine kinase p150 myristylée et de la Beclin1 ou Atg6. L'élongation de la membrane isolée pour permettre la formation d'un autophagosome est contrôlée par deux systèmes de conjugaison ubiquitin-like : Atg8-PE (LC3II) et Atg5-Atg12. Le premier consiste en la conversion de protéine LC3 (Light Chain 3) aussi nommée Atg8 : la forme libre LC3-I se convertit en une forme conjuguée à des lipides LC3-II qui se lie à la membrane. L'accumulation de LC3-II et sa localisation dans des structures vésiculaires est communément utilisé comme marqueur d'autophagie. L'autophagosome fusionne ensuite avec les lysosomes formant ainsi un autolysosome

dans lequel les composants intracellulaires sont dégradés. L'autophagie est inhibée par un complexe mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) qui est composé d'une kinase sérine/thréonine mTOR, d'une protéine partenaire régulatrice raptor et de mLST8 (Lethal with Sec Thirteen 8).

Les données récentes de la littérature montrent que le stress du RE peut induire l'autophagie. L'autophagie permettrait ainsi de maintenir la fonction du RE en dégradant les protéines mal conformées limitant ainsi le stress du RE et l'apoptose. Les voies de signalisation PERK, IRE1 et le calcium intracellulaire peuvent induire l'autophagie lors d'un stress du RE. En effet, l'expression ectopique d'une répétition de polyglutamine (PolyQ72) induit l'expression d'Atg12 et l'autophagie (Kouroku Y., *et al.* 2007). Les auteurs ont montré que la voie PERK-eIF2 α est impliquée dans cette régulation. La phosphorylation d'eIF2 α est exigée pour la conversion de LC3, une étape essentielle pour l'induction de l'autophagie et ATF4 semble être impliqué dans l'induction de l'expression de la protéine Atg12. Récemment, une équipe a montré que des cellules déficientes en caspase 3/7 et donc résistantes à l'apoptose sont plus sensibles à une radiation qui active la voie PERK et induit l'autophagie (Kim KW., *et al.* 2010). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 qui sont déficientes en caspase 3 et résistantes à la radiation, la tunicamycine induit un stress du RE et de l'autophagie ce qui rend les cellules plus sensibles à la radiation (Kim KW., *et al.* 2010). Certains auteurs suggèrent que la voie IRE1 plutôt que la voie PERK est impliquée dans l'induction de l'autophagie (Ogata M., *et al.* 2006). En utilisant des MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) déficients pour IRE1, les auteurs ont montré que la thapsigargine n'induit plus d'accumulation de vésicules LC3 dans ces cellules. Ce processus est également inhibé dans des cellules n'exprimant pas TRAF2 ou avec un inhibiteur pharmacologique JNK montrant que la voie IRE1-TRAF2-JNK est essentielle pour l'induction de l'autophagie (Ogata M., *et al.* 2006). L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire cytoplasmique active également l'autophagie. Cette autophagie dépendante du calcium dépend de l'activation de la CaMKK β (Ca²⁺/calModulin-dependent Kinase Kinase β) par AMPK (Høyer-Hansen M. & Jäättelä M. 2007). AMPK déphosphoryle le complexe mTORC1 ce qui l'inhibe et induit l'autophagie. Les auteurs suggèrent que cette voie seule peut activer l'autophagie, indépendamment de la voie PERK et IRE1.

L'autophagie est bloquée par les protéines anti-apoptotique Bcl-2 et Bcl-XL qui régulent négativement la protéine Beclin1 par une liaison directe à la membrane du RE (Patingre S., *et al.* 2005). La formation du complexe Bcl-2/Beclin1 est régulée par les protéines BH3-only. En effet, des agents BH3 mimétiques inhibent l'interaction entre Beclin1 et Bcl-2 et stimulent l'autophagie (Maiuri MC., *et al.* 2007). Par ailleurs, la phosphorylation de Bcl-2 par JNK est essentielle dans le contrôle de l'autophagie (Wei Y., *et al.* 2008). Cette phosphorylation de Bcl-2, libère la Beclin1 et favorise la

formation de l'autophagosome. Bcl-2 bloque aussi l'autophagie induite par une augmentation du calcium intracellulaire (Høyer-Hansen M., *et al.* 2007). Dans ce cas, Bcl-2 inhibe le flux de calcium libéré après un stress du RE et bloque ainsi l'activation de CaMKK- β .

4. Effet des ligands sur le réticulum endoplasmique

Plusieurs études montrent que les ligands de PPAR γ peuvent induire un stress du réticulum endoplasmique. En effet, la 15d-PGJ2 induit l'expression de BiP dans des cellules Hela (Odani N., *et al.* 1996). De même, un analogue des prostaglandines GIF0010, est capable d'induire l'expression de BiP de manière plus forte que la 15d-PGJ2 dans des cellules rénales de rat. Cet analogue marqué avec une sonde fluorescente a permis de montrer que ce ligand s'accumule autour du noyau dès 12 heures de traitement et se co-localise avec BiP dans le RE (Takahashi S., *et al.* 1998). Dans des cellules cancéreuses de colon HCT116, un traitement avec 30 μ M de 15d-PGJ2 induit aussi l'expression de BiP (Su RY., *et al.* 2008). La TGZ et la CGZ induisent également un stress du RE : ils augmentent la libération de Ca²⁺ dans le cytoplasme et diminuent la synthèse protéique *via* la phosphorylation d'eIF2 α (Palakurthi SS., *et al.* 2001). Cet effet est PPAR γ -indépendant puisqu'il est similaire entre les cellules ES PPAR γ +/+ et PPAR γ -/-. Le stress du RE est également induit par la TGZ et la CGZ dans des cellules d'adénocarcinomes de poumon A549 où ils induisent la phosphorylation de PKR et d'eIF2 α (Gardner OS., *et al.* 2005). Dans des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, une analyse par microarray a montré que le ligand dual TZD18, à action PPAR α et PPAR γ indépendante, induit une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse UPR tels que BiP, XBP1, ATF3 et ATF4 (Zang C., *et al.* 2009). Les trois voies de signalisation UPR sont activées : ATF6, PERK et eIF2 α ainsi que le clivage de XBP1 uniquement détecté dans les cellules MDA-MB-231 (Zang C., *et al.* 2009). Dans une lignée cancéreuse de prostate LNCaP, les composés TGZ et CGZ induisent l'expression de BiP, CHOP et IRE1 α pour des doses de 100 μ M après 48 heures de traitement alors que deux dérivés inactifs de PPAR γ , STG28 et OSU-CG12 ont un effet similaire dès 20 μ M et 5 μ M respectivement (Wei S., *et al.* 2010).

Plusieurs études suggèrent que l'effet anti-prolifératif des TZD est associé au stress du réticulum endoplasmique. CHOP est un régulateur central de l'apoptose induite après un stress du RE. Dans des cellules de côlon HCT116, la thapsigargine, un inducteur du stress du RE, induit l'apoptose *via* l'induction de l'expression de CHOP. CHOP agit en régulant directement l'expression de DR5 et active la caspase 8, le clivage de Bid et la voie mitochondriale (Yamaguchi H. & Wang HG. 2004). Dans les cellules Hela, une dose de 10 μ M de 15d-PGJ2 entraîne l'expression de CHOP après 12 heures de

traitement et l'apoptose, évaluée par une mesure de l'annexine V (Saito S., *et al.* 2003). La 15d-PGJ2 stimule directement l'activité du promoteur CHOP en se liant sur des séquences ERSE et l'expression ectopique de CHOP conduit à l'apoptose des cellules Hela (Saito S., *et al.* 2003). Une inhibition de l'expression de CHOP par interférence ARN diminue l'expression de DR5 et la sensibilité des cellules HCT116 à la mort cellulaire induite par un co-traitement avec TRAIL (Su RY., *et al.* 2008). De même, un traitement CGZ associé à l'acide niflumique, un inhibiteur de COX-2 induit une apoptose caspase-dépendante et l'inhibition de chop par interférence ARN bloque le clivage de la caspase 8 et de Bid, montrant ainsi que le stress du réticulum est en partie responsable de l'effet pro-apoptotique du traitement. Deux antagonistes de PPAR γ , T0070907 et GW9662, n'affectent pas l'apoptose induite par ce co-traitement, démontrant que cette action est PPAR γ -indépendante (Kim BM., *et al.* 2011). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, CHOP est induit par le TZD18 ainsi que des protéines pro-apoptotiques comme DR5, Bax et Bak. Par ailleurs, les caspases 3, 8, 9 sont également activées (Zang C., *et al.* 2009). Une inhibition de l'expression de CHOP par interférence ARN bloque partiellement l'apoptose induite par le TZD18, ainsi que l'augmentation de l'expression de DR5. Néanmoins, l'expression de Bax/Bak n'est pas modifiée (Zang C., *et al.* 2009). Le lien entre l'apoptose et CHOP n'est pas clairement établi. Dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, un analogue de la CGZ, OSU-CG12, induit l'expression de la protéine β -TrCP qui régule la dégradation de protéines cibles du cycle cellulaire et de l'apoptose, *via* une voie indépendante de l'induction de CHOP. En effet, l'interférence ARN de CHOP ne bloque pas l'induction de l'expression de la β -TrCP, ni le clivage de PARP suggérant que ces deux voies sont indépendantes (Wei S., *et al.* 2010). Ce composé OSU-CG12 est également capable d'induire l'autophagie par une troisième voie indépendante des deux autres. En effet, il induit l'expression de LC3-II, la phosphorylation d'AMPK et la déphosphorylation de mTOR. Un dominant négatif AMPK bloque l'autophagie induite par l'OSU-CG12 et bloque en partie son effet anti-prolifératif sur les cellules LNCaP (Wei S., *et al.* 2010). La TGZ peut également induire l'autophagie des cellules endothéliales aortiques porcines par un mécanisme PPAR γ -indépendant. L'AMPK joue un rôle clé puisque son inhibition pharmacologique par le composé C diminue l'accumulation de LC3-II induit par la TGZ (Yan J., *et al.* 2010). Dans les cellules adénocorticales H295R, la RGZ inhibe la prolifération cellulaire et induit l'autophagie démontré par la formation de vacuoles, la phosphorylation de AMPK, la déphosphorylation mTOR et l'induction de l'expression de la Beclin1. La formation de ROS semble être impliquée dans cette induction de l'autophagie (Cerquetti L., *et al.* 2011). Ce processus est dépendant du type cellulaire puisque la RGZ n'induit pas d'autophagie dans une autre lignée de cellules adénocorticales SW13 (Cerquetti L., *et al.* 2011). Récemment, une équipe a montré que la 15d-PGJ2 induisait une mort cellulaire non-autophagique mais dépendante de LC3. Elle est caractérisée par une vacuolisation cytoplasmique

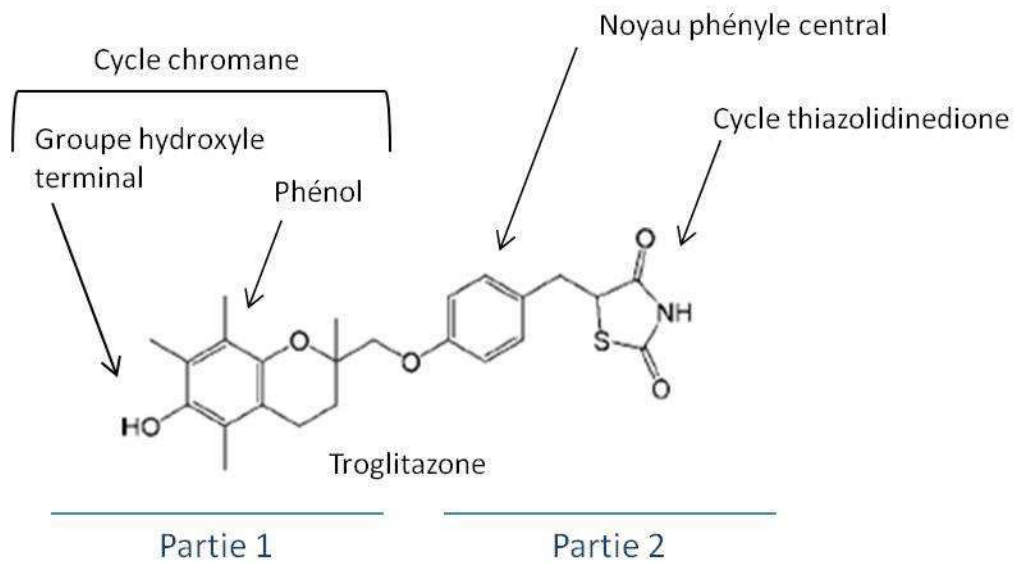


Figure 30 : Structure détaillée de la troglitazone. La troglitazone est structurée autour d'un atome d'oxygène sur lequel est greffé deux parties. La partie 1 correspond au cycle chromane qui comprend un phénol avec une fonction hydroxyle terminale. La partie 2, à droite, est constituée du cycle thiazolidinedione lié à un noyau phényle central.

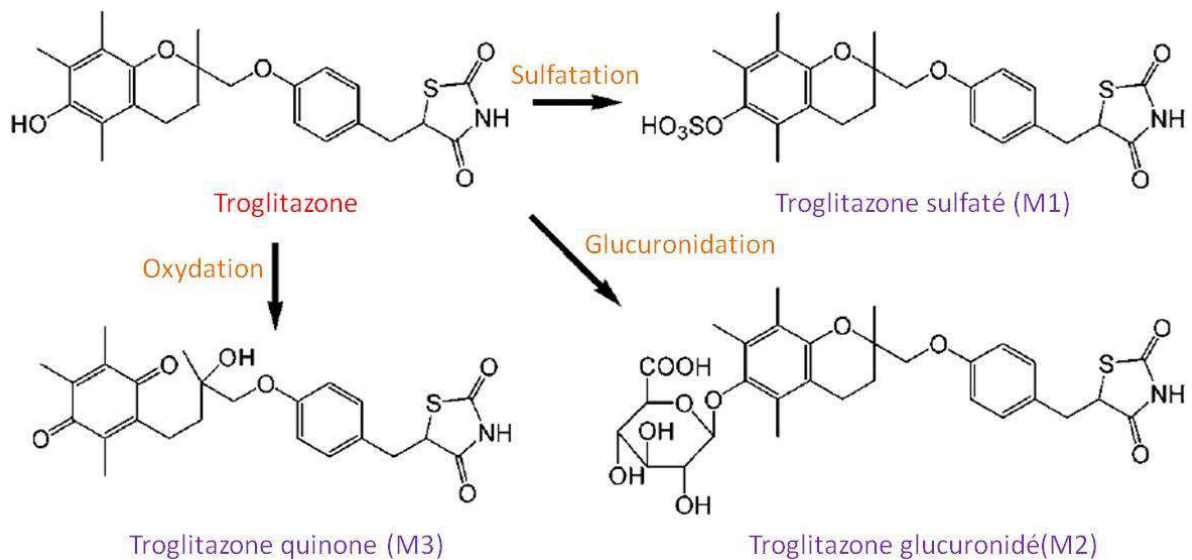


Figure 31 : Métabolisme de la troglitazone. La troglitazone est principalement métabolisée par 3 voies : la sulfatation qui conduit à la formation d'un conjugué sulfaté M1, la glucuronidation qui produit un composé glucuronidé M2 et l'oxydation formant un métabolite de type quinonique M3. Modifié d'après Masubuchi Y. 2006.

dans 3 lignées cancéreuses différentes HCT116, MDA-MB-231 et DU145 et une induction de l'expression de LC3. Elle est associée à un stress du RE puisque CHOP et BiP sont induits. Néanmoins, elle ne correspond pas à un processus autophagique, puisque des inhibiteurs PI3K d'autophagie ne bloquent pas la vacuolisation et l'accumulation de LC3-II induit par la 15d-PGJ2. Par contre, LC3 joue un rôle essentiel dans cette mort puisque son inhibition par interférence ARN bloque la formation de vacuoles induites par la 15d-PGJ2 (Kar R., et al. 2010).

IV. Amélioration des composés TZD

L'activité anti-tumorale PPAR γ -indépendante des TZD est une piste encourageante pour le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. Néanmoins, les effets toxiques des TZD limitent leur utilisation en clinique. De ce fait, la recherche s'oriente vers l'optimisation de ces composés en modifiant leur structure de manière à accroître leur activité anti-proliférative et à diminuer leur toxicité.

1. Relation structure-toxicité

Actuellement, la recherche tend vers le développement de nouvelles molécules dérivées des TZD afin d'augmenter leur activité anti-proliférative tout en limitant leur toxicité. En effet, la TGZ a été retirée du marché en 2000 en raison de son hépatotoxicité (Chojkier M. 2005 ; Gale EAM. 2006). Cette toxicité hépatique n'est pas complètement élucidée et pourrait être multifactorielle. Elle semble être en grande partie la conséquence de son métabolisme (Alvarez-Sanchez R., *et al.* 2006 ; Yokoi T. 2010). La TGZ contient un cycle thiazolidinedione qui est commun à toutes les TZD et un hétérocycle de type chromane, similaire à celui de la vitamine E (**Figure 30**). Dans le foie, la TGZ est principalement métabolisée par 3 voies : la sulfatation, la glucuronidation et l'oxydation (**Figure 31**) (Masubuchi Y. 2006). La réaction de sulfatation s'effectue sur le groupe hydroxyle terminal du noyau chromane. Elle est réalisée par la phénol-sulfotransférase ST1A3 et conduit à la formation d'un conjugué sulfaté M1. Ce métabolite est le plus abondamment retrouvé dans le plasma humain pour environ 70% (Loi CM., *et al.* 1999). La glucuronidation de la TGZ est réalisée par les UDP-glucuronosyltransferases (UGT) où le même groupement que précédemment est conjugué à l'acide glucuronique. Cette réaction s'effectue principalement dans l'intestin et produit un composé glucuronidé M2. Ce composé est aussi détecté dans le plasma mais à de faibles concentrations. Par ailleurs, l'oxydation de la TGZ entraîne le clivage du noyau TZD et du cycle chromane. Elle est réalisée par les enzymes de type P450, majoritairement les enzymes CYP3A4 et CYP2C8. Cette réaction

conduit à la formation de métabolites intermédiaires très réactifs dont un métabolite de type quinonique M3 obtenu par oxydation du cycle chromane (Yokoi T. 2010). Sa formation a été suggérée comme impliquée dans l'hépatotoxicité de la TGZ. En effet, la RGZ et la PGZ, qui ne présentent pas ce noyau chromane, ne génèrent pas de métabolite quinone et n'ont pas d'effet hépatotoxique. *In vitro*, la RGZ est moins toxique que la TGZ sur des hépatocytes de donneurs humains (Lloyd S., *et al.* 2002). Une étude de cytotoxicité sur des cellules HepG2 évalue l'EC₅₀ de la TGZ à 34µM et celle de son métabolite quinone M3 à 66µM : ce dernier présente une toxicité finalement moindre comparé à la TGZ (Yamamoto Y., *et al.* 2001). De même, ce composé M3 ne présente pas de toxicité sur des hépatocytes de rat alors que la TGZ est toxique (Tettey JN., *et al.* 2001). Ces résultats ne semblent pas en faveur d'une implication directe du métabolite M3 dans la toxicité hépatique. Néanmoins, plusieurs composés intermédiaires électrophiles plus toxiques que le composé M3 sont produits au cours de l'oxydation de la TGZ. Par exemple, la formation d'une TGZ epoxy quinone à partir du composé M3 a été identifiée dans des cellules HepG2 (Yamamoto Y., *et al.* 2002).

Des métabolites réactifs sont également formés à partir de la métabolisation du noyau TZD de la RGZ et PGZ (Alvares-Sanchez R., *et al.* 2006). Par exemple, le soufre du cycle TZD peut être oxydé par l'enzyme CYP3A4 en un composé sulfoxyde électrophile et en dérivés α-cétoisocyanate (Yokoi T. 2010). Le rôle du noyau TZD de la TGZ dans l'induction de l'hépatotoxicité a été analysé à l'aide d'un analogue de la TGZ, le trosuccinimide (TSN) où le noyau TZD a été remplacé par une pyrrolidine-2,5-dione (PRD). Ce dernier est dépourvu de l'atome de soufre réactif qui a été remplacé par un groupe méthylène. Dans des hépatocytes sains humains THLE-2, le composé TSN est moins toxique que la TGZ avec des EC₅₀ de 138,5µM et 27,2µM respectivement démontrant que le noyau TZD de la TGZ est en partie responsable de la toxicité hépatique (Saha S., *et al.* 2010a). Les métabolites intermédiaires formés à partir de l'oxydation du groupement chromane et du noyau TZD peuvent réagir avec le glutathion (GSH) ou se lier de manière covalente à des macromolécules cellulaires conduisant à un effet cytotoxique. De nombreux métabolites de la TGZ couplés à la GSH ont été identifiés (Kassahun K., *et al.* 2001 ; Tettey JN., *et al.* 2001). Quatre métabolites intermédiaires conjugués au glutathion (GSH) ont été détectés uniquement avec la TGZ, dont trois sont issus de l'oxydation du noyau TZD et un du cycle chromane (Saha S., *et al.* 2010a).

L'enzyme CYP3A4 joue un rôle majeur dans la formation de quinone et de réactifs intermédiaires par oxydation de la TGZ. La TGZ augmente son expression dans des hépatocytes humains et de rat accélérant ainsi sa métabolisation (Ramachandran V., *et al.* 1999 ; Sahi J., *et al.* 2000). L'utilisation d'un inhibiteur de CYP3A4, le kétoconazole, ne diminue pas la toxicité de la TGZ dans les cellules HepG2 suggérant qu'elle n'est pas impliquée dans cet effet hépatotoxique (Yamamoto Y., *et al.* 2001). Cependant l'utilisation des cellules HepG2 est controversée pour ces études de cytotoxicité

puisqu'elles expriment faiblement les enzymes P450. La transfection de ces cellules avec CYP3A4, qui est capable de métaboliser la TGZ, conduit à une augmentation de la cytotoxicité (Vignati L., *et al.* 2005). Le ketoconazole protège les cellules de la toxicité de la TGZ confirmant le rôle de l'enzyme CYP3A4 dans la formation de métabolites réactifs (Vignati L., *et al.* 2005).

Le métabolite M1 ne présente pas de cytotoxicité *in vitro* sur différentes lignées d'hépatocytes humains normaux dont HepG2 (Yamamoto Y., *et al.* 2001). Cependant, une étude de corrélation entre l'activité des enzymes hépatiques et la cytotoxicité de la TGZ a suggéré que le métabolite sulfaté M1 pourrait être un agent toxique direct. En effet, des hépatocytes présentant une faible activité CYP3A4 et une haute activité sulfotransférase sont associés à une forte toxicité de la TGZ (Hewitt NJ., *et al.* 2002). Récemment, il a été démontré pour la première fois que le métabolite sulfaté M1 induit une diminution de la viabilité des cellules hépatiques normales humaines THLE-2, des cellules métaboliquement actives contrairement aux cellules HepG2. La toxicité du métabolite sulfaté M1 a été établie avec des EC₅₀ respectives étant égales à 21,74 et 41,12µM pour le métabolite sulfaté M1 et la TGZ (Saha S., *et al.* 2010b). Les auteurs ont montré que le métabolite M1 induit un stress oxydatif plus important que la TGZ (Saha S., *et al.* 2010b). Cette étude est la première à démontrer un effet toxique direct du métabolite sulfaté M1 sur des cellules hépatiques humaines. Ce métabolite contribue à l'hépatotoxicité par accumulation de sels biliaires dans les hépatocytes en se liant et en inhibant la pompe Bsep (Bile salt export pump) qui joue un rôle important dans l'export des acides biliaires. Le métabolite M1 inhibe également le transporteur OATP-C (Organic Anion Transporting Polypeptide-C) qui est impliqué dans la prise en charge des acides biliaires, de la bilirubine et d'autres composés anioniques (Masubuchi Y. 2006).

Etant donné que les effets sur le métabolisme lipidique sont principalement médiés par PPARγ, il a été proposé que l'activation du récepteur puisse être impliquée dans la toxicité de la TGZ. Chez des souris obèses ou diabétiques, l'expression de PPARγ est induite dans le foie. Par ailleurs, le traitement de ces souris à la TGZ ou RGZ, augmente l'expression hépatique de PPARγ ce qui conduit à un déséquilibre du métabolisme lipidique avec le développement d'une stéatose hépatique (Masubuchi Y. 2006). Récemment, une étude a montré que l'expression de PPARγ dans les hépatocytes, mais également dans les macrophages, joue un rôle important dans le développement de cette maladie. En effet, l'inhibition conditionnelle de l'expression de PPARγ dans les hépatocytes de souris modèles obèses les protège de la stéatose hépatique (Moran-Salvador E., *et al.* 2013).

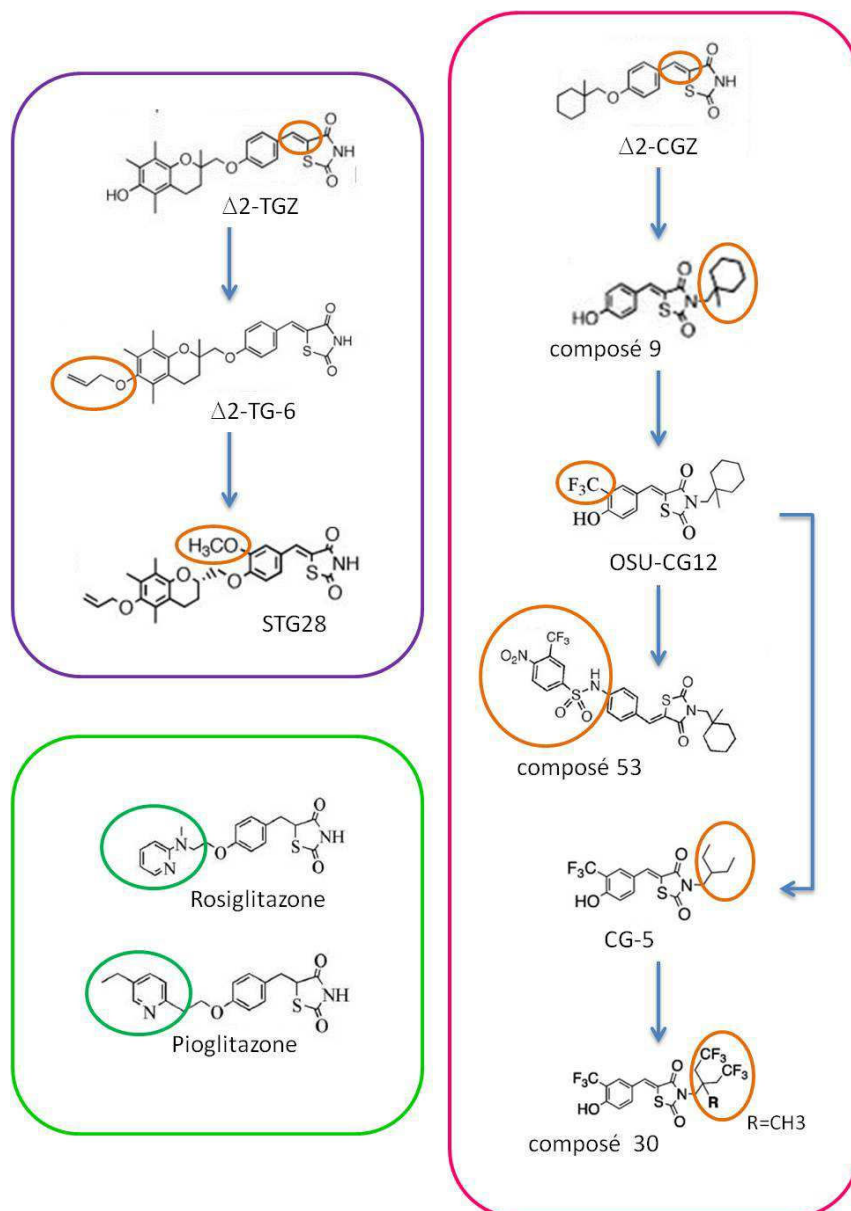


Figure 32 : Amélioration des composés $\Delta 2$ -TGZ et $\Delta 2$ -CGZ. Les composés dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ sont encadrés en violet. Le groupe hydroxyle du cycle chromane de la $\Delta 2$ -TGZ a été fonctionnalisé par une fonction allyle pour donner le composé $\Delta 2$ -TG-6. La molécule STG28 correspond à l'isomère S du composé $\Delta 2$ -TG-6 sur lequel un groupement méthoxy a été ajouté sur le noyau phényle central. Les composés dérivés de la $\Delta 2$ -CGZ sont encadrés en rose. Le composé 9 correspond à une structure inversée de la $\Delta 2$ -CGZ : l'extrémité méthylcyclohexyle terminale est réarrangée de telle sorte que le noyau TZD se retrouve dans la partie centrale de la molécule. Ce composé 9 a été fonctionnalisé par un groupement trifluorométhyle sur le noyau phénol, ce qui a donné la molécule OSU-CG12. Cette dernière a été modifiée de deux façons. Le CF₃ a été ôté et l'hydroxyle remplacé par un groupement phénylsulfonamide et a conduit au composé 53 ou OSU-53. Le remplacement du cycle méthylcyclohexyle terminal par un groupement 3-méthylpentane a fourni le composé CG-5. Des groupements CF₃ et un méthyle ont été ajoutés aux extrémités de la chaîne 3-méthylpentane, elle-même fixée sur l'atome d'azote du cycle TZD ce qui produit le composé 30. Les composés RGZ et PGZ, encadrés en vert, présentent un groupement aminopyridine et un groupement pyridine respectivement.

2. Relation structure-activité

Toutes les TZD appartiennent à la même famille et portent le même résidu 4'-hydroxy-5-benzil-thiazolidine-2,4-dione. Néanmoins, leur mécanisme d'action diffère et n'est pas toujours PPAR γ -dépendant. Par exemple, la TGZ inhibe la prolifération de cellules cancéreuses de poumon A549 de manière PPAR γ -indépendante *via* la libération du calcium intracellulaire et l'inhibition de la traduction (Palakurthi SS., *et al.* 2001). La CGZ et la RGZ qui diffèrent de la TGZ par la fonctionnalisation du groupe 4'-hydroxyle ne présentent pas le même effet : la CGZ agit de manière similaire à la TGZ alors que la RGZ ne modifie pas la prolifération des cellules A549, ni la libération de calcium. Afin de rechercher la fonctionnalisation minimale nécessaire pour maintenir la libération de calcium et l'inhibition de la traduction, les auteurs sont partis du résidu 4'-hydroxy-5-benzil-thiazolidinedione-2,4-dione de base des TZD contenant le groupe hydroxyle terminal (partie 2 de la structure TZD, **Figure 30**) sur lequel ils ont greffé des structures plus ou moins longues telles que le cycle chromane donnant la TGZ. Cette étude a montré que les composés qui ne possèdent pas de substitution sur le groupe 4'-hydroxy ne sont plus capables d'induire la libération de calcium ce qui suggère que ces substitutions sont essentielles pour l'activité des molécules. De plus, une corrélation a été observée entre la taille, le caractère lipophile du substituant et la libération de calcium. Notamment, la RGZ, qui n'est pas capable d'induire la libération de calcium intracellulaire, possède un groupement aminopyridine ce qui lui confère un caractère polaire (Fan YH., *et al.* 2004). De même, la PGZ possède un groupement pyridine (**Figure 32**). Par ailleurs, les auteurs ont synthétisé les analogues insaturés pour chaque composé, caractérisé par une double liaison au niveau du cycle TZD. De manière générale, les TZD insaturées sont plus efficaces que les composés parents dans l'inhibition de la prolifération cellulaire (Fan YH., *et al.* 2004). Ces analogues insaturés correspondent aux composés nommés $\Delta 2$ de nos jours (**Figure 32**). Comme les composés parents, les dérivés $\Delta 2$ -TGZ et $\Delta 2$ -CGZ sont capables d'induire la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 et du récepteur ER α dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Huang JW., *et al.* 2005). Les analogues $\Delta 2$ sont plus efficaces puisqu'ils agissent à des concentrations inférieures comparées aux composés parents. A partir de ces composés $\Delta 2$, de nouveaux dérivés capables de dégrader la cycline D1 ont été développés. Parmi les nombreux analogues synthétisés, le composé $\Delta 2$ -TG-6 qui possède un groupement allyle sur le groupe hydroxyle terminal du cycle chromane de la $\Delta 2$ -TGZ, présente une activité supérieure à celle de la $\Delta 2$ -TGZ (**Figure 32**). Cette molécule induit la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 pour une dose de 7,5 μ M comparé à 30 μ M pour la $\Delta 2$ -TGZ après 24 heures de traitement (Huang JW., *et al.* 2005). L'ensemble des données obtenues par Huang suggère l'importance d'une structure linéaire des TZD puisque le changement de position du cycle TZD sur le phénol, conduisant à une molécule moins linéaire, induit une diminution de son efficacité.

Par ailleurs, le remplacement du groupement allyle par un groupement succinique polaire atténue l'effet sur la répression de la cycline D1 démontrant l'importance de la présence d'un groupement hydrophobe dans cette partie (Huang JW., *et al.* 2006). L'ajout d'un groupement méthoxy sur le noyau phényle central de la $\Delta 2$ -TG-6 a conduit au développement de la molécule STG28 (Huang JW., *et al.* 2006) (**Figure 32**). Cette dernière est plus efficace puisqu'après 24 heures de traitement, la dégradation de la cycline D1 est observée pour une dose de 5 μ M. De plus, une préférence stéréochimique a été démontrée puisque l'isomère *S* est plus efficace que l'isomère *R* dans la répression de la cycline D1 (Huang JW., *et al.* 2006). Le composé STG28 inhibe efficacement la prolifération des cellules MCF-7 et LNCaP avec des EC₅₀ de 12 μ M et 11 μ M respectivement, ce qui est inférieur aux EC₅₀ de la TGZ (70 et 70 μ M) et de la CGZ (70 et 42 μ M) (Wei S., *et al.* 2010). Il dégrade également la cycline D1 de manière protéasome-dépendante (Wei S., *et al.* 2008).

Le composé $\Delta 2$ -CGZ a également servi de base pour le développement de nouveaux dérivés. Des analyses de relations structure-activité ciblant l'expression du récepteur aux androgènes ont conduit à l'élaboration du composé 9 (Yang J., *et al.* 2008) (**Figure 32**). Ce dernier correspond à une structure inversée de la $\Delta 2$ -CGZ : l'extrémité méthylcyclohexyle terminale est réarrangée de telle sorte que le noyau TZD se retrouve dans la partie centrale de la molécule. Une modification supplémentaire du noyau phénol par l'ajout d'un groupement trifluorométhyle a donné la molécule OSU-CG12 (**Figure 32**). Cette dernière réprime complètement l'expression d'AR dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP (Yang J., *et al.* 2008). Elle inhibe également la prolifération des cellules LNCaP et MCF-7 plus efficacement que le composé STG28 avec des EC₅₀ de 5,7 μ M et 5 μ M respectivement (Wei S., *et al.* 2010). Ces composés STG28 et OSU-CG12 induisent des réponses cellulaires caractéristiques observées lors d'une restriction énergétique et représentent une nouvelle classe d'agents nommés ERMA pour « Energy Restriction-Mimetic Agents ». Ces composés induisent les mêmes effets que ceux décrits lors d'une privation de glucose induite par le 2-deoxyglucose (2-DG) ou le resveratrole. En effet, OSU-CG12 perturbe l'homéostasie glucidique en diminuant la glycolyse et la production de NADH. Différentes voies de signalisation sont activées par cette restriction énergétique menant à l'induction transitoire de Sirt1, l'activation de l'AMPK et à un stress du réticulum (Wei S., *et al.* 2010). Toutes ces voies conduisent à l'effet anti-prolifératif de l'OSU-CG12 contrôlé par des mécanismes d'apoptose et d'autophagie. Ce dernier est très efficace puisque les effets sur la restriction énergétique sont observés pour une dose de 5 μ M d'OSU-CG12 comparé aux 100 μ M et 5mM avec le 2-DG et le resveratrole respectivement (Wei S., *et al.* 2010). La régulation épigénétique du gène suppresseur de tumeur KLF6 semble jouer un rôle clé dans l'apoptose induite par le composé ERMA OSU-CG12 (Chen CH., *et al.* 2011).

D'autres composés anti-tumoraux plus actifs ont été recherchés en ciblant l'activation de l'AMPK, une protéine clé dans le contrôle du métabolisme cellulaire. Une modification de la molécule OSU-

CG12 par l'ajout d'un groupement phénylsulfonamide a conduit au développement du composé 53 ou OSU-53 (**Figure 32**). Ce dernier induit la phosphorylation de l'AMPK et inhibe la production d'IL-6 dès une dose de 1 μ M dans des macrophages humains THP-1. Il active également AMPK par phosphorylation dans des cellules d'adénocarcinomes de colon C-26 (Guh JH., *et al.* 2010). OSU-53 inhibe aussi la prolifération des cellules cancéreuses mammaires triple-négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-468 avec des EC₅₀ respectives de 5 μ M et 2 μ M. Les cellules non cancéreuses mammaires MCF-10A ne sont pas affectées par OSU-53 (Lee KH., *et al.* 2011). *In vivo*, OSU-53 bloque la croissance de tumeurs MDA-MB-231 xénogreffées chez la souris Nude (Lee KH., *et al.* 2011). D'autres composés impliqués dans la restriction énergétique ont été développés à partir de la molécule OSU-CG12 : par exemple, le composé CG-5 où le cycle méthylcyclohexyle terminal est remplacé par un groupement 3-méthylpentane (Lin HY., *et al.* 2012) (**Figure 32**). Cette modification augmente la capacité du composé CG-5 à bloquer le prélèvement du glucose comparé à l'OSU-CG12. De plus, ce composé CG-5 inhibe plus efficacement la prolifération des cellules LNCaP avec des EC₅₀ de 4,5 μ M et 6 μ M pour CG-5 et OSU-CG12 respectivement (Lin HY., *et al.* 2012). Ce composé CG-5 est impliqué dans la diminution de l'expression de la DNA méthyltransférase DNMT1 ce qui permet la réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs contrôlés par méthylation comme GADD45a, IGFDP3 (Lin HY., *et al.* 2012). Récemment, des composés inhibant les transporteurs de glucose ont été développés comme le composé 30 dérivé de la molécule CG-5 (Wang D., *et al.* 2012). Pour cela, des groupements CF₃ ont été ajoutés aux deux extrémités d'une chaîne elle-même fixée sur l'atome d'azote de la thiazolidine-2,4-dione. Ce composé est capable d'inhiber la prolifération des cellules LNCaP pour une dose de 1,5 μ M. Les cellules épithéliales de prostate (PrEC) et mammaires (HMEC) sont résistantes à l'effet cytotoxique de ce composé, même à des doses plus élevées de 10 μ M. Il induit également un stress du RE et de l'autophagie, active l'AMPK et dégrade les protéines cycline D1 et Sp1 *via* la protéine β -TrcP. Ce composé inhibe le transporteur de glucose GLUT1 pour une dose de 2,5 μ M. Des études de modélisation ont montré que le composé 30 peut se lier sur GLUT1 à des sites différents du glucose (Wang D., *et al.* 2012).

Ces recherches d'amélioration et d'optimisation des molécules TZD ont permis de conduire au développement de nouveaux composés présentant une meilleure activité anti-tumorale et s'inscrivant dans une nouvelle classe de molécules impliqués dans la restriction énergétique.

Objectifs de la thèse

L'un des enjeux majeurs de la recherche anti-cancéreuse est de développer de nouvelles thérapies en direction des tumeurs réfractaires aux traitements conventionnels. Dans ce contexte, l'identification récente de l'activité PPAR γ -indépendante des thiazolidinediones ouvre de nouvelles perspectives. En effet, à partir de ces composés, on peut envisager la synthèse de dérivés n'activant pas PPAR γ avec des modifications structurales qui augmentent leur action anti-cancéreuse tout en diminuant leur toxicité hépatique. Le laboratoire s'intéresse ainsi à la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets anti-cancéreux des TZD ainsi qu'au développement de nouveaux dérivés plus actifs et moins toxiques. En 2008, il a montré que certains composés de la famille des TZD induisent une dégradation protéasome-dépendante du récepteur α aux œstrogènes de manière PPAR γ -indépendante (Lecomte J., *et al.* 2008). A partir de ces données, les objectifs de ma thèse ont été **i)** de mieux comprendre les mécanismes PPAR γ -indépendants mis en jeu dans l'effet anti-cancéreux des TZD **ii)** de participer à l'étude de nouveaux composés moins toxiques et plus efficaces à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Pour effectuer ces travaux, la synthèse de l'ensemble des molécules a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec une équipe de chimiste de l'UMR 7565 CNRS UL (Dr. Michel Boisbrun, Groupe S.U.C.R.E.S.). Pour l'aspect biologique, deux modèles cellulaires de cancers mammaires ont été utilisés : une première lignée hormono-dépendante MCF-7 et une seconde lignée hormono-indépendante MDA-MB-231.

La première partie de mon travail a consisté à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'action PPAR γ -indépendante de la Δ^2 -TGZ. Pour cela, nous avons ajouté un groupement biotine à la Δ^2 -TGZ puisqu'il a été décrit que la biotinylation des composés permet d'augmenter leur incorporation dans les cellules par un récepteur spécifique à la biotine. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes de mort cellulaire impliqués dans l'effet anti-prolifératif PPAR γ -indépendant des TZD. Nous avons notamment étudié l'effet de la Δ^2 -TGZ sur les voies de signalisation du stress du réticulum endoplasmique et de l'apoptose. Cette dernière partie a été réalisée en collaboration avec le laboratoire Luxembourgeois du Dr. Diederich. Enfin, nous avons étudié l'effet de la biotinylation du ligand naturel 15d-PGJ2. Nous avons aussi étudié l'effet de la 15d-PGJ2 biotinylée sur le stress du réticulum et l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires. L'ensemble de ce travail a conduit à une publication acceptée (Colin C., *et al.* Breast Cancer Research and Treatment, 2010), une soumise et une en préparation.

La deuxième partie de mon travail a porté sur l'étude de la relation structure-activité de nouveaux dérivés de la TGZ. L'effet anti-prolifératif de ces différents composés ont été étudiés sur nos deux lignées cellulaires. En parallèle, des études d'hépatotoxicité ont été réalisées par la société Kaly-Cell à Besançon. Nous avons ainsi mis en évidence de nouveaux composés plus efficaces sur l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et moins cytotoxiques. Ces travaux ont donné lieu à deux publications de chimie dont une acceptée (Salamone S., et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012) et une soumise.

Les résultats obtenus au cours de la thèse sont présentés sous forme d'articles. Chaque article est précédé d'une introduction brève situant les principales données bibliographiques et les principaux résultats obtenus. Enfin, ces résultats sont discutés dans une dernière partie « Discussion et Perspectives ».

Chapitre 2



Résultats

Résultats

I. Compréhension des mécanismes PPAR γ -indépendants

1. Effet de la biotinylation de la $\Delta 2$ -TGZ

New troglitazone derivatives devoid of PPAR γ agonist activity display an increased anti-proliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines.

Christelle Colin, Stéphane Salamone, Isabelle Grillier-Vuissoz, Michel Boisbrun, Sandra Kuntz, Julie Lecomte, Yves Chapleur, Stéphane Flament. *Breast Cancer Research and Treatment*, 124(1):101-110, 2010.

a. Introduction

Les recherches pré-cliniques montrent que les thiazolidinediones (TZD) présentent *in vitro* un fort potentiel pour le traitement des cancers mammaires (Fenner MH., *et al.* 2005 ; Blanquicett C., *et al.* 2008). Cependant, leur faible indice thérapeutique dans le traitement de cette maladie nécessite l'utilisation de molécules à effet plus ciblé. Depuis quelques années, un nombre croissant d'études a montré que l'effet anti-cancéreux de ces composés ne nécessite pas l'activation du récepteur PPAR γ (Weng JR., *et al.* 2006). L'implication de PPAR γ a été écartée par différentes techniques : l'utilisation d'antagoniste de PPAR γ , la transfection d'un dominant négatif de PPAR γ , l'interférence ARN ciblant PPAR γ et l'utilisation de la $\Delta 2$ -TGZ, une molécule dérivée de la TGZ n'activant pas le récepteur PPAR γ (Clay CE., *et al.* 2002 ; Shiao CW., *et al.* 2005 ; Lecomte J., *et al.* 2008). Ce composé $\Delta 2$ -TGZ a été obtenu par l'introduction d'une double liaison accolée au cycle thiazolidinedione ce qui rigidifie sa structure et l'empêche d'activer PPAR γ (Shiao CW., *et al.* 2005). Ceci a été vérifié par transfection en utilisant un gène rapporteur contenant un élément de réponse PPRE. Au laboratoire, il a été démontré sur deux lignées hormono-dépendantes MCF-7 et ZR-75 que la $\Delta 2$ -TGZ induit une dégradation protéasome-dépendante du récepteur ER α de manière PPAR γ -indépendante (Lecomte J., *et al.* 2008). De plus, sur des cellules cancéreuses de prostate, la $\Delta 2$ -TGZ ainsi que la $\Delta 2$ -CGZ induisent la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 de manière PPAR γ -indépendante (Huang JW., *et al.* 2005). Par ailleurs, ils ont observé que les composés $\Delta 2$ sont plus efficaces sur l'inhibition de la prolifération cellulaire et la dégradation de la protéine cycline D1 que les composés parents. Néanmoins, les doses de composés sont encore élevées puisque la dégradation de la cycline D1 est obtenue pour une dose de 30 μ M de $\Delta 2$ -TGZ ou $\Delta 2$ -CGZ (Huang JW., *et al.* 2005).

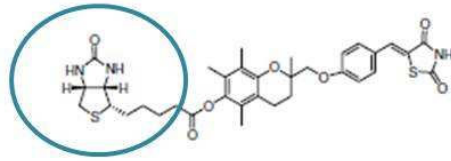
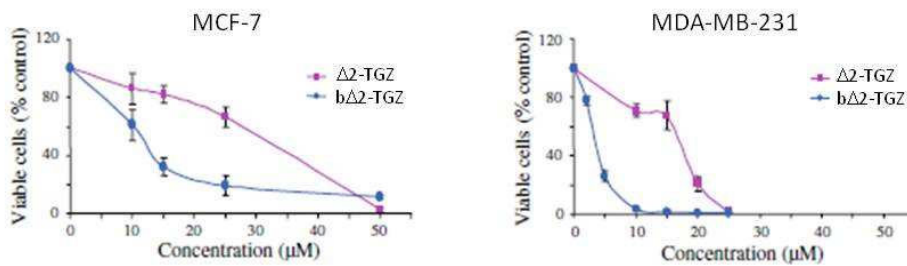
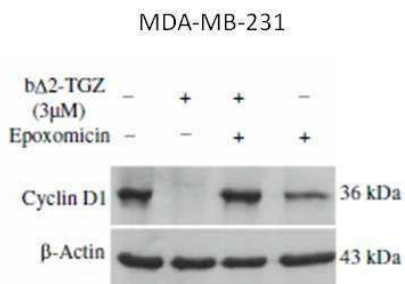
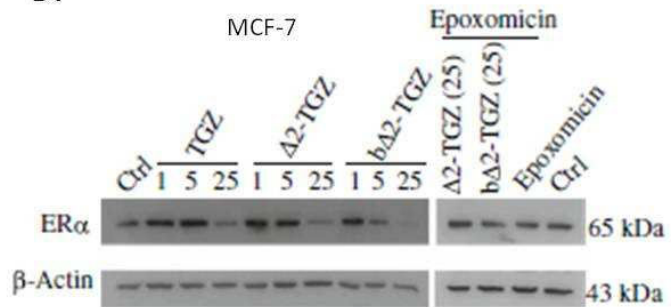
A.**B.****C.****D.**

Figure 33 : Effet de la bΔ2-TGZ sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. **A.** Structure de la molécule bΔ2-TGZ. La biotine est ajoutée sur le phénol du cycle chromane (entouré en bleu). **B.** Mesure de la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 traitées à la bΔ2-TGZ. La prolifération a été mesurée après 24 heures de traitement avec des doses croissantes de Δ2-TGZ et bΔ2-TGZ. On observe une diminution dose-dépendante de la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 en présence des deux composés. La bΔ2-TGZ a une efficacité plus accrue avec des EC₅₀ significativement plus faible de 11,3±1,8μM et 3,4±0,1μM pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement. Les EC₅₀ sont de 29,7±2μM et de 16,6±0,9μM pour la Δ2-TGZ. **C.** Etude de l'expression de la cycline D1 par western blot dans les cellules MDA-MB-231 traitées à la bΔ2-TGZ. Après 24 heures, une diminution du taux de la protéine cycline D1 est détectée dès une dose de 3μM de bΔ2-TGZ. Cette dégradation est protéasome-dépendante puisque l'epoxomicin, un inhibiteur du protéasome, bloque la protéolyse de cette protéine. **D.** Etude de l'expression de l'ERα par western blot dans les cellules MCF-7 traitées à la bΔ2-TGZ. Après 24 heures, une diminution du taux de la protéine ERα est détectée dès une dose de 5μM de bΔ2-TGZ. Cette dégradation est protéasome-dépendante puisque l'epoxomicin bloque la protéolyse de cette protéine.

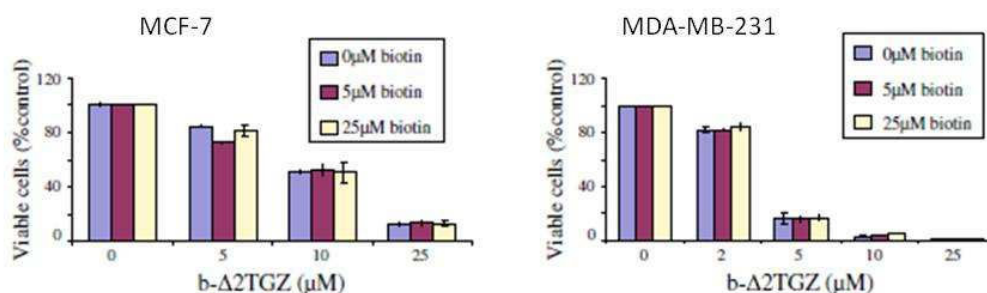
Il a été décrit récemment que l'ajout d'un groupement biotine sur des molécules transporteuses permet d'augmenter l'incorporation de composés anti-cancéreux dans les cellules tumorales (Russell-Jones G., *et al.* 2004 ; Yang W., *et al.* 2009). En effet, la biotine appartient à la famille des vitamines (vitamine H) dont l'un des rôles est d'induire la prolifération cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, le récepteur à la biotine est plus fortement exprimé comparé aux tissus sains. Il est localisé à la membrane plasmique. Le ciblage des molécules d'intérêts par l'ajout d'un groupement biotine permettrait d'augmenter leur incorporation dans les cellules cancéreuses. Dans cette optique, un groupement biotine a été ajouté sur la $\Delta 2$ -TGZ au niveau du groupe hydroxyle du cycle chromane (**Figure 33A**). Nous avons ensuite étudié l'effet de la biotinylation de la $\Delta 2$ -TGZ (b $\Delta 2$ -TGZ) sur les cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231).

b. Principaux résultats

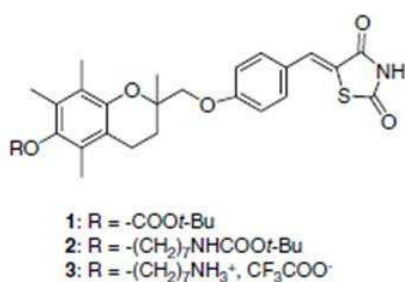
Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de la TGZ et $\Delta 2$ -TGZ sur la prolifération de nos deux lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 et déterminé les EC_{50} . Après 24 heures de traitement, nous avons observé une diminution dose-dépendante de la prolifération des cellules en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ. Les cellules MDA-MB-231 apparaissent plus sensibles que les cellules MCF-7 : après 24 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ, les EC_{50} sont de $29,7 \pm 2 \mu M$ et de $16,6 \pm 0,9 \mu M$ pour les MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement. Cette inhibition de prolifération n'est pas différente du composé parent TGZ pour les cellules MDA-MB-231 avec une EC_{50} de $15,8 \pm 0,3 \mu M$. Par contre, l'effet anti-prolifératif de la $\Delta 2$ -TGZ est significativement plus fort que la TGZ sur les cellules MCF-7 avec une EC_{50} de $35,4 \pm 1,3 \mu M$ pour la TGZ.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de notre nouveau composé $\Delta 2$ -TGZ biotinylé (b $\Delta 2$ -TGZ) sur la prolifération de nos deux lignées cellulaires. Ce composé montre une efficacité accrue sur l'inhibition de la prolifération avec des EC_{50} significativement plus faible de $11,3 \pm 1,8 \mu M$ et $3,4 \pm 0,1 \mu M$ pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement (**Figure 33B**). L'action PPAR γ -indépendante de la b $\Delta 2$ -TGZ a été vérifiée par transfection d'un vecteur d'expression pPPRE3tk-luc dans les cellules MCF-7 démontrant que la biotinylation ne modifie pas les propriétés de la molécule d'origine $\Delta 2$ -TGZ. Par ailleurs, la molécule b $\Delta 2$ -TGZ induit la dégradation de la cycline D1. Dans les cellules MCF-7, la b $\Delta 2$ -TGZ diminue le niveau de cycline D1 dès une dose de $5 \mu M$ et le signal disparaît complètement à $25 \mu M$. Dans les cellules MDA-MB-231 qui sont plus sensibles à la b $\Delta 2$ -TGZ, la cycline D1 est complètement protéolysée dès une dose de $3 \mu M$ qui correspond à EC_{50} (**Figure 33C**). Cette

A.



B.



Compound	IC ₅₀ (μM)	
	MCF-7	MDA-MB-231
TGZ	35.4	15.8
Δ2-TGZ	29.7	16.6
bΔ2-TGZ	11.3	3.4
1	7.7	3.3
2	13	3.2
3	3.2	5

Figure 34 : Rôle de la biotine dans l'inhibition de la prolifération de la bΔ2-TGZ. **A.** Test de compétition de bΔ2-TGZ vs biotine libre. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été traitées avec 0, 5, 10, 25 μM de bΔ2-TGZ en présence ou non de biotine libre (0, 5 et 25 μM). La prolifération cellulaire a été mesurée après 24 heures de traitement. On observe que l'ajout de biotine libre ne modifie pas l'inhibition de prolifération induite par la bΔ2-TGZ. **B.** Etude de trois nouveaux dérivés sur la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Trois nouveaux dérivés ont été synthétisés. Ils présentent une substitution (R) au niveau de l'hydroxyle terminal porté par le cycle chromane. Cette substitution se situe à la même position que le groupement biotine de la bΔ2-TGZ. Ces trois composés sont aussi actifs que la bΔ2-TGZ pour inhiber la prolifération des cellules. Dans les cellules MCF-7, les EC₅₀ pour les composés 1, 2 et 3 sont respectivement de 7,7 μM, 13 μM et 3,2 μM. Dans les cellules MDA-MB-231, les EC₅₀ pour les composés 1, 2 et 3 sont respectivement de 3,3 μM, 3,2 μM et 5 μM.

dégradation est protéasome-dépendante puisque l'époxomycine, un inhibiteur du protéasome, bloque la protéolyse de la cycline D1 dans les deux lignées cellulaires (**Figure 33C**).

La dégradation du récepteur ER α en réponse à la b Δ 2-TGZ a été étudiée dans les cellules MCF-7. Nous avons observé comme pour la Δ 2-TGZ une diminution dose-dépendante du récepteur ER α : le signal est plus faible dès une dose de 5 μ M de b Δ 2-TGZ et le signal disparaît complètement à 25 μ M. Ce nouveau composé b Δ 2-TGZ est plus efficace que la Δ 2-TGZ sur la dégradation d'ER α mais aussi plus rapide car pour une dose de 25 μ M le marquage disparaît complètement après 8 heures de traitement en présence de b Δ 2-TGZ alors qu'aucun changement n'est détecté avec la Δ 2-TGZ (**Figure 33D**).

Nous nous sommes ensuite intéressés à comprendre les mécanismes d'action anti-prolifératif de la b Δ 2-TGZ. Nous avons supposé que l'efficacité accrue de cette molécule pourrait être liée à l'amélioration de son internalisation *via* sa fixation sur des récepteurs à la biotine. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience de compétition avec de la biotine libre. Les résultats montrent que l'ajout de biotine libre jusqu'à une dose de 25 μ M ne diminue pas l'inhibition de prolifération induite par la b Δ 2-TGZ dans nos deux lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 (**Figure 34A**). Par conséquent, ces résultats montrent que l'effet anti-prolifératif de la b Δ 2-TGZ sur les cellules cancéreuses mammaires est indépendant de la fixation à un récepteur à la biotine.

Dans le but de mieux comprendre l'effet anti-prolifératif accru de la b Δ 2-TGZ, trois nouveaux dérivés présentant une substitution (R) au niveau de la même position que la biotine ont été produits et testés sur la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (**Figure 34B**). Après 24 heures de traitement, ces trois composés inhibent la prolifération des deux lignées cellulaires. Dans les cellules MCF-7, les EC₅₀ pour les composés 1, 2 et 3 sont respectivement de 7,7 μ M, 13 μ M et 3,2 μ M et sont aussi faibles voir plus faibles que celles de la Δ 2-TGZ (29,3 μ M) et b Δ 2-TGZ (11,3 μ M). Dans les cellules MDA-MB-231, les EC₅₀ pour les composés 1, 2 et 3 sont respectivement de 3,3 μ M, 3,2 μ M et 5 μ M et sont plus faibles que la Δ 2-TGZ (16,6 μ M) mais pas différents de la b Δ 2-TGZ (3,4 μ M) (**Figure 33B**). Ces résultats suggèrent que la présence de la biotine n'est pas responsable de l'efficacité accrue de la molécule. Celle-ci semble en fait être liée à la substitution du phénol porté par le groupement chromane.

c. Conclusion

Nous avons montré que la $\Delta 2$ -TGZ, un dérivé de la TGZ à activité PPAR γ -indépendante, inhibe la prolifération des cellules hormono-dépendantes mais aussi hormono-indépendantes. La biotinylation de la $\Delta 2$ -TGZ augmente son effet anti-prolifératif et la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1. Cette efficacité accrue n'est pas liée à l'ajout d'un groupement biotine mais à une modification de la $\Delta 2$ -TGZ sur le phénol du groupement chromane. Ces résultats sont très prometteurs pour l'optimisation de molécules anti-cancéreuses plus efficaces basées sur la $\Delta 2$ -TGZ et capables de cibler les lignées cancéreuses mammaires hormono-dépendantes et indépendantes.

New troglitazone derivatives devoid of PPAR γ agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines

Christelle Colin · Stéphane Salamone · Isabelle Grillier-Vuissoz · Michel Boisbrun · Sandra Kuntz · Julie Lecomte · Yves Chapleur · Stéphane Flament

Received: 12 November 2009 / Accepted: 16 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Abstract Numerous recent studies indicate that most anticancer effects of PPAR γ agonists like thiazolidinediones are the result of PPAR γ -independent pathways. These conclusions were obtained by several approaches including the use of thiazolidinedione derivatives like Δ 2-Troglitazone (Δ 2-TGZ) that does not activate PPAR γ . Since biotinylation has been proposed as a mechanism able to increase the specificity of drug delivery to cancer cells which could express a high level of vitamin receptor, a biotinylated derivative of Δ 2-TGZ (b Δ 2-TGZ) has been synthesized. In the present article, we have studied the in vitro effects of this molecule on both hormone-dependent (MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cells. In both cell lines, b Δ 2-TGZ was more efficient than Δ 2-TGZ to decrease cell viability. b Δ 2-TGZ was also more potent than Δ 2-TGZ to induce the proteasomal degradation of cyclin D1 in both cell lines and those of ER α in MCF-7 cells. However, in competition experiments, the presence of free biotin in the culture medium did not decrease the antiproliferative action of b Δ 2-TGZ. Besides, other compounds that had no biotin but that were substituted at the same position of the phenolic group of the chromane moiety of Δ 2-TGZ decreased cell viability similarly to b Δ 2-TGZ. Hence, we concluded that

the increased antiproliferative action of b Δ 2-TGZ was not due to biotin itself but to the functionalization of the terminal hydroxyl group. This should be taken into account for the design of new thiazolidinedione derivatives able to affect not only hormone-dependent but also hormone-independent breast cancer cells in a PPAR γ -independent pathway.

Keywords Breast cancer · PPAR γ · Troglitazone · Cyclin D1 · Biotin

Introduction

Breast cancer is the most frequent cancer in women and represents the second leading cause of cancer death in this population after lung cancer. Breast tumors can be separated in at least four individual subgroups defined by estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status [1]. These markers led to the development of endocrine agents against hormone receptor-positive tumors and targeted therapeutics against HER2-expressing tumors. However, almost 25% of ER-positive breast cancer patients do not respond to the anti-estrogen tamoxifen and half of the patients receiving tamoxifen eventually die due to creation of tamoxifen-resistant phenotype [2]. Similarly, de novo and acquired resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab (Tzb; Herceptin[®]) also exist [3]. Indeed, the majority of patients who achieve an initial response to Herceptin-based regimens generally acquire resistance within 1 year. Besides, no targeted therapy is available for patients with triple-negative breast cancer, lacking expression of hormone receptors and HER. These limitations in the therapy of breast cancer provide a strong

C. Colin · I. Grillier-Vuissoz · S. Kuntz · J. Lecomte · S. Flament (✉)
EA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO), Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy-Université, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France
e-mail: stephane.flament@sbiol.uhp-nancy.fr

S. Salamone · M. Boisbrun · Y. Chapleur
Groupe S.U.C.R.E.S., UMR 7565 Nancy-Université, CNRS, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

stimulus for developing new therapeutic agents. In this context, ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), mainly thiazolidinediones (TZD), have been proposed as anticancer agents and tested in clinical trials for breast cancer [4, 5].

Peroxisome proliferator-activated receptors are ligand-activated transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily [6]. Three types of receptors have been described: α , β (also called δ), and γ [7–9]. Their activation involves ligand binding, heterodimerization with the retinoid X receptor (RXR), and interaction with a specific response element (PPRE) leading to the transcription modulation of the target gene facilitated by coactivators recruitment [10–13]. PPAR γ is activated by endogenous ligands, the polyunsaturated fatty acids, mainly arachidonic derivatives such as 15d-PGJ(2) [14–16]. Thiazolidinediones including troglitazone (TGZ), rosiglitazone (RGZ), pioglitazone, and ciglitazone (CGZ) are synthetic PPAR γ agonists belonging to a class of drugs used in the treatment of type II diabetes [17].

PPAR γ ligands inhibit proliferation and induce differentiation of breast cancer cell lines in vitro and in vivo [18–21]. Growth inhibition is associated with apoptosis and alteration in cell-cycle progression through the overexpression of the cdk inhibitors p21 and p27 and the repression of cyclin D1 expression [22, 23]. Recently, in the hormone-independent breast cancer cells, MDA-MB-231, a non-apoptotic and non-autophagic cytoplasmic vacuolation death, was observed in response to 15d-PGJ(2), whereas autophagy was described in response to thiazolidinediones [24, 25]. Besides, PPAR γ agonists inhibit breast tumor angiogenesis and cell migration [26, 27].

Nevertheless, the involvement of PPAR γ in these effects is not clear since numerous PPAR γ -independent events have been demonstrated [28, 29]. The PPAR γ independence of these events was shown using PPAR γ antagonists, transfection of dominant negative PPAR γ isoforms, PPAR γ -targeted RNA interference as well as PPAR γ -inactive TZD analogs like Δ 2-TGZ [30–32]. Such compounds were obtained by introducing a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring [31]. These Δ 2 derivatives were inactive in PPAR γ activation according to a PPAR γ transcription factor ELISA as well as transfection assays using a reporter construct that contains PPAR response element [31, 33]. The loss of PPAR γ activity was explained by the structural rigidity induced by the double bond introduction surrounding the thiazolidinedione ring. We recently used Δ 2-TGZ, together with RNAi and PPAR γ antagonists, to demonstrate the PPAR γ independence of TZD-induced ER α proteasomal degradation in two hormone-sensitive breast cancer cell lines [32]. Both Δ 2-TGZ and Δ 2-CGZ were used to demonstrate PPAR γ -independent cyclin D1 proteolysis in the hormone-

dependent cell line MCF-7 [34]. However, our knowledge about the action of these molecules in hormone-independent breast cancer cells is very poor. Moreover, these derivatives devoid of PPAR γ agonist activity were only modestly more potent than TGZ and CGZ in inhibiting cell proliferation and inducing cyclin D1 proteolysis [34]. Hence, the use of these compounds for breast cancer therapy needs to improve their antiproliferative effects.

Recently, several studies showed that biotin-conjugated macromolecular carriers were able to increase the uptake of anticancer drugs in tumor cells [35, 36]. Biotin, a member of the vitamin family (vitamin H), is a growth promoter of cells. Its content in cancerous tumors is significantly higher than in normal tissue and cancer cells often over-express biotin-specific receptors on the cell surface. Thus, the specific interactions between biotin and its receptors may be exploited for targeted drug delivery. In the present study, we have assessed the in vitro effects of a biotinylated derivative of Δ 2-TGZ not only in hormone-dependent (MCF-7) but also in hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cells. The biotinylated derivative was more potent in affecting cell proliferation than Δ 2-TGZ. This was correlated to a higher potency to induce cyclin D1 proteolysis. However, the addition of other substituents to the terminal hydroxyl function of Δ 2-TGZ also resulted in an increase in the antiproliferative activity. This suggested that rather than biotinylation, the functionalization of the terminal hydroxyl function of Δ 2-TGZ was a key element for the antiproliferative effect of the molecule. This important result should be taken into account for the design of new thiazolidinedione derivatives able to affect various types of breast cancer cells in a PPAR γ -independent pathway.

Materials and methods

Cell culture and reagents

MCF-7 and MDA-MB231 human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). Both cell lines were grown at 37°C under 5% CO₂, in phenol red Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for MCF-7 and in L-15 medium (Gibco, Invitrogen, UK) for MDA-MB-231. These media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Eurobio, Les Ulis, France) and 2 mM L-glutamine.

TGZ was purchased from Sigma–Aldrich. The synthesis of compound **1** (carbonic acid *tert*-butyl ester 2-{4-[2,4-dioxothiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]phenoxyethyl}-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl ester) was achieved according to slight modifications of known procedures [37, 38].

Then, $\Delta 2$ -TGZ resulted from trifluoroacetic acid treatment of compound **1**. Biotinylated- $\Delta 2$ -TGZ (b $\Delta 2$ -TGZ) was obtained from $\Delta 2$ -TGZ by simple esterification of the phenol group of the chromane moiety by carboxylic acid group of biotin. Compound **2** (*O*-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-8-aminocapryloyl) $\Delta 2$ -TGZ) and compound **3** (*O*-(8-aminocapryloyl) $\Delta 2$ -TGZ trifluoroacetate) were obtained during the synthesis of another form of b $\Delta 2$ -TGZ in which biotin was associated to $\Delta 2$ -TGZ by the use of a linker. Synthetic and analytical details will be published elsewhere. The identity and purity of these synthetic derivatives were verified by nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, and elemental analysis. TGZ, $\Delta 2$ -TGZ, b $\Delta 2$ -TGZ, and compounds **1–3** were dissolved in DMSO.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 6-well plates at the density of 8.10^4 cells/well in 2 ml of medium supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 h of cell attachment, the medium was replaced by fresh medium supplemented with 1% FCS, 2 mM L-glutamine and investigated compounds. Cell proliferation was studied after 24 h of treatment. Control wells received 0.1% DMSO. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized, and counted with the CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières, France). Each treatment was performed in triplicate. For the different compounds, the concentration leading to a decrease of 50% in the number of viable cells (IC₅₀) was measured.

Transient transfection assay

MCF-7 cells were seeded in 6-well plates at the density of 2.10^5 cells/well in 2 ml of medium supplemented with 5% FCS and 2 mM L-glutamine and allowed to adhere for 24 h. For PPAR transcriptional activity measurement, cells were transfected with pPPRE3tk-luc reporter (1 μ g/well) and SV40-driven β -galactosidase (β -Gal) (0.6 μ g/well), as an internal control plasmid, in the presence of a human PPAR γ expression vector (2 μ g/well). Transfections were performed using Exgen 500 (Euromedex, France) according to the manufacturer's protocol. After transfection, cells were allowed to grow for 24 h in phenol-red DMEM supplemented with 10% FCS stripped in dextran-coated charcoal and 2 mM L-glutamine. Cells were then treated with different compounds for 24 h in fresh medium. In each sample, luciferase activity was measured by using the Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières, France). β -Gal activity was measured using the β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega). Luciferase activity was detected using a luminometer and normalized with respect to β -Gal activity measured using a spectrophotometer.

Western immunoblotting

At the end of the treatment, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were washed twice with PBS in T-75 flasks, scrapped, and collected by centrifugation at 180g for 10 min. The pellets were washed with PBS and suspended in 200 μ l of lysis buffer containing: 25 mM MOPS pH 7.2, 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM nitrophenylphosphate, 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitors (10 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, and 100 μ M benzamidine). An aliquot of cell lysate was used for protein concentration determination (RC-DC kit, Bio-Rad Laboratories). After addition of 2 \times Laemmli buffer (1v/1v), samples were heated at 100°C for 10 min. Thirty micrograms of total proteins were subjected to SDS-PAGE (10%). After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in TNT buffer (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powder milk and incubated with ER α antibody (clone F-10, SC-8002, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:500, cyclin D1 antibody (Cell Signaling) diluted at 1:1000, cyclin B1 antibody (clone H-433, SC-752, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:500, or β -Actin antibody (clone C-11, SC-1615-R, Santa Cruz Biotechnology) diluted at 1:3000 in TNT buffer overnight at 4°C. Then, the membranes were washed five times with TNT and incubated for 1 h with a peroxidase-linked secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). After five washes with TNT, the membranes were developed with ECL detection reagent using chemiluminescence (Amersham, Orsay, France) and observed using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories).

Statistical analysis

The results of IC₅₀ and those of luciferase/ β -Gal activities were expressed as mean \pm standard error of the mean of three different experiments. Differences among treatment groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which *P* was less than 0.05 were statistically significant. When significant differences were detected, specific post hoc comparisons between treatment groups were examined with the Bonferroni test (SPSS v11.0 Computer Software).

Results

MDA-MB-231 cells are more sensitive than MCF-7 to TGZ and $\Delta 2$ -TGZ

The antiproliferative effects of $\Delta 2$ -TGZ (the PPAR γ inactive analog of TGZ) had mainly been tested on the

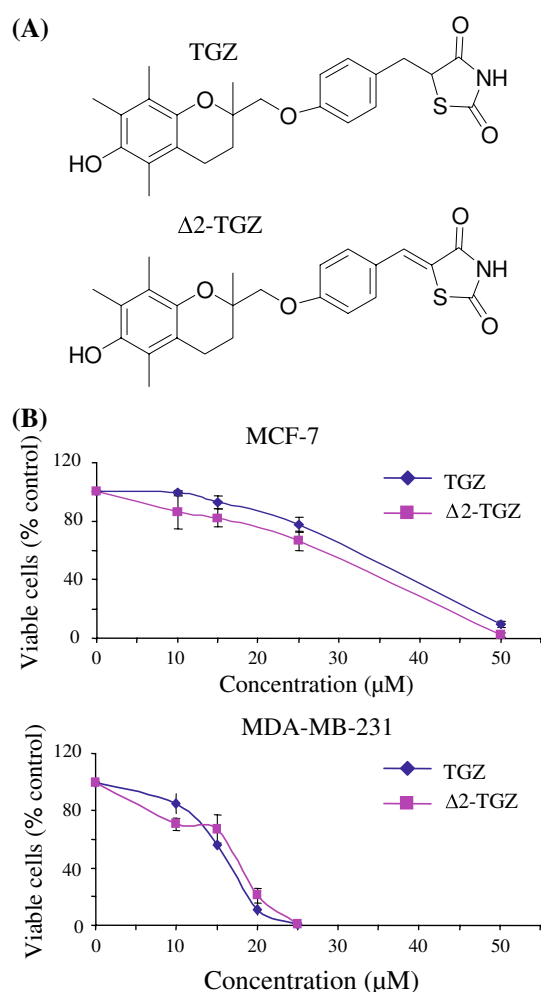


Fig. 1 Analysis of cell proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed to TGZ and its PPAR γ inactive analog $\Delta 2$ -TGZ. **a** Structure of TGZ and $\Delta 2$ -TGZ which possesses a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring. **b** Cells were treated with 10, 15, 25, or 50 μM TGZ or $\Delta 2$ -TGZ. Control cells were treated with DMSO. Cell numbers were evaluated after 24 h using the CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean \pm s.e.m. of three different counts

hormone-dependent MCF-7 cell line. Hence, we started our study by analyzing its effects on the hormone-insensitive cell line MDA-MB-231. We compared its effects to those of TGZ, and both compounds were also applied on MCF-7 cells as a reference (Fig. 1).

After 24 h of treatment with TGZ, an inhibition of MCF-7 cell proliferation was observed: at 25 μM , the number of viable cells was 81% of those in control cultures treated with DMSO, whereas at 50 μM TGZ, only 11% of viable cells were present. The IC_{50} was $35.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$. This compound was more potent in inhibiting MDA-MB-231 cell proliferation. Indeed, after 24 h of exposure, at 15 μM , viable cells were 56% of control and at 25 μM there were approximately no viable cells. The IC_{50} was $15.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ which was significantly different from the

IC_{50} measured in MCF-7 cells ($P < 0.05$). Thus, the hormone-insensitive cell line was more sensitive to TGZ.

After 24 h of treatment with $\Delta 2$ -TGZ, an inhibition of proliferation was also observed in both cell lines. In MCF-7 cells, this inhibition was significantly higher than with TGZ since the IC_{50} was $29.7 \pm 2 \mu\text{M}$ ($P < 0.05$). At 50 μM , there were approximately no viable cells. In MDA-MB-231, the IC_{50} was $16.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$, and it was not significantly different from those observed with TGZ.

The antiproliferative effect of $\Delta 2$ -TGZ is potentiated by biotinylation

Then, we studied the effects of a biotinylated derivative of $\Delta 2$ -TGZ (b $\Delta 2$ -TGZ) whose structure is shown in Fig. 2a. First, we verified that b $\Delta 2$ -TGZ did not activate PPAR γ . This was performed using MCF-7 cells transfected with a pPPRE3tk-luc reporter. In contrast to TGZ used as a positive control, b $\Delta 2$ -TGZ did not induce a significant increase in luciferase activity (Fig. 2b). Thus, biotinylation did not modify the properties of $\Delta 2$ -TGZ. Then, both MCF-7 and MDA-MB-231 were treated with b $\Delta 2$ -TGZ. In both cell lines, after 24 h of exposure to this derivative, we observed a higher inhibition of proliferation than with $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 2c). Indeed, in MCF-7 cells, the IC_{50} was $11.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$ (significantly different from 29.7 μM in the case of $\Delta 2$ -TGZ, $P < 0.05$). In MDA-MB-231, the IC_{50} was $3.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ (significantly different from 16.6 μM in the case of $\Delta 2$ -TGZ, $P < 0.05$). Once again, the hormone-insensitive cell line displayed a higher sensitivity than the hormone-dependent cell line.

Then, we analyzed cyclin D1 in breast cancer cells that had been exposed to the biotinylated derivative of $\Delta 2$ -TGZ. Indeed, the inhibition of MCF-7 cell proliferation induced by $\Delta 2$ -TGZ is associated with a proteolysis of cyclin D1 which occurs in a PPAR γ -independent manner. We studied cyclin D1 by western blotting in whole cell lysates from both MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed for 24 h to b $\Delta 2$ -TGZ. We compared the effect of this molecule with those of $\Delta 2$ -TGZ.

In the hormone-dependent MCF-7 cells exposed to 1 or 5 μM $\Delta 2$ -TGZ, the intensity of the signal obtained with the anti-cyclin D1 antibody was similar to those of control cells (Fig. 3a). However, the signal intensity decreased significantly in lysates of cells exposed to 25 μM of the compound. In the case of b $\Delta 2$ -TGZ-treated MCF-7 cells, a dose-dependent decrease in cyclin D1 detection was observed: at 5 μM b $\Delta 2$ -TGZ, a significant decrease of the staining was observed whereas in the presence of 25 μM b $\Delta 2$ -TGZ, the signal almost completely disappeared (Fig. 3a). The decrease in cyclin D1 detection in case of $\Delta 2$ -TGZ or b $\Delta 2$ -TGZ treatment (25 μM) was not observed when the proteasome inhibitor epoxomicin (10 μM) was present in the culture medium demonstrating a proteasome-

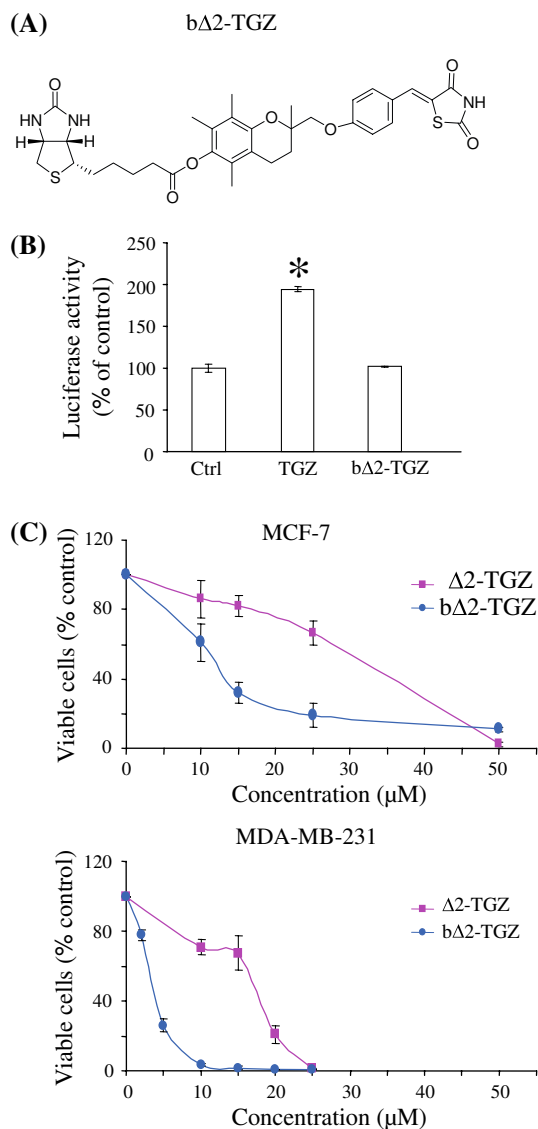


Fig. 2 Analysis of cell proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed to $\Delta 2$ -TGZ and its biotinylated derivative. **a** Structure of $b\Delta 2$ -TGZ that was obtained by coupling of the terminal hydroxyl function of $\Delta 2$ -TGZ with biotin. **b** MCF-7 cells were transiently co-transfected with pPPRE3tkLuc and pCMV- β Gal in the presence of a human PPAR γ expression vector. The cells were treated for 24 h with TGZ or $b\Delta 2$ -TGZ (25 μ M). Luciferase reporter activity was measured, normalized with the β -Gal activity, and expressed as percentage of the control assumed as 100%. The values represent the means \pm s.e.m. of three different experiments. In each experiment, the activities of transfected plasmids were assayed in duplicate transfections. * Significantly different from untreated control ($P < 0.05$). **c** Cells were treated with increasing concentrations of $\Delta 2$ -TGZ or $b\Delta 2$ -TGZ. Control cells were treated with DMSO. Cell numbers were evaluated after 24 h using the CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean \pm s.e.m. of three different counts

dependent degradation (Fig. 3a). β -Actin detection was identical in all samples demonstrating the loading of equal amount of proteins.

In the hormone-independent cell line, MDA-MB-231 which was more sensitive to $b\Delta 2$ -TGZ in regard to its antiproliferative effect, we used only 3 μ M $b\Delta 2$ -TGZ which is approximately the IC₅₀ value measured in our proliferation analyses. Cyclin D1 was not detected in lysates of MDA-MB-231 cells that had been exposed for 24 h to such a concentration of $b\Delta 2$ -TGZ (Fig. 3b). At a similar concentration, neither TGZ nor $\Delta 2$ -TGZ could induce a modification of cyclin D1 signal intensity in comparison to control cells (Fig. 3b). In the same cell lysates, cyclin B1 detection was not affected as previously reported in MCF-7 cells exposed to $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 3b). As observed in MCF-7, the disappearance of cyclin D1 did not occur in case of $b\Delta 2$ -TGZ exposure in the presence of epoxomicin (Fig. 3c). Thus, $b\Delta 2$ -TGZ that we have shown to have a more potent antiproliferative action than $\Delta 2$ -TGZ is also a higher cyclin D1-ablative agent. Besides, the higher sensitivity of MDA-MB-231 cells to $b\Delta 2$ -TGZ in regard to cell proliferation is associated with a higher sensitivity to cyclin D1 proteolysis.

$b\Delta 2$ -TGZ has also a more potent ER α -ablative effect in MCF-7 cells

Since in hormone-dependent cell lines, $\Delta 2$ -TGZ is known to induce ER α proteolysis in a PPAR γ -independent manner, we also studied ER α in MCF-7 cells. This receptor was studied by western blotting in whole cell lysates from cells exposed to $b\Delta 2$ -TGZ, $\Delta 2$ -TGZ, or TGZ used at 1, 5, and 25 μ M for 24 h. The intensity of the signal obtained with the anti-ER α antibody decreased significantly in lysates of MCF-7 cells exposed to 25 μ M of either TGZ or $\Delta 2$ -TGZ. In the presence of 25 μ M $b\Delta 2$ -TGZ, the signal almost completely disappeared, whereas at a dose as low as 5 μ M, a decrease of the staining was observed (Fig. 4a). These changes in ER α detection were related to its proteasomal degradation as demonstrated using epoxomicin (Fig. 4a). The decrease in ER α immunodetection was not only obtained at lower doses of $b\Delta 2$ -TGZ but it was also obtained faster. Indeed, when used at 25 μ M, this compound induced a complete disappearance of the signal as soon as 8 h after the beginning of the treatment, whereas no decrease could be observed in case of treatment with 25 μ M $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 4b). Thus, $b\Delta 2$ -TGZ also displays a higher ER α -ablative effect than $\Delta 2$ -TGZ.

Biotin is not responsible for the increased antiproliferative effects of $b\Delta 2$ -TGZ

In order to determine if the increase in the antiproliferative effects of $b\Delta 2$ -TGZ was the result of the functionalization by biotin which could be internalized by a membrane receptor, we performed competition experiments with free

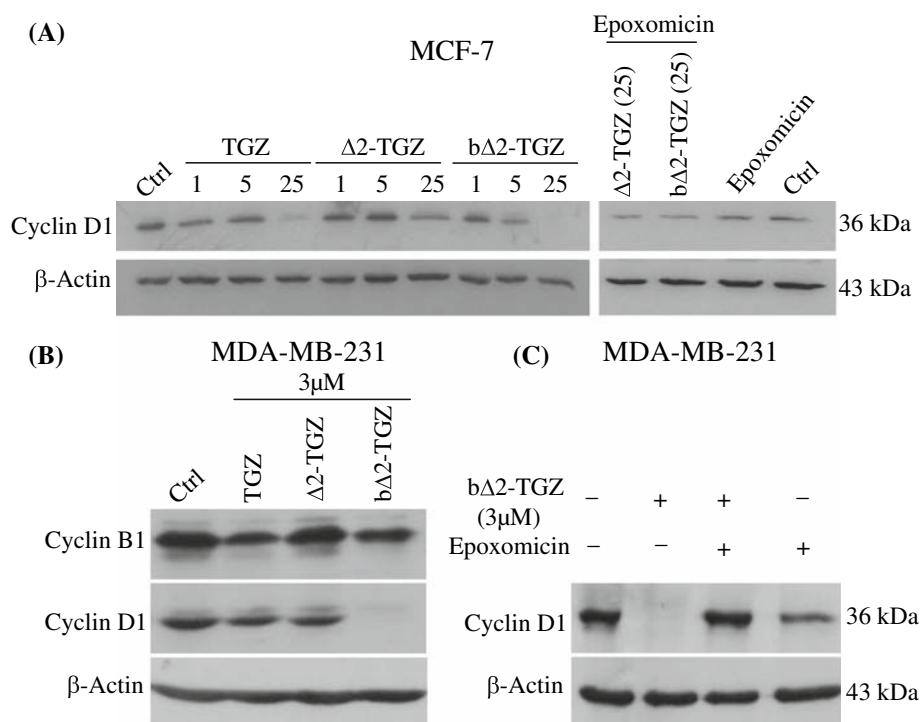


Fig. 3 Western blot analysis of Cyclin D1 in MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed to bΔ2-TGZ. **a** MCF-7 cells were treated with TGZ, Δ2-TGZ, or bΔ2-TGZ (at 1, 5, and 25 μM) for 24 h. Other cells were exposed to 25 μM Δ2-TGZ or bΔ2-TGZ in the presence of epoxomicin (10 μM) which was also used alone. Control cells received DMSO. 30 μg of total proteins were subjected to SDS-PAGE and western blotting analysis using an anti-cyclin D1 polyclonal antibody. β-Actin was used as an internal control. **b**

Similar analysis performed after 24 h of culture of MDA-MB-231 cells in the presence of 3 μM of TGZ, Δ2-TGZ, or bΔ2-TGZ. Control cells were exposed to DMSO alone. Cyclin B1 was also detected in addition to cyclin D1 and β-Actin. **c** MCF-7 cells were exposed for 24 h to 3 μM bΔ2-TGZ used alone or in addition to epoxomicin (10 μM). Other cells were exposed for the same time only to epoxomicin or to DMSO (Ctrl)

biotin (Fig. 5). In both MCF-7 and MDA-MB-231 cells, we could not observe a lower antiproliferative effect of bΔ2-TGZ after 24 h in the presence of free biotin used up to 25 μM. This result did not agree with an interaction between biotin and its receptors to explain the increased antiproliferative effects of bΔ2-TGZ.

In order to get more information on the increase in the antiproliferative effects of bΔ2-TGZ, we studied the effects of other compounds that were substituted at the same position (Fig. 6). Compound **1** was carbonic acid *tert*-butyl ester 2-{4-[2,4-dioxothiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]phenoxy-methyl}-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl ester. This compound was obtained during the synthesis of Δ2-TGZ which resulted from trifluoroacetic acid treatment of compound **1**. Compounds **2** and **3** were obtained during the synthesis of other Δ2-TGZ derivatives. Compound **2** was *O*-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-8-aminocapryloyl)Δ2-TGZ and compound **3** was *O*-(8-aminocapryloyl)Δ2-TGZ trifluoroacetate.

When these compounds were studied in cell proliferation assays, we observed that despite the absence of biotin, they had antiproliferative effects on both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. When applied on the hormone-

dependent cell line MCF-7 during 24 h, the IC₅₀ of compounds **1**, **2**, and **3** were 7.7 ± 0.9 μM, 13 ± 2.6 μM, and 3.2 ± 0.1 μM, respectively (Table 1). These values were lower than the IC₅₀ values measured for Δ2-TGZ (29.7 μM; *P* < 0.05) and not significantly different from those measured for bΔ2-TGZ (11.3 μM). In the hormone-independent cell line MDA-MB-231, the IC₅₀ of compounds **1**, **2**, and **3** were 3.3 ± 0.1 μM, 3.2 ± 0.5 μM, and 5 ± 1.3 μM, respectively, that is lower than the IC₅₀ value measured for Δ2-TGZ (16.6 μM; *P* < 0.05) and not significantly different from those measured for bΔ2-TGZ (3.4 μM) (Table 1). Thus, the potentiation of the antiproliferative effects of Δ2-TGZ did not appear to be associated with the presence of biotin but rather to the functionalization of the terminal OH group of the molecule.

Discussion

Advances in the characterization of breast tumor molecular phenotypes led to an improvement of therapy. Nevertheless, de novo and acquired resistance mechanisms to endocrine or targeted therapies on the one hand and the

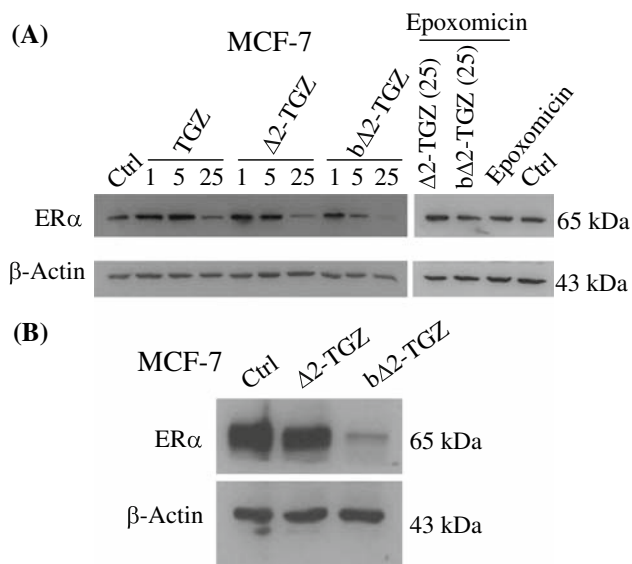


Fig. 4 Western blot analysis of ER α in MCF-7 cells exposed to different PPAR γ ligands. **a** MCF-7 cells were treated with TGZ, Δ 2-TGZ, or b Δ 2-TGZ (at 1, 5, and 25 μ M) for 24 h. Other cells were exposed to 25 μ M Δ 2-TGZ or b Δ 2-TGZ in the presence of epoxomicin (10 μ M) which was also used alone. Control cells received DMSO. 30 μ g of total proteins were subjected to SDS-PAGE and western blotting analysis using an anti-ER α monoclonal antibody. β -Actin was used as an internal control. **b** Similar analysis performed after 8 h of culture in the presence of 25 μ M of the different compounds

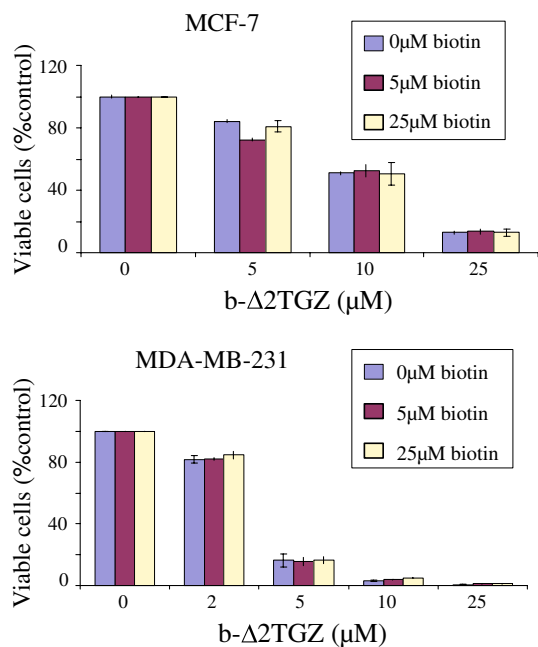
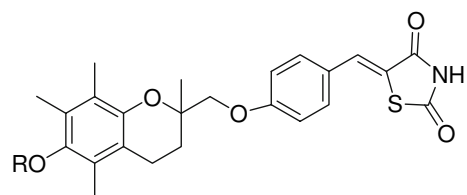


Fig. 5 Analysis of cell proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed to b Δ 2-TGZ in the presence of biotin. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with Δ 2-TGZ in the presence of increasing concentration of biotin (0, 5, and 25 μ M). Cell numbers were evaluated after 24 h using the CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay. Results are given as mean \pm s.e.m. of three different counts



- 1: R = -COO t -Bu
- 2: R = -(CH₂)₇NHCOO t -Bu
- 3: R = -(CH₂)₇NH₃⁺, CF₃COO⁻

Fig. 6 Chemical structure of various *O*-substituted Δ 2-TGZ derivatives. **1:** *O*-*tert*-butoxycarbonyl Δ 2-TGZ. **2:** *O*-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-8-aminocapryloyl) Δ 2-TGZ. **3:** *O*-(8-aminocapryloyl) Δ 2-TGZ trifluoroacetate

Table 1 Antiproliferative effects of various Δ 2-TGZ derivatives

Compound	IC ₅₀ (μ M)	
	MCF-7	MDA-MB-231
TGZ	35.4	15.8
Δ 2-TGZ	29.7	16.6
b Δ 2-TGZ	11.3	3.4
1	7.7	3.3
2	13	3.2
3	3.2	5

absence of targeted therapy for patients with triple-negative breast cancer on the other hand are two important reasons for developing new therapeutic agents. In this purpose, thiazolidinediones that are synthetic PPAR γ ligands have been subjected to numerous studies due to their anti-tumor activity in preclinical models of breast cancer. However, mounting evidence indicates that the anti-tumor effects of thiazolidinediones occur independently of PPAR γ activation. The dissociation of the anti-tumor effects of thiazolidinediones from their PPAR γ agonist activity provided a rationale for using thiazolidinediones as scaffolds for lead optimization to develop a novel class of anti-tumor agents. Such compounds were obtained by introducing a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring [31]. For instance, Δ 2-TGZ was a derivative of TGZ devoid of PPAR γ activating activity [34]. However, Δ 2-TGZ was only modestly more potent than TGZ in inhibiting MCF-7 cell proliferation (IC₅₀ = 55 μ M vs. 65 μ M as determined graphically) [34]. A similar modest increase in cell proliferation inhibiting potency was observed in prostate cancer cell lines (IC₅₀ = 20 μ M vs. 30 μ M in PC-3 cells for Δ 2-TGZ and TGZ, respectively) [31]. Hence, it is necessary to improve the effects of this kind of derivative. The specific interactions between biotin and its receptors may be exploited for targeted drug delivery [35, 36]. Thus, the aim of our study was to study the in vitro effects of a biotinylated derivative of Δ 2-TGZ.

We studied the effect of b Δ 2-TGZ on two breast cancer cell lines: MCF-7 which are hormone-sensitive cells which were studied previously for their response to Δ 2-TGZ and MDA-MB-231 which are hormone-insensitive and whose response to Δ 2-TGZ has not been described. In MCF-7, our results confirm the antiproliferative action of TGZ ($IC_{50} = 35.4 \mu\text{M}$) and the modest increase in antiproliferative action of Δ 2-TGZ ($IC_{50} = 29.7 \mu\text{M}$) previously reported [34]. We observed that MDA-MB-231 cells were more sensitive to TGZ ($IC_{50} = 15.8 \mu\text{M}$). This is consistent with a previous study that also demonstrated a TGZ-induced acidification of intracellular pH in both MCF-7 and MDA-MB-231 [39]. In this hormone-independent cell line, we showed that the PPAR γ -inactive compound Δ 2-TGZ also inhibited cell proliferation but we did not observe a significant difference with TGZ ($IC_{50} = 16.6 \mu\text{M}$). It might be interesting to determine if Δ 2-TGZ also acts on cellular pH and to study other hormone-independent breast cancer cell lines to determine if Δ 2-TGZ could be used for the therapy of both hormone-sensitive and hormone-insensitive tumors.

Then, we studied the effects of a biotinylated TGZ derivative. b Δ 2-TGZ could not stimulate the PPRE-driven expression of luciferase in MCF-7 transfected cells, demonstrating that biotinylation did not modify the property of Δ 2-TGZ in regard to PPAR γ activation. The level of luciferase expression measured in MCF-7 cells exposed to TGZ that we used as a positive control was similar to previously reported values [32]. b Δ 2-TGZ was more potent than TGZ and Δ 2-TGZ in inhibiting cell proliferation in both MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. Its antiproliferative potency was 2.6-fold and 4.9-fold higher than that of Δ 2-TGZ in MCF-7 and MDA-MB-231, respectively. This result is consistent with the fact that vitamin-mediated targeting is a potential mechanism to increase drug uptake by cancer cells [35]. Interestingly, b Δ 2-TGZ also exhibited higher potency in inducing cyclin D1 proteasomal degradation compared to TGZ or Δ 2-TGZ in both cell lines. This result indicates that in the hormone-independent MDA-MB-231 cells, cyclin D1 proteolysis can also occur in a PPAR γ -independent manner as in MCF-7 cells exposed to either Δ 2-TGZ or some of its derivatives [34, 38]. These PPAR γ -inactive compounds also induce cyclin D1 proteolysis in prostate cancer cells and this has been recently shown to be mediated by a SCF $^{\beta\text{TrCP}}$ mechanism [33, 40]. It could be interesting to determine if a similar mechanism is involved in cyclin D1 proteolysis in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cells.

In the hormone-dependent cell line MCF-7, there was also an improvement of ER α proteasomal degradation by b Δ 2-TGZ. The proteolysis of this receptor occurred earlier and more completely than in case of Δ 2-TGZ treatment. It

could be interesting to compare MCF-7 with other hormone-dependent breast cancer cell lines to determine if this is a general feature of this compound. The mechanism of this proteolysis that is observed not only with TGZ derivatives but also with 15d-PGJ(2) is still unknown [32]. It was recently reported that 15d-PGJ(2) was able to bind covalently to ER α in vitro and in vivo [41]. One might suggest that such a modification could trigger ER α proteolysis. We studied the possibility of a covalent binding of b Δ 2-TGZ to ER α in MCF-7 cells but we failed to observe it (data not shown).

Since biotinylation of Δ 2-TGZ improved its antiproliferative and both cyclin D1- and ER α -ablating activities, we checked that it was related to the presence of biotin which could lead to a better internalization of Δ 2-TGZ in case of a receptor-mediated event. We were surprised to observe that the inhibition of proliferation could not be reduced in the presence of biotin in the culture medium. Indeed, free biotin should have realized a competition with b Δ 2-TGZ for the receptor as expected from experiments in which unlabeled biotin was able to inhibit [^3H]biotin uptake in epithelial cells [42]. This negative result suggested that the presence of biotin per se was not the reason for the increased activity of Δ 2-TGZ. This hypothesis was confirmed by the use of other Δ 2-TGZ derivatives that possessed substituents at the same position and that were as potent as b Δ 2-TGZ in inhibiting cell proliferation. These results were in accordance with previous studies using Δ 2-TGZ as a lead compound for structural modifications [34, 38]. Structural optimization of Δ 2-TGZ led, for instance, to Δ 2-TG-6 which possessed an additional allyl moiety on the terminal hydroxyl function of Δ 2-TGZ. This derivative exhibited IC_{50} of $8 \mu\text{M}$ in inhibiting MCF-7 cell viability after 24 h of exposure [34]. In regard to cyclin D1 proteolysis, on western blots, in extracts of cells exposed to $7.5 \mu\text{M}$ Δ 2-TG-6, the level of this protein was only 2% of that of control cells [34, 40]. Other Δ 2-TGZ derivatives having other substituents on the terminal hydroxyl group like 3,3-dimethylallyl or benzyl also exhibited a higher cyclin D1 ablative activity than Δ 2-TGZ: at $7.5 \mu\text{M}$, cyclin D1 levels were reduced to 5 and 12%, respectively [38]. The highest potency in cyclin D1 proteolysis induction and proliferation inhibition was obtained with STG28. In addition to an allyl-functionalization of the terminal hydroxyl group, this Δ 2-TG-6 derivative bore an additional methoxy moiety at the central phenyl ring [38]. In MCF-7 cells exposed during 24 h to $7.5 \mu\text{M}$ STG28, cyclin D1 levels were reduced to 1% of that in control cells, and the IC_{50} in MCF-7 cell proliferation was $5 \mu\text{M}$ [38]. It might be interesting to determine if a similar substitution could also potentiate the activity of our derivatives, especially compound **3** that was the most efficient molecule on both MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

To conclude, our results demonstrate that PPAR γ -inactive troglitazone derivatives have anti-proliferative activity not only in hormone-dependent, but also in hormone-independent breast cancer cells. In both hormone-dependent and hormone-independent cell lines, biotinylation of $\Delta 2$ -TGZ increases its antiproliferative effect and its cyclin D1 proteasomal degradation. This potentiation is due to the modification of $\Delta 2$ -TGZ on its hydroxyl terminal group rather than to biotin per se. This optimization of the anti-proliferative action of $\Delta 2$ -TGZ is very promising for the design of new synthetic compounds able to target various forms of breast cancer.

Acknowledgments This work was supported by grants of the “Université Henri Poincaré (BQR),” “Conseil Régional de Lorraine,” “Association pour la Recherche sur le Cancer,” “Ligue Contre le Cancer, comité de la Haute-Marne”, “Cancéropôle Grand Est.” Julie Lecomte was recipient of a grant of the “Ligue Contre le Cancer, comité de la Haute-Marne.” Christelle Colin was recipient of a grant of the “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche”. We would like to thank SANOFI-AVENTIS for a studentship to Stéphane Salamone. We acknowledge Alexandra Kleinclaus for fruitful contribution to cell culture and western blotting. We also thank Martine Chillet, Brigitte Fernet, Sandrine Adach, and François Dupire for their technical assistance. The pPPRE3tkLuc construct was a generous gift from Pr. Philippe Becuwe.

References

- Sørli T (2004) Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer* 40(18):2667–2675
- Early Breast Cancer Trialist’ Collaborative Group (EBCTC) (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet* 365:1687–1717
- Nahta R, Esteva FJ (2006) Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 232(2):123–138
- Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E et al (2003) Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand TGZ as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 79:391–397
- Yee LD, Williams N, Wen P et al (2007) Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum marker. *Clin Cancer Res* 13:246–252
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–839
- Isseman I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645–650
- Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B et al (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7355–7359
- Dreyer C, Krey G, Keller H et al (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879–887
- Isseman I, Prince RA, Tugwood JD et al (1993) The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 75:251–256
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841–850
- McKenna NJ, O’Malley BW (2002) Minireview: nuclear receptor coactivators—an update. *Endocrinology* 43:2461–2465
- Yang W, Rachez C, Freedman LP (2000) Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol Cell Biol* 20:8008–8017
- Thoennes SR, Tate PL, Price TM et al (2000) Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by omega-3 and omega-6 fatty acids in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol* 160:67–73
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J et al (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803–812
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM et al (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813–819
- Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507–514
- Kim KY, Kim SS, Cheon HG (2006) Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 72:530–540
- Elstner E, Muller C, Koshizuka K et al (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 USA* 95:8806–8811
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P et al (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell* 1:465–470
- Mehta RG, Williamson E, Patel MK et al (2000) A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst* 92:418–423
- Fenner MH, Elstner E (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Invest Drugs* 14:557–568
- Yin F, Wakino S, Liu Z et al (2001) TGZ inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 286:916–922
- Kar R, Singha PK, Venkatachalam MA et al (2009) A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells. *Oncogene* 28(28):2556–2568
- Zhou J, Zhang W, Liang B et al (2009) PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 41(11):2334–2342
- Goetze S, Xi XP, Kawano H et al (1999) PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 33:798–806
- Xin X, Yang S, Kowalski J et al (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274:9116–9121
- Blanquicett C, Roman J, Hart CM (2008) Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 6(A):25–34
- Wei S, Yang J, Lee SL et al (2009) PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Lett* 276(2):119–124
- Clay CE, Monjazeb A, Thorburn J et al (2002) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2-induced apoptosis does not require PPAR-gamma in breast cancer cells. *J Lipid Res* 43(11):1818–1828
- Shiau CW, Yang CC, Kulp SK et al (2005) Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res* 65(4):1561–1569

32. Lecomte J, Flament S, Salamone S et al (2008) Disruption of ER α signalling pathway by PPAR γ agonists: evidences of PPAR γ -independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 112:437–451
33. Yang CC, Ku CY, Wei S et al (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent repression of prostate-specific antigen expression by thiazolidinediones in prostate cancer cells. *Mol Pharmacol* 69(5):1564–1570
34. Huang JW, Shiau CW, Yang YT et al (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor γ -independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 67:1342–1348
35. Russell-Jones G, McTavish K, McEwan J et al (2004) Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J Inorg Biochem* 98(10):1625–1633
36. Yang W, Cheng Y, Xu T et al (2009) Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. *Eur J Med Chem* 44(2):862–868
37. Boschi D, Tron GC, Lazzarato L et al (2006) NO-donor phenols: a new class of products endowed with antioxidant and vasodilator properties. *J Med Chem* 49:2886–2897
38. Huang JW, Shiau CW, Yang J et al (2006) Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents. *J Med Chem* 49:4684–4689
39. Turturro F, Friday E, Fowler R et al (2004) Troglitazone acts on cellular pH and DNA synthesis through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism in breast cancer-derived cell lines. *Clin Cancer Res* 10(20):7022–7030
40. Yang J, Wei S, Wang DS et al (2008) Pharmacological exploitation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ciglitazone to develop a novel class of androgen receptor-ablative agents. *J Med Chem* 51(7):2100–2107
41. Kim HJ, Kim JY, Meng Z et al (2007) 15-deoxy-Delta 12, 14-prostaglandin J2 inhibits transcriptional activity of estrogen receptor-alpha via covalent modification of DNA-binding domain. *Cancer Res* 67:2595–2602
42. Kansara V, Luo S, Balasubrahmanyam B et al (2006) Biotin uptake and cellular translocation in human derived retinoblastoma cell line (Y-79): a role of hSMVT system. *Int J Pharm* 312(1–2):43–52

2. Etude des mécanismes de mort cellulaire induit par la $\Delta 2$ -TGZ

PPAR γ -inactive $\Delta 2$ -troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells

Christelle Colin-Cassin, Xiao Yao, Claudia Cerella, Sarra Chbicheb, Sandra Kuntz, Sabine Mazerbourg, Michel Boisbrun, Yves Chapleur, Marc Diederich, Stephane Flament, Isabelle Grillier-Vuissoz. *Soumis dans Molecular carcinogenesis (mai 2013)*

a. Introduction

Nous avons démontré dans l'étude précédente que la $\Delta 2$ -TGZ inhibe de manière efficace la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. Nous avons également montré qu'elle est capable de modifier le cycle cellulaire en induisant la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 et du récepteur ER α . Néanmoins, les mécanismes impliqués dans l'activité anti-proliférative de la $\Delta 2$ -TGZ ne sont pas encore clarifiés.

Il a été décrit que la plupart des TZD sont capables d'induire l'apoptose de différents types de lignées cancéreuses de manière PPAR γ -indépendante. En effet, la $\Delta 2$ -TGZ et la $\Delta 2$ -CGZ induisent la libération du cytochrome c et la fragmentation de l'ADN de deux lignées cancéreuses de prostate PC-3 et LNCaP qui expriment ou pas PPAR γ respectivement (Shiau CW., *et al.* 2005). De plus, l'induction de l'apoptose par la $\Delta 2$ -TGZ est caspase-dépendante puisqu'un pré-traitement avec un inhibiteur pan-caspases Z-VAD-FMK protège les cellules de la mort induite par la $\Delta 2$ -TGZ (Shiau CW., *et al.* 2005). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, l'agoniste dual PPAR α/γ TZD18 inhibe leur prolifération de manière dose-dépendante et induit une apoptose significative détectée par TUNEL (Zang C., *et al.* 2009). Par ailleurs, une analyse par microarray montre que le ligand TZD18 induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse UPR du stress du réticulum endoplasmique tels que BiP, XBP1, ATF3 et ATF4 (Zang C., *et al.* 2009). De plus, il induit également l'expression du facteur de transcription CHOP et des protéines pro-apoptotiques comme DR5, Bax et Bak (Zang C., *et al.* 2009). L'inhibition de l'expression de CHOP par interférence ARN bloque partiellement l'apoptose induite par le TZD18 ainsi que l'augmentation de l'expression de DR5 démontrant un rôle clé de CHOP et du stress du RE dans l'apoptose induite par le ligand TZD18 (Zang C., *et al.* 2009). Néanmoins, le lien entre stress du réticulum endoplasmique et apoptose n'est pas clairement établi. Dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, un analogue de la CGZ, OSU-CG12, induit l'expression de la protéine β -TrCP qui est un régulateur de l'apoptose. OSU-CG12 induit également un stress du RE avec une induction de l'expression de BiP, CHOP et IRE1 α . Cependant, l'OSU-CG12 semble agir de manière indépendante sur l'activation de ces deux voies puisqu'une

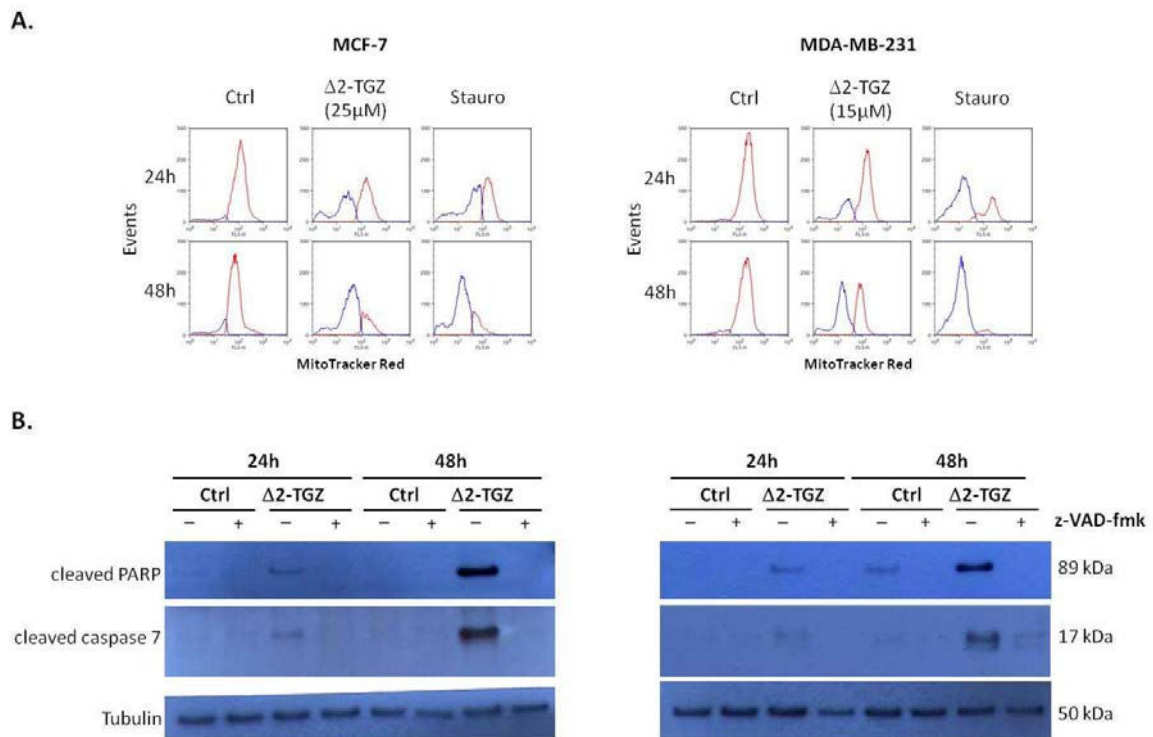


Figure 35 : Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (gauche) et MDA-MB-231 (droite) par la Δ2-TGZ. A. Mesure du potentiel membranaire mitochondrial par cytométrie en flux. Dans les cellules contrôles (Ctrl), un pic de forte intensité (courbe rouge) est observé ce qui correspond à une forte accumulation du MitoTrackerRed dans les mitochondries. Après 24 et 48 heures de traitement par la Δ2-TGZ, un second pic de moindre intensité apparaît (courbe bleue). Il est similaire à celui observé après un traitement à la Staurosporine (Stauro), un inducteur d'apoptose. Ce second pic correspond à des cellules dont les membranes des mitochondries sont altérées. **B.** Analyse par western blot de deux marqueurs de l'apoptose : PARP et caspase 7 après 24 et 48 heures de traitement à la Δ2-TGZ dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Un traitement à la Δ2-TGZ induit le clivage de PARP et de la caspase 7 dans les deux lignées cancéreuses mammaires. L'apoptose induite par la Δ2-TGZ est caspase-dépendante puisque l'inhibiteur pan-caspase Z-VAD-FMK bloque les clivages de PARP et caspase 7.

approche similaire par interférence ARN CHOP ne bloque pas l'induction de l'expression de la protéine β -TrCP, ni le clivage de PARP (Wei S., *et al.* 2010).

Ainsi, notre objectif était de caractériser les mécanismes de mort cellulaire impliqués dans l'effet anti-prolifératif PPAR γ -indépendant de la Δ 2-TGZ. Nous avons notamment étudié l'effet de la Δ 2-TGZ sur les voies de signalisation du stress du réticulum endoplasmique et de l'apoptose et vérifié si ces deux voies étaient liées.

b. Principaux résultats

Puisque les TZD induisent l'apoptose de différentes lignées cancéreuses, nous avons étudié la modification du potentiel membranaire de la mitochondrie ainsi que différents marqueurs de l'apoptose dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 en réponse à la Δ 2-TGZ. Pour étudier la modification du potentiel membranaire mitochondrial, les mitochondries sont marquées à l'aide du MitoTrackerRed, un marqueur fluorescent rouge. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux. Le MitoTrackerRed s'accumule dans les cellules où la membrane mitochondriale n'est pas altérée et ceci se traduit par la présence d'un pic rouge. Dans les cellules apoptotiques, la membrane mitochondriale est déstabilisée et le MitoTrackerRed peut sortir de la mitochondrie ce qui conduit à une diminution de la fluorescence et donc du pic rouge et à l'apparition d'un second pic bleu. Dans les cellules témoin MCF-7 et MDA-MB-231, nous observons un pic de forte intensité correspondant à une accumulation du MitoTrackerRed dans les mitochondries alors que les cellules traitées à la staurosporine, un inducteur de l'apoptose, présentent un second pic de faible intensité (**Figure 35A**). Après un traitement de 24 et 48 heures avec 25 μ M et 15 μ M de Δ 2-TGZ, un deuxième pic est détecté pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 suggérant que la membrane mitochondriale est déstabilisée (**Figure 35A**). Pour les MCF-7, 46,3% et 70,7% des cellules présentent une modification de potentiel membranaire après 24h et 48h de traitement respectivement. Pour les MDA-MB-231, seulement 28,4% et 50% des cellules présentent une modification de potentiel membranaire après 24 et 48 heures de traitement respectivement. Afin de confirmer que cette modification du potentiel mitochondrial induit par la Δ 2-TGZ correspond à des cellules apoptotiques, différents marqueurs d'apoptose ont été testés par western blot. Nous avons observé que la Δ 2-TGZ induit un clivage de PARP et de la caspase 7 après 24 et 48 heures de traitement dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (**Figure 35B**). Ce clivage est bloqué par l'inhibiteur de pan-caspases Z-VAD-FMK démontrant que la Δ 2-TGZ induit une apoptose caspase-dépendante dans les deux lignées cancéreuses mammaires (**Figure 35B**).

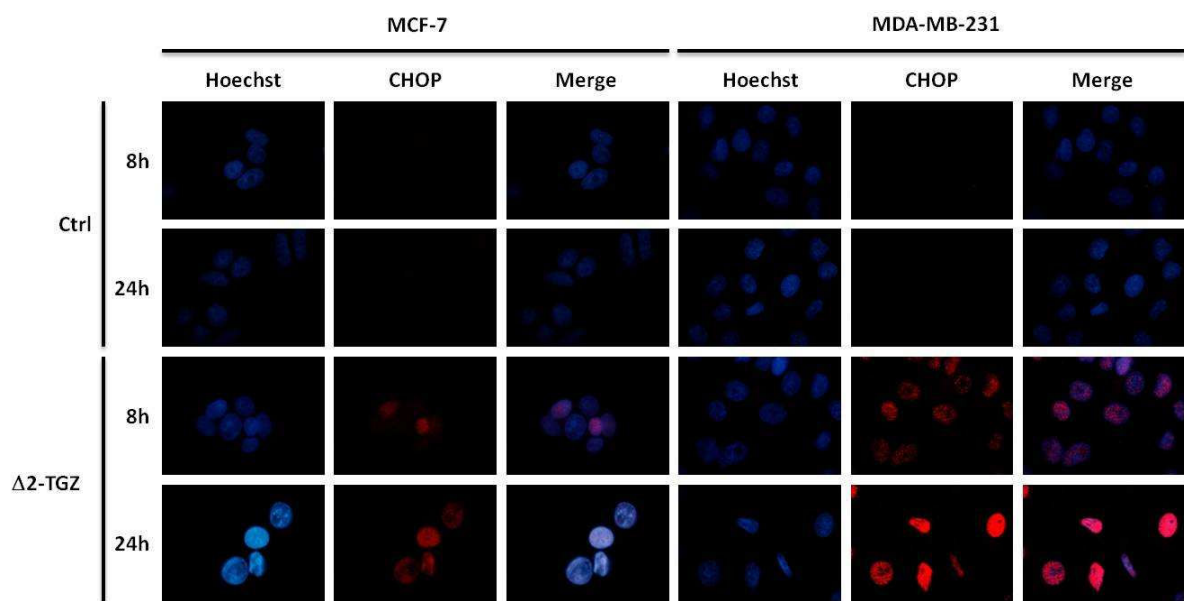


Figure 36 : Etude du stress du réticulum endoplasmique par la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Etude de la localisation de CHOP (rouge) par immunocytochimie sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. La protéine CHOP est induite après 8 et 24 heures de traitement par la $\Delta 2$ -TGZ. Le noyau est coloré en bleu par un marquage au Hoechst.

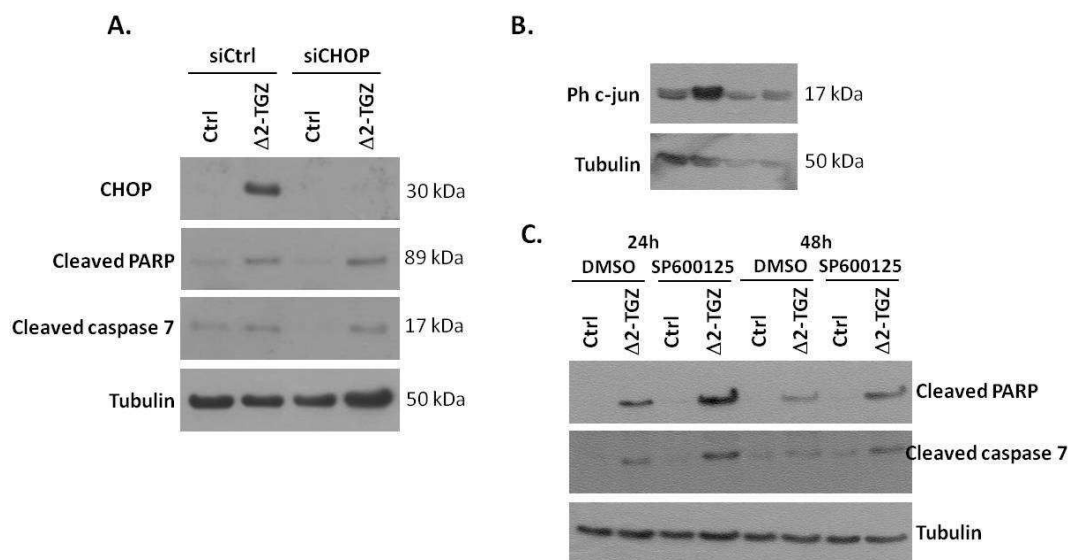


Figure 37 : Implication du stress du réticulum endoplasmique dans l'apoptose induits par la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MCF-7. **A.** Implication de la protéine CHOP dans le lien stress du RE et apoptose dans les cellules MCF-7. La protéine CHOP est inhibée par RNA interférence dans les cellules MCF-7. L'expression des deux marqueurs de l'apoptose, PARP et caspase 7, ont été étudié par western blot après 48 heures de traitement. Le clivage de PARP et de la caspase 7 est toujours détecté en présence du siRNA CHOP. **B.** Activité de l'inhibiteur JNK dans les cellules MCF-7. L'activité de l'inhibiteur JNK est vérifiée sur la phosphorylation de c-jun après 3 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MCF-7. La phosphorylation de c-jun induite par la $\Delta 2$ -TGZ est bloquée par l'inhibiteur. **C.** Implication des JNK dans le lien stress du RE et apoptose dans les cellules MCF-7. Les JNK sont bloquées grâce à un inhibiteur de kinase dans les cellules MCF-7. Le clivage de PARP et de la caspase 7 est toujours détecté en présence de l'inhibiteur.

En parallèle, une analyse par puce à ADN sur des cellules MCF-7 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ a mis en évidence l'induction de l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la voie du stress du RE comme BiP et CHOP. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR et western blot. Un traitement à la $\Delta 2$ -TGZ induit la phosphorylation de PERK et d'eIF2 α dès 1,5 heure de traitement. L'ARN messenger de XBP1 est clivé et l'expression du facteur de transcription ATF3 augmente dès 3 heures de traitement. A 6 heures, les protéines BiP et CHOP sont induites. L'augmentation de l'expression de CHOP a été confirmée par immunolocalisation et sa translocation nucléaire est détectée dès 8 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ (**Figure 36**). Dans les cellules MDA-MB-231, la $\Delta 2$ -TGZ induit également un stress du RE avec un clivage du transcrit XBP1, l'induction de l'expression d'ATF3 à 3 heures, de CHOP à 6 heures et de BiP à 12 heures. PERK et eIF2 α sont déjà activés dans les cellules contrôles comme dans les cellules traitées à la $\Delta 2$ -TGZ. En fait, les cellules MDA-MB-231 sont plus sensibles aux conditions de culture où les traitements sont effectués dans 1% SVF. Lorsque les cellules témoins sont en culture dans 10% de SVF, PERK et eIF2 α ne sont pas phosphorylés.

Puisque l'apoptose induite par la $\Delta 2$ -TGZ est observée après le stress du RE, nous avons cherché à établir s'il existait un lien entre ces deux évènements. Pour cela, nous avons testé deux voies principales en inhibant la protéine CHOP par interférence ARN et JNK grâce à un inhibiteur de kinase dans les cellules MCF-7. Le blocage de chacune des deux voies ne permet pas d'empêcher ni le clivage de PARP, ni celui de la caspase 7 (**Figure 37**). Ces résultats montrent que l'apoptose et le stress du RE induit semble être indépendants dans les cellules MCF-7.

c. Conclusion

Nous avons contribué à montrer que la $\Delta 2$ -TGZ induit un stress du RE. Il est détecté dès 1,5 et 3 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement. La $\Delta 2$ -TGZ induit également l'apoptose dès 24 heures de traitement. Dans les cellules MCF-7, nous n'avons pas montré de lien entre le stress du RE et l'apoptose suggérant que ces deux voies agissent de manière indépendante.

PPAR γ -inactive Δ 2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells

Christelle Colin-Cassin^{a,b}, Xiao Yao^{a,b}, Claudia Cerella^e, Sarra Chbicheb^{a,b}, Sandra Kuntz^{a,b}, Sabine Mazerbourg^{a,b}, Michel Boisbrun^{c,d}, Yves Chapleur^{c,d}, Marc Diederich^{e,f}, Stephane Flament^{a,b}, Isabelle Grillier-Vuissoz^{a,b}

^aUniversité de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

^bCNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

^cUniversité de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

^dCNRS, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

^eLaboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer. Hopital Kirchberg, L-2540, Luxembourg

^fDepartment of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Correspondence: Stéphane Flament, CRAN, UMR 7039, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France. Tél : 011 33(0) 3 83 68 42 52, Fax : 011 33(0) 3 83 68 40 01; E-mail: stephane.flament@univ-lorraine.fr

Abbreviations: $\Delta 2$ -Troglitazone ($\Delta 2$ -TGZ), Thiazolidinediones (TZDs), endoplasmic reticulum (ER), Ciglitazone (CGZ), Estrogen Receptor alpha ($ER\alpha$), unfolded protein response (UPR).

Abbreviated title: PPAR γ -independent effects in breast cancer cells

Key words: Thiazolidinediones, Breast cancer, Endoplasmic reticulum stress, Apoptosis.

Abstract

Our aim was to better understand the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)-independent pathways involved in the anti-cancer effects of thiazolidinediones (TZDs). We focused on $\Delta 2$ -troglitazone ($\Delta 2$ -TGZ), a PPAR γ inactive TZD that inhibits breast cancer cell proliferation. Changes in mitochondrial membrane potential, cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 and caspase-7 revealed that apoptosis occurred in both hormone-dependent MCF7 and hormone-independent MDA-MB-231 breast cancer cells after 24 and 48 hours of treatment. A microarray study allowed identifying endoplasmic reticulum (ER) stress as an essential cellular function as many genes involved in ER stress were up regulated in MCF7 cells following $\Delta 2$ -TGZ treatment. $\Delta 2$ -TGZ-induced ER stress was further confirmed in MCF-7 cells by phosphorylation of Pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) and its target eIF2 α after 1.5 hours, rapid increase in Activating transcription factor (ATF)3 mRNA levels, splicing of XBP1 (X-box binding protein 1) after 3 hours, accumulation of BiP (Binding immunoglobulin protein) and CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) after 6 hours. Immunofluorescence microscopy indicated that CHOP was relocalized into the nucleus of treated cells. Similarly, in MDA-MB-231 cells, overexpression of ATF3, splicing of XBP1, and accumulation of BiP and CHOP were observed following $\Delta 2$ -TGZ treatment. In MCF7 cells, knock-down of CHOP or the inhibition of c-Jun N-terminal kinase (JNK) did not impair the cleavage of PARP-1 and caspase-7. Altogether, our results show that ER stress is an early response of major types of breast cancer cells to $\Delta 2$ -TGZ, prior to, but not causative of apoptosis.

Introduction

Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), mainly thiazolidinediones (TZDs), have been proposed as anticancer agents and tested in clinical trials against breast cancer [1, 2]. Nevertheless, many of these compounds induce PPAR γ -independent effects and the involvement of PPAR γ in the anticancer action is not clear [3-7]. Δ 2-TZD derivatives having a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring which abolished agonist activity, presumably due to the increased structural rigidity surrounding the heterocyclic system, contributed to the demonstration of PPAR γ -independent events [8]. Our previous studies performed in breast cancer cell lines demonstrated anti-proliferative effects of Δ 2-TGZ, which is associated to proteasomal degradation of key proteins such as estrogen receptor alpha (ER) α and cyclin D1 [7, 9]. However, molecular mechanisms involved in anticancer effects of Δ 2-TGZ remain to be elucidated.

Some TZDs induce apoptosis in a PPAR γ -independent manner in various cancer cell types. For instance, in prostate cancer cells, Δ 2-ciglitazone (CGZ) and Δ 2-TGZ (both devoid of PPAR γ agonist activity) were more potent compared to CGZ and TGZ in inducing cytochrome c release and DNA fragmentation [6]. CGZ, TGZ and their Δ 2 derivatives inhibited the anti-apoptotic function of Bcl-xL and Bcl-2 by disrupting BH3 domain-mediated interactions with the pro-apoptotic members of Bcl-2 family [4, 6, 10]. Treatment of PC-3 cells with TGZ and Δ 2-TGZ led to caspase-9 activation and apoptosis which was prevented by the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK [6]. Finally, in PPAR γ -deficient LNCaP cells, Bcl-xL overexpression protects against TGZ- and Δ 2-TGZ-induced apoptosis [6]. OSU-CG12, a CGZ derivative devoid of PPAR γ -agonist activity, was also shown to induce cleavage of PARP-1 in prostate cancer cells [11]. In breast MCF7 and MDA-MB-231 cancer cells, the dual PPAR α/γ agonist TZD18 that inhibits cell proliferation in a PPAR-independent manner also induces apoptosis [12]. Similar results were documented in RT4 and T24 bladder cancer cells after TGZ treatment [13].

TZD-induced apoptosis is not well understood but could be the result of prolonged endoplasmic reticulum (ER) stress. Protein folding in the ER is impaired under various conditions collectively called ER stress including perturbations of Ca²⁺ homeostasis, glucose/energy deprivation or redox changes [14]. ER stress activates unfolded protein

response (UPR) mediated by three transmembrane receptors: Pancreatic endoplasmic reticulum kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK), Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1) and Activating Transcription Factor 6 (ATF6) [15]. Activated PERK phosphorylates the eukaryotic Initiation Factor 2 α (eIF2 α) on Ser⁵¹ to decrease protein translation, activated IRE-1 gains endoribonuclease activity to cleave the X-box-binding protein 1 (XBP-1) mRNA resulting in the synthesis of a highly active transcription factor and the activating transcription factor 6 (ATF6) translocates to the Golgi where it is cleaved and then translocates to the nucleus to bind ER stress response elements [15]. The signaling cascades initiated by these “sensor” membrane proteins promote protein folding via up-regulation of ER protein chaperones like BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) also called GRP78 (Glucose-Regulated Protein, 78 kDa) which is a major protective player of the UPR. The protective response of UPR can switch to a proapoptotic signaling if the unfolded protein accumulation is persistent and the stress cannot be relieved [16, 17]. Three major pathways are known to be involved in ER stress-induced apoptosis: the transcriptional activation of CHOP (also known as GADD153), the activation of the c-Jun-N-terminal Kinase (JNK) and calcium release in the cytosol [18].

Interestingly, a few studies indicate that TZDs including derivatives of the $\Delta 2$ series could induce ER stress. For example, in both control and PPAR γ ^{-/-} ES cells, conventional TZDs like CGZ and TGZ were shown to promote calcium release from the ER leading to PKR-dependent phosphorylation of eIF2 α [19]. In rat liver epithelial cells, CGZ and TGZ could induce PERK and eIF2 α phosphorylation, suggesting ER stress [20]. In breast cancer cells, mainly MCF7 and MDA-MB-231, the dual ligand for PPAR α/γ TZD18, induced ER stress and also increased ER stress-related cell death-regulators such as CHOP [12]. Besides, the knockdown of CHOP by siRNA antagonized TZD18-induced apoptosis, leading to the conclusion of an important role of CHOP and ER stress in the apoptotic process [12]. STG28, a TGZ derivative, and OSU-CG12, a CGZ derivative, were also shown to induce ER stress in prostate cancer cells [11]. Nevertheless, in contrast to what was observed with TZD18 in breast cancer cells, a similar approach of silencing of CHOP in the prostate cancer cells LNCaP had no effect on the susceptibility to the antiproliferative action of OSU-CG12 and on the cleavage of PARP [11].

We have recently reported that in MCF7 cells, Δ^2 -TGZ triggered a rapid increase in cytosolic calcium [21]. This calcium increase occurred even in the absence of extracellular calcium, indicating a release from ER. In order to better understand the mode of action of TZDs in breast cancer cells, the aim of the present study was to determine if the PPAR γ inactive compound Δ^2 -TGZ could trigger apoptosis and ER stress and if these events could be interconnected. To address this issue, we used hormone-dependent MCF7 and hormone-independent MDA-MB-231 cell lines. Our results clearly show that ER stress occurs early, followed later by apoptotic cell death which was independent of ER stress.

Materials and methods

Cell culture and treatment

Human breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231 were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). MCF7 cells were cultured at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) phenol red and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Sigma–Aldrich, Lyon, France). MDA-MB-231 cells were cultured at 37°C without CO₂ in L-15 medium (Invitrogen) containing phenol red and supplemented with 10% FCS. 24 hours after plating, medium was replaced by the appropriate medium containing 1% FCS and treatments with Δ 2-TGZ, staurosporine (Invitrogen) or dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) were performed 24 hours later. SP600125 and BAPTA-AM (Calbiochem Merck, Darmstadt, Germany) were dissolved in DMSO. Cells were treated with these compounds for 30 minutes prior to Δ 2-TGZ or DMSO exposure.

The experimental procedures for the synthesis of Δ 2-TGZ were described recently [22]. The identity and purity of this synthetic derivative were verified by proton nuclear magnetic resonance and elemental analysis. Δ 2-TGZ was dissolved at 50 mM in DMSO and stock solution was stored at -20°C and further diluted to appropriate concentrations with medium before use.

Microarray analysis

MCF7 cells were cultured in 6-well culture plates for 0, 3 or 12 hours in presence of Δ 2-TGZ (25 μ M) or the vehicle DMSO (0.05%). Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and then processed at the “Biopuces” Core Facility of IGBMC (Strasbourg, France). Total RNA was reverse transcribed into cDNA by using a T7 promoter-dT primer, amplified, and biotinylated in an *in vitro* transcription reaction by using T7 RNA polymerase before hybridization to the GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (containing 764,885 distinct probes including 28,869 well-annotated genes) according to the manufacturer's protocol (Affymetrix, Santa Clara, USA). The Expression Console™ software (EC) was used to scan, quantify and normalize the gene chips under default scan settings. Data were further analysed using Significance Analysis of Microarrays.

Genes differentially expressed between the cells treated with $\Delta 2$ -TGZ and the cells without treatment were selected with a threshold t test p value < 0.05, False Discovery Rate (FDR) < 10%, fold change > 2.0. Genes involved in ER stress were identified by a combination of Gene Ontology analysis; analysis was performed using DAVID [23].

FACS analysis

After treatment (24 or 48 hours), culture medium containing non-adherent cells was collected. Adherent cells were then washed with PBS, trypsinized, and resuspended in medium containing 10% FCS. Non adherent cells and trypsinised cells were pooled. After centrifugation (1,200 rpm), cells were resuspended in 10% FCS containing medium. MitoTracker[®] Red CMXRos (Molecular Probes/Invitrogen) was added at 50 nM at 37 °C for 10 min or 20 min for MCF7 and MDA-MB-231 cells respectively. Dysfunctional mitochondria were measured by fluorescence levels using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) and the 579 nm line of an argon-ion laser was used to excite the dye. For each treatment, 10,000 cells were analysed using FlowJo. Fluorescence intensity was high in cells with healthy mitochondria whereas it was low in cells with dysfunctional mitochondria. The percentage of each type of cells was calculated and results were expressed as the mean \pm standard error of the mean from three independent experiments.

Western blotting

For ER stress protein analysis, at the end of treatment for the times indicated in the text, cells were rinsed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then scraped into ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton-X100, 1% sodium deoxycholate) with freshly added 200 μ M Na₃VO₄, 250 μ M phenylmethsulfonyl fluoride, 5 μ g/mL leupeptin. The cell lysates were clarified by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4°C.

Protein concentration was determined using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France).

For Bip and CHOP analysis, cell lysate was resuspended in Laemmli sample buffer (125 mM

Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and heated at 95°C for 5 min to denature proteins.

To analyze PERK and eIF2 α phosphorylation, cell lysis was performed directly in ice-cold Laemmli sample buffer.

For apoptosis protein analysis, at the end of treatment for the times indicated in the text, culture medium containing non-adherent cells was collected. Adherent cells were then scrapped and pooled with non-adherent cells. After centrifugation (1,200 rpm), the pellet was rinsed with PBS and re-suspended in lysis buffer containing: 25 mM MOPS pH 7.2, 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM nitrophenylphosphate, 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitors (10 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL pepstatin, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL soybean trypsin inhibitor and 100 μ M benzamidine). The cell lysates were subjected to three heat shock (1 min at 37°C, 1 min in liquid nitrogen) and clarified by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories).

For each sample, total protein samples were separated by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. Non specific binding sites were blocked in TNT buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% non-fat powder milk and membranes were then incubated with the primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4°C. The mouse monoclonal antibodies raised against CHOP (SC-7351, Santa Cruz Biotechnology), cleaved PARP (F21-852, BD Pharmingen) and caspase-7 (ref 9494, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), the rabbit monoclonal antibodies raised against PERK (C33E10, Cell Signaling Technology), BiP (B1770, United States Biological, Swampscott, USA) and the rabbit polyclonal anti-phospho eIF2 α (11279-1, Signalway Antibody, Pearland, USA) and anti-PARP (GTX100573, Euromedex, Mundolsheim, France) were diluted at 1:1000. The rabbit monoclonal antibody anti-tubulin (EP1332Y, Epitomics, Burlingame, USA) was used diluted at 1:2000. The rabbit polyclonal antibody anti-actin (SC-1615-R, Santa Cruz Biotechnology) was used diluted at 1:3000.

Once washed 3 times with TNT, membranes were probed with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature. After 3 washes in TNT, the membranes were developed with ECL detection reagent using

chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific, Brebières France) according to manufacturer's instructions and observed using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories).

Immunofluorescence

MCF7 and MDA-MB-231 cells were seeded on glass coverslips and grown in their respective medium as described above. After exposure to $\Delta 2$ -TGZ or DMSO, coverslips were washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min. After washing with PBS, cells were permeabilized for 10 min in 0.5% Triton X100, washed with PBS and incubated for 30 minutes in a blocking solution (4% bovine serum albumin, 0.1% Triton X100 in PBS buffer) to reduce non specific binding of the antibodies. Then, coverslips were incubated with anti-CHOP monoclonal antibody diluted at 1:250 in the blocking solution for 1 hour. They were then washed 3 times in PBS/Triton X100 and exposed for 1 hour to Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) diluted 1:1000 in the blocking solution. Finally, cells were rinsed with PBS/Triton X100 for 15 min and counterstained with Hoechst dye to stain nuclei. Fluorescence labeling was observed under an Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Images were collected using LuciaG software 4.81 (Laboratory imaging/Nikon).

Semi-quantitative RT-PCR

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5.10^5 cells/well. Cells were treated as previously described. Total RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in 20 μ L volume containing 1 μ g of total RNA, 15 ng random hexamer primer, 1X Invitrogen buffer, 10 mM DTT, 0.5 mM of each dNTP, 1 U RNase inhibitor and 5 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The mixture was incubated for 10 min at 25°C, for 110 min at 37°C and subsequently for 10 min at 70°C in order to stop the reaction.

The cDNA were further amplified by PCR. The specific primers are shown in Table 1. PCR was carried out in a thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) in a final volume of 25 μ L containing 2 μ L cDNA, 1X EconoTaq[™] Reaction buffer (-Mg), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of dNTP mix, 0.2 μ M of each primer and 2.5 U EconoTaq. Negative controls were always

included. Amplification was carried out under the following conditions: (1) initial denaturation 94°C for 2 min ; (2) 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec and 72°C for 45 sec ; (3) 10 min extension step at 72°C. The number of cycles was chosen to realize the analysis in the linear phase of the PCR reaction. 20 µL of the PCR products were mixed with loading buffer (5 µL) and submitted to electrophoresis in a 1.2% agarose gel (3% in case of XBP1 analysis) at 90 V for 35 min at room temperature. The gel was stained with ethidium bromide, viewed and photographed on a UV-transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad Laboratories).

RNA interference

The small-interfering RNA (siRNA) duplexes for targeting CHOP (sense 1: GGU-CCU-GUC-UUC-AGA-UGA-A55; antisense 1: UUC-AUC-UGA-AGA-CAG-GAC-C55; sense 2: GGA-GAA-AGA-ACA-GGA-GAA-U55; antisense 2: AUU-CUC-CUG-UUC-UUU-CUC-C55) as well as a scrambled sequence (control siRNA duplex, negative control) were purchased from Eurogentec (Angers, France). MCF7 cells (2×10^5) were plated overnight in six-well culture plates in DMEM supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Cells were then transiently transfected with either target gene siRNA (50 nM of the duplex mix) or the negative control siRNA-sequence using the Oligofectamine™ Reagent (Invitrogen) as described by the manufacturer. The concentration of siRNA used was standardized to get maximum knockdown without affecting the viability of the cells. After 4 hours, we added DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine and FCS (1% final concentration). 20 hours later, MCF7 cells were exposed to $\Delta 2$ -TGZ (25 µM) or DMSO for 24 or 48 hours and harvested for western blot analyses.

Statistical analysis

To analyse the results of flow cytometry analyses, differences among treatment groups were tested using analysis of variance (ANOVA). Differences in which *P* was less than 0.05 were statistically significant. When significant differences were detected, specific post-hoc comparisons between treatment groups were examined with the Bonferroni test (SPSS v11.0 Computer Software).

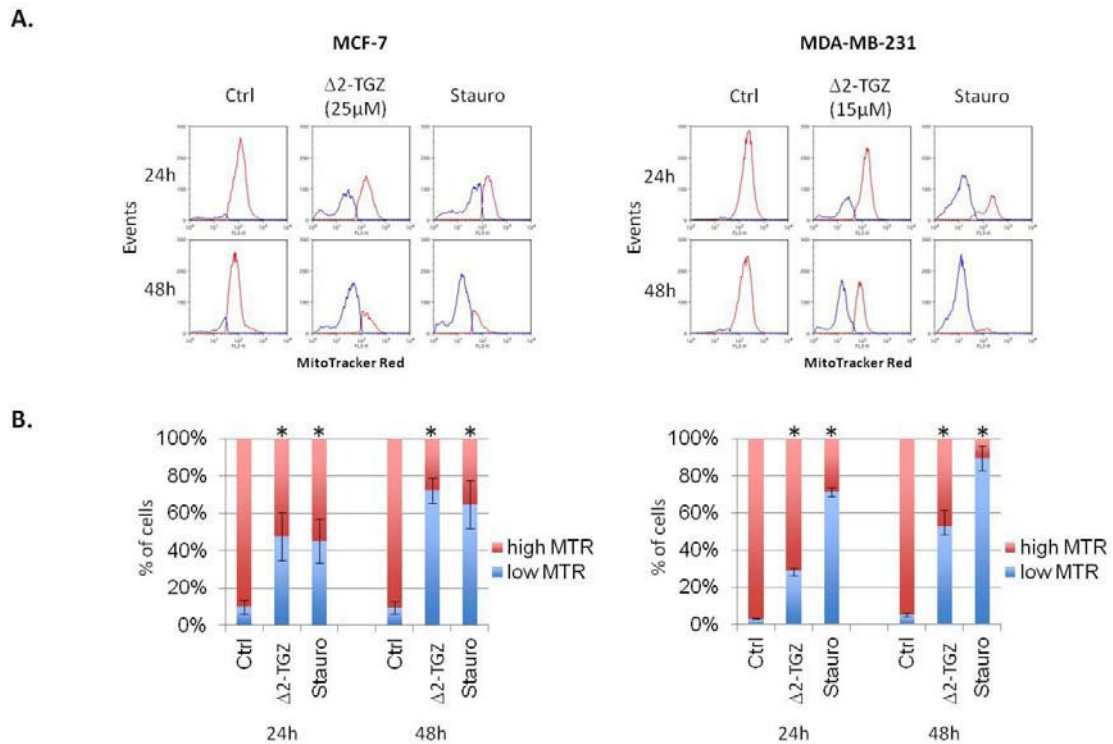


Figure 1: Dysfunctional mitochondria accumulate in $\Delta 2$ -TGZ-treated breast cancer cells. After treatment for 24 and 48 hours with DMSO (negative control, Ctrl), 1 μ M staurosporin (positive apoptosis control, Stauro) or $\Delta 2$ -TGZ, MCF7 and MDA-MB-231 cells were stained with MitoTracker® Red (which accumulates in functional mitochondria) and analysed by FACS. A typical FACS analysis is depicted (a) as well as means of three independent experiments (b). *, significantly different from control cells ($p < 0.05$).

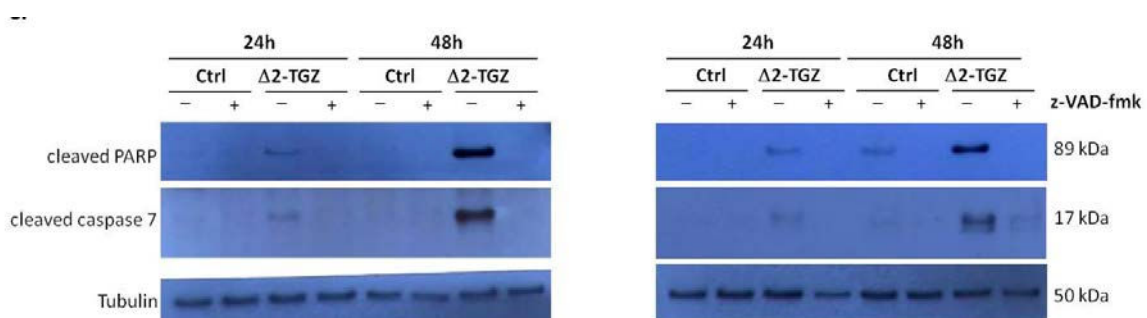


Figure 2: $\Delta 2$ -TGZ triggers the cleavage of PARP and caspase-7 in MCF7 and MDA-MB-231 cells. MCF7 and MDA-MB-231 cells were treated with $\Delta 2$ -TGZ (25 and 15 μ M respectively) or DMSO (0.05%; Ctrl) in the presence or absence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (50 μ M). At the indicated time-points, cells were harvested and lysed for protein analysis. After electrophoresis (SDS-PAGE), proteins were transferred on a nitrocellulose membrane for the study of PARP and caspase-7. Tubulin was used as a loading control.

Results

$\Delta 2$ -TGZ triggers apoptosis in both MCF7 and MDA-MB-231 cells

Since TZDs induce apoptosis in various cell lines, we studied several markers of this event in MCF7 and MDA-MB-231 cells exposed to $\Delta 2$ -TGZ. We used $\Delta 2$ -TGZ concentrations of 25 μM and 15 μM for MCF7 and MDA-MB-231 cells since they are just below the IC_{50} values that we measured previously in both cell lines (29.7 μM and 16.6 μM respectively) [9]. First, we used the MitoTracker® Red fluorescent dye to assess for disruption of mitochondrial membrane potential (Fig. 1). In control conditions, $9.8 \pm 3.7 \%$ of MCF7 cells displayed mitochondrial membrane potential loss at 24 hours and this value did not increase after 48 hours ($9.3 \pm 3.4 \%$). After $\Delta 2$ -TGZ treatment (25 μM), $46.3 \pm 12.5 \%$ of MCF7 cells possessed dysfunctional mitochondria after 24 hours and this percentage reached $70.7 \pm 6.7 \%$ after 48 hours. Similar values were observed in staurosporin-treated cells (1 μM) used as a positive apoptosis control: 44.8 ± 11.7 and $63.7 \pm 12.7 \%$ at 24 and 48 hours respectively. Comparable results were obtained in MDA-MB-231 cells besides that staurosporine affected more drastically this cell line since 70.5 ± 2.4 and $89.1 \pm 6.6 \%$ of the cells displayed mitochondrial membrane potential loss (see Fig. 1 for details).

To confirm induction of apoptosis, we investigated activation of executioner caspase-7 (since caspase-3 is not expressed in MCF7 cells) as well as cleavage of PARP-1 as a prototypical caspase substrate (Fig. 2). In $\Delta 2$ -TGZ-treated MCF7 cells, western blot analysis shows cleaved caspase-7 and PARP-1 after 24 hours of treatment. Accumulation of cleaved fragments further increased after 48 hours. Cleaved proteins were not observable in control cells. Similar results were obtained in MDA-MB-231 cells besides that residual levels of both cleaved PARP and cleaved caspase-7 were already detected in control cells after 48 hours.

When $\Delta 2$ -TGZ treatment was performed in the presence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (50 μM), cleavage of PARP and caspase-7 were abolished in both MCF7 and MDA-MB-231 cells (Fig. 2). Altogether these results clearly validate induction of apoptosis in the two breast cancer cell lines following $\Delta 2$ -TGZ treatment.

ER stress-related genes are overexpressed after $\Delta 2$ -TGZ treatment of MCF7 cells

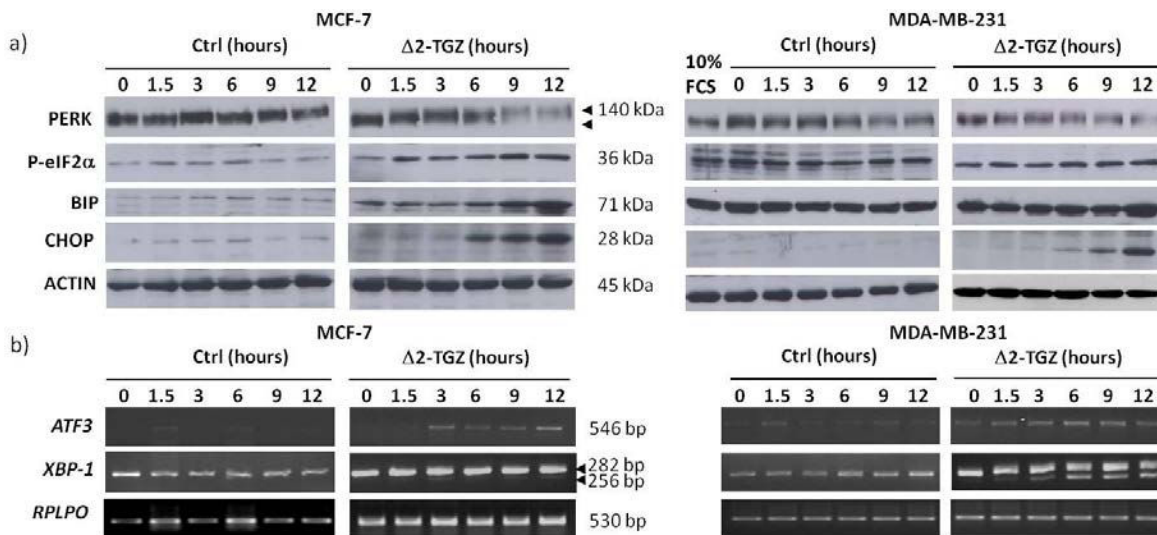


Figure 3: Various ER stress players are activated in breast cancer cells following $\Delta 2$ -TGZ treatment. MCF7 and MDA-MB-231 cells were treated with $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M and 15 μ M respectively) or DMSO (0.05%; Ctrl). At the indicated time-points, cells were harvested and lysed for protein (a) or RNA (b) analysis. After electrophoresis (SDS-PAGE), proteins were transferred on a nitrocellulose membrane for the study of PERK, eIF2 α , BiP and CHOP. Actin was used as a control (a). *XBP1* and *ATF3* were studied using specific primers and the PCR products were observed after agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. *RPLPO* was used as a control (b).

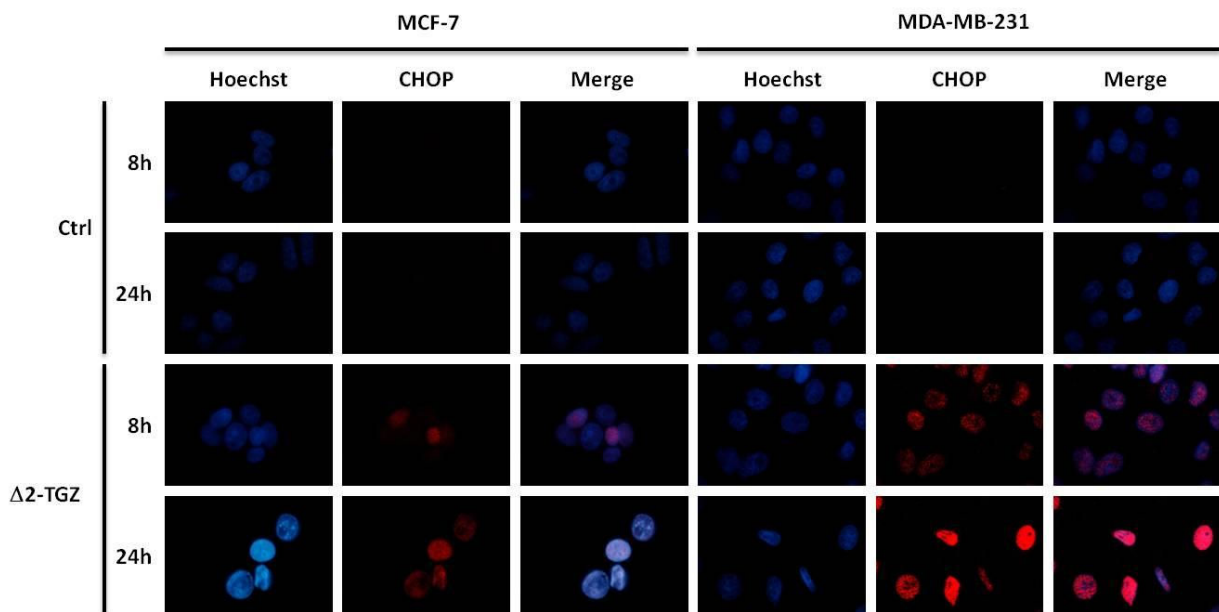


Figure 4: CHOP is localized in the nucleus of MDA-MB-231 cells treated with $\Delta 2$ -TGZ. Cells were grown on coverslips and exposed to $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M for MCF7 and 15 μ M for MDA-MB-231) or DMSO (0.05%). After 8 and 24 hours, they were fixed and subjected to CHOP immunodetection and Hoechst staining. Merge clearly shows the nuclear localization of CHOP in $\Delta 2$ -TGZ-treated cells. Bar represents 100 μ m.²⁸

Gene expression profiles were then generated during a time course exposure to $\Delta 2$ -TGZ at 25 μ M. Microarray analyses revealed that signals from 351 genes of 33297 probe sets were specifically increased ≥ 2 -fold after 12 hours in $\Delta 2$ -TGZ-treated MCF7 cells. Interestingly, of the 351 genes, 19 genes were annotated as genes involved in ER stress (Table 2). These included genes encoding C/EBP homologous protein *CHOP/GADD153/DDIT3*, UPR-inducible gene *CHAC1* (ChaC, cation transport regulator homolog 1), *DNAJB9* (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9, also called *MDG1* or *ERdj4*), *PPP1R15A* (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A, also called *GADD34*), *ERN1* (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1, also called *IRE1*), *HERPUD1* (homocysteine-inducible, ER stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1, also called *HERP*), *GADD45A* (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha, also called *DDIT1*), the chaperone encoding gene *BiP* also called *GRP78* (glucose-regulated protein, 78 kDa) or *HSPA5*, and genes encoding the transcription factors *ATF3* and *ATF4* (activating transcription factor 3 and 4). Among these 19 genes, 7 were already stimulated more than 2-fold after 3 hours of treatment (Table 2).

$\Delta 2$ -TGZ triggers ER stress in both MCF7 and MDA-MB-231 cells

In order to validate microarray data, we investigated several UPR-associated effectors by western blot during a time course exposure to $\Delta 2$ -TGZ. In MCF7 cells, as soon as 1.5 hour after exposure to $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M), we observed an enhanced phosphorylation of PERK, as shown by mobility shift, and of its downstream target eIF2 α (as shown by a phospho-specific antibody against Ser 51) (Fig. 3a). These events are required to achieve translational attenuation during UPR. Activation of IRE1 was witnessed by the presence of cleaved form *XBPI* mRNA, which was observed as early as 3 hours after addition of $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 3b). Nevertheless, an important amount of *XBPI* mRNA was not affected by the cleavage even after 12 hours of exposure to $\Delta 2$ -TGZ. Processing of *XBPI* leads to the synthesis of a highly active transcription factor that transactivates chaperone genes such as BiP/GRP78. On western blots, BiP was up-regulated after 6 hours of treatment (Fig. 3a).

When cell protective changes mediated by the UPR fail to restore ER function, apoptosis is triggered. Proapoptotic signaling is mainly mediated by induction of CHOP that is upregulated by several factors including ATF3. Using RT-PCR, we observed that $\Delta 2$ -TGZ

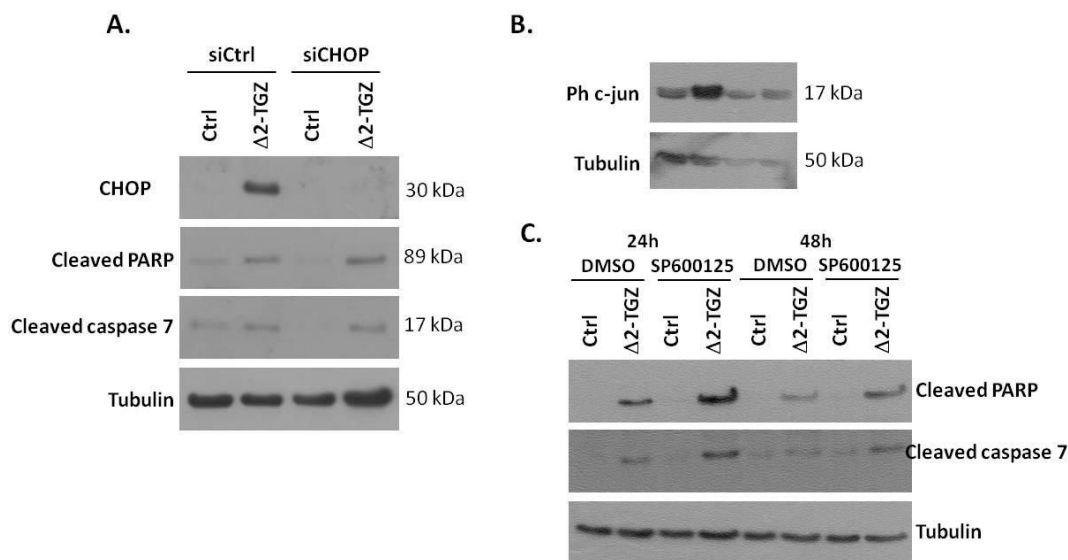


Figure 5: Inhibition of CHOP expression and inhibition of JNK do not impair $\Delta 2$ -TGZ-induced apoptosis. MCF7 cells were transiently transfected with CHOP siRNA (siCHOP) or a scramble siRNA (siCtrl) and treated with $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M) or DMSO (0.05%; Ctrl) (a). After 48 hours of treatment, MCF7 cells were harvested and subjected to western blot analyses with anti-CHOP, anti-PARP and anti-caspase-7 antibodies (a). MCF7 cells were pretreated with SP600125 (10 μ M), a specific inhibitor of JNK, for 30 minutes before treatment with $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M), for 3 hours. Control cells were treated with DMSO (0.05%). Phosphorylated c-JUN (Ph c-JUN) was analyzed by western blot (b). MCF7 cells were pretreated with SP600125 (10 μ M) for 30 minutes before treatment with $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M). Control cells were treated with DMSO (0.05%, Ctrl). After 48 hours of treatment, MCF7 cells were harvested and subjected to western blot analyses with anti-PARP and anti-caspase-7 antibodies (c). In each panel, tubulin was used as a loading control.

triggered an increase in *ATF3* mRNA as soon as 3 hours after the exposure to $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 3b). Besides, $\Delta 2$ -TGZ treatment induced CHOP expression, which was detected on western blots after 6 hours (Fig. 3a). We also studied ER stress markers in MDA-MB-231 cell line. We did not detect any shift on the western blots whatever the time of exposure to $\Delta 2$ -TGZ and failed to detect any increase in the intensity of phosphorylated eIF2 α (Fig. 3a). Both profiles were similar to those observed in control cells treated with DMSO (Fig. 3a). However, when we analyzed MDA-MB-231 cells that were grown in 10% FCS containing medium, we observed that both proteins were inactive: PERK appeared under its fast migrating form and eIF2 α was not strongly phosphorylated (Fig. 3a). So, in control MDA-MB-231 cells cultured in 1% SVF-containing medium and exposed to DMSO, PERK and eIF2 α are already activated and the treatment with $\Delta 2$ -TGZ did not modify the immunodetection profile. Regarding *XBPI* mRNA, no splicing was observed in control cells exposed to DMSO whereas a splicing was clearly detected as early as 1.5 hours after the addition of $\Delta 2$ -TGZ (Fig 3b). Splicing was more important compared to MCF7 cells (Fig. 3b). BiP showed an up-regulation after 6 hours of $\Delta 2$ -TGZ treatment (Fig. 3a). In addition, an increase in *ATF3* mRNA expression occurred as soon as 1.5 hours after $\Delta 2$ -TGZ treatment (Fig. 3b). CHOP was clearly up-regulated 6 hours after the addition of $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 3a). In both MCF7 and MDA-MB-231 cells, after translation, CHOP was translocated into the nucleus as shown by the nuclear staining (Fig. 4). Nuclear staining intensity was low after 8 hours and increased after 24 hours of $\Delta 2$ -TGZ treatment (Fig. 4). None of these changes associated with ER stress were observed in control cells exposed to DMSO (Figs 3 and 4).

$\Delta 2$ -TGZ-triggered apoptosis is not related to ER stress in MCF7 cells

Since apoptosis occurs later than ER stress, we hypothesized that it could be a consequence of $\Delta 2$ -TGZ-triggered ER stress. The relationship between the two events was tested in MCF7 cells. First, we studied the effect of an inhibition of CHOP expression (Fig. 5a). The efficiency of CHOP siRNA-mediated knock-down was verified by western blot (Fig. 5a) In absence of CHOP expression, our results show that cleavage of PARP and caspase-7 still occurred in response to $\Delta 2$ -TGZ treatment.

Moreover increased levels of phosphorylated c-JUN were observed after 3 hours of $\Delta 2$ -TGZ

treatment, suggesting JNK activation (Fig. 5b). In the presence of SP600125, a JNK inhibitor, as expected, Δ^2 -TGZ-triggered phosphorylation of c-Jun was abrogated after 3 hours (Fig. 5b). Nevertheless cleavage of PARP and caspase-7 persisted in response to Δ^2 -TGZ treatment (Fig. 5c).

Discussion

In our previous studies we showed that the PPAR γ -inactive $\Delta 2$ -TGZ inhibits proliferation of MCF7 and MDA-MB-231 cells [9]. The potency to inhibit cell proliferation was correlated to the induction of the proteasomal degradation of two proteins: ER α in MCF7 and cyclin D1 in both MCF7 and MDA-MB-231 cell lines [7, 9].

Results of the present study show that apoptosis occurs in MCF7 and MDA-MB-231 cells exposed to $\Delta 2$ -TGZ for 24 and 48 hours. The fact that apoptosis is the result of PPAR γ -independent events is consistent with studies performed in several cancer cell types. In bladder cancer cells (RT4, T24), TGZ induces apoptosis independently of PPAR γ [13]. This is associated with the up-regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), the increased expression of DR5, proteasomal degradation of c-FLIP and survivin and activation of caspases-8 and -9. In prostate cancer LNCaP cells, despite their deficiency in PPAR γ , cells exhibit a higher degree of susceptibility to TGZ-mediated apoptosis compared to the PPAR γ -rich PC-3 cells [6]. Besides, $\Delta 2$ -TGZ, is more potent than TGZ in inducing cytochrome c release and DNA fragmentation in both cell lines. Similar results were obtained with CGZ and $\Delta 2$ -CGZ. RGZ and PGZ, which are more potent PPAR γ agonists than CGZ and TGZ, are poor apoptosis inducers [6]. In breast cancer cells MCF7 and MDA-MB-231, dual PPAR α/γ agonist TZD18 inhibits cell proliferation in a PPAR-independent manner and leads to activation of caspase-8 and -9 that can be blocked by pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK [12].

Other TZDs have been described as ER stress inducers in various cell types, and it is well documented that sustained ER stress leads to apoptosis. We reported recently a rapid increase in intracellular calcium in MCF7 cells exposed to $\Delta 2$ -TGZ which was due to a release of calcium from ER [21]. Thus, it was interesting to determine if $\Delta 2$ -TGZ affected breast cancer cells in a similar way. Our results including data from microarrays, RT-PCR, western immunoblotting and immunofluorescent microscopy clearly demonstrate that $\Delta 2$ -TGZ triggers ER stress in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Since $\Delta 2$ -TGZ is devoid of PPAR γ agonist activity, ER stress is induced in a PPAR γ -independent manner [7]. These results are consistent with the fact that TGZ (and CGZ) triggers an increase in $[Ca^{2+}]_i$ and an

eIF2 α phosphorylation-related inhibition of translation in PPAR γ ^{-/-} embryonic stem cells [19]. Our findings are also similar to those obtained in MCF7 and MDA-MB-231 cells exposed to TZD18, a dual ligand for PPAR α/γ [12]. Indeed, TZD18 activated ER stress (attested by microarray analysis and various ER stress markers) in both cell lines and this compound induced this response even in absence of PPAR α or γ . Our results are also in agreement with the fact that OSU-CG12, a PPAR γ inactive derivative of CGZ, triggers eIF2 α phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells [11]. Moreover, OSU-CG12 and STG28, a PPAR γ inactive derivative of TGZ, both trigger the accumulation of BIP and CHOP in these cells [11].

The activation of PERK and the phosphorylation of eIF2 α could be responsible for decreased cyclin D1 levels observed after Δ 2-TGZ treatment [9]. Indeed, it has been reported in mouse NIH3T3 fibroblasts, treated with the ER stress inducer tunicamycin, that the translation of cyclin D1 was inhibited as deduced from ³⁵S incorporation in the protein [24]. In mouse embryonic fibroblasts, it was also shown that activation of the eIF2 α kinases PKR and PERK led to a decrease in cyclin D1 levels [25]. However, this was not due to an effect on cyclin D1 translation but on cyclin D1 degradation, which was dependent on eIF2 α phosphorylation. In our conditions (1% FCS containing medium), we show that MDA-MB-231 displayed activated PERK and Ser51-phosphorylated eIF2 α . However, our previous work indicates that cyclin D1 was still detected in these conditions and disappeared only in response to TGZ or Δ 2-TGZ treatment [9]. This could suggest that ER stress and especially the PERK-eIF2 α pathway are not responsible for the decrease in cyclin D1 observed in MCF7 and MDA-MB-231 cells following exposure to Δ 2-TGZ. In prostate cancer cells, it was reported that STG28 and OSU-CG12 triggered cyclin D1 proteasomal degradation by a mechanism requiring the F-box protein β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein which is an E3 ubiquitin ligase) rather than to the PERK-eIF2 α component of ER stress [11, 26]. A similar situation could be observed in response to Δ 2-TGZ in breast cancer cells and it might be interesting to test this hypothesis.

In addition to the activation of the PERK/eIF2 α pathway, we observed another major difference between MCF7 and MDA-MB-231: the latter displayed a higher amount of spliced XBP1 mRNA than MCF7 after Δ 2-TGZ treatment. Interestingly, a similar difference in XBP1 mRNA splicing was observed between MCF7 and MDA-MB-231 cell lines in response to the

dual PPAR α/γ agonist TZD18 [12]. In addition to the changes in the phosphorylation status of PERK and eIF2 α , the elevated amount of spliced XBP1 mRNA suggests that MDA-MB-231 cells are more sensitive to stress inducing agents. Splicing of XBP1 mRNA has been reported to depend on the activation of the RNase activity of IRE1 and to result in the synthesis of a potent XBP1 transcription factor [27]. This does not mean that this pathway is not fully active in MCF7 cells since we could observe it clearly in response to ER stress inducers like thapsigargin (data not shown). XBP1 stimulates transcription of chaperone genes such as BiP. Despite the very low amount of spliced XBP1 mRNA occurring in MCF7 cells exposed to Δ 2-TGZ, we could observe the accumulation of BiP. This suggests that BiP accumulation could be the result of either ATF6 or PERK-eIF2 α [28, 29].

If ER stress is involved in the antiproliferative effect of Δ 2-TGZ, it could therefore explain why MDA-MB-231 proliferation is inhibited at lower doses of ER stress inducing agents such as Δ 2-TGZ (after 24 hours of treatment in 1% FCS containing medium IC₅₀ = 29.7 μ M for MCF7 versus 16.6 μ M for MDA-MB-231) [21]. A higher sensitivity of MDA-MB-231 cell proliferation was also observed in response to TZD18 [12].

Several apoptosis pathways are known to be involved in ER stress-induced apoptosis. For instance, the transcription factor CHOP that is induced by ER stress inhibits the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2 and induces the pro-apoptotic protein BIM [30]. Besides, the cascade IRE1 α -TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), Apoptosis Signal regulating Kinase 1 (ASK1), MKK6/7 activate JNK that has been reported to activate the pro-apoptotic protein BIM [30]. In mice ER stress is also known to activate caspase-12 which can directly activate caspase-9 [31]. Finally, ER stress can cause a slow but sustained increase in mitochondrial free Ca²⁺ that can reach a critical threshold inducing pro-apoptotic membrane permeabilisation [32]. However, only a few studies attempted to determine if there was a link between ER stress and apoptosis induced by TZD derivatives. In agreement with our results on Δ 2-TGZ, in breast cancer MCF7 and MDA-MB-231 cells, JNK inhibitor SP600125 did not prevent BAX/BAK up-regulation induced by dual PPAR α/γ agonist TZD18 [12]. Regarding a potential link between CHOP and apoptosis, in the same study, authors show that the knockdown of CHOP by siRNA antagonized TZD18-induced apoptosis [12]. In contrast, a

similar siRNA strategy targeting CHOP did not modify the apoptotic effect of OSU-CG12 in prostate cancer cells [11]. Our results are consistent with the latter study in which the authors link OSU-CG12-induced apoptosis to the pathway leading to the proteasomal degradation of cyclin D1 rather than to ER stress [11].

To conclude, our results clearly show that $\Delta 2$ -TGZ triggers ER stress and apoptosis in both MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. In MCF7 cells, we could not observe that apoptosis was a consequence of ER stress. Due to the occurrence of similar events (namely proteasomal degradation of cyclin D1, induction of ER stress and apoptosis), it might be interesting to determine now if $\Delta 2$ -TGZ acts in breast cancer cells by inducing early energy restriction comparable to STG28 or OSU-CG12 in prostate cancer [11].

Acknowledgements

This work was supported by grants of the “Université de Lorraine”, of the “Conseil Régional de Lorraine” and of the “Ligue Contre le Cancer”. Christelle Colin was recipient of a PhD grant of the “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche”. Xiao Yao was recipient of a post-doctoral grant of the Université de Lorraine” and of the “Conseil Régional de Lorraine”. Claudia Cerella is supported by a “Waxweiler grant for cancer prevention research” from the Action Lions “Vaincre le Cancer”. We acknowledge Alexandra Kleinclauss for fruitful contribution to cell culture and western blotting. We also thank Martine Chillet, Brigitte Fernet, Lucie Moitrier Sandrine Adach and François Dupire for technical assistance. Research at LBMCC is financially supported by the Fondation de Recherche Cancer et Sang, the Recherches Scientifiques Luxembourg association, the Een Haerz fir kriibskrank Kanner association, the Action Lions Vaincre le Cancer association, the European Union (ITN “RedCat” 215009, interreg IVa project “Corena”) and the Télévie Luxembourg. MD is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant, [grant number 2012-0001184]; by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

- [1] Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79:391-397.
- [2] Yee LD, Williams N, Wen P, et al. Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. *Clin Cancer Res* 2007; 13:246-252.
- [3] Blanquicett C, Roman J, Hart CM. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 2008; 6:25-34.
- [4] Wei S, Yang J, Lee SL, Kulp SK, Chen CS. PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Lett* 2009; 276:119-124.
- [5] Clay CE, Monjazebe A, Thorburn J, Chilton FH, High KP. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis does not require PPAR gamma in breast cancer cells. *J Lipid Res* 2002; 43:1818-1828.
- [6] Shiau CW, Yang CC, Kulp SK, Chen KF, Chen CS, Huang JW. Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res* 2005; 65:1561-1569.
- [7] Lecomte J, Flament S, Salamone S, et al. Disruption of ERalpha signalling pathway by PPAR gamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112:437-451.
- [8] Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995; 83:803-812.
- [9] Colin C, Salamone S, Grillier-Vuissoz I, et al. New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124(1):101-110.
- [10] Weng JR, Chen CY, Pinzone JJ, Ringel MD, Chen CS. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of

- thiazolidinediones. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 401-413.
- [11] Wei S, Kulp SK, Chen CS. Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones. *J Biol Chem* 2010; 285(13):9780-9791.
- [12] Zang C, Liu H, Bertz J, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(8):2296-2307.
- [13] Plissonnier ML, Fauconnet S, Bittard H, Lascombe I. Insights on distinct pathways of thiazolidinediones (PPARgamma ligand)-promoted apoptosis in TRAIL-sensitive or -resistant malignant urothelial cells. *Int J Cancer* 2010; 127:1769-1784.
- [14] Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response and aging. *Rev Neurosci* 2009; 20(1):23-37.
- [15] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:519-529.
- [16] Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 2006; 11:5-13.
- [17] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7:880-885.
- [18] Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(12):1013-1030.
- [19] Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 2001; 61(16):6213-6218.
- [20] Gardner OS, Shiau CW, Chen CS, Graves LM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2005; 280(11):10109-10118.
- [21] Chbicheb S, Yao X, Rodeau JL, et al. EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR(γ)-independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*

- 2011; 81(9):1087-1097.
- [22] Salamone S, Colin C, Grillier-Vuissoz I, et al. Synthesis of new troglitazone derivatives: anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur J Med Chem* 2012; 51:206-215.
- [23] Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003; 4:P3.
- [24] Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(15):8505-8510.
- [25] Raven JF, Baltzis D, Wang S, et al. PKR and PKR-like endoplasmic reticulum kinase induce the proteasome-dependent degradation of cyclin D1 via a mechanism requiring eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 2008; 283(6):3097-3108.
- [26] Wei S, Yang HC, Chuang HC, et al. A novel mechanism by which thiazolidinediones facilitate the proteasomal degradation of cyclin D1 in cancer cells. *J Biol Chem* 2008; 283(39):26759-26770.
- [27] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001; 107(7):881-891.
- [28] Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem* 2007; 282(31):22865-22878.
- [29] Harding HP, Novoa I, Zhang Y, et al.. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 2000; 6(5):1099-1108.
- [30] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13(3):184-190.
- [31] Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277(37):34287-34294.
- [32] Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P. Structural and functional link

between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(10):1817-1827.

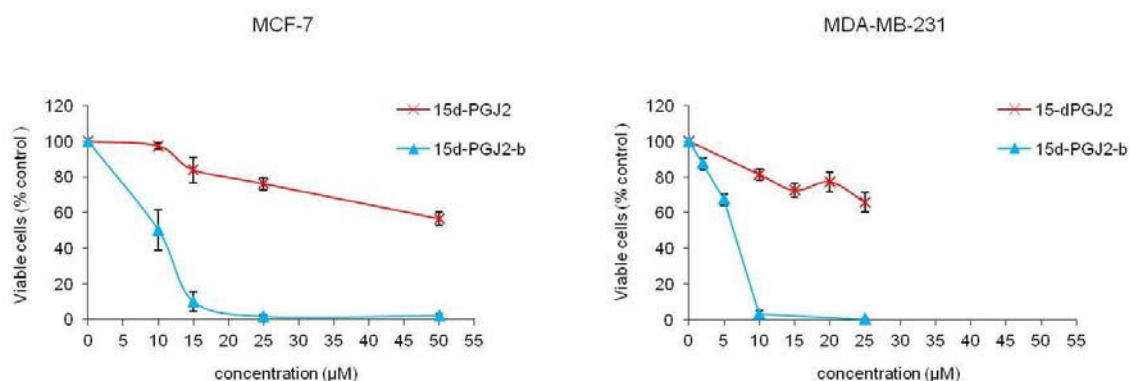


Figure 38 : Etude de l'activité anti-proliférative de la 15d-PGJ2 et 15d-PGJ2-B dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été traitées avec des doses croissantes de 15d-PGJ2 et 15d-PGJ2-B et le nombre de cellules viables est mesuré après 24 heures de traitement. Les EC_{50} de la 15d-PGJ2-B sont de $9,8\mu M$ et $6\mu M$ dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement alors que ceux de la 15d-PGJ2 n'ont pu être atteinte ($>50\mu M$).

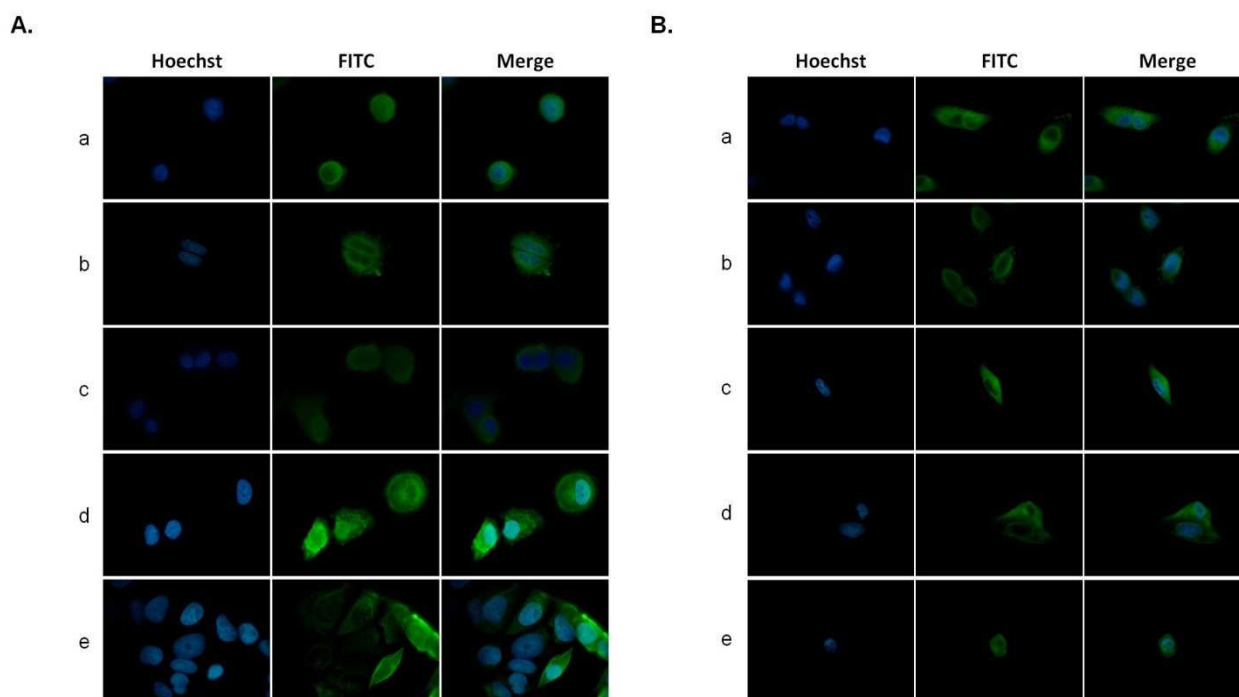


Figure 39 : Localisation du composé 15d-PGJ2-B. La 15d-PGJ2-B est détecté grâce à un anticorps dirigé contre la biotine couplé à la FITC dans les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-231 (B) à 30 min (a), 1 (b), 3 (c), 6 (d), 9 (e). Les noyaux sont colorés en bleu par une coloration au Hoechst. La 15d-PGJ2-B est localisée dans le cytoplasme dès 30 minutes de traitement et une accumulation cytoplasmique et périnucléaire est ensuite observée après 6 et 3 heures de traitement dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement.

3. Effet de la biotinylation du ligand naturel 15d-PGJ2

Induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis by a biotinylated derivative of 15d-PGJ2 in human breast cancer cells.

Christelle Colin-Cassin, Maxime Meyer, Claudia Cerella, Gérald Monard, Michel Boisbrun, Marc Diedrich, Stéphane Flament, Isabelle Grillier-Vuissoz, Sandra Kuntz. *En préparation pour soumission dans Molecular Pharmacology.*

a. Introduction

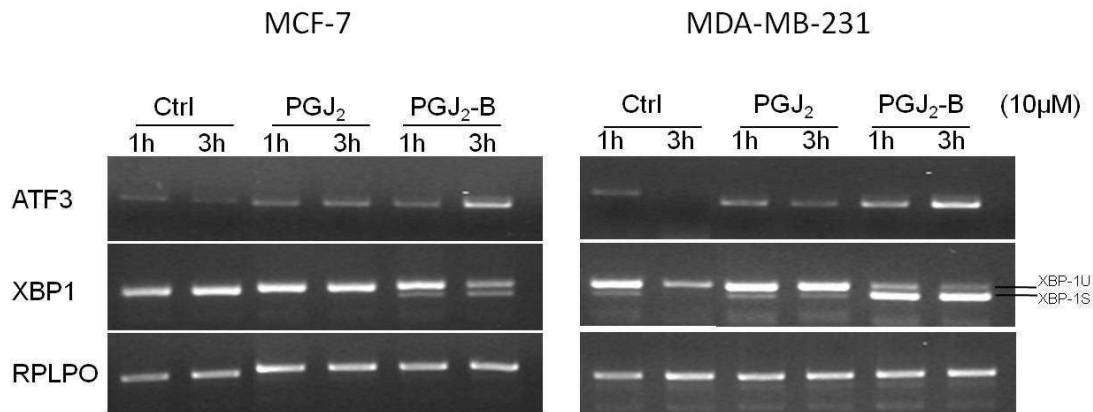
La 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 (15d-PGJ2) est le ligand naturel le plus puissant de PPAR γ . Tout comme pour les TZD, la 15d-PGJ2 a montré des capacités anti-cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. Les voies PPAR γ -dépendantes et indépendantes sont impliquées dans ces effets (Clay CE., *et al.* 1999 ; Saito S., *et al.* 2003 ; Uchida and Shibata, 2008). Néanmoins, il a été démontré que ces effets sont moins puissants que ceux des ligands synthétiques. Il est donc nécessaire de développer des dérivés de la 15d-PGJ2 plus efficaces. Comme nous avons montré que la conjugaison d'un groupement biotine sur la Δ^2 -TGZ augmentait ses capacités anti-prolifératives sur les lignées MCF-7 et MDA-MB-231, nous avons cherché à étudier l'effet de la biotinylation du ligand 15d-PGJ2. Les mécanismes d'action de ce dérivé biotinylé ont également été étudiés.

b. Principaux résultats

Les capacités anti-prolifératives de la 15d-PGJ2 et de son dérivé biotinylé 15d-PGJ2-B ont été évaluées sur ces deux lignées cancéreuses mammaires. Le ligand naturel n'inhibe pas la prolifération cellulaire puisqu'une dose de 50 μ M ne diminue pas significativement le nombre de cellules vivantes avec une EC₅₀ supérieure à la dose maximale utilisée. La biotinylation du ligand naturel augmente son efficacité anti-proliférative avec une EC₅₀ de 9,8 μ M et 6 μ M dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement (**Figure 38**). Une dose de 10 μ M, proche de l'EC₅₀, a été choisie pour étudier les effets anti-cancéreux de la 15d-PGJ2-B dans les deux lignées cancéreuses mammaires.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action impliqués dans les effets anti-cancéreux du dérivé biotinylé, nous avons commencé par suivre la localisation de la 15d-PGJ2-B par immunofluorescence au cours du temps dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Dès 30 minutes de traitement, nous détectons un signal dans le cytoplasme montrant que ce composé est capable de pénétrer dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Le composé s'accumule ensuite dans le cytoplasme et une localisation périnucléaire est observée après 6 et 3 heures de traitement dans les

A.



B.

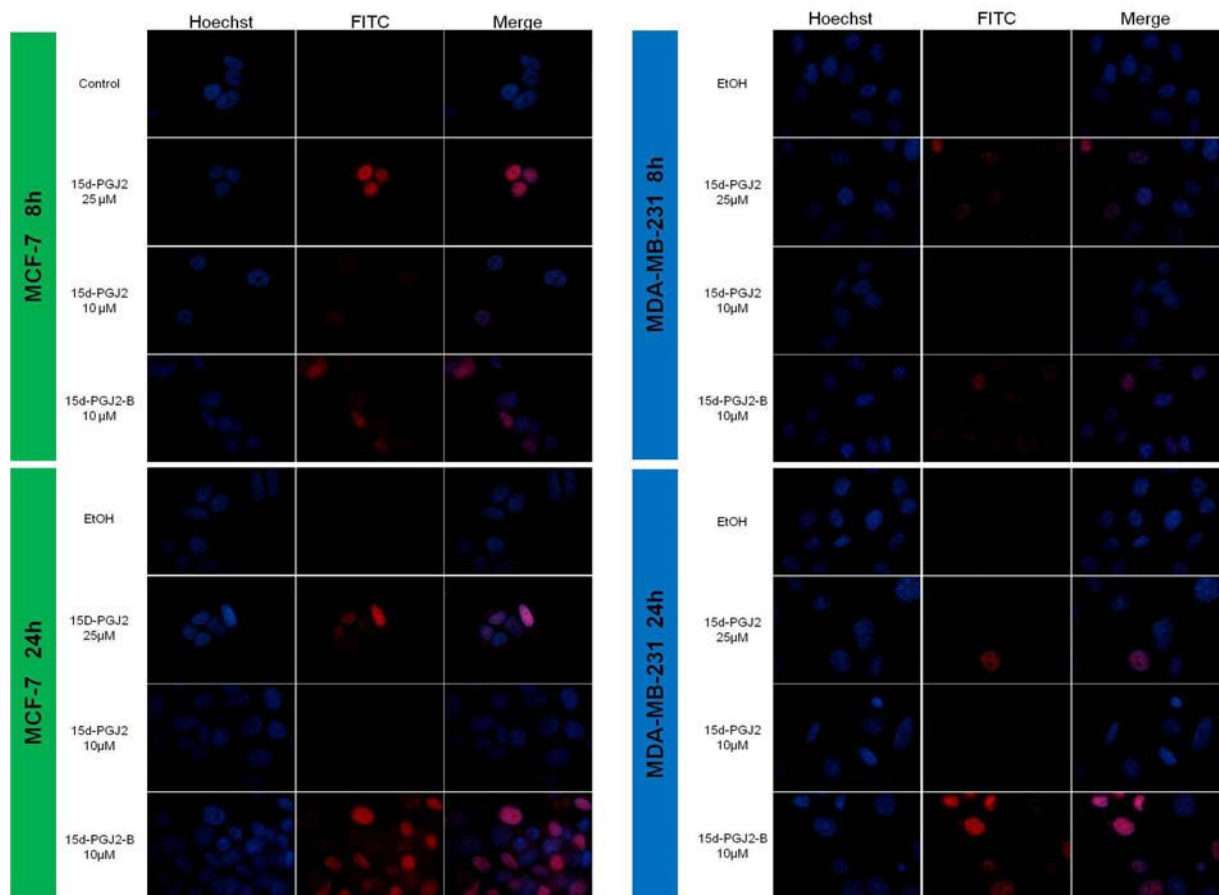


Figure 40 : Etude du stress du réticulum endoplasmique par la 15d-PGJ2-B dans les cellules MCF-7 (gauche) et MDA-MB-231 (droite). **A.** Etude de l'expression de deux marqueurs du stress du RE par RT-PCR semi-quantitative. ATF3, cible de la voie eIF2 α , et le clivage du transcrite de XBP1, cible de la voie IRE1, ont été étudié dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 après 1 et 3 heures de traitement. L'expression d'ATF3 ainsi que l'épissage de XBP1 sont induits dans les deux lignées cancéreuses en présence de 10 μ M de 15d-PGJ2-B. **B.** Etude de la localisation de CHOP (rouge) par immunocytochimie sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. La protéine CHOP est induite après 8 et 24 heures de traitement par 10 μ M de 15d-PGJ2-B. Le noyau est coloré en bleu par un marquage au Hoechst.

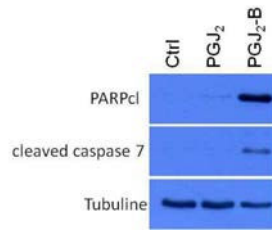
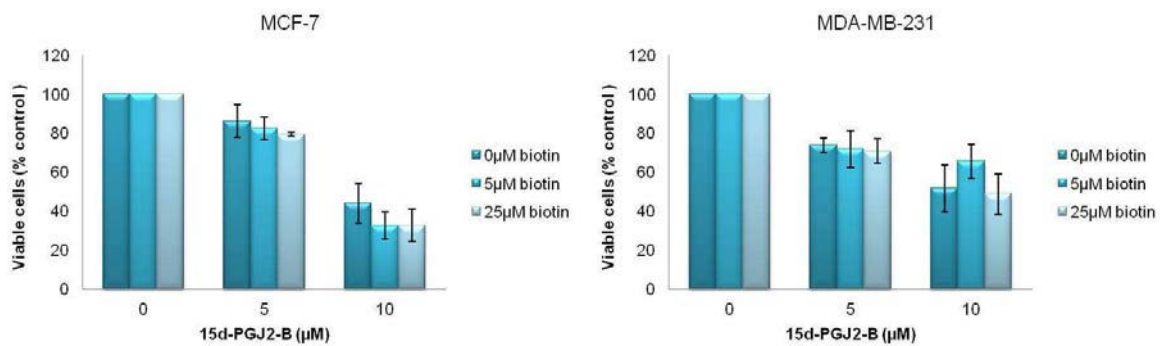


Figure 41 : Etude de l'apoptose par la 15d-PGJ2-B dans les cellules MCF-7. A. Etude de l'expression de deux marqueurs de l'apoptose par western blot. Le clivage de PARP et de la caspase 7 ont été étudiés dans les cellules MCF-7 après 24 heures de traitement. Ces deux marqueurs sont clivés en présence de 10 μ M de 15d-PGJ2-B.

A.



B.

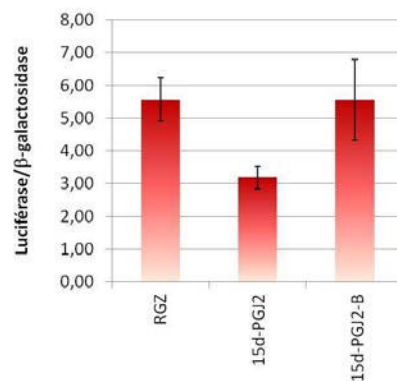


Figure 42 : Etude du mécanisme d'action de la 15d-PGJ2-B. A. Test de compétition 15d-PGJ2-B vs biotine libre. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été traitées avec 0, 5, 10 μ M de 15d-PGJ2-B en présence ou non de biotine libre (0, 5 et 25 μ M). La prolifération cellulaire a été mesurée après 24 heures de traitement. On observe que l'ajout de biotine libre ne modifie pas l'inhibition de prolifération induite par la 15d-PGJ2-B. **B.** Etude de la capacité de transactivation d'un vecteur PPRE-Tk-Luc par la 15d-PGJ2-B. Les cellules MCF-7 ont été transfectées avec un vecteur luciférase contenant un élément de réponse PPRE. L'intensité de luciférase est mesurée après 24 heures de traitement par 10 μ M de RGZ, 15d-PGJ2 et 15d-PGJ2-B. Les résultats sont exprimés en fonction du control. La RGZ et la 15d-PGJ2 induisent respectivement l'activation de PPAR γ de 5x et de plus de 3x. La 15d-PGJ2-B stimule l'expression de la luciférase plus de 5x.

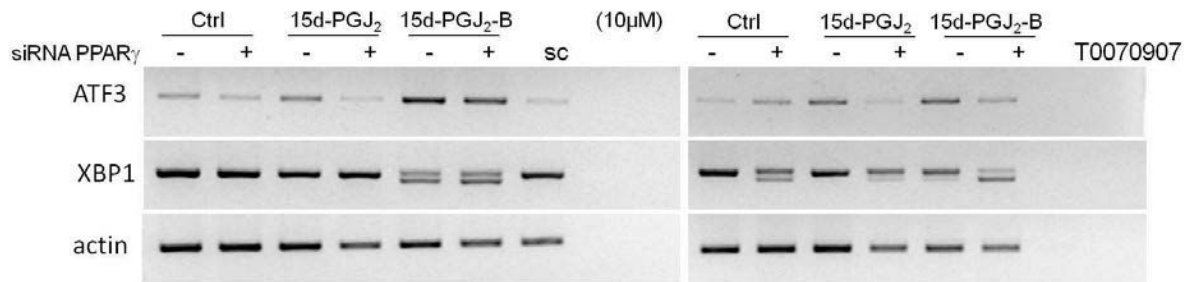
cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement (**Figure 39A et B**). La 15d-PGJ2-B ne pénètre pas dans le noyau.

Il a été décrit que la 15d-PGJ2 s'accumule dans le réticulum endoplasmique et peut induire l'expression de BiP (Takahashi S., *et al.* 1998 ; Odani N., *et al.* 1996). La localisation périnucléaire de la 15d-PGJ2-B suggère qu'elle pourrait également induire un stress du RE. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'expression de différents marqueurs du stress du RE. Après 1 heure de traitement avec 10 μ M de 15d-PGJ2-B, le transcrite XBP1 est épissé dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 montrant que la voie IRE1 du stress du RE est activée (**Figure 40A**). La voie PERK est également activée puisque l'expression du facteur de transcription ATF3, une cible du facteur ATF4 induit par eIF2 α , est aussi augmentée après 3 heures de traitement avec la 15d-PGJ2-B (**Figure 40A**). Nous avons enfin étudié l'expression de CHOP, un facteur de transcription qui est notamment induit par ATF4 et XBP1. Après 8 heures de traitement avec 10 μ M de 15d-PGJ2-B, nous détectons la protéine CHOP dans le noyau des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Dans les cellules traitées avec le ligand naturel 15d-PGJ2, un marquage nucléaire n'est observé que pour une dose de 25 μ M (**Figure 40B**). Tous ces résultats montrent que la 15d-PGJ2 induit un stress du RE dans les lignées cancéreuses mammaires.

Comme un stress prolongé peut induire la mort cellulaire par apoptose, nous avons analysé l'effet de la 15d-PGJ2-B sur l'expression de deux marqueurs d'apoptose : PARP et caspase 7. Après 24 heures de traitement, la 15d-PGJ2-B induit le clivage de PARP et de la caspase 7 ce qui n'est pas observé avec la 15d-PGJ2 à une dose de 10 μ M (**Figure 41**). Par ailleurs, un marquage des noyaux au Hoeschst confirme la présence de figures apoptotiques dans les cellules MCF-7 traitées avec 10 μ M de 15d-PGJ2-B. L'analyse de l'effet pro-apoptotique de la 15d-PGJ2-B dans les cellules MDA-MB-231 est en cours.

La présence de la biotine pourrait favoriser la pénétration de la molécule par sa fixation sur des récepteurs à la biotine présents en grande quantité à la surface cellulaire des cellules cancéreuses. Afin de vérifier si l'effet anti-prolifératif accru de la 15d-PGJ2-B est lié à la présence de ce groupement biotine, nous avons réalisé un test de compétition avec de la biotine libre. Nous avons mesuré la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 après un traitement de 24 heures avec 0, 5 et 10 μ M de 15d-PGJ2-B en présence de 0, 5 et 25 μ M de biotine libre. Même à la plus forte concentration de biotine libre (25 μ M), aucune modification significative de la prolifération cellulaire n'est observée ce qui suggère que l'effet anti-prolifératif de la 15d-PGJ2-B est indépendant de l'activation d'un récepteur à la biotine (**Figure 42A**). Nous avons alors cherché à savoir si l'effet anti-prolifératif de la 15d-PGJ2-B est le résultat d'une activation du récepteur nucléaire PPAR γ . Pour ce

A.



B.

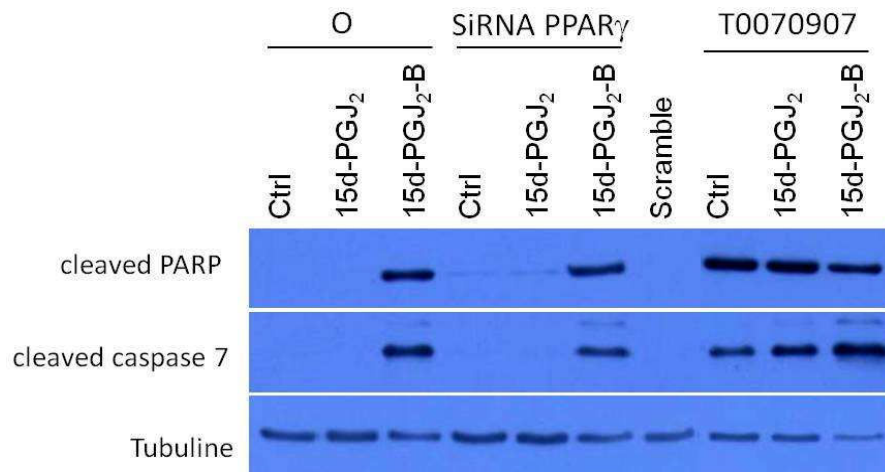


Figure 43 : Implication de PPAR γ dans le stress du réticulum endoplasmique et l'apoptose induits par la 15d-PGJ₂-B dans les cellules MCF-7. Dans les cellules MCF-7, l'activité de PPAR γ est bloquée grâce à un siRNA ou l'antagoniste T0070907 puis les cellules sont traitées par 10 μM de 15d-PGJ₂ et 15d-PGJ₂-B. **A.** Effet sur le stress du RE. L'expression des deux marqueurs du stress du RE, ATF3 et XBP1 sont étudiés par RT-PCR semi-quantitative après 3 heures de traitement. L'épissage de XBP1 n'est pas bloqué par le siRNA PPAR γ alors que l'expression d'ATF3 diminue en présence du siRNA et de l'antagoniste T0070907. **B.** Effet sur l'apoptose. L'expression des deux marqueurs de l'apoptose, PARP et caspase 7, ont été étudié par western blot après 24 heures de traitement. Le clivage de PARP et de la caspase 7 est toujours détecté en présence du siRNA PPAR γ ou de l'antagoniste T0070907.

faire, l'activation du récepteur PPAR γ a été mesurée après la transfection d'un vecteur luciférase contenant un élément de réponse PPRE dans les cellules MCF-7. Le ligand naturel, qui est l'activateur le plus puissant de PPAR γ , induit de plus de 40x et de 3x l'activation de PPAR γ à 25 μ M et 10 μ M respectivement. La RGZ, qui est également un agoniste de PPAR γ , induit l'expression de la luciférase de 5x à 25 μ M et 10 μ M (**Figure 42B**). La 15d-PGJ2-B, uniquement étudiée à 10 μ M, stimule l'expression de la luciférase plus de 5x ce qui suggère qu'elle est aussi capable d'activer le récepteur PPAR γ (**Figure 42B**). Par une étude de modélisation menée en collaboration avec le groupe de chimistes (Pr. Gérald Monard, équipe de Chimie et Biochimie Théoriques, UMR 7565, Nancy-Université, CNRS), nous avons montré que ce dérivé biotinylé est capable de pénétrer dans la poche de liaison au ligand du récepteur PPAR γ confirmant que l'effet anti-prolifératif de la 15d-PGJ2-B peut être lié à une activation du récepteur PPAR γ . Pour vérifier que le stress du RE et l'apoptose induits par la 15d-PGJ2-B sont PPAR γ -dépendants, des expériences ont été réalisées à l'aide d'ARN interférants ciblant PPAR γ et d'un antagoniste de PPAR γ , le T0070907. L'efficacité de l'interférence ARN a été confirmée par transfection du vecteur luciférase PPRE ainsi que par RT-PCR semi-quantitative. Concernant le stress du RE, l'épissage de XBP1 n'est pas bloqué par le siRNA PPAR γ suggérant que l'activation de la voie IRE1 est un mécanisme indépendant de PPAR γ . Cependant, l'expression d'ATF3 diminue en présence du siRNA et de l'antagoniste T0070907 montrant que la voie PERK est dépendante de l'activation de PPAR γ (**Figure 42A**). Par contre, l'apoptose induite la 15d-PGJ2-B est un mécanisme indépendant de PPAR γ puisque le clivage de PARP et de la caspase 7 est toujours détecté en présence du siRNA PPAR γ ou de l'antagoniste T0070907 (**Figure 42B**). Un traitement des cellules MDA-MB-231 par le siRNA PPAR γ et l'antagoniste T0070907 reste à effectuer.

c. Conclusion

La biotinylation de la 15d-PGJ2 augmente les capacités anti-prolifératives du ligand naturel 15d-PGJ2 sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. L'efficacité accrue de la 15d-PGJ2-B n'est pas liée à l'activation d'un récepteur à la biotine. Nous avons montré que la 15d-PGJ2-B pénètre rapidement dans les cellules et présente une localisation cytoplasmique et périnucléaire. Il peut activer le récepteur PPAR γ et une étude de modélisation montre que ce composé peut pénétrer dans la poche de liaison au ligand. Comme le ligand naturel, la 15d-PGJ2-B induit un stress du RE par l'activation des voies PERK et IRE1 *via* des mécanismes PPAR γ -dépendants et indépendants respectivement. La 15d-PGJ2-B induit également l'apoptose des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 de manière PPAR γ -indépendante.

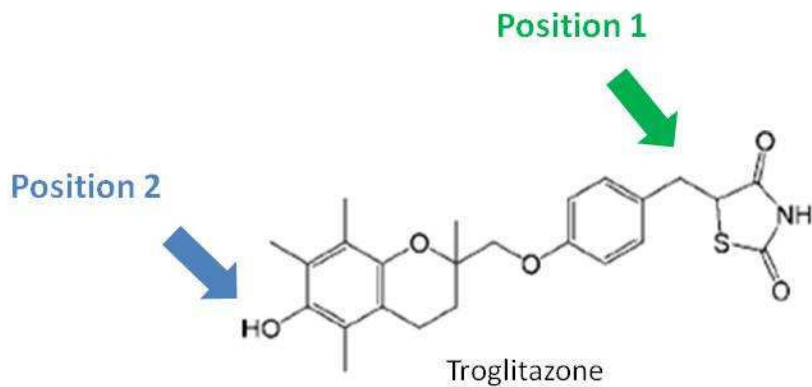


Figure 44 : Positions des principales modifications structurales apportées à la TGZ. Deux principales modifications ont été réalisées pour nos études de relation structure-activité. La première située en position 1 correspond à l'insertion d'une double liaison accolée au cycle thiazolidinedione qui rigidifie le squelette de la molécule la rendant incapable d'activer PPAR γ . Cette double liaison caractérise les dérivés $\Delta 2$. En position 2, le groupement hydroxyle du cycle chromane a été substitué ou désoxygéné.

II. Vers la conception de nouvelles molécules : interface Chimie-Biologie

1. Etude de l'activité anti-proliférative de nouveaux dérivés de la TGZ sur les cellules cancéreuses mammaires

Synthesis of new troglitazone derivatives: Anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study

Stéphane Salamone, Christelle Colin, Isabelle Grillier-Vuissoz, Sandra Kuntz, Sabine Mazerbourg, Stéphane Flament, Hélène Martin, Lysiane Richert, Yves Chapleur, Michel Boisbrun. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 51:206-15, 2012.

a. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité anti-tumorale PPAR γ -indépendante des TZD est une piste encourageante pour le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. Néanmoins, les effets toxiques des TZD limitent leur utilisation en clinique. En effet, la TGZ a été retirée du marché dans les années 2000 à cause de son hépatotoxicité (Chojkier M., *et al.* 2005). La TGZ induit de manière plus efficace que la RGZ la dégradation d'ER α dans les cellules MCF-7 et ZR-75. Nous avons montré que cet effet était PPAR γ -indépendant (Lecomte J., *et al.* 2008). De ce fait, la recherche s'oriente vers le développement de nouvelles molécules dérivées des TZD afin d'augmenter leur activité anti-proliférative tout en limitant leur toxicité. L'introduction d'une double liaison proche du cycle thiazolidinedione (position 1) a conduit au développement des composés $\Delta 2$, à activité PPAR γ -indépendante (**Figure 44**). De manière générale, ces composés insaturés sont plus efficaces que les composés parents dans l'inhibition de la prolifération cellulaire (Fan YH., *et al.* 2004 ; Huang JW., *et al.* 2005). En 2010, nous avons montré que la molécule $\Delta 2$ -TGZ inhibe de manière dose-dépendante la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (Colin C., *et al.* 2010). D'autres dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ avec une meilleure activité anti-proliférative ont été développés (Huang JW., *et al.* 2005). Ces études de relation structure-activité ont permis de mettre en évidence l'importance de la présence d'un groupement hydrophobe à proximité du cycle chromane (position 2) (**Figure 44**). Les auteurs ont ainsi développé le composé STG28 qui inhibe la prolifération des cellules MCF-7 avec une EC₅₀ de 5 μ M. De plus, une préférence stéréochimique a été démontrée puisque l'isomère S est plus efficace que l'isomère R dans la répression de la cycline D1 (Huang JW., *et al.* 2006). Le composé $\Delta 2$ -CGZ a également servi de base pour le développement de nouveaux dérivés et a conduit à une nouvelle classe de molécules impliqués dans la restriction énergétique (Guh JH., *et al.* 2010 ; Lin HY., *et al.* 2012 ; Wang D., *et al.* 2012). Parmi ces composés, l'OSU-53, inhibe la prolifération des cellules cancéreuses mammaires triple-négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-468 avec des EC₅₀ respectives de 5 μ M et 2 μ M et n'affecte pas les cellules non cancéreuses

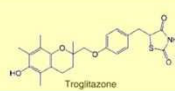
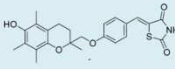
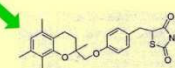
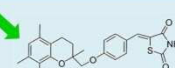
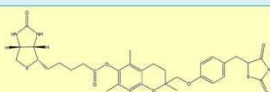
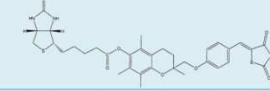
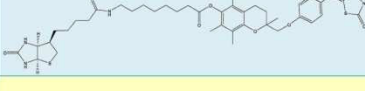
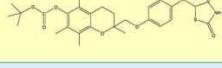
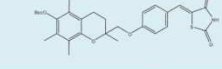
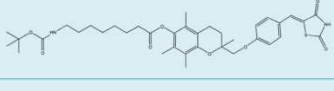
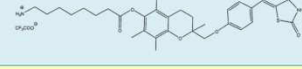
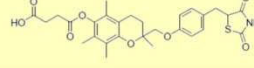
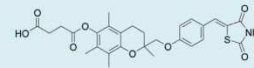
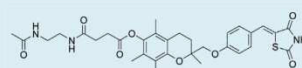
	Formule	molécule	Viabilité cellulaire (EC50)		hépatocytes
			MCF-7	MDA-MB-231	
	 Troglitazone	TGZ	35,4 ± 1,3	15,7 ± 0,1	52
		7 = Δ2-TGZ	29,7 ± 2,0	16,6 ± 1,0	63
Dérivés désoxygénés		9b = H-TGZ = TGZ désoxygénée	20 ± 1,0	12,3 ± 0,5	66
		6b = H-Δ2-TGZ = Δ2-TGZ désoxygénée	12,5 ± 0,9	10,8 ± 0,7	84
Dérivés biotinylés		11 = b-TGZ	15,9 ± 0,8	6,5 ± 0,4	50
		8a = b-Δ2-TGZ	11,2 ± 1,8	3,5 ± 0,1	66
		8d = b-L-Δ2-TGZ	26 ± 5,7	3,7 ± 0,7	61
Dérivés boc		9a = boc-TGZ	11,2 ± 0,3	3,8 ± 0,4	47
		6a = boc-Δ2-TGZ	7,7 ± 0,5	3,3 ± 0,1	75
		8b = boc-L-Δ2-TGZ	13 ± 1,5	3,2 ± 0,3	79
Dérivés aminés		8c = NH2-Δ2-TGZ	3,2 ± 0,1	5,0 ± 0,7	57
Dérivés succiniques		12	>50	>25	76
		8e	>50	>25	54
		8f	>50	>25	75

Figure 45 : Etude de l'activité anti-proliférative de nouveaux dérivés de la TGZ. L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 a été évaluée après 24 heures de traitement en présence des différents composés. La structure des dérivés insaturés Δ2 (surlignés en bleu) comme les dérivés saturés (surlignés en jaune) sont présentés. Parmi ces dérivés présentant des modifications au niveau de l'hydroxyle du cycle chromane, on distingue les dérivés désoxygénés, les dérivés biotinylés, les dérivés boc, le dérivés aminé et les dérivés succiniques. Pour ces composés, les EC₅₀ ont été déterminées pour les deux lignées cellulaires et la toxicité a été testée sur des cultures primaires d'hépatocytes humains. Les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages de cellules vivantes après 90 minutes d'incubation en présence de 100μM de composé.

mammaires MCF-10A (Lee KH., *et al.* 2011). Ce dernier est aussi efficace *in vivo* et bloque la croissance de tumeurs MDA-MB-231 xénotransplantées chez les souris Nude (Lee KH., *et al.* 2011).

Notre objectif était de développer de nouveaux dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ plus efficaces dans l'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires et moins hépatotoxiques comparés à la TGZ.

b. Principaux résultats

Nos collègues chimistes ont synthétisé de nouveaux dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ (Dr Michel BOISBRUN, Groupe S.U.C.R.E.S., UMR 7565 Nancy-Université, CNRS). Nous avons ensuite étudié leurs activités anti-prolifératives sur nos deux lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. En parallèle, la toxicité de ces dérivés a été testée sur des cultures primaires d'hépatocytes humains par les docteurs Hélène Martin et Lysiane Richert (Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, UFR Pharmacie Besançon).

Les nouveaux composés ont été obtenus par des modifications au niveau du groupe hydroxyle du phénol du cycle chromane (position 2) (**Figure 44**). Ces modifications ont été effectuées sur la $\Delta 2$ -TGZ et la TGZ. De manière générale, les dérivés insaturés de type $\Delta 2$ sont plus efficaces que les composés parents. La substitution du phénol par des groupements polaires de type succinique à proximité du cycle chromane (composés 8e, 8f et 12) diminue l'activité anti-proliférative des composés (**Figure 45**). Par-contre, le remplacement du groupe hydroxyle polaire (OH) du cycle chromane par un atome d'hydrogène, donnant la molécule $\Delta 2$ -TGZ désoxygénée n°6b, augmente l'activité anti-proliférative avec des EC_{50} de 12,5 μ M et 10,8 μ M pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement (**Figure 45**). Le résultat est similaire pour une modification identique de la TGZ (n°9b). Pour conserver une activité anti-proliférative, les groupements polaires doivent être séparés du cycle chromane par un linker apolaire. Parmi les composés, le 8c, dont la fonction amine primaire (polaire) est reliée en position 2 au cycle chromane par 7 groupes méthylènes apolaires est une des molécules les plus actives avec des EC_{50} de 3,2 μ M et 5 μ M pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement (**Figure 45**). Par ailleurs, comparé aux autres substitutions, l'ajout d'un groupement biotine sur la $\Delta 2$ -TGZ (n°8a) n'augmente pas l'activité anti-proliférative avec des EC_{50} de 11 μ M et 3,5 μ M pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement (**Figure 45**).

L'hépatotoxicité des différents composés a été analysée sur des cultures d'hépatocytes humains avec une gamme de concentrations allant jusqu'à 100 μ M. La viabilité des cellules a été mesurée par un

test MTT. De manière générale, tous les composés insaturés $\Delta 2$ sont moins toxiques que les dérivés de type TGZ. En effet, la viabilité est de 63% pour la $\Delta 2$ -TGZ et de 52% pour la TGZ. De même, la viabilité est de 84% pour la $\Delta 2$ -TGZ désoxygénée (6b) alors qu'elle est de 66% pour la TGZ désoxygénée (9b). La toxicité de la TGZ est en partie liée à sa conjugaison avec le glutathion. Il est supposé que la double liaison proche du cycle thiazolidinedione (position 1) des composés $\Delta 2$ diminuerait la conjugaison avec le glutathion et par conséquent leur toxicité. Par ailleurs, la substitution en position 2 du phénol du cycle chromane avec des groupements lipophiles diminue la toxicité des composés, ce qui est le cas pour les composés 6a et 8b avec 75% et 79% de viabilité des hépatocytes respectivement. Enfin, les composés dont le groupe hydroxyle du cycle chromane a été remplacé par un atome d'hydrogène sont les moins toxiques, en particulier le composé 6b qui présente la meilleure viabilité de la série (84%). Ceci s'expliquerait par l'absence de l'oxygène en position 2 ce qui empêcherait la formation de métabolites toxiques de type quinone.

c. Conclusion

Cette étude a permis la synthèse de dérivés originaux présentant une meilleure activité anti-proliférative sur les cellules cancéreuses mammaires ainsi qu'une hépatotoxicité plus faible par rapport aux composés TGZ et $\Delta 2$ -TGZ. Nous avons montré que les composés les plus actifs et les moins toxiques sont des dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ, et notamment ceux dont l'oxygène en position 2 a été supprimé.



Original article

Synthesis of new troglitazone derivatives: Anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study

Stéphane Salamone^a, Christelle Colin^b, Isabelle Grillier-Vuissoz^b, Sandra Kuntz^b, Sabine Mazerbourg^b, Stéphane Flament^b, Hélène Martin^c, Lysiane Richert^c, Yves Chapleur^a, Michel Boisbrun^{a,*}^a Groupe SUCRES, UMR 7565, Nancy-Université-CNRS, BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France^b EA 4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGRETO), Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy-Université, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France^c Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, EA 4267, IFR133, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 25030 Besançon Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2011

Received in revised form

20 February 2012

Accepted 21 February 2012

Available online 28 February 2012

Keywords:

Troglitazone

Chromane

Breast cancer

Hepatotoxicity

ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent cancer in women. The development of resistances to therapeutic agents and the absence of targeted therapy for triple negative breast cancer motivate the search for alternative treatments. With this aim in mind, we synthesised new derivatives of troglitazone, a compound which was formerly used as an anti-diabetic agent and which exhibits anti-proliferative activity on various cancer cell lines. Among the compounds prepared, some displayed micromolar activity against hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cells. Furthermore, the influence of the compounds on the viability of primary cultures of human hepatocytes was evaluated. This enabled us to obtain for the first time interesting structure–toxicity relationships in this family of compounds, resulting in **6b** and **8b**, which show good anti-proliferative activities and poor toxicity towards hepatocytes, compared to troglitazone.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the most prevalent cancer in women and represents the second highest leading cause of cancer death in this population after lung cancer. Approximately 75% of tumours express the oestrogen receptor ER α that allows for treatment with the anti-oestrogen tamoxifen. Additionally, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expressing tumours may be treated with the monoclonal antibody trastuzumab [1]. Nevertheless, *de novo* or acquired resistance to these therapeutic agents often lead to treatment failure [2,3]. Therefore, there is an urgent need to develop alternative therapeutics. Moreover, there is no targeted therapy for the treatment of breast tumours known as triple negative: ER α -, PR- (progesterone receptor), HER2-. In this regard, ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and especially thiazolidinediones (TZD) were envisioned as a therapeutic alternative towards advanced (or relapsing) breast cancer [4]. PPAR γ is a nuclear receptor associated with glucose homeostasis. It can be activated by endogenous ligands such as 15d-PGJ(2) or synthetic compounds like TZD,

including troglitazone, rosiglitazone, and pioglitazone [5]. Among these drugs, which were used in the treatment of type II diabetes, only pioglitazone is still therapeutically used in some countries; the others were withdrawn from the market because of side-effects such as Drug-Induced Liver Injury (DILI) [6]. Regarding breast cancer, several PPAR γ ligands of the TZD family have been shown to possess anticancer properties *in vitro* and *in vivo* [7,8]. Among these, troglitazone (TGZ) seems to be particularly interesting and has even been tested in clinical trials for breast cancer before its withdrawal [9]. The anti-proliferative modes of action have been extensively studied, but are still not fully elucidated. Actually, increasing data suggest that its activity is mainly related to PPAR γ -independent mechanisms [10–12]. Cyclin D1 ablation [13,14], inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions [15], TGF β signalling [16], ER α disruption [10], telomerase activity suppression [17], interaction with oestrogen-related receptor α and γ [18], energy restriction [19], and calcium and ERK-dependent expression of the early growth response gene 1 [20] are examples of TZD-induced PPAR γ -independent events. A major aspect of this new therapeutic strategy lies in the fact that non-malignant cells seem to be resistant to these PPAR γ -independent antitumour effects, which holds the translational potential of these agents [12].

New TGZ derivatives have already been prepared. In particular, the introduction of a double bond adjacent to the thiazolidinedione

* Corresponding author. Tel.: +33 383 68 43 63; fax: +33 383 68 47 80.
E-mail address: michel.boisbrun@univ-lorraine.fr (M. Boisbrun).

ring yielded $\Delta 2$ -troglitazone ($\Delta 2$ TGZ) which was devoid of PPAR γ activity but exhibited an anti-proliferative ability similar to the one of TGZ [13,21]. Additional structural modulations were made on the $\Delta 2$ TGZ template, especially by chromane phenol functionalisation, arising in low micromolar active molecules [22]. Nevertheless, a major drawback of TGZ derivatives lies in the fact that TGZ itself exhibits hepatotoxicity. The mechanisms underlying TGZ DILI are not fully understood. Yokoi [23] has recently reviewed the proposed mechanisms and suggested that the presence of the chromane moiety could be of importance in the induction of DILI since it can lead to toxic derivatives. Besides, Bharatam [24] recently reported a theoretical study to better understand the formation of these derivatives.

The goal of the present work was to synthesise new $\Delta 2$ TGZ derivatives, aiming at increasing anti-proliferative activity towards breast cancer cell lines, and decreasing hepatotoxicity, as compared to TGZ.

2. Chemistry

Since phenolic functionalisation of $\Delta 2$ TGZ seems to have a great influence on its biological activity, we envisioned the synthesis of many ester derivatives of this molecule. Thus, we first needed a straightforward access to $\Delta 2$ TGZ. As mentioned by Halperin et al. [25], its synthesis is not trivial. Taking into account reported methods dealing with the synthesis of $\Delta 2$ TGZ and derivatives [22,25–29], we started from commercial racemic Trolox[®] **1**, but intended to proceed without protection of the phenol of the chromane moiety with usual groups (*i.e.* Bn, TBDMS, MOM, MEM) whose introduction and removal proved to be troublesome. Therefore, after a simple esterification of the starting material [30,31] to give **2**, we smoothly introduced a *tert*-butyloxycarbonyl group to get compound **3a** (Scheme 1). After reduction to **4a**, triflate formation followed by substitution with *p*-hydroxybenzaldehyde gave **5a**. Then, condensation with 2,4-thiazolidinedione gave O-protected $\Delta 2$ TGZ **6a** in 65% overall yield. In order to study the influence of the phenolic hydroxyl group on both activity and toxicity, we intended to remove this moiety. Thus, based on a method reported by Salvatore et al. [32] to get new tocopherol derivatives, we prepared triflate **3b** in almost quantitative yield, followed by catalytic hydrogenation under basic conditions to get the deoxygenated compound **3c** in very good yield. The previously mentioned sequence afforded deoxygenated $\Delta 2$ TGZ **6b** in 39% overall yield. Smooth removal of the phenolic protecting group of **6a** in acidic medium afforded $\Delta 2$ TGZ **7** in 86% yield after chromatography, which enabled us to functionalise the molecule *via* an ester linkage.

It has been reported [33,34] that conjugation of molecules with biotin might increase their uptake in tumour cells since the latter often over-express biotin-specific receptors on their surface. Thus, we prepared the biotinoyl derivative **8a**, albeit in moderate yield. In order to facilitate recognition by the biotin receptor, we envisioned the introduction of a linker. Hence, Boc-protected aminocaprylic compound **8b** was obtained in good yield. Acidic deprotection afforded **8c** which was in turn linked to biotin to give **8d**. Furthermore, it has been reported that the succinoyl moiety linked to α -tocopherol induces antiadhesion properties on breast cancer cells [35]. We then synthesised the succinoyl derivative **8e**, along with non-acidic derivative **8f**.

In order to study the influence of the double bond of these molecules on the anti-proliferative activity and toxicity, we prepared saturated analogues. Thus, as reported by Ramachandran [28], 70 psi hydrogen afforded **9a** and **9b** in good yield from **6a** and **6b** respectively. Acidic treatment of **9a** gave TGZ **10** which was in turn converted into biotinoyl and succinoyl derivatives (**11** and **12** respectively).

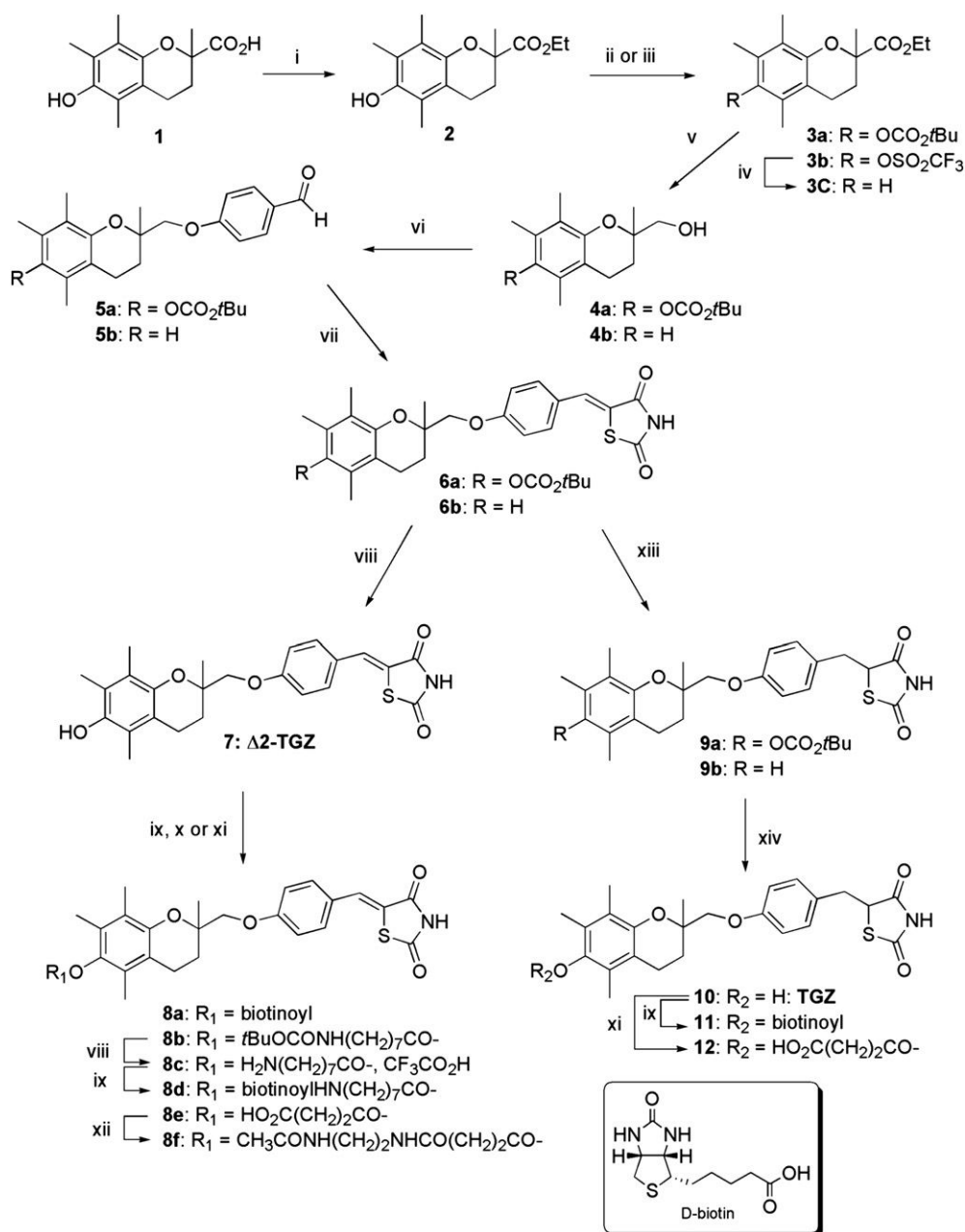
3. Biological studies and discussion

All of the TGZ derivatives were tested for their anti-proliferative activity against hormone-dependent (MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. Their hepatotoxicity was also evaluated by incubation with primary cultures of human hepatocytes. The results are summarised in Table 1.

Regarding cell proliferation, it can first be noticed that the hormone-independent cell line (MDA-MB-231) is more sensitive to the synthesised molecules than the hormone-dependent cell line (MCF-7), with the exception of compound **8c**. These are interesting data that could be helpful for understanding the mechanism of action of TGZ derivatives in future studies. Besides, MDA-MB-231 cells display less variability than MCF-7 in their sensitivity to the various compounds: the IC₅₀ values range from 3.2 to 5.0 μ M for most of the active compounds (see **6a**, **8a–d**) in MDA-MB-231 whereas in the MCF-7 cell line they are ranging from 3.2 μ M for the most active **8c** to 26.0 μ M for the least active **8d**.

Dealing with structure–activity relationships, one can first notice that the double bond has an influence on the activity of the compounds. If we compare **6a** to **9a**, **6b** to **9b**, and **8a** to **11**, a slight positive effect is observed on both cell lines: unsaturated derivatives are more active than their saturated counterparts. Comparing $\Delta 2$ TGZ to TGZ, a positive effect is also observed in MCF-7, but not in MDA-MB-231 cell line. Besides, phenol functionalisation with succinoyl residues (see **8e**, **8f**, **12**) appears deleterious to the anti-proliferative activity. This might be due to the increase of polarity that such substituents induce in the proximity of the chromane core. In the case of compound **8c**, the polar ammonium moiety is rather distant from the chromane, since it is linked to this heterocycle by seven apolar methylene groups, resulting in one of the most active molecules. Such methylene groups are also present in the case of biotinoyl derivatives **8a** and **8d** and in the case of Boc-linker intermediate **8b**, which are also active. Furthermore, strongly apolar Boc residue directly linked to the chromane afforded very active **6a**. A confirmation of the role of polarity came from compounds **6b** and **9b** in which the polar hydroxyl moiety was replaced by a hydrogen atom. Even if they are not the most active compounds, it resulted in a clear increase in potency. Furthermore, one can notice that the presence of the biotin residue (with or without a caprylic linker: see **8a** and **8d**) does not provide additive value compared to other substituents, unlike what we expected. Compounds **6a**, **8a**, and reference compounds **7** ($\Delta 2$ TGZ) and TGZ were selected to exhibit proliferation curves for both cell lines, in Figs. 1 and 2.

In terms of hepatotoxicity assessment, it is important to take into account the pharmacokinetic parameters [23] and even more importantly, the potential tissue concentration in the liver, an organ potentially able to accumulate xenobiotics. As reported by Loi et al. [36], the maximum plasma concentration of TGZ in patients taking a dose of 600 mg/day reached 6.3 μ M, while Sahi et al. [37] demonstrated that in rats the concentration in liver was 10–12 fold higher than that in the plasma. For this reason, in the present study, the cytotoxicity of TGZ and its derivatives were assessed using human hepatocytes at concentrations up to 100 μ M, as reported by Yamamoto [38] for the evaluation of TGZ metabolites toxicity. Our study was conducted by measuring cell viability using the MTT assays on primary cultures of human hepatocytes and for clarity, we present the results as percentage of surviving cells after incubation with 100 μ M of compound (Table 1). The study shows that, with the exception of non-active succinoyl derivatives, all $\Delta 2$ TGZ derivatives are much less toxic than TGZ ones: compare $\Delta 2$ TGZ (**7**) to TGZ, **6a** to **9a**, **6b** to **9b**, and **8a** to **11**. It has been reported that TGZ toxicity is at least partly due to glutathione depletion because of conjugation through linkage with the



Scheme 1. Reagents and conditions: i EtOH, cat. *p*-TSA, reflux, 95%; ii Boc₂O, cat. DMAP, 99%; iii Tl₂O, Pyr., 99%; iv TEA, H₂ 70 psi, 10% Pd/C, 96%; v LiAlH₄, 91% (**4a**), 94% (**4b**); vi 1) Tl₂O, Pyr. 2) 4-hydroxybenzaldehyde, K₂CO₃ 86% (**5a**), 84% (**5b**); vii 2,4-thiazolidinedione, piperidine, Δ, 88% (**6a**), 54% (**6b**); viii TFA, 86% (**7**), 94% (**8c**); ix D-biotin, TEA, IBCF, cat. DMAP, 35% (**8a** and **11**), 64% (**8d**); x Boc-aminocaproic acid, TEA, IBCF, cat. DMAP, 75%; xi Succinic anhydride, cat. DMAP, 43% (**8e**), 63% (**12**); xii TEA, IBCF, *N*-acetylenehtylenediamine, 29%; xiii H₂ 70 psi, 10% Pd/C, 99% (**9a**), 70% (**9b**); xiv HCl, quant.

thiazolidinedione ring [23,29,39]. The presence of a conjugated double bond might decrease the electrophilicity of the heterocycle, then disfavour conjugation with glutathione, and thus decrease the toxicity.

In addition, one can notice that Δ²TGZ derivatives bearing a lipophilic substituent on the chromane (see **6a** and **8b**) exhibit much less toxicity towards hepatocytes than others. Such residues might disfavour formation of reported toxic quinone-type metabolites [23,39]. From that point of view, compounds **6b** and **9b** devoid of hydroxyl group and thus unable to be transformed into that type of metabolite, show less toxicity towards hepatic cells than Δ²TGZ and TGZ respectively. Furthermore, the best viability value of the whole series is observed for **6b**. Fig. 3 shows the cytotoxicity profiles for TGZ, Δ²TGZ, **6b**, and **8b** which are similar

for these compounds up to 50 μM but evidences that **6b** and **8b** are less cytotoxic, as compared to TGZ and Δ²TGZ at 100 μM.

4. Conclusion

A series of new TGZ and Δ²TGZ derivatives were prepared and tested for their anti-proliferative activity against hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. These molecules were obtained *via* functionalisation or removal of the hydroxyl group of the chromane moiety. The most active molecules were Δ²TGZ derivatives, exhibiting low-micromolar range activity. Some of them also showed much less toxicity on primary cultured hepatocytes than parents TGZ and Δ²TGZ. This is a new step in the way to get more active and less toxic molecules to

Table 1
Anti-proliferative activity and hepatocyte viability related to prepared compounds and TGZ.

Compound	IC ₅₀ ^a ± SEM ^b		Hepatocyte viability ^f (%)
	MCF-7 ^c	MDA-MB-231 ^d	
6a ^e	7.7 ± 0.5	3.3 ± 0.1	75
6b	12.5 ± 0.9	10.8 ± 0.7	84
7 ^e (Δ2TGZ)	29.7 ± 2.0	16.6 ± 1.0	63
8a ^e	11.2 ± 1.8	3.5 ± 0.1	66
8b ^e	13.0 ± 1.5	3.2 ± 0.3	79
8c ^e	3.2 ± 0.1	5.0 ± 0.7	57
8d	26.0 ± 5.7	3.7 ± 0.7	61
8e	>50	>25	54
8f	>50	>25	75
9a	11.2 ± 0.3	3.8 ± 0.4	47
9b	20.0 ± 1.0	12.3 ± 0.5	66
11	15.9 ± 0.8	6.5 ± 0.4	50
12	>50	>25	76
TGZ	35.4 ± 1.3	15.7 ± 0.1	52

^a Concentration (μM) required to inhibit tumour cell proliferation by 50%.

^b Standard Error of the Mean.

^c Hormone-dependent breast cancer cell line.

^d Hormone-independent breast cancer cell line.

^e Anti-proliferative activity of these molecules on MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines have already been reported [21].

^f Percentage of surviving primary hepatocytes as compared to non-treated cells, after 90 min of incubation with compounds, at 100 μM.

treat breast cancer. Synthesis of new molecules aiming at reaching this goal is currently ongoing by our team.

5. Experimental protocols

Solvents and liquid reagents were purified and dried according to recommended procedures. Troglitazone used for anti-proliferative and hepatotoxicity assays was purchased from Sigma–Aldrich. TLC analyses were performed using standard procedures on Kieselgel 60 F254 plates (Merck). Compounds were visualised using UV light (254 nm) and a solution of cerium sulfate tetrahydrate and phosphomolybdic acid in 10% aqueous sulfuric acid as developing agent. Column chromatography was performed on Silica Gel SI 60 (63–200 μm) (Merck). Some chromatographic purifications were performed on Silica Gel 60H (5–40 μm) (Merck) using an Axxial[®] Modul Prep apparatus, working at 8 bars, with a 20 mm diameter column. FTIR spectra were recorded on a Perkin–Elmer spectrum 1000 apparatus on NaCl windows or KBr pellets. Melting points were determined with a Kofler bench and are uncorrected. ¹H and

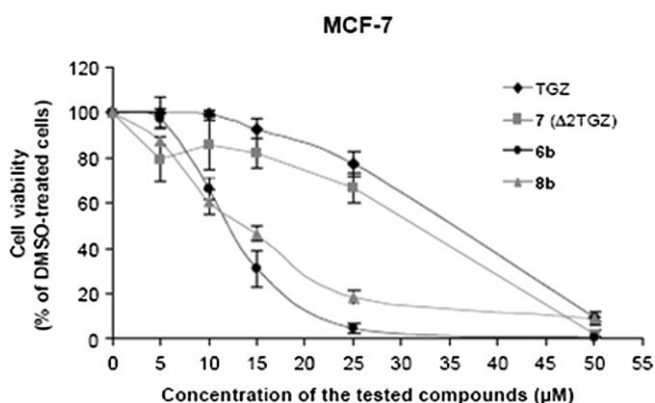


Fig. 1. Cytotoxicity of troglitazone (TGZ) and derived compounds 7 (Δ2TGZ), 6b and 8b in MCF-7 cells. Data are means ± SEM of triplicate determinations. IC₅₀ of 6b and 8b were significantly different from those measured for TGZ ($p < 0.05$) and Δ2TGZ ($p < 0.05$).

MDA-MB-231

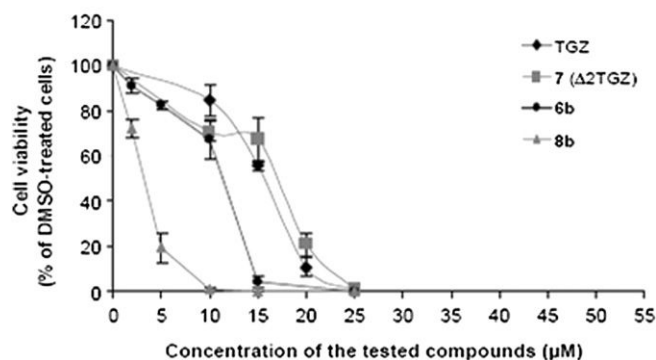


Fig. 2. Cytotoxicity of troglitazone (TGZ) and derived compounds 7 (Δ2TGZ), 6b and 8b in MDA-MB-231 cells. Data are means ± SEM of triplicate determinations. IC₅₀ of 6b and 8b were significantly different from those measured for TGZ ($p < 0.05$) and Δ2TGZ ($p < 0.05$).

¹³C NMR spectra were mainly recorded on a Bruker spectrometer DPX250 (250 MHz and 62.9 MHz, respectively). A few spectra were recorded on a Bruker spectrometer DRX400 (400 MHz for ¹H and 100.6 MHz for ¹³C). Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the solvent residual peak. The following abbreviations are used for multiplicity of NMR signals: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, br = broad signal. The *J* values given refer to apparent multiplicities and do not represent the true coupling constants. Mass spectra were obtained on a VG-Platform Micromass-Waters (ESI+/quad). Elemental analyses were performed on a Thermofinnigan FlashEA 1112 apparatus.

5.1. Synthesis

5.1.1. (±) 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid ethyl ester (2)

To a solution of (±) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid 1 (4.46 g, 18.82 mmol) in EtOH (175 mL) was added *p*-TSA (361 mg, 1.90 mmol), and the mixture was heated at reflux for 12 h. The solution was concentrated under vacuum, and the residue was dissolved in EtOAc (150 mL). The resulting solution

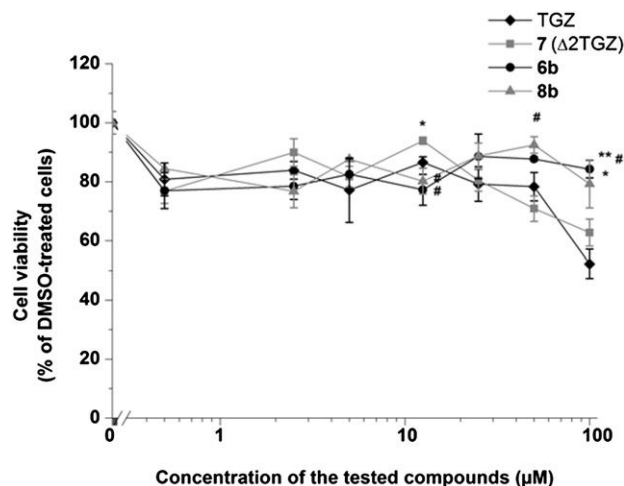


Fig. 3. Cytotoxicity of troglitazone (TGZ) and derived compounds 7 (Δ2TGZ), 6b and 8b in human hepatocytes. Data are means ± SEM of triplicate determinations. *Statistical significantly different from TGZ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). #Statistical significantly different from Δ2TGZ (# $p < 0.05$).

was washed with 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 × 50 mL) and brine (2 × 50 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and the solvent evaporated. The crude product was dried to give 4.98 g of white crystals (17.90 mmol, 95% yield). M.p. 124 °C. IR (film) cm⁻¹: 3532, 2985, 2927, 1731, 1185, 1107. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.60 (s, 3H, CH₃), 1.81–1.94 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.06 (s, 3H, ArCH₃), 2.16 (s, 3H, ArCH₃), 2.19 (s, 3H, ArCH₃), 2.38–2.69 (m, 3H, chromane 3-H_aH_b and 4-H₂), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.24 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 11.4 (ArCH₃), 11.9 (ArCH₃), 12.3 (ArCH₃), 14.2 (CH₃), 21.1 (CH₂), 25.5 (CH₃), 30.7 (CH₂), 61.1 (OCH₂), 77.0, 117.0, 118.5, 121.3, 122.7, 145.4, 145.8, 174.0 (C=O). ESI-MS (pos. mode): m/z = 205.42 [M - CO₂Et]⁺, 301.30 [M + Na]⁺, 317.27 [M + K]⁺. Anal. Calcd for C₁₆H₂₂O₄ (278.3): C, 69.04; H, 7.97. Found: C, 68.70; H, 8.08.

5.1.2. (±) 6-tert-Butoxycarbonyloxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid ethyl ester (**3a**)

To a solution of **2** (4.72 g, 16.96 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) were added di-tert-butylidicarbonate (4.08 g, 18.96 mmol) and 4,4-dimethylaminopyridine (207 mg, 1.69 mmol) under argon atmosphere. The solution was stirred at room temperature for 2 h and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in EtOAc (100 mL), washed with a 1:1 solution of brine and 1 N aqueous HCl (60 mL), and a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2 × 40 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and the solvent evaporated. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 90:10) to give the titled compound (6.39 g, 16.88 mmol, 99% yield) as colourless liquid. IR (film) cm⁻¹: 2981, 2934, 1754, 1731, 1279, 1238, 1157, 1105. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.54 (s, 9H, t-Bu), 1.59 (s, 3H, CH₃), 1.79–1.92 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 1.99 (s, 3H, ArCH₃), 2.08 (s, 3H, ArCH₃), 2.16 (s, 3H, ArCH₃), 2.36–2.69 (m, 3H, chromane 3-H_aH_b and 4-H₂), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 11.8 (ArCH₃ × 2), 12.7 (ArCH₃), 14.1 (CH₃), 20.8 (CH₂), 25.3 (CH₃), 27.7 (t-Bu), 30.2 (CH₂), 61.1 (OCH₂), 77.1, 82.7 (t-Bu), 117.1, 123.0, 125.1, 127.3, 141.6, 149.3, 152.2 (carbonate C=O), 173.6 (ester C=O). ESI-MS (pos. mode): m/z = 401.25 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₃₀O₆ (378.5): C, 66.65; H, 7.99. Found: C, 66.24; H, 7.76.

5.1.3. (±) 2,5,7,8-Tetramethyl-6-trifluoromethanesulfonyloxy-chroman-2-carboxylic acid ethyl ester (**3b**)

To a stirred solution of **2** (500 mg, 1.80 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) under argon was added pyridine (872 μL, 10.78 mmol) and the solution was cooled to 0 °C. Then, triflic anhydride (453 μL, 2.69 mmol) was added dropwise and the solution was stirred for 1 h at room temperature. The solution was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL) and washed with water (2 × 30 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. The liquid residue was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 85:15) to give 735 mg (1.79 mmol, 99% yield) of colourless liquid. IR (film) cm⁻¹: 2922, 1457, 1417, 1403, 1228, 1208, 1140, 1111, 1034, 878. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.66 (s, 3H, CH₃), 1.84–1.97 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.19 (s, 3H, ArCH₃), 2.22 (s, 3H, ArCH₃), 2.27 (s, 3H, ArCH₃), 2.44–2.74 (m, 3H, chromane 3-H_aH_b and 4-H₂), 4.17 (dq, J_a = 7.1 Hz, J_b = 1.0 Hz, 2H, COOCH₂CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 12.1, 13.3, 14.2 (2 peaks), 21.1, 25.4, 30.2, 61.4, 77.7, 118.4, 118.8 (q, J = 318 Hz, CF₃), 124.6, 126.8, 128.6, 140.5, 151.1, 173.2 (ester C=O). ESI-MS (pos. mode): m/z = 433.14 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₇H₂₁O₆F₃S (410.4): C, 49.75; H, 5.16. Found: C, 49.87; H, 5.39.

5.1.4. (±) 2,5,7,8-Tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid ethyl ester (**3c**)

In a Parr hydrogenator flask was first introduced 10% palladium on carbon (3.00 g), in order to avoid any ignition of the solvent. Please note that following reported procedure [32], Pd/C was

purchased from Fisher/ACROS (catalogue #19503-0500). A solution of 4.96 g (12.09 mmol) of **3b** in THF (40 mL) was added to the flask, followed by MeOH (80 mL), and TEA (7.4 mL, 53.22 mmol). The suspension was shaken under 70 psi hydrogen pressure for 20 h at room temperature, then filtered on celite® and the resulting solution was concentrated. Column chromatography (Hexane/EtOAc, 90:10) afforded 3.03 g (11.55 mmol, 96% yield) of colourless liquid which upon storage at 4 °C gave low melting point (# 30 °C) white crystals. IR (film) cm⁻¹: 2981, 2935, 1753, 1732, 1462, 1312, 1202, 1178, 1137, 1108, 1023. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.62 (s, 3H, CH₃), 1.82–1.95 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.13 (s, 3H, ArCH₃), 2.16 (s, 3H, ArCH₃), 2.21 (s, 3H, ArCH₃), 2.38–2.69 (m, 3H, chromane 3-H_aH_b and 4-H₂), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 6.58 (s, 1H, H_{arom}). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 11.5, 14.2, 18.8, 19.8, 20.5, 25.4, 30.4, 61.2, 77.4, 116.6, 122.0, 123.4, 133.2, 134.9, 151.6, 173.8 (ester C=O). ESI-MS (pos. mode): m/z = 285.21 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₆H₂₂O₃ (262.4): C, 73.25; H, 8.45. Found: C, 73.63; H, 8.20.

5.1.5. (±) Carbonic acid tert-butyl ester 2-hydroxymethyl-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**4a**)

To a suspension of LiAlH₄ (558 mg, 14.70 mmol) in anhydrous THF (15 mL) at 0 °C, was slowly added under argon, a solution of **3a** (6.34 g, 16.75 mmol) in anhydrous THF (40 mL). The suspension was stirred for 1 h (not more, to avoid reduction of the carbonate protecting group) at 0 °C, then, allowed to reach room temperature. The mixture was poured into a saturated aqueous solution of NH₄Cl (60 mL) and extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined organic layers were washed with water (1 × 60 mL), brine (1 × 60 mL), dried (MgSO₄) and the solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 80:20) to give a colourless gum which was dissolved in hexane. Evaporation of the solvent afforded the titled compound (5.14 g, 15.28 mmol, 91% yield) as a white solid. M.p. 78–80 °C. IR (film) cm⁻¹: 3486, 2980, 2932, 1754, 1281, 1236, 1156, 1097. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.22 (s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 9H, t-Bu), 1.64–1.77 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 1.87–2.02 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.05 (s, 3H, ArCH₃), 2.09 (br s, 6H, 2 × ArCH₃), 2.65 (m, 2H, chromane 4-H₂), 3.62 (m, 2H, CH₂OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 12.0 (2 × ArCH₃), 12.8 (ArCH₃), 20.2 (CH₂), 20.6 (CH₃), 27.5 (CH₂), 27.8 (t-Bu), 69.4 (OCH₂), 75.6, 82.9 (t-Bu), 117.4, 123.0, 125.5, 127.4, 141.3, 148.8, 152.3 (C=O). ESI-MS (pos. mode): m/z = 359.28 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₂₈O₅ (336.4): C, 67.83; H, 8.39. Found: C, 67.97; H, 8.19.

5.1.6. (±) (2,5,7,8-Tetramethyl-chroman-2-yl)methanol (**4b**)

To a suspension of LiAlH₄ (85 mg, 2.24 mmol) in anhydrous THF (5 mL) at 0 °C, was added dropwise under argon, a solution of **3c** (623 mg, 2.37 mmol) in anhydrous THF (10 mL). The suspension was stirred for 1 h at 0 °C, then LiAlH₄ (81 mg, 2.13 mmol) was anew added to the mixture. After 30 min the mixture was poured into a saturated aqueous solution of NH₄Cl (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 × 10 mL), dried (MgSO₄) and the solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 90:10) to give the titled compound (490 mg, 2.22 mmol, 94% yield) as a white solid. M.p. 81–82 °C. IR (film) cm⁻¹: 3367, 2931, 1458, 1310, 1106, 1049. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.24 (s, 3H, CH₃), 1.68–1.78 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 1.89 (t, J = 7.5 Hz, 1H, OH), 1.95–2.05 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.08 (s, 3H, ArCH₃), 2.17 (s, 3H, ArCH₃), 2.21 (s, 3H, ArCH₃), 2.62–2.68 (m, 2H, chromane 4-H₂), 3.63 (m, 2H, CH₂OH), 6.89 (s, 1H, H_{arom}). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 11.5, 18.9, 19.7, 19.9, 20.7, 27.7, 69.6, 75.8, 116.9, 122.1, 123.0, 133.7, 135.0, 151.1. ESI-MS (pos. mode): m/z = 243.06 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₁₄H₂₀O₂ (220.3): C, 76.33; H, 9.15. Found: C, 76.52; H, 9.03.

5.1.7. (\pm) Carbonic acid tert-butyl ester 2-(4-formylphenoxy)methyl)-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**5a**)

Preparation of the triflate intermediate: to an ice-cooled solution of anhydrous pyridine (2.8 mL, 34.50 mmol) in dry CH_2Cl_2 (20 mL), was added dropwise trifluoromethanesulfonic anhydride (1.39 mL, 8.26 mmol) under argon. A solution of **4a** (1.95 g, 5.80 mmol) in dry CH_2Cl_2 (20 mL) was added to the reaction mixture. The solution was stirred at 0 °C for 30 min and the solvent was evaporated. The excess of pyridine was co-evaporated with toluene and the residue so obtained was diluted in EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with 5% aqueous NaHCO_3 solution (2 \times 30 mL), brine (2 \times 30 mL), dried (MgSO_4) and the solvent was removed under vacuum to give a brown liquid residue.

Substitution with 4-hydroxybenzaldehyde: to a solution of the above triflate in anhydrous DMF (12 mL) were added 4-hydroxybenzaldehyde (709 mg, 5.81 mmol) and K_2CO_3 (1.61 g, 11.65 mmol). The reaction mixture was stirred under argon at room temperature for two days, and then water (30 mL) was added. The resulting solution was extracted with EtOAc (30 mL). The organic layer was washed with water (30 mL) dried (MgSO_4) and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 90:10) to give a colourless syrup which was dissolved in diethyl ether and concentrated under vacuum to give the titled compound as a white solid (2.20 g, 4.99 mmol, 86% yield over two steps). M.p. 124–125 °C. IR (film) cm^{-1} : 2980, 2934, 1752, 1693, 1601, 1278, 1237, 1157, 1096. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.43 (s, 3H, CH_3), 1.55 (s, 9H, *t*-Bu), 1.80–1.95 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.04 (s, 3H, ArCH_3), 2.06 (s, 3H, ArCH_3), 2.08 (s, 3H, ArCH_3), 2.11–2.19 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.64 (m, 2H, chromane 4- H_2), 3.97, 4.08 (AB system, $J = 9.3$ Hz, 2H, CH_2O), 7.03 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{arom}), 9.89 (s, 1H, CHO). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11.9 (ArCH_3), 12.0 (ArCH_3), 12.8 (ArCH_3), 20.2 (CH_2), 22.8 (CH_3), 27.8 (*t*-Bu), 28.3 (CH_2), 72.8, 74.4, 82.9 (*t*-Bu), 115.1 (CH_{arom}), 117.2, 123.2, 125.5, 127.5, 130.2, 132.0 (CH_{arom}), 141.4, 148.8, 152.3 (carbonate C=O), 164.1, 190.9 (CHO). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 463.22$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 441.22 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (440.5): C, 70.89; H, 7.32. Found: C, 70.77; H, 7.29.

5.1.8. (\pm) 4-(2,5,7,8-Tetramethyl-chroman-2-ylmethoxy)-benzaldehyde (**5b**)

Preparation of the triflate intermediate: to an ice-cooled solution of anhydrous pyridine (930 μL , 11.50 mmol) in dry CH_2Cl_2 (10 mL), was added dropwise trifluoromethanesulfonic anhydride (480 μL , 2.85 mmol) under argon. A solution of **4b** (422 mg, 1.92 mmol) in dry CH_2Cl_2 (10 mL) was added to the reaction mixture. The solution was stirred at 0 °C for 20 min and the solvent was evaporated. The excess of pyridine was co-evaporated with toluene and the residue so obtained was dissolved in EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with 5% aqueous NaHCO_3 solution (2 \times 10 mL), brine (1 \times 10 mL), dried (MgSO_4) and the solvent was removed under vacuum to give a brown oily residue.

Substitution with 4-hydroxybenzaldehyde: to a solution of the above triflate in anhydrous DMF (5 mL) were added 4-hydroxybenzaldehyde (236 mg, 1.93 mmol) and K_2CO_3 (528 mg, 3.82 mmol). The reaction mixture was stirred under argon at room temperature for two days, then water (10 mL) was added. The resulting solution was extracted with EtOAc (2 \times 30 mL). The organic layer was dried (MgSO_4) and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 90:10) to give the titled compound as a colourless syrup (521 mg, 1.61 mmol, 84% yield over two steps). IR (film) cm^{-1} : 2933, 1693, 1600, 1577, 1310, 1246, 1157. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.45 (s, 3H, CH_3), 1.86–1.97 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.05 (s, 3H, ArCH_3), 2.08–2.17 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.17 (s, 3H, ArCH_3), 2.20 (s, 3H, ArCH_3), 2.63 (m, 2H, chromane 4- H_2), 4.00, 4.09 (AB system,

$J = 9.3$ Hz, 2H, CH_2O), 6.59 (s, 1H, H_{arom}), 7.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_{arom}), 9.89 (s, 1H, CHO). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11.5, 18.9, 19.8, 19.9, 22.9, 28.5, 73.1, 74.6, 115.2, 116.7, 122.2, 123.0, 130.3, 132.1, 133.6, 135.2, 151.1, 164.2, 190.9 (CHO). ESI-MS: $m/z = 347.14$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_3$ (324.4): C, 77.75; H, 7.46. Found: C, 77.05; H, 6.98.

5.1.9. (\pm) Carbonic acid tert-butyl ester 2-{4-[2,4-dioxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]phenoxy)methyl}-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**6a**)

To a solution of **5a** (2.20 g, 4.99 mmol) in absolute EtOH (50 mL, which may be replaced by dry toluene), was added thiazolidine-2,4-dione (1.17 g, 9.99 mmol) and piperidine (247 μL , 2.50 mmol). The mixture was heated at reflux under argon for 12 h. The solution was concentrated under vacuum, and the residue was dissolved in EtOAc (100 mL). The resulting solution was washed with 5% aqueous NaHCO_3 solution (2 \times 50 mL) and water (2 \times 50 mL). The organic layer was dried (MgSO_4) and the solvent evaporated to give a yellow solid. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 80:20) to give the titled compound (2.37 g, 4.39 mmol, 88% yield) as a white solid. M.p. 195–196 °C. IR (film) cm^{-1} : 3189, 2981, 2933, 1747, 1705, 1595, 1510, 1245, 1154. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.41 (s, 3H, CH_3), 1.56 (s, 9H, *t*-Bu), 1.81–1.93 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.04 (s, 3H, ArCH_3), 2.05 (s, 3H, ArCH_3), 2.07 (s, 3H, ArCH_3), 2.08–2.16 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.64 (br t, $J = 6.7$ Hz, 2H, chromane 4- H_2), 3.94, 4.01 (AB system, $J = 9.3$ Hz, 2H, CH_2O), 6.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.80 (s, 1H, $\text{ArCH}=\text{C}$). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11.9 (ArCH_3), 12.0 (ArCH_3), 12.8 (ArCH_3), 20.2 (CH_2), 22.7 (CH_3), 27.8 (*t*-Bu), 28.4 (CH_2), 73.0, 74.5, 83.1 (*t*-Bu), 115.6 (CH_{arom}), 117.3, 119.6, 123.3, 125.6, 125.9, 127.7, 132.4 (CH_{arom}), 134.2 (=CH), 141.4, 148.8, 152.6 (carbonate C=O), 161.1, 167.0 (C=O), 167.5 (C=O). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 562.08$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{NO}_7\text{S}$ (539.6): C, 64.54; H, 6.16; N, 2.60. Found: C, 64.38; H, 6.20; N, 2.65.

5.1.10. (\pm) 5-[1-[4-(2,5,7,8-Tetramethyl-chroman-2-ylmethoxy)-phenyl]-meth-(Z)-ylidene]-thiazolidine-2,4-dione (**6b**)

To a solution of **5b** (437 mg, 1.35 mmol) in absolute EtOH (13 mL), were added thiazolidine-2,4-dione (317 mg, 2.71 mmol) and piperidine (67 μL , 0.68 mmol). The mixture was heated at reflux under argon for 24 h. The solution was concentrated under vacuum, and the residue was dissolved in EtOAc (40 mL). The resulting solution was washed with 5% aqueous NaHCO_3 solution (2 \times 10 mL) and brine (2 \times 10 mL). The organic layer was dried (MgSO_4) and the solvent evaporated. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 80:20) to give the titled compound (308 mg, 0.73 mmol, 54% yield) as a yellow amorphous solid. M.p. 129–134 °C. IR (film) cm^{-1} : 3190, 3050, 2934, 1740, 1690, 1595, 1511, 1249, 1178, 1111, 1042, 827, 738. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.44 (s, 3H, CH_3), 1.85–1.96 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.05 (s, 3H, ArCH_3), 2.08–2.16 (m, 1H, chromane 3- H_aH_b), 2.16 (s, 3H, ArCH_3), 2.20 (s, 3H, ArCH_3), 2.63 (br t, $J = 6.2$ Hz, 2H, chromane 4- H_2), 3.98, 4.07 (AB system, $J = 9.3$ Hz, 2H, 2- CH_2O), 6.59 (s, 1H, H_{arom}), 7.02 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.44 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.81 (s, 1H, $\text{ArCH}=\text{C}$), 8.28 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11.5, 18.9, 19.8, 19.9, 22.9, 28.5, 73.0, 74.6, 115.7, 116.8, 119.4, 122.2, 123.0, 125.9, 132.4, 133.6, 134.5, 135.2, 151.1, 161.3, 166.5 (C=O), 167.2 (C=O). ESI-MS (pos. mode): $m/z = 446.17$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{S}$ (423.5): C, 68.06; H, 5.95; N, 3.31. Found: C, 67.82; H, 5.95; N, 3.34.

5.1.11. (\pm) 5-[1-[4-(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-ylmethoxy)phenyl]meth-(Z)-ylidene]thiazolidine-2,4-dione (**7**)

To a solution of **6a** (601 mg, 1.11 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL), was added trifluoroacetic acid (5 mL). The mixture was stirred for 1 h

and the solvent was evaporated. The crude product was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 × 50 mL) and water (2 × 50 mL). The organic layer was dried (MgSO₄) and the solvent evaporated. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 80:20) and then recrystallised in MeOH to give the titled compound (422 mg, 0.95 mmol, 86% yield) as a yellow solid. M.p. 130–132 °C. IR (film) cm⁻¹: 3321, 3181, 2927, 1738, 1690, 1594, 1510, 1253, 1178. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.85–1.96 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.05–2.20 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.08 (s, 3H, ArCH₃), 2.11 (s, 3H, ArCH₃), 2.16 (s, 3H, ArCH₃), 2.65 (br t, *J* = 6.5 Hz, 2H, chromane 4-H₂), 3.96, 4.05 (AB system, *J* = 9.3 Hz, 2H, CH₂O), 4.31 (br s, 1H, OH), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.44 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.81 (s, 1H, ArCH=), 8.75 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 11.5 (ArCH₃), 12.0 (ArCH₃), 12.4 (ArCH₃), 20.4 (CH₂), 22.7 (CH₃), 28.8 (CH₂), 72.9, 74.1, 115.7 (CH_{arom}), 117.3, 118.7, 119.3, 121.5, 122.9, 125.8, 132.4 (CH_{arom}), 134.5 (=CH), 145.0, 145.2, 161.3, 166.8 (C=O), 167.4 (C=O). ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 440.15 [M + H]⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₅NO₅·1/4H₂O (444.0): C, 64.92; H, 5.79; N, 3.16. Found: C, 64.84; H, 5.62; N, 3.35.

5.1.12. (±) 5-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-pentanoic acid 2-{4-[2,4-dioxo-thiazolidin-(5*Z*)-ylidenemethyl]-phenoxy-methyl}-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**8a**)

To a solution of D(+)-biotin (46 mg, 0.19 mmol) in DMF (4 mL) under an argon atmosphere were added CH₂Cl₂ (2 mL) and triethylamine (26 μL, 0.19 mmol). The solution was cooled to 0 °C and isobutyl chloroformate (24 μL, 0.19 mmol) was added. The mixture was stirred 45 min at this temperature, then **7** (76 mg, 0.17 mmol) and DMAP (2 mg, 0.017 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (6 mL) were added. The solution was stirred at room temperature for 12 h. The CH₂Cl₂ was evaporated and the liquid residue was diluted with EtOAc (30 mL). The solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 × 20 mL), 5% aqueous citric acid solution (2 × 20 mL), water (2 × 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. Column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) using Axxial® Modul Prep apparatus (see above) afforded a colourless residue which was suspended in a 1:1 mixture of water and CH₃CN (5 mL) and freeze dried to give 40 mg (0.06 mmol, 35% yield) of white powder. M.p. 196 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 3422, 2928, 1736, 1702, 1598, 1509, 1250, 1160. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 1.28 (s, 3H, CH₃), 1.35–1.70 (m, 6H, biotin CH₂), 1.75–2.00 (m, 2H, chromane 3-CH₂), 1.86 (s, 6H, ArCH₃), 1.91 (s, 3H, ArCH₃), 2.50–2.65 (m, 5H, CH₂CO + chromane 4-CH₂ + CH_aH_bS), 2.78 (A part of an ABX system, *J* = 5.1, 12.4 Hz, 1H, CH_aH_bS), 3.07 (m, 1H, CHS), 4.08 (m, 3H, OCH₂ + CHNH), 4.26 (m, 1H, CHNH), 6.32 (s, 1H, NH), 6.41 (s, 1H, NH), 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.48 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.69 (s, 1H, ArCH=), 12.45 (br s, 1H, thiazolidinedione NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 11.7 (ArCH₃), 12.0 (ArCH₃), 12.8 (ArCH₃), 19.4 (CH₂), 21.5 (CH₃), 24.6 (biotin CH₂), 27.6 (CH₂), 28.1 (biotin CH₂), 28.2 (biotin CH₂), 33.0 (CH₂), 40.2 (CH₂S), 55.4 (CHS), 59.2 (CHNH), 61.1 (CHNH), 72.6 (OCH₂), 74.5 (OCCH₃), 115.7 (CH_{arom}), 117.4, 120.4, 122.0, 125.0, 125.7, 126.5, 131.8 (=CH), 132.0 (CH_{arom}), 140.6, 148.2, 160.5, 162.7, 167.5, 168.0, 171.6. ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 666.21 [M + H]⁺, 688.19 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₃₄H₃₉N₃O₇S₂·1/2H₂O (674.8): C, 60.51; H, 5.97; N, 6.23. Found: C, 60.75; H, 6.21; N, 6.21.

5.1.13. (±) 8-*tert*-Butoxycarbonylamino-octanoic acid 2-{4-[2,4-dioxo-thiazolidin-(5*Z*)-ylidenemethyl]-phenoxy-methyl}-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**8b**)

To an argon-flushed solution of 8-(*tert*-butoxycarbonylamino) caprylic acid (532 mg, 2.05 mmol, prepared as previously reported [40]) in CH₂Cl₂ (40 mL) was added TEA (286 μL, 2.05 mmol) and the mixture was cooled with an ice bath. Then, isobutyl chloroformate

(266 μL, 2.05 mmol) was added, the solution was stirred for 1 h at the same temperature, and a solution of **7** (751 mg, 1.71 mmol) and DMAP (25 mg, 0.21 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature, then washed with 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 × 40 mL), 5% aqueous citric acid solution (2 × 40 mL), brine (2 × 40 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. Column chromatography (CH₂Cl₂/EtOAc, 95:5) using Axxial® Modul Prep apparatus (see above) afforded 873 mg (1.28 mmol, 75% yield) of light yellow amorphous low melting point solid. IR (film) cm⁻¹: 3375, 3181, 2932, 1747, 1705, 1597, 1511, 1250, 1178. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.45 (s, 9H, *t*-Bu), 1.32–1.55 (m, 8H, caprylic CH₂ × 4), 1.80 (m, 2H, caprylic CH₂), 1.92 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 1.97 (s, 3H, ArCH₃), 2.01 (s, 3H, ArCH₃), 2.05 (s, 3H, ArCH₃), 2.10 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.62 (m, 4H, chromane 4-CH₂ + caprylic CH₂), 3.12 (br q, *J* = 6.4 Hz, 2H, caprylic CH₂), 3.99 (m, 2H, CH₂O), 4.53 (br s, 1H, carbamate NH), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.43 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.79 (s, 1H, ArCH=), 8.87 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 12.0, 12.3, 13.1, 20.3, 22.8, 25.2, 26.8, 28.5, 28.6, 29.1, 29.4, 30.2, 34.2, 40.8, 73.1, 74.5, 77.4, 79.3, 115.7, 117.4, 119.7, 123.3, 125.3, 126.0, 127.4, 132.3, 134.1, 141.2, 148.8, 156.2, 161.1, 166.8, 167.3, 172.6. ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 703.27 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₃₇H₄₈N₂O₈S (680.8): C, 65.27; H, 7.11; N, 4.12. Found: C, 64.99; H, 6.89; N, 4.14.

5.1.14. (±) 8-Amino-octanoic acid 2-{4-[2,4-dioxo-thiazolidin-(5*Z*)-ylidenemethyl]-phenoxy-methyl}-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**8c**)

To a solution of **8b** (306 mg, 0.45 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL) was added trifluoroacetic acid (5 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 45 min. The solution was concentrated to dryness. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and Et₂O (10 mL) was added to the solution. The suspension was concentrated to dryness and carefully dried to give 290 mg (0.42 mmol, 94% yield) of light yellow solid. M.p. 114 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 3423, 2930, 1745, 1686, 1598, 1252, 1204, 1179, 1147. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.33 (br s, 9H, CH₃ + caprylic CH₂ × 3), 1.52 (m, 2H, caprylic CH₂), 1.66 (m, 2H, caprylic CH₂), 1.85 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 1.91 (s, 6H, 2 × ArCH₃), 1.96 (s, 3H, ArCH₃), 2.03 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.63 (m, 4H, chromane 4-CH₂ + caprylic CH₂), 2.78 (m, 2H, caprylic CH₂), 4.12 (s, 2H, OCH₂), 7.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.68 (br s, 3H, NH₃⁺), 7.75 (s, 1H, ArCH=), 12.54 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 11.6, 11.9, 12.7, 19.4, 21.5, 24.4, 25.7, 27.0, 27.6, 28.2, 28.3, 30.7, 33.1, 72.6, 74.5, 115.7, 117.4, 120.4, 122.0, 125.0, 125.7, 126.5, 131.8, 132.0, 140.6, 148.2, 160.5, 167.4, 167.9, 171.6. ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 581.28 [M]⁺. Anal. Calcd for C₃₄H₄₁N₂O₈SF₃·1/2H₂O (703.8): C, 58.02; H, 6.02; N, 3.98. Found: C, 57.79; H, 5.91; N, 3.91.

5.1.15. (±) 8-[5-((3*a*R,6*R*,6*a*S)-2-Oxo-hexahydro-thieno[2,3-*d*]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-octanoic acid 2-{4-[2,4-dioxo-thiazolidin-(5*Z*)-ylidenemethyl]-phenoxy-methyl}-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**8d**)

To an argon-flushed solution of biotin (35 mg, 0.14 mmol) in dry DMF (4 mL) were added dry CH₂Cl₂ (1 mL) and TEA (50 μL, 0.36 mmol). The solution was cooled in an ice bath, isobutyl chloroformate (19 μL, 0.14 mmol) was added, and the solution was stirred for 45 min. Then a solution of **8c** (100 mg, 0.14 mmol) in DMF (2 mL) was added and the mixture was stirred for 12 h. The solution was diluted with EtOAc (50 mL) and washed with 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 × 30 mL), 5% aqueous citric acid solution (2 × 30 mL), brine (2 × 30 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. Column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3 to 90:10) using Axxial® Modul Prep apparatus (see above) afforded 72 mg (0.089 mmol, 64% yield) of white powder. M.p. 147 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 3422, 2927, 1741, 1699, 1597, 1510, 1250, 1151. ¹H NMR (DMSO-*d*₆,

400 MHz) δ : 1.12–1.42 (m, 15H, CH₃ + 6 \times CH₂), 1.50 (m, 2H, CH₂), 1.65 (m, 2H, CH₂), 1.80–2.02 (m, 2H, chromane 3-CH₂), 1.91 (s, 6H, 2 \times ArCH₃), 1.96 (s, 3H, ArCH₃), 2.04 (m, 2H, caprylic CH₂), 2.40–2.70 (m, 5H, chromane 4-CH₂ + CH₂CONH + CH₃H_bS), 2.80 (dd, J = 4.7, 12.8 Hz, 1H, CH₃H_bS), 3.01 (m, 2H, caprylic CH₂), 3.08 (m, 1H, CHS), 4.11 (m, 3H, OCH₂ + CHNH), 4.29 (m, 1H, CHNH), 6.36 (s, 1H, NH), 6.43 (s, 1H, NH), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_{arom}), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_{arom}), 7.74 (m, 2H, ArCH= + CONH), 12.50 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 12.5 (CH₃), 12.8 (CH₃), 13.6 (CH₃), 20.3 (CH₂), 22.4 (CH₃), 25.3 (CH₂), 26.2 (CH₂), 27.1 (CH₂), 28.5 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 30.0 (CH₂), 34.0 (CH₂), 36.1 (CH₂), 39.2 (CH₂), 55.8 (CH₂), 56.3 (CH), 60.0 (CH), 61.9 (CH), 73.5, 75.4, 116.5 (CH_{arom}), 118.2, 121.6, 122.8, 125.8, 126.7, 127.4, 132.2 (ArCH=), 132.8 (CH_{arom}), 141.4, 149.0, 161.2, 163.6, 168.7, 169.0, 172.5, 172.6. ESI-MS (pos. mode): m/z = 829.33 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₄₂H₅₄N₄O₈S₂, 1/2H₂O (816.0): C, 61.81; H, 6.79; N, 6.87. Found: C, 61.72; H, 6.80; N, 6.68.

5.1.16. (\pm) Succinic acid mono-(2-{4-[2,4-dioxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]-phenoxyethyl]-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl} ester (**8e**)

To a solution of **7** (82 mg, 0.18 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) were added succinic anhydride (37 mg, 0.37 mmol) and DMAP (2 mg, 0.018 mmol), and the mixture was refluxed for 12 h. Succinic anhydride (18 mg, 0.18 mmol) was anew added and the mixture was refluxed for another 12 h. The solvent was evaporated, the residue was dissolved in EtOAc (20 mL) and the solution was washed with 5% aqueous citric acid solution (3 \times 10 mL), water (3 \times 10 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. Column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 then 96:4) using Axxial[®] Modul Prep apparatus (see above) afforded a residue which was suspended in a 1:1 mixture of water and CH₃CN (5 mL) to give after freeze drying 43 mg (0.08 mmol, 43% yield) of light yellow powder. M.p. 131–136 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 3433, 2926, 1736, 1686, 1598, 1510, 1253, 1151. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 1.34 (s, 3H, CH₃), 1.92 (s, 6H, ArCH₃ \times 2), 1.96 (s, 3H, ArCH₃), 1.78–2.11 (m, 2H, chromane 3-CH₂), 2.61 (m, 4H, CH₂), 2.83 (m, 2H, CH₂), 4.12 (s, 2H, OCH₂), 7.15 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.54 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.73 (s, 1H, ArCH=), 12.29 (s, 1H, NH), 12.47 (br s, 1H, COOH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 11.6, 11.8, 12.6, 19.4, 21.5, 27.6, 28.4, 28.7, 72.6, 74.5, 115.7, 117.3, 120.6, 121.9, 125.1, 125.7, 126.7, 131.6, 132.0, 140.6, 148.1, 160.4, 167.6, 168.0, 170.9, 173.3. ESI-MS (pos. mode): m/z = 562.20 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₈H₂₉NO₈S, 1/2H₂O (548.6): C, 61.30; H, 5.51; N, 2.55. Found: C, 60.98; H, 5.40; N, 2.58.

5.1.17. (\pm) *N*-(2-Acetylamino-ethyl)-succinamic acid 2-{4-[2,4-dioxo-thiazolidin-(5Z)-ylidenemethyl]-phenoxyethyl]-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl} ester (**8f**)

To an argon-flushed solution of **8e** (101 mg, 0.18 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) was added TEA (28 μ L, 0.20 mmol). The solution was cooled with an ice bath, then isobutyl chloroformate (26 μ L, 0.20 mmol) was added. The mixture was stirred at this temperature for 45 min, then it was added to a solution of *N*-acetylenediamine (23 mg, 0.20 mmol) in MeOH (10 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 12 h. The solvents were evaporated. Column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 then 96:4) using Axxial[®] Modul Prep apparatus (see above) afforded a residue which was suspended in a 1:1 mixture of water and CH₃CN (5 mL) to give after freeze drying 34 mg (0.054 mmol, 29% yield) of white powder. M.p. 150–154 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 3432, 2930, 1743, 1698, 1648, 1598, 1511, 1251, 1153. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 1.33 (s, 3H, CH₃), 1.78 (s, 3H, CH₃CO), 1.87 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 1.91 (s, 6H, 2 \times ArCH₃), 1.96 (s, 3H, ArCH₃), 2.01 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.46 (t, J = 6.7 Hz, 2H, succinic CH₂), 2.63 (br t, 2H, chromane 4-CH₂), 2.82 (t, J = 6.7 Hz, 2H, succinic CH₂), 3.07 (m, 4H, ethylenediamine CH₂),

4.12 (s, 2H, OCH₂), 7.15 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.54 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.82 (br t, 1H, NH), 7.94 (br t, 1H, NH), 12.49 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ : 11.6, 11.9, 12.7, 19.4, 21.5, 22.6, 27.6, 28.7, 29.8, 38.3, 38.4, 72.6, 74.5, 115.7, 117.3, 120.7, 121.8, 125.1, 125.7, 126.7, 131.6, 132.0, 140.6, 148.1, 160.4, 167.7, 168.1, 169.3, 170.7, 171.1. ESI-MS (pos. mode): m/z = 646.39 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₃₂H₃₇N₃O₈S, 1/2H₂O (632.7): C, 60.74; H, 6.05; N, 6.64. Found: C, 60.83; H, 5.92; N, 6.50.

5.1.18. (\pm) Carbonic acid tert-butyl ester 2-[4-(2,4-dioxo-thiazolidin-5-ylmethyl)-phenoxyethyl]-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**9a**)

In a Parr hydrogenator flask was first introduced 10% palladium on carbon (400 mg), in order to avoid any ignition of the solvent. A solution of **6a** (500 mg, 0.93 mmol) in dioxane (40 mL) was then added and the suspension was shaken under 70 psi hydrogen pressure for 20 h at room temperature, then filtered on celite[®] and the resulting solution was concentrated. Thorough drying of the residue afforded 499 mg (0.92 mmol, 99% yield) of amorphous solid. M.p. 143 °C. IR (film) cm⁻¹: 3218, 2928, 1755, 1704, 1514, 1239, 1156. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 9H, *t*-Bu), 1.89 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.04 (s, 3H, ArCH₃), 2.07 (s, 6H, 2 \times ArCH₃), 2.14 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.63 (t, J = 6.3 Hz, 2H, chromane 4-CH₂), 3.09 (dd, A part of an ABX system, J = 9.5, 14.1 Hz, 1H, PhCH₂), 3.45 (dd, B part of an ABX system, J = 3.8, 14.1 Hz, 1H, PhCH₂), 3.86, 3.97 (AB system, J = 9.2 Hz, 2H, CH₂O), 4.48 (dd, X part of an ABX system, J = 3.8 Hz, 9.5 Hz, 1H, CH), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.26 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 11.9, 12.0, 12.8, 20.3, 23.0, 27.9, 28.5, 37.9, 53.8, 72.8, 74.7, 82.9, 115.2, 117.5, 123.2, 125.5, 127.5, 128.0, 130.4, 141.4, 149.0, 152.5, 158.7, 170.1, 173.9. ESI-MS (pos. mode): m/z = 564.29 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₉H₃₅NO₇S (541.6): C, 64.30; H, 6.51; N, 2.59. Found: C, 64.49; H, 6.96; N, 2.44.

5.1.19. (\pm) 5-[4-(2,5,7,8-Tetramethyl-chroman-2-ylmethoxy)-benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (**9b**)

In a Parr hydrogenator flask was first introduced 10% palladium on carbon (102 mg), in order to avoid any ignition of the solvent. A solution of **6b** (98 mg, 0.23 mmol) in dioxane (20 mL) was then added and the suspension was shaken under 70 psi hydrogen pressure for 20 h at room temperature, then filtered on celite[®] and the resulting solution was concentrated. The crude product was purified by column chromatography (Hexane/EtOAc, 80:20) to give a colourless syrup which was dissolved in diethyl ether and concentrated under vacuum to give 67 mg of white solid (0.16 mmol, 70% yield). Low melting point solid. IR (film) cm⁻¹: 3212, 2924, 1755, 1699, 1512, 1310, 1243, 1159. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.88 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.06 (s, 3H, ArCH₃), 2.13 (m, 1H, chromane 3-H_aH_b), 2.16 (s, 3H, ArCH₃), 2.20 (s, 3H, ArCH₃), 2.62 (br t, J = 7.0 Hz, 2H, chromane 4-H₂), 3.11 (dd, A part of an ABX system, J = 9.3, 14.1 Hz, 1H, PhCH₂), 3.45 (dd, B part of an ABX system, J = 3.8, 14.1 Hz, 2H, PhCH₂), 3.88, 3.98 (AB system, J = 9.1 Hz, 2H, CH₂O), 4.50 (dd, X part of an ABX system, J = 3.8, 9.3 Hz, 1H, CH), 6.57 (s, 1H, H_{arom}), 6.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.13 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.74 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 11.5, 18.9, 19.8, 19.9, 23.1, 28.5, 37.9, 53.8, 72.8, 74.7, 115.2, 116.9, 122.2, 122.9, 127.9, 130.4, 133.6, 135.0, 151.2, 158.8, 170.0, 173.7. ESI-MS (pos. mode): m/z = 448.22 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₄H₂₇NO₄S (425.5): C, 67.74; H, 6.40; N, 3.29. Found: C, 67.53; H, 6.28; N, 3.37.

5.1.20. (\pm) 5-((3*a*,4*S*,6*aR*)-2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-pentanoic acid 2-[4-(2,4-dioxo-thiazolidin-5-ylmethyl)-phenoxyethyl]-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl ester (**11**)

Synthesis of troglitazone **10**: A suspension of **9a** (100 mg, 0.18 mmol) in CH₃CN (10 mL) and 3 M HCl (5 mL) was refluxed for

45 min. The mixture of solvents was evaporated, the residue was dissolved in EtOAc (20 mL) and the solution was washed with water (3 × 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness to give a colourless residue.

Coupling with biotin: To a solution of D(+)-biotin (50 mg, 0.20 mmol) in DMF (4 mL) were added CH₂Cl₂ (2 mL) and TEA (28 μL, 0.20 mmol). The solution was cooled with an ice bath, isobutyl chloroformate (26 μL, 0.20 mmol) was added under an argon atmosphere, then the mixture was stirred for 45 min, and a solution of **10** and DMAP (2 mg, 0.02 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) was added. Stirring was continued at room temperature for 12 h, and CH₂Cl₂ was evaporated. The residue was diluted with EtOAc (30 mL) and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ solution (2 × 20 mL), 5% aqueous citric acid solution (2 × 20 mL), water (2 × 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. Column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) using Axxial® Modul Prep apparatus (see above) afforded a residue which was suspended in a 1:1 mixture of water and CH₃CN (5 mL) to give after freeze drying 43 mg (0.064 mmol, 35% yield) of white powder. M.p. 133 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 3423, 2926, 1752, 1702, 1511, 1459, 1244, 1160. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.32 (s, 3H, CH₃), 1.46 (m, 2H, biotin CH₂), 1.70 (m, 2H, biotin CH₂), 1.86 (m, 1H, chromane 3-*H_a*H_b), 1.91 (s, 6H, 2 × ArCH₃), 1.98 (s, 6H, ArCH₃), 2.03 (m, 1H, 3-*H_a*H_b), 2.62 (m, 5H, CH₂CO + chromane 4-CH₂ + CH₃H_bS), 2.84 (A part of an ABX system, *J* = 5.0, 12.4 Hz, 1H, CH₂H_bS), 3.06 (dd, A part of an ABX system, *J* = 8.9, 14.3 Hz, 1H, PhCH₂), 3.13 (m, 1H, biotin CHS), 3.29 (m, 1H, PhCH₂, overlapped with H₂O from solvent), 3.99 (m, 2H, OCH₂), 4.16 (m, 1H, CHNH), 4.31 (m, 1H, CHNH), 4.86 (dd, X part of an ABX system, *J* = 4.4, 8.9 Hz, 1H, PhCH₂CH), 6.35 (br s, 1H, biotin NH), 6.43 (br s, 1H, biotin NH), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{arom}), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H_{arom}), 11.98 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 11.6, 11.9, 12.7, 19.4, 21.7, 24.6, 27.7, 28.0, 28.1, 32.9, 36.2, 39.8, 53.0, 55.3, 59.2, 61.1, 72.4, 74.5, 114.7, 117.4, 122.0, 124.9, 126.5, 128.8, 130.3, 140.5, 148.2, 157.8, 162.7, 171.5, 171.6, 175.7. ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 690.23 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₃₄H₄₁N₃O₇S₂ (667.8): C, 61.14; H, 6.19; N, 6.29. Found: C, 60.87; H, 6.52; N, 6.31.

5.1.21. (±) Succinic acid mono-{2-[4-(2,4-dioxo-thiazolidin-5-ylmethyl)-phenoxyethyl]-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-6-yl} ester (**12**)

To a solution of **10** (82 mg, 0.19 mmol, obtained from **9a** as reported above) in CH₂Cl₂ (14 mL) were added succinic anhydride (37 mg, 0.37 mmol) and DMAP (2 mg, 0.019 mmol). The solution was refluxed for 2 days. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (30 mL). The solution was washed with 5% aqueous citric acid solution (2 × 20 mL), water (2 × 20 mL), dried (MgSO₄) and concentrated to dryness. The solid residue was suspended in CH₂Cl₂ (5 mL), sonicated, filtered and washed with CH₂Cl₂. Careful drying afforded 63 mg (0.12 mmol, 63% yield) of white powder. M.p. 204 °C. IR (KBr) cm⁻¹: 3418, 3189, 2926, 1743, 1680, 1515, 1246, 1142. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.32 (s, 3H, CH₃), 1.85 (m, 1H, chromane 3-*H_a*H_b), 1.91 (s, 6H, 2 × ArCH₃), 1.97 (s, 6H, ArCH₃), 2.00 (m, 1H, 3-*H_a*H_b), 2.61 (m, 4H, succinic CH₂CH₂), 2.83 (m, 2H, chromane 4-CH₂), 3.05 (dd, A part of an ABX system, *J* = 9.0, 14.1 Hz, 1H, CH₂CH), 3.29 (dd, B part of an ABX system, *J* = 4.3, 9.0 Hz, 1H, CH₂CH), 3.98 (m, 2H, OCH₂), 4.86 (dd, X part of an ABX system, *J* = 4.3, 9.0 Hz, 1H, CH₂CH), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{arom}), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{arom}), 12.04 (br s, 1H), 12.29 (br s, 1H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 11.7, 11.9, 12.7, 19.5, 21.7, 27.7, 28.5, 28.7, 36.3, 53.1, 72.4, 74.6, 114.7, 117.4, 122.0, 125.1, 126.7, 128.9, 130.3, 140.5, 148.2, 157.8, 171.0, 171.8, 173.4, 175.9. ESI-MS (pos. mode): *m/z* = 564.05 [M + Na]⁺. Anal. Calcd for C₂₈H₃₁NO₈S, 1/2 CH₂Cl₂ (584.1): C, 58.60; H, 5.52; N, 2.40. Found: C, 58.81; H, 5.43; N, 2.45.

5.2. Anti-proliferative activity measurement

5.2.1. Cell culture and reagents

MCF-7 and MDA-MB231 human breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). Both cell lines were grown at 37 °C, according to American Type Culture Collection recommendations, in phenol red Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for MCF-7 and in L-15 medium (Invitrogen) for MDA-MB-231. These media were supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma–Aldrich, Lyon, France) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen).

5.2.2. Cell proliferation assay

Cells were seeded in 6-well plates at the density of 8.10⁴ cells/well in 2 mL of medium supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. After 24 h of cell attachment, the medium was replaced by fresh medium supplemented with 1% FCS and 2 mM L-glutamine. Cell proliferation was studied after 24 h of treatment. Control wells received 0.1% DMSO. At the end of the treatment, cells were washed with PBS, trypsinized and counted with the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières, France). Each treatment was performed in triplicate. For the different compounds, the concentration leading to a decrease of 50% in the number of viable cells (IC50) was measured.

5.3. Hepatotoxicity evaluation

5.3.1. Cell culture and reagents

Cryopreserved human hepatocytes were provided by Kaly-cell (Illkirch, France). They were distributed in 96-well plates at the density of 0.1 × 10⁶ cells/well in 50 μL of DMEM (Gibco, Invitrogen, UK) supplemented with gentamycin (50 mg/L, Sigma Aldrich, France), insulin (4 mg/L, Sigma Aldrich, France) and dexamethasone (10 μM, Sigma Aldrich, France) under a CO₂/air (5%/95%) humidified atmosphere at 37 °C. After 30 min of equilibration, under stirring at 900 rpm, 50 μL of test compounds or DMSO (0.4%) were added. Compounds were tested at 7 concentrations (0.5, 2.5, 5, 12.5, 25, 50 and 100 μM) in triplicate.

5.3.2. Cytotoxicity assay (MTT assay)

After 90 min of treatment, MTT (10 μL/well at 10 mg/mL, Sigma Aldrich, France) was added and incubated during 30 min at 37 °C. Plates were centrifuged, MTT was removed and 100 μL DMSO was distributed per well. The absorbance was read at 595 nm by microplate spectrophotometry. Cell viability was expressed as percentage over controls (DMSO).

Acknowledgements

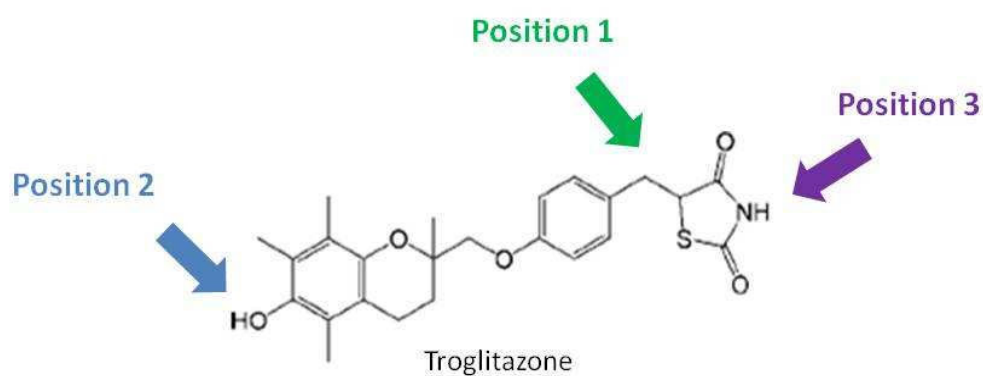
This article is dedicated to the memory of Professor Alain Olivier (17th September 1942–19th February 2010). We thank Sanofi–Aventis for a studentship to Stéphane Salamone, and “Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche” for a studentship to Christelle Colin. Many thanks to Kaly-Cell (Illkirch) for providing human hepatocytes and for viability measurements. We acknowledge Brigitte Fernet, Sandrine Adach and François Dupire for their technical assistance. This work was performed with grants of the Ligue contre le cancer, Conseil Régional de Lorraine, and Université Henri Poincaré. Special thanks to Jason M. Hargreaves for help with the English.

References

- [1] T. Sørlie, Eur. J. Cancer 40 (2004) 2667–2675.
- [2] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Lancet 365 (2005) 1687–1717.

- [3] R. Nahta, F.J. Esteva, *Cancer Lett.* 232 (2006) 123–138.
- [4] A. Baranova, *PPAR Res.* 2008 (2008) 1–10.
- [5] T.M. Willson, P.J. Brown, D.D. Sternbach, B.R. Henke, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 527–550.
- [6] M. Chojkier, *Hepatology* 41 (2005) 237–246.
- [7] K.Y. Kim, S.S. Kim, H.G. Cheon, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 530–540.
- [8] E. Elstner, C. Muller, K. Koshizuka, E.A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J.W. Said, D. Heber, H.P. Koeffler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 8806–8811.
- [9] H.J. Burstein, G.D. Demetri, E. Mueller, P. Sarraf, B.M. Spiegelman, E.P. Winer, *Breast Cancer Res. Treat.* 79 (2003) 391–397.
- [10] J. Lecomte, S. Flament, S. Salamone, M. Boisbrun, S. Mazerbourg, Y. Chapleur, I. Grillier-Vuissoz, *Breast Cancer Res. Treat.* 112 (2008) 437–451.
- [11] J.-R. Weng, C.-Y. Chen, J.J. Pinzone, M.D. Ringel, C.-S. Chen, *Endocr. Relat. Cancer* 13 (2006) 401–413.
- [12] S. Wei, J. Yang, S.-L. Lee, S.K. Kulp, C.-S. Chen, *Cancer Lett.* 276 (2009) 119–124.
- [13] J.-W. Huang, C.-W. Shiau, Y.-T. Yang, S.K. Kulp, K.-F. Chen, R.W. Brueggemeier, C.L. Shapiro, C.-S. Chen, *Mol. Pharmacol.* 67 (2005) 1342–1348.
- [14] S. Wei, H.-C. Yang, H.-C. Chuang, J. Yang, S.K. Kulp, P.-J. Lu, M.-D. Lai, C.-S. Chen, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 26759–26770.
- [15] C.-W. Shiau, C.-C. Yang, S.K. Kulp, K.-F. Chen, C.-S. Chen, J.-W. Huang, C.-S. Chen, *Cancer Res.* 65 (2005) 1561–1569.
- [16] M.H. Jarrar, A. Baranova, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 71–87.
- [17] F. Rashid-Kolvear, M.A. Taboski, J. Nguyen, D.-Y. Wang, L.A. Harrington, S.J. Done, *BMC Cancer* 10 (2010) 390.
- [18] Y. Wang, F. Fang, C.-W. Wong, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 80–85.
- [19] S. Wie, S.K. Kulp, C.-S. Chen, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 9780–9791.
- [20] S. Chbicheb, X. Yao, J.-L. Rodeau, S. Salamone, M. Boisbrun, G. Thiel, D. Spohn, I. Grillier-Vuissoz, Y. Chapleur, S. Flament, S. Mazerbourg, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 1087–1097.
- [21] C. Colin, S. Salamone, I. Grillier-Vuissoz, M. Boisbrun, S. Kuntz, J. Lecomte, Y. Chapleur, S. Flament, *Breast Cancer Res. Treat.* 124 (2010) 101–110.
- [22] J.-W. Huang, C.-W. Shiau, J. Yang, D.-S. Wang, H.-C. Chiu, C.-Y. Chen, C.-S. Chen, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4684–4689.
- [23] T. Yokoi, *Handb. Exp. Pharmacol.* 196 (2010) 419–435.
- [24] V.A. Dixit, P.V. Bharatam, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 1113–1122.
- [25] Y.-H. Fan, H. Chen, A. Natarajan, Y. Guo, F. Harbinski, J. Lyasere, W. Christ, H. Aktas, J.A. Halperin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 2547–2550.
- [26] K.A. Reddy, B.B. Lohray, V. Bhushan, A.S. Reddy, N.V.S.R. Mamidi, P.P. Reddy, V. Saibaba, N.J. Reddy, A. Suryaprakash, P. Misra, R.K. Vikramadithyan, R. Rajagopalan, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 3265–3278.
- [27] J.M. Babu, D. Nageshwar, Y.R. Kumar, C. Prabhakar, M.R. Sarma, G.O. Reddy, K. Vyas, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 271–281.
- [28] U. Ramachandran, A. Mital, P.V. Bharatam, S. Khanna, P.R. Rao, K. Srinivasan, R. Kumar, H.P.S. Chawla, C.L. Kaul, S. Raichur, R. Chakrabarti, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 655–662.
- [29] S. Saha, L.S. New, H.K. Ho, W.K. Chui, E.C.Y. Chan, *Toxicol. Lett.* 192 (2010) 141–149.
- [30] P. Arya, N. Alibhai, H. Qin, G.W. Burtun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 2433–2438.
- [31] D. Boschi, G.C. Tron, L. Lazzarato, K. Chegaev, C. Cena, A. Di Stilo, M. Giorgis, M. Bertinaria, R. Fruttero, A. Gasco, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 2886–2897.
- [32] E. Mahdavian, S. Sangsura, G. Landry, J. Eytina, B.A. Salvatore, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 19–21.
- [33] G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan, J. Rice, D. Nowotnik, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1625–1633.
- [34] W. Yang, Y. Cheng, T. Xu, X. Wang, L.-P. Wen, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 862–868.
- [35] D. Wang, H.-C. Chuang, S.-C. Weng, P.-H. Huang, H.-Y. Hsieh, S.K. Kulp, C.-S. Chen, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5642–5648.
- [36] C.M. Loi, M. Young, E. Randinitis, A. Vassos, J.R. Koup, *Clin. Pharmacokinet.* 37 (1999) 91–104.
- [37] J. Sahi, G. Hamilton, M. Sinz, S. Barros, S.M. Huang, L.J. Lesko, E.L. LeCluyse, *Xenobiotica* 30 (2000) 273–284.
- [38] Y. Yamamoto, M. Nakajima, H. Yamazaki, T. Yokoi, *Life Sci.* 70 (2001) 471–482.
- [39] R. Alvarez-Sánchez, F. Montavon, T. Hartung, A. Pähler, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 1106–1116.
- [40] L. Guetzoyan, F. Ramiandrasoa, H. Dorizon, C. Desprez, A. Bridoux, C. Rogier, B. Pradines, M. Perrée-Fauvet, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 3278–3289.

A.



B.

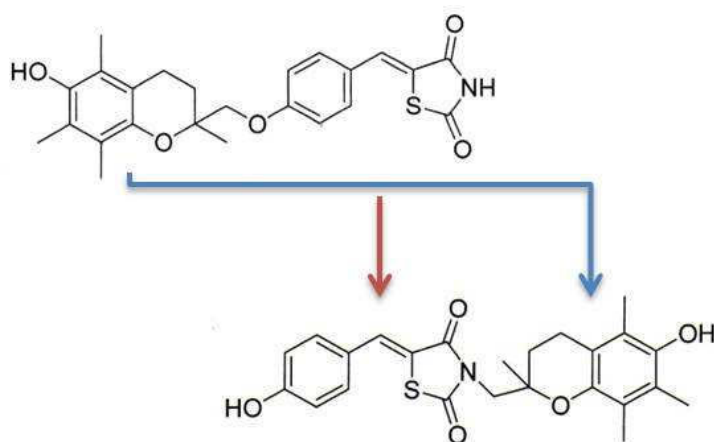


Figure 46 : Nouvelles modifications structurales de la TGZ et molécules inversées. A. En plus des modifications apportées en position 1 et 2 de la TGZ, l'atome d'azote du cycle thiazolidinedione (position 3) a été substitué par différents groupement. B. Des composés inversés ont été synthétisés par une permutation de la structure de la $\Delta 2$ -TGZ. Le noyau TZD se retrouve dans la partie centrale de la molécule.

2. Synthèse de nouveaux dérivés : optimisation du composé $\Delta 2$ -TGZ

Optimization of Troglitazone Derivatives as Potent Anti-Proliferative Agents: Towards More Active and Less Toxic Compounds.

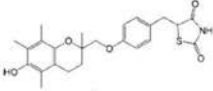
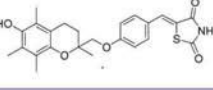
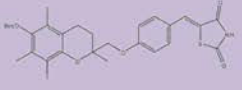
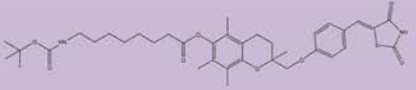
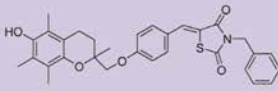
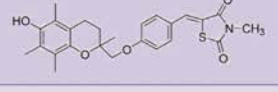
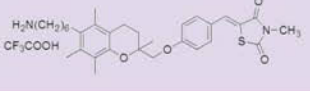
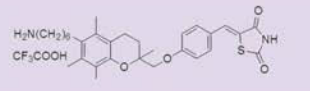
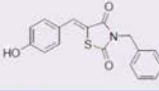
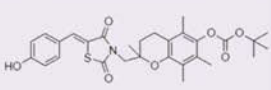
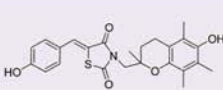
Andrea Bordessa, Christelle Colin-Cassin, Isabelle Grillier-Vuissoz, Sandra Kuntz, Sabine Mazerbourg, Gauthier Husson, Myriam Vo, Stéphane Flament, Hélène Martin, Yves Chapleur, Michel Boisbrun, soumis en 2013.

a. Introduction

Dans l'étude précédente, de nouveaux dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ ont été développés par des modifications du groupe hydroxyle du phénol du cycle chromane de la $\Delta 2$ -TGZ et la TGZ. Nous avons montré que les dérivés $\Delta 2$ -TGZ sont plus efficaces que les dérivés TGZ dans l'inhibition de la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. De plus, la présence de groupements apolaires en position 2 sur le cycle chromane augmente encore leur activité. Enfin, la désoxygénation en position 2 induit à la fois une augmentation d'activité et une toxicité plus faible envers des hépatocytes non malins en culture primaire (Salamone S., *et al.* 2012). Dans l'optique d'obtenir un effet cumulatif sur l'inhibition de prolifération et la toxicité, des composés présentant simultanément toutes ces modifications ont été synthétisés par les collègues chimistes. De plus, l'atome d'azote du cycle thiazolidinedione en position 3, qui joue un rôle important pour l'interaction de la molécule avec le récepteur PPAR γ , a été fonctionnalisé (**Figure 46A**). Une autre série de composés a aussi été produite par une permutation de la structure de la $\Delta 2$ -TGZ puisqu'il a été décrit qu'une structure inversée de la $\Delta 2$ -CGZ améliore l'activité anti-proliférative (Yang J., *et al.* 2008). Dans le cas de la $\Delta 2$ -CGZ, l'extrémité méthylcyclohexyle terminale a été réarrangée de telle sorte que le noyau TZD se retrouve dans la partie centrale de la molécule (Yang J., *et al.* 2008) (**Figure 46B**).

b. Principaux résultats

Tous les nouveaux dérivés ont été testés au laboratoire sur la prolifération cellulaire des deux lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. En parallèle, l'effet anti-prolifératif de ces composés a été évalué sur un plus large spectre de cellules cancéreuses aux concentrations de 10^{-5} et 10^{-6} M. Les cellules utilisées sont : les cellules cancéreuses de sein (MCF-7 et MDA-MB-231), de colon (HTC116), de mélanome métastasé (MDA-MB-435), de pancréas (Mia-PaCa), de foie (HepG2), et de prostate (PC3 et LNCaP) à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette. La toxicité hépatique a également été évaluée sur des cultures primaires d'hépatocytes humains par les

	Formule	molécule	Viabilité cellulaire (EC50)	
			MCF-7	MDA-MB-231
TGZ		TGZ	35.4 ± 1.3	15.7 ± 0.1
Δ2-TGZ		7 = Δ2-TGZ	29.7 ± 2.0	16.6 ± 1.0
Dérivés boc		6a = boc-D2-TGZ	7.7 ± 0.5	3.3 ± 0.1
		8b = boc-L-Δ2-TGZ	13.0 ± 1.5	3.2 ± 0.3
Dérivés N-substitués		3 *	>50	>25
		5 *	>50	4,4 ± 0,4
Dérivés désoxygénés-modifiés		17	6.1 ± 0.4	6.7 ± 0.7
		18	3.6 ± 0.7	1.52 ± 0.1
Dérivés inversés		25	14,8 ± 0,8	11,0 ± 0,3
		33	5,1 ± 0,5	1,9 ± 0,1
		34	29,5 ± 2,7	>25

* : participation à la réalisation des tests.

Figure 47 : Activité anti-proliférative de nouveaux dérivés de la Δ2-TGZ. L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 a été évaluée après 24 heures de traitement en présence des différents composés. La TGZ et Δ2-TGZ ainsi que les composés 1 et 6 analysés lors de la précédente étude sont rapportés dans le tableau. De nouveaux dérivés avec d'autres modifications ont été étudiés : les dérivés N-substitués, les dérivés désoxygénés-modifiés et les dérivés inversés. Pour ces composés, les EC₅₀ sont déterminées pour les deux lignées cellulaires.

docteurs Hélène Martin et Lysiane Richert (Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, UFR Pharmacie Besançon).

Certains de ces composés trop hydrophobes n'ont pas été étudiés puisqu'ils n'ont pas pu être dissous dans le DMSO. La simple N-méthylation du cycle thiazolidinedione en position 3 de la Δ 2-TGZ inhibe la prolifération des cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 mais ne présente aucun effet sur les cellules hormono-dépendantes MCF-7 (**Figure 47**). Ce composé apparait très prometteur pour cibler les tumeurs hormono-indépendantes dont les traitements thérapeutiques sont limités. Les composés qui sont à la fois désoxygénés et reliés par une chaîne apolaire au cycle chromane sont comme attendu très actifs sur les lignées cancéreuses mammaires (**Figure 47**). Certains présentent une viabilité cellulaire inférieure pour 10% à une dose de 10 M de composé. Pour les composés inversés, seulement quelques-uns sont efficaces sur l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses.

La toxicité des composés les plus actifs a été test e sur des hépatocytes primaires en culture. La Δ 2-TGZ N-m thyl e en position 3 présente la meilleure viabilité cellulaire, avec même une petite induction de la prolifération des hépatocytes. Les composés à la fois désoxygénés et reliés à une chaîne apolaire en position 2 sont comme attendu très peu toxiques : 80% de survie cellulaire en présence de 200 M de composé (vs 43% pour la Δ 2-TGZ). Cet effet bénéfique sur la toxicité semble être lié à l'absence de l'oxygène du cycle chromane ce qui empêche la formation de dérivés quinones. Enfin, les composés inversés les plus efficaces sur l'inhibition de la prolifération cellulaire présentent eux aussi une faible hépatotoxicité, qui est plus difficile à rationaliser.

La Δ 2-TGZ ainsi que deux composés 17 et 18 ont été testés *in vivo* sur des modèles de souris BALBc/AnNHsd. Les composés ont été injectés par voie intraveineuse et la dose maximale tol r e (DMT) a été  valu e. Pour le composé Δ 2-TGZ, la DMT est inférieure à 34mg/kg. Cette DMT est équivalente à 34mg/kg pour le composé 18 et est de 65mg/kg pour le composé 17. Ces données montrent que la N-méthylation en position 3 diminue la toxicité *in vivo*. Une hypothèse serait que cette modification empêche la formation d'intermédiaires responsables de l'hépatotoxicité.

c. Conclusion

De nouveaux dérivés de la Δ 2-TGZ ont été synthétisés et inhibent très efficacement la prolifération de différentes lignées cancéreuses avec moins de 10% de viabilité cellulaire en présence de 10 M du composé. De plus, la majorité d'entre eux présente une toxicité plus faible envers les hépatocytes

sains en culture primaire avec une viabilité supérieure à 80%. Deux composés ont été testés *in vivo* et la DMT a été évaluée à 34 et 65,5mg/kg. Certains de ces composés ont fait l'objet d'un dépôt de brevet en janvier 2012.

Optimization of Troglitazone Derivatives as Potent Anti-Proliferative Agents: Towards More Active and Less Toxic Compounds

Andrea Bordessa,^{†, ‡} Christelle Colin-Cassin,^{§, ||} Isabelle Grillier-Vuissoz,^{§, ||} Sandra Kuntz,^{§, ||} Sabine Mazerbourg,^{§, ||} Gauthier Husson,^{§, ||} Myriam Vo,^{†, ‡} Stéphane Flament,^{§, ||} Hélène Martin,[⊥] Yves Chapleur,^{†, ‡} Michel Boisbrun^{*, †, ‡}

[†]Université de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, BP 70239, F-54506 Vand oeuvre-lès-Nancy, France

[‡]CNRS, SRSMC, UMR 7565, BP 70239, F-54506 Vand oeuvre-lès-Nancy, France

[§]Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, BP 70239, F-54506 Vand oeuvre-lès-Nancy Cedex, France

^{||} CNRS, CRAN, UMR 7039, BP 70239, F-54506 Vand oeuvre-l es-Nancy Cedex, France

[⊥] Université de Franche-Comt e, laboratoire de Toxicologie Cellulaire, EA 4267, 25030 Besançon Cedex, France

ABSTRACT: Δ_2 -troglitazone derivatives were shown to exhibit anti-proliferative activity in a PPAR γ -independent manner. We prepared various compounds in order to increase their potency and decrease their toxicity towards non-malignant primary cultured hepatocytes. Many compounds induced viabilities less than 20% at 10 μ M on various cancer cell lines. Furthermore, three of them showed hepatocyte viability of 80% or more at 200 μ M, and compound **17** exhibited in vivo a maximum tolerated dose of 65.5 mg/kg on a murine model.

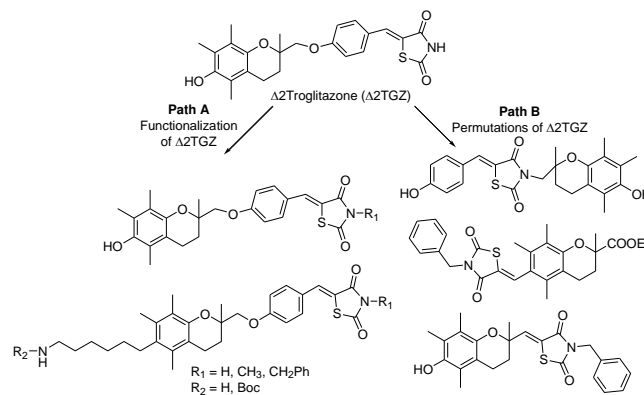
INTRODUCTION

Numerous compounds bearing a thiazolidine-2,4-dione (TZD) moiety were shown to exhibit outstanding biological activities.¹ Among others, ciglitazone (CGZ) and troglitazone (TGZ) are insulin sensitizers via peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) transactivation and TGZ was used in the United States for the treatment of type 2 diabetes from 1997 until its withdrawal in 2000.² Furthermore, TZD derivatives showed anti-proliferative activity and TGZ was envisioned as a therapeutic alternative to treat breast cancer.^{3,4} Many studies have recently shown that this property is at least partly PPAR γ -independent,⁵ with various cellular targets being involved, such as cyclin D1,⁶ androgen receptor,⁷ estrogen receptor,⁸ AMPK,^{9,10} Ca²⁺ intracellular stores¹¹, ERK1/2 activation...¹² Chen et al. recently proposed that TZD derivatives activity is mediated by energy restriction.^{13,14,15}

Previously, we synthesized¹⁶ new TGZ derivatives bearing various substituents on the chromane moiety, in order to clarify structure-activity and structure-toxicity relationships in this series of compounds. This study confirmed that the presence of a double bond adjacent to the TZD moiety (Δ_2 TGZ series) favors the anti-proliferative activity (MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines), and that such a modification induces less toxicity on primary cultured human hepatocytes. Furthermore, apolar substituents linked to the chromane moiety (via an ester linkage) were favorable on both aspects too. Polar groups were tolerated if they were distant from the

heterocycle thanks to an apolar linker. In addition, simple removal of the chromane hydroxyl group slightly increased the potency of the parent compound and yielded the least toxic compound. Thus, in the present study, we intended to obtain a cumulative effect by linking the deoxygenated Δ_2 TGZ template to an apolar linear alkyl chain via a stable carbon-carbon bond. A terminal amino group would give interesting solubility property and an additional *N*-functionalization of the TZD group could also be of value (Chart 1, Path A). Furthermore, since a permutational rearrangement of CGZ-based molecules led to an increased anti-proliferative activity,⁷ we intended to follow an analogous strategy starting from Δ_2 TGZ, exploring three permutational possibilities (Chart 1, Path B).

Chart 1. Structures of Δ_2 -Troglitazone and target molecules

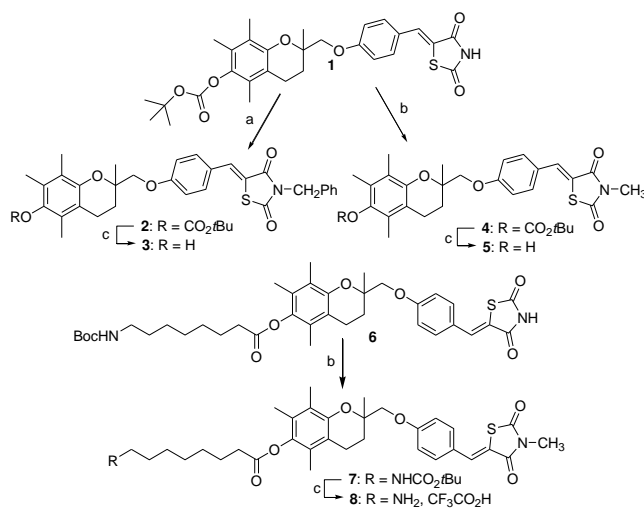


The aim of our study was to synthesize these compounds and to evaluate their anti-proliferative activity towards various cancer cell lines. Since TGZ itself exhibited serious hepatotoxicity² leading to its withdrawal from the market, the toxicity of the most active compounds were evaluated on primary cultured human hepatocytes and maximum tolerated dose of the lead compounds were further evaluated in vivo using a murine model.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. In the context of PPAR γ activation, it was reported that the TZD moiety is involved in a network of hydrogen bonds in the Ligand Binding Domain, for which the acidic NH proton plays a major role.¹⁷ Since the anti-cancer effects of our molecules are PPAR γ -independent, it was challenging to functionalize this position. Thus, already reported compounds **1** and **6**¹⁶ which showed encouraging activity and toxicity profiles were selected for this purpose (Scheme 1). They afforded benzylated and methylated compounds **2-5** and **7,8**.

Scheme 1.^a



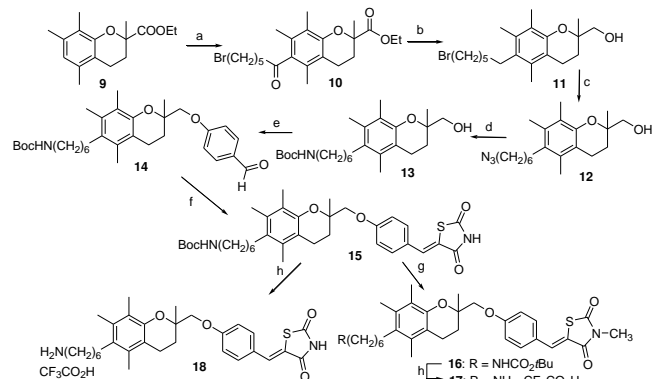
^aReagents and conditions: (a) PhCH₂Br, K₂CO₃; (b) CH₃I, K₂CO₃; (c) TFA.

We intended to prepare deoxygenated Δ 2TGZ derivatives (Scheme 2). For this purpose, Friedel-Crafts reaction on reported compound **9**¹⁶ using 6-bromohexanoyl chloride afforded keto-ester **10**, which was reduced with LiAlH₄/AlCl₃¹⁸ to give **11**. Bromide was substituted by azide to give **12**, and simultaneous reduction to primary amine and Boc protection¹⁹ afforded **13**. Triflate activation of the primary alcohol followed by displacement with 4-hydroxybenzaldehyde gave **14**, then Knoevenagel condensation with TZD yielded target compound **15**. The Boc group could be removed with or without anticipated methylation of TZD, affording **17** (via **16**), and **18**.

As mentioned above, we prepared permuted Δ 2TGZ derivatives. We started from 4'-hydroxy-5-benzylidene-thiazolidinedione²⁰ **19** (Scheme 3). In a first attempt, we simply *N*-benzylated this compound to afford **25**, which was immediately tested for its anti-proliferative activity. We were surprised by its high activity (Table 1, Figure 1).

Thus, we prepared many derivatives starting from vari-

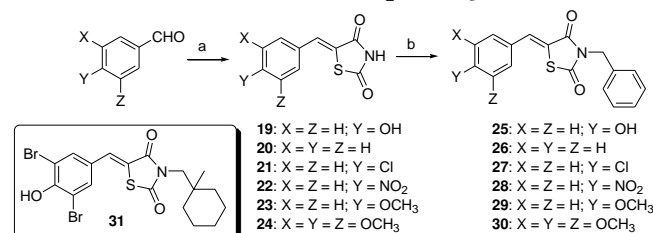
Scheme 2. Synthesis of deoxygenated derivatives^a



^aReagents and conditions: (a) Br(CH₂)₅COCl, AlCl₃; (b) LiAlH₄, AlCl₃; (c) NaN₃; (d) H₂, Pd/C, Boc₂O; (e) Tf₂O, Pyr., then 4-hydroxybenzaldehyde, K₂CO₃; (f) TZD, piperidine; (g) CH₃I, K₂CO₃; (h) TFA.

ously substituted benzaldehydes. We also prepared related compound **31** which was previously reported by Chen and coworkers,⁷ for comparison.

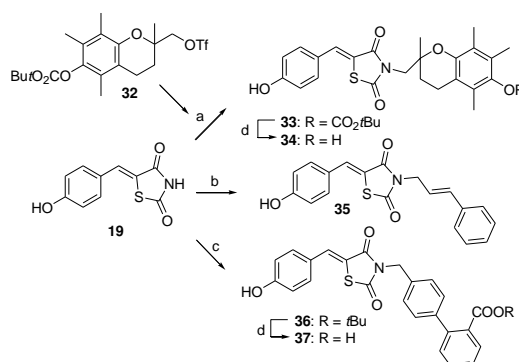
Scheme 3. Synthesis of 3-benzyl-5-benzylidene derivatives^a and structure of compound **31**



^aReagents and conditions: (a) TZD, β -alanine;²⁰ (b) K₂CO₃, PhCH₂Br.

We prepared permuted compound **34** by condensing **19** with already reported¹⁶ triflate **32** and subsequent deprotection of intermediate **33** (Scheme 4). To explore further structure-activity relationships, we also reacted **19** with commercial cinnamyl bromide and with a biphenyl synthon,²¹ affording **35**, **36**, and **37**.

Scheme 4. Synthesis of permuted **34** and derivatives^a



^aReagents and conditions: (a) **32**, K₂CO₃; (b) cinnamyl bromide, K₂CO₃; (c) 4'-Bromomethyl-biphenyl-2-carboxylic acid *tert*-butyl ester, K₂CO₃; (d) TFA.

Other permuted Δ 2TGZ derivatives were obtained as depicted in Scheme 5. Formylation²² of **9**¹⁶ gave **38** which was condensed with TZD, and then benzylated to give

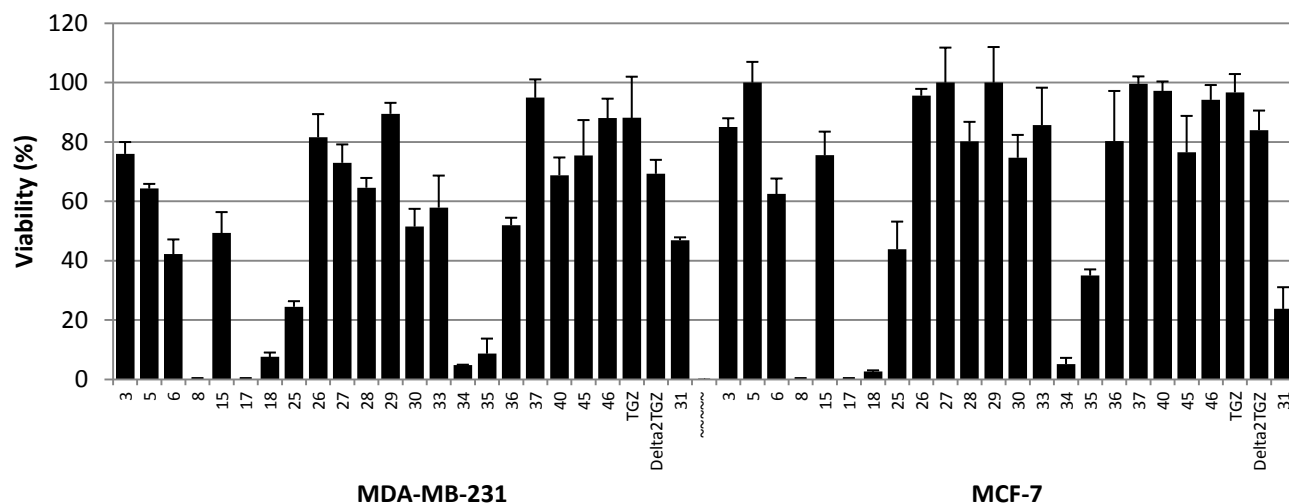
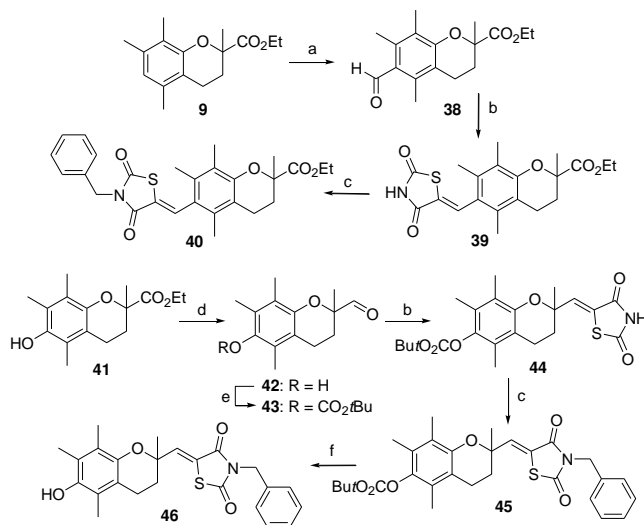


Figure 1. Viability of two breast cancer cell lines subjected to prepared compounds, evaluated by MTS assays in 10% FBS-containing RPMI medium after 72 h of drug treatment (10 μ M). Column, mean; bars SEM (N = 3).

40. Reported **41**¹⁶ was reduced in one step (instead of the reported two-steps procedure²³) to give **42** which was then *O*-protected. Condensation with TZD, followed by benzylation and subsequent deprotection afforded permuted compound **46**.

Scheme 5. Other permuted derivatives^a



^aReagents and conditions: (a) dichloromethoxymethane, TiCl_4 ; (b) TZD, piperidine, benzoic acid; (c) K_2CO_3 , PhCH_2Br ; (d) DIBAL-H, hexane, -78°C ; (e) Boc_2O , DMAP; (f) TFA.

Biological evaluation. All the new compounds were tested for their anti-proliferative activity against 8 cancer cell lines focusing on colon, breast, skin, pancreas, liver, and prostate cancers (see supporting information). Among these compounds, a few were very hydrophobic and were prone to precipitate after addition of the DMSO solution into the culture medium. Thus, we could not evaluate the activities of **2**, **4**, **7**, and **16**. Besides, since the activities of the compounds towards various cell lines were roughly similar, we extracted

from this pool of results the activities towards hormone-dependent (MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cell lines (Figure 1). TGZ, Δ 2TGZ and compound **31** were also tested for comparison. As expected, Δ 2TGZ was slightly more active than TGZ. The other reference compound, **31**, was much more active. *N*-benzylation on the Δ 2TGZ core (giving **3**) did not change the activity. *N*-methylation (compound **5**) had also low impact on the hormone-independent cell line, but abolished activity towards MCF-7 cells. This selectivity would be valuable in order to target hormone non-responsive tumors. The same chemical modification on reported active compound **6**¹⁶ was much beneficial towards both cell lines (compare **6** to **8**). Furthermore, deoxygenated Δ 2TGZ series afforded very active compounds towards both cell lines too, especially unprotected **17** and **18**. It is remarkable that **8**, **17**, and **18** were very active since they induce viabilities lower than 10% at 10 μ M. As mentioned before, it was our surprise to notice that simple *N*-benzylated permuted compound **25** was so active (24.5% viability on MDA-MB-231), but changing the nature of the substituents on the phenyl ring (**26-30**) was detrimental to the activity. Real permuted Δ 2TGZ derivative **34** was very active on both cell lines, as cinnamyl **35** (less than 10% viability on MDA-MB-231), but biphenyl **36** was less active and carboxyl-deprotected **37** was not active. Unfortunately, other permuted derivatives were not very active.

We investigated the effects of the most active compounds on the viability of primary cultured non-malignant human hepatocytes, together with reference compounds (Table 1). *N*-methylation of Δ 2TGZ gave **5** which exhibited the best viability of the whole series, showing surprisingly a slight increase of cell number. The same *N*-methylation of **6** gave **8** which was finally more toxic towards hepatocytes than **6** at 200 μ M. Very interestingly, deoxygenated compounds **15**, **17**, and **18**

exhibited 80% (or more) viability on primary cultured hepatocytes at 100 and 200 μM . This might be due to the absence of oxygen atom on the chromane core, preventing the formation of reported toxic quinone-type derivatives.²⁴

Table 1. Impact of selected compounds on the viability of two cell lines and on human hepatocytes

Compd	Cancer cells viability (% of control) ^a		Hepatocyte viability (% of control) ^b	
	MDA-MB-231	MCF-7	100 μM	200 μM
5	64.3 \pm 1.6	100.0 \pm 7.0	146.7 \pm 5.7	127.1 \pm 5.9
6	42.2 \pm 5.0	62.5 \pm 5.2	79.3 \pm 8.2	74.7 \pm 2.2
8	0.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.2	84.5 \pm 4.3	54.4 \pm 3.8
15	49.3 \pm 7.1	75.5 \pm 8.0	85.1 \pm 9.3	80.3 \pm 2.0
17	0.0 \pm 0.3	0.0 \pm 0.1	82.6 \pm 6.0	82.7 \pm 8.5
18	7.6 \pm 1.5	2.7 \pm 0.4	83.2 \pm 19.0	79.9 \pm 5.8
25	24.5 \pm 1.9	43.9 \pm 9.3	40.8 \pm 4.6	18.0 \pm 1.2
33	57.9 \pm 0.8	85.7 \pm 12.6	65.1 \pm 6.5	37.8 \pm 1.2
34	4.8 \pm 0.2	5.2 \pm 2.1	110.0 \pm 5.8	103.4 \pm 14.5
35	8.7 \pm 5.1	35.0 \pm 2.1	88.8 \pm 9.3	62.7 \pm 5.9
TGZ	88.1 \pm 13.9	96.7 \pm 6.2	52.2 \pm 4.9	22.5 \pm 5.1
Δ 2TGZ	69.3 \pm 4.7	84.0 \pm 6.6	62.8 \pm 4.6	43.1 \pm 3.6
31	46.9 \pm 1.0	23.8 \pm 7.3	42.1 \pm 7.0	30.3 \pm 1.0

^aSurviving breast cancer cells \pm SEM at 10 μM concentration. ^bSurviving human non-malignant hepatocytes in primary cultures at two concentrations.

Permuted compounds **25**, **33** and reference compounds exhibited much higher hepatotoxicity, especially at 200 μM , highlighting the potential of our best new compounds. Very active permuted compounds **34** and **35** showed low to very low toxicity on hepatocytes. This is not easy to rationalize, especially for **34**, which bears a hydroxyl group on the chromane template. But since **17** and **18** are devoid of this moiety and showed a very good activity/hepatocyte viability profile, they were selected for further studies. Since the tumor growth relies on the cell ability to proliferate on limited nutriment conditions, we measured their IC₅₀ in limited (1%) FCS condition, instead of usual 10%. IC₅₀ of **17** and **18** were shown to be 6.1 \pm 0.4 and 3.6 \pm 0.7 μM respectively towards MCF-7 and 6.7 \pm 0.7 and 1.52 \pm 0.1 μM respectively towards MDA-MB-231.

In vivo toxicity was evaluated on a murine model. Compounds **17**, **18**, and reference Δ 2TGZ were injected intravenously to female BALBc/AnNHsd mice (see supplementary material). Maximum Tolerated Dose (MTD) was inferior to 34.0 mg/kg for Δ 2TGZ. It was equal to this dose for **18** and to 65.5 mg/kg for **17**, (solubility limit of **17** in the mixture of solvents used). Thus, it appears that *N*-methylation decreases the in vivo toxicity of the compound since they only differ in this moiety. This could be rationalized by the fact that TZD moiety of

TGZ was reported to be metabolized into isocyanate derivative which in turn traps cytoprotective glutathione.²⁴ *N*-methylation should prevent the formation of this deleterious intermediate and this could also account for the high hepatocyte viability of **5**, compared to Δ 2TGZ.

CONCLUSION

We prepared a series of new compounds based on a Δ 2TGZ template, with alkylation of the thiazolidinedione moiety and/or alkylation of the chromane template after removal of the hydroxyl group. Other compounds with a permuted structure were also synthesized. Many compounds exhibited anti-proliferative activity towards various cancer cell lines with viabilities less than 20% at 10 μM . Furthermore, many of them exhibited low toxicity towards human non-malignant hepatocytes with viabilities at or over 80% at 200 μM . Two compounds displayed low in vivo toxicity in a rodent model with MTD at 34.0 and 65.5 mg/kg. These promising data let us envision further studies dealing with these compounds or related derivatives.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. The synthesis of key compound **15** is described below. Other procedures and analytical data are supplied in the Supporting Information, along with biological protocols.

(6-{2-[4-(2,4-Dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl]-phenoxy)methyl]-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-yl}-hexyl)carbamic acid *tert*-butyl ester (15**).** A solution of **14** (68 mg, 0.13 mmol), thiazolidinedione (**31** mg, 0.26 mmol), piperidine (70 μL , 0.07 mmol), and benzoic acid (80 mg, 0.07 mmol) in dry toluene (3 mL) was refluxed overnight under argon. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with EtOAc (10 mL), washed with 1 N HCl solution (5 mL), 5% aqueous NaHCO₃ solution (5 mL) and brine (5 mL), dried (MgSO₄), and the solvent was removed under vacuum to give a yellowish oil which was purified by precipitation in cold MeOH to afford **15** (66 mg, 0.10 mmol, 81%) as a slightly yellow solid. Mp 116-118 °C; IR (neat) 2930, 2762, 1741, 1697, 1596; ¹H NMR (250 MHz in CDCl₃) δ 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.36-1.44 (m, 4H, linker-CH₂), 1.45 (s, 9H, -*t*Bu), 1.55-1.69 (m, 4H, linker-CH₂), 1.82-1.98 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.10-2.14 (m, 1H, chromane 3-*H_aH_b*), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.52-2.74 (m, 4H, chromane 4-*H_a*, linker-CH₂), 3.06-3.18 (m, 2H, linker-CH₂), 3.96, 4.06 (AB system, *J* = 9.4 Hz, 2H, CH₂O), 4.50 (br s, 1H, NHBoc), 7.01 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 7.80 (s, 1H, CH=C), 8.41 (br s, 1H, NH); ¹³C (62.5 MHz in CDCl₃) δ 12.0, 14.9, 15.8, 20.6, 22.7, 25.3, 26.7, 28.4, 28.7, 29.9, 30.0, 30.1, 30.2, 40.6, 72.9, 74.0, 115.6, 116.7, 119.4, 122.2, 125.8, 131.0, 131.6, 132.2, 133.4, 134.2, 148.9, 161.2, 166.7, 167.2; MS (ESI) *m/z* 645 [(M + Na)⁺]. Anal. (C₃₅H₄₆N₂O₆S·0.3H₂O) C, H, N.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting information

Experimental procedures and spectroscopic data for all compounds and detailed in vitro and in vivo protocols. This

material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author

*For M.B.: phone, +33 383 68 43 63; fax +33 383 68 47 80; E-mail, michel.boisbrun@univ-lorraine.fr

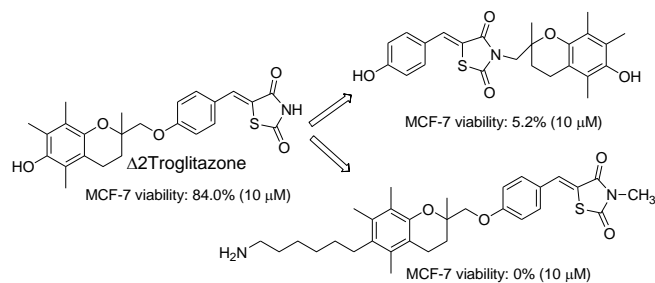
ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Kaly-Cell (Illkirch) for providing human hepatocytes and for viability measurements, T. Cresteil and G. Aubert (ICSN, Gif sur Yvette) for viability measurements and J.-F. Bisson (ETAP, Vandœuvre-lès-Nancy) for evaluation of MTD on mice. We also acknowledge A. Kleinclaus F. Dupire, S. Adach and B. Fernette for technical assistance.

REFERENCES

- (1) Jain, V. S.; Vora, D. K.; Ramaa, C. S. Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1599-1620.
- (2) Chojkier, M. Troglitazone and Liver Injury: In Search for Answers. *Hepatology* **2005**, *41*, 237-246.
- (3) Baranova, A. PPAR Ligands as Potential Modifiers of Breast Carcinoma Outcomes. *PPAR Research* **2008**, *2008*, 1-10.
- (4) Burstein, H. J.; Demetri, G. D.; Mueller, E.; Sarraf, P.; Spiegelman, B. M.; Winer, E. P. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *79*, 391-397.
- (5) Grillier-Vuissoz, I.; Mazerbourg, S.; Boisbrun, M.; Kuntz, S.; Chapleur, Y.; Flament, S. PPAR γ -independent Activity of Thiazolidinediones: A Promising Mechanism of Action for New Anticancer Drugs? *J. Carcinogene. Mutagene.* **2013**, in press, <http://dx.doi.org/4172/2157-2518.S8-002>.
- (6) Huang, J.-W.; Shiao, C.-W.; Yang, J.; Wang, D.-S.; Chiu, H.-C.; Chen, C.-Y.; Chen, C.-S. Development of Small-Molecule Cyclin D₁-Ablative Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4684-4689.
- (7) Yang, J.; Wei S.; Wang, D.-S.; Wang, Y.-C.; Kulp, S. K.; Chen, C.-S. Pharmacological Exploitation of the Peroxisome Proliferator -Activated Receptor γ Agonist Ciglitazone To Develop a Novel Class of Androgen Receptor-Ablative Agents. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2100-2107.
- (8) Lecomte, J.; Flament, S.; Salamone, S.; Boisbrun, M.; Mazerbourg, S.; Chapleur, Y.; Grillier-Vuissoz, I. Disruption of ER α signalling pathway by PPAR γ agonists: evidences of PPAR γ -independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *112*, 437-451.
- (9) Guh, J.H.; Chang, W.-L.; Yang, J.; Lee, S.-L.; Wei, S.; Wang, D.; Kulp, S. K.; Chen, C.-S. Development of Novel Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Activators. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2552-2561.
- (10) Lee, K.-H.; Hsu, E.-C.; Guh, J.-H.; Yang, H.-C.; Wang, D.; Kulp, S. K.; Shapiro, C. L.; Chen, C.-S. Targeting Energy Metabolic and Oncogenic Signaling Pathways in Triple-negative Breast Cancer by a Novel Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK) Activator. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39247-39258.
- (11) Fan, Y.-H.; Chen, H.; Natarajan, A.; Guo, Y.; Harbinski, F.; Lyasere, J.; Christ, W.; Aktas, H.; Halperin, J. A. Structure-activity requirements for the antiproliferative effect of troglitazone derivatives mediated by depletion of intracellular calcium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2547-2550.

- (12) Chbicheb, S.; Yao, X.; Rodeau, J.-L.; Salamone, S.; Boisbrun, M.; Thield, G.; Spohnd, D.; Grillier-Vuissoz, I.; Chapleur, Y.; Flament, S.; Mazerbourg, S. EGR α expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR γ -independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 1087-1097.
- (13) Wei, S.; Chuang, H.-C.; Tsai, W.-C.; Yang, H.-C.; Ho, S.-R.; Paterson, A. J.; Kulp, S. K.; Chen, C.-S. Thiazolidinediones Mimic Glucose Starvation in Facilitating Sp α Degradation through the Up-Regulation of β -Transducin Repeat-Containing Protein. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 47-57.
- (14) Wei S.; Kulp, S. K.; Chen, C.-S. Energy Restriction as an Antitumor Target of Thiazolidinediones. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9780-9791.
- (15) Wang, D.; Chu P.-C.; Yang, C.-N.; Yan, R.; Chuang, Y.-C.; Kulp, S. K.; Chen, C.-S. Development of a Novel Class of Glucose Transporter Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3827-3836.
- (16) Salamone, S.; Colin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Flament, S.; Martin, H.; Richert, L.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. Synthesis of new troglitazone derivatives: Anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 206-215.
- (17) Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1771*, 915-925.
- (18) Kiprof, P.; Li, J.; Renish C. L.; Kalombo, E. K.; Young, V. G. The effect of solubility on the stability of titanium(IV) arene complexes derived from hexasubstituted arenes and TiCl₄. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *620*, 113-118.
- (19) Reddy, P. G.; Pratap, T. V.; Kumar, G. D. K.; Mohanty, S. K.; Baskaran, S. The Lindlar Catalyst Revitalized: A Highly Chemoselective Method for the Direct Conversion of Azides to *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)amines. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 3740-3743.
- (20) Luo, Y.; Ma, L.; Zheng, H.; Chen, L.; Li, R.; He, C.; Yang, S.; Ye, X.; Chen, Z.; Li, Z.; Gao, Y.; Han, J.; He, G.; Yang, L.; Wei, Y. Discovery of (Z)-5-(4-Methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione, a Readily Available and Orally Active Glitazone for the Treatment of Concanavalin A-Induced Acute Liver Injury of BALB/c Mice. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 273-281.
- (21) Schoen, W. R.; Pisano, J. M.; Prendergast, K.; Wyrvatt, M. J.; Fisher, M. H.; Cheng, K.; Chan, W. W.-S.; Butler, B.; Smith, R. G.; Ball, R. G. A Novel 3-Substituted Benzazepinone Growth Hormone Secretagogue (L-692,429). *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 897-906.
- (22) Garcia, O.; Bofill, J. M.; Nicolas, E.; Albericio, F. 2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-methyl (Pbfm) as an Alternative to the Trityl Group for the Side-Chain Protection of Cysteine and Asparagine/Glutamine. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 3631-3640.
- (23) Koufaki, M.; Kiziridi, C.; Alexi, X.; Alexis, M. N. Design and synthesis of novel neuroprotective 1,2-dithiolane/chroman hybrids. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6432-6441.
- (24) Dixit, V. A.; Bharatam, P. V. Toxic Metabolite Formation from Troglitazone (TGZ): New Insights from a DFT Study. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1113-1122.



Chapitre 3



Discussion et Perspectives

DISCUSSION et PERSPECTIVES

L'un des enjeux majeurs dans le traitement du cancer du sein est le développement de thérapies novatrices en cas de résistances innées (tumeurs triples négatives) ou acquises. A ce titre, l'activité anti-tumorale PPAR γ -indépendante des TZD pourrait être une piste prometteuse.

Précédemment, le laboratoire a démontré que la TGZ et la $\Delta 2$ -TGZ, un analogue inactif de la TGZ, induisent une dégradation protéasome-dépendante du récepteur ER α de manière PPAR γ -indépendante (Lecomte J., *et al.* 2008).

I. Synthèse de nouveaux dérivés à effets PPAR γ -indépendants : piste prometteuse dans le traitement du cancer du sein

Nous avons montré que la $\Delta 2$ -TGZ induit une diminution dose-dépendante de la prolifération de deux lignées de carcinome mammaire, MCF-7 et MDA-MB-231. Les EC₅₀ de la TGZ sont de 35,4 μ M et 15,8 μ M respectivement pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 et de 29,7 μ M et 16,6 μ M pour la $\Delta 2$ -TGZ. La $\Delta 2$ -TGZ est aussi efficace que la TGZ. Les résultats de Huang portant sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 confirment que l'efficacité anti-proliférative de la $\Delta 2$ -TGZ est similaire à celle de la TGZ (Huang JW., *et al.* 2005). Concernant les cellules cancéreuses de prostate PC-3, la $\Delta 2$ -TGZ montre une efficacité plus forte (Shiau CW., *et al.* 2005). Par contre, nous avons montré que les cellules triples négatives MDA-MB-231 sont plus sensibles à la $\Delta 2$ -TGZ. Ce dernier résultat nous semble très important dans une perspective vis-à-vis de ces tumeurs.

Afin de cibler plus spécifiquement les cellules cancéreuses, la $\Delta 2$ -TGZ a été fonctionnalisée par une substitution du groupe hydroxyle du cycle chromane (position 2) par un groupement biotine. En effet, les cellules cancéreuses surexpriment le récepteur membranaire à la biotine ce qui augmente l'incorporation de la molécule et donc son efficacité (Russell-Jones G., *et al.* 2004 ; Yang W., *et al.* 2009). Ce composé b- $\Delta 2$ -TGZ présente une efficacité anti-proliférative accrue avec des EC₅₀ de 11,3 μ M et 3,4 μ M pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement. En accord avec les résultats de prolifération, la b- $\Delta 2$ -TGZ dégrade le récepteur ER α dans les cellules MCF-7 dès 5 μ M contre 25 μ M pour la $\Delta 2$ -TGZ. Il en est de même pour la cycline D1. Dans les cellules MDA-MB-231, une dose de 3 μ M est suffisante pour induire une dégradation complète de la cycline D1.

Un test de compétition montre que l'activité de la b- Δ 2-TGZ ne dépend pas d'une meilleure incorporation due à la fixation du groupement biotine sur son récepteur. De plus, une substitution différente au niveau de la même position que la biotine conduit à des effets anti-prolifératifs similaires ce qui confirme que la biotine n'est pas responsable de l'effet accru de la b- Δ 2-TGZ.

La substitution du groupe hydroxyle du cycle chromane en position 2 de la Δ 2-TGZ joue un rôle clef dans l'effet anti-prolifératif des composés. Nous avons montré que le groupement substitué doit être apolaire pour maintenir une activité anti-proliférative des composés. Nos résultats confirment ceux de l'équipe de Huang qui a démontré à partir de molécules dérivées de la Δ 2-TGZ (Δ 2-TG-6 et STG28), que le groupement substitué en position 2 doit être hydrophobe (Huang JW., *et al.* 2005 ; Huang JW., *et al.* 2006). Nous avons également montré que lorsque le substituant est polaire il doit être éloigné du cycle chromane par un linker pour maintenir l'activité anti-proliférative des composés. Enfin, le remplacement du groupe hydroxyle polaire par un atome d'hydrogène augmente l'activité anti-proliférative des deux molécules mères (TGZ et Δ 2-TGZ) et a conduit au développement des molécules désoxygénées (9b et 6b). Afin d'améliorer l'activité anti-proliférative de nos composés, nous envisageons par la suite d'étudier la spécificité stœchiométrique des composés les plus intéressants puisqu'il a été montré que l'énantiomère S de la STG28 est plus efficace que l'énantiomère R (Huang JW., *et al.* 2006).

Nous avons poursuivi l'amélioration de l'efficacité anti-proliférative de nos molécules par plusieurs autres modifications. L'ajout d'un linker apolaire sur la position 2 de la molécule désoxygénée diminue fortement la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. Deux composés apparaissent prometteurs : composé 17 et composé 18. Les EC₅₀ du composé 17 sont de 6,1 μ M et 7,35 μ M pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement et de 4,8 μ M et 1,4 μ M pour le composé 18. La dose maximale tolérée (DMT) a été déterminée *in vivo* sur des souris. Elle est de 34mg/kg et de 65mg/kg pour les composés 18 et 17 respectivement. Un troisième composé nommé composé 5 apparaît également prometteur dans l'optique d'un traitement des cancers triple-négatifs. Il présente une simple N-méthylation du cycle thiazolidinedione (position 3) de la Δ 2-TGZ et diminue uniquement la prolifération des cellules MDA-MB-231. L'EC₅₀ est supérieur à 50 μ M pour les cellules MCF-7 et est égale à 4,4 μ M pour les cellules MDA-MB-231. Basé sur le travail de Chen *et al.*, nous avons également développé des molécules inversées dérivées de la Δ 2-TGZ (Yang J., *et al.* 2008). Quelques composés inhibent la prolifération cellulaire mais de manière plus modérée que les dérivés désoxygénés. Cependant, il est difficile de conclure quant à une réelle relation structure-activité. L'efficacité des composés 17, 18 et 5 doit être vérifiée *in vivo*. Le modèle utilisé sera les souris Nude xénotreffées avec des cellules MDA-MB-231. Les souris seront traitées avec les composés après que la tumeur ait commencé à croître selon deux protocoles : une ou deux

injections par semaine à une dose DMT/2 ou DMT/4. Des souris traitées avec la RGZ et la $\Delta 2$ -TGZ serviront de contrôles. La croissance tumorale sera suivie pendant au moins deux semaines. Les souris seront sacrifiées lorsque le volume éthique de la tumeur sera atteint (1 cm^3).

Parmi tous les nouveaux dérivés que nous avons étudié, les traitements *in vitro* avec les molécules les plus efficaces nécessitent encore des concentrations de l'ordre du μM . Afin d'envisager une utilisation thérapeutique de ces molécules, nous devons diminuer la dose efficace de ces molécules, en deçà du μM . Pour cela, plusieurs types de co-traitements peuvent être envisagés. De nombreuses études montrent que la combinaison de TRAIL avec différentes TZD stimule la réponse pro-apoptotique de différentes lignées cancéreuses de manière synergique (Kim Y., *et al.* 2002, Lu M., *et al.* 2005, Schultze K., *et al.* 2006, Kim YH., *et al.* 2008 ; Plissonnier ML., *et al.* 2010). Cet effet est PPAR γ -indépendant. Les TZD agissent en dégradant les protéines régulatrices de l'apoptose (survivin et c-Flip) et en augmentant l'expression de DR5 ce qui sensibilise les cellules à TRAIL (Schultze K., *et al.* 2006, Kim YH., *et al.* 2008 ; Plissonnier ML., *et al.* 2010). Nos résultats préliminaires montrent que le récepteur DR5 est stimulé et que la survivin diminue en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ (induction de 2,82x pour DR5 et une diminution de 0,56x pour survivin après 12 heures de traitement des cellules MCF-7).

Le protéasome pourrait aussi être une cible. En effet, nous avons montré au laboratoire que des inhibiteurs du protéasome bloquent la dégradation des protéines ER α et cycline D1 dans les cellules cancéreuses mammaires. En outre, un effet synergique entre le bortezomib et les TZD a été décrit (Von Schwarzenberg K., *et al.* 2009 ; Freudlsperger C., *et al.* 2007). De plus, la TGZ inhibe l'activité histone déacétylase dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Davies GF., *et al.* 2010). L'effet histone déacétylase de l'acide valproïque peut être renforcé par la PGZ ce qui conduit à l'apoptose des cellules de myélomes multiples (Aouali N., *et al.* 2009). Récemment, il a été montré qu'un analogue inactif de la CGZ, CG-12, augmente l'expression du gène suppresseur de tumeur KLF-6 (Kruppel-like factor 6) en réprimant les histones déacétylases (Chen CH., *et al.* 2011).

On peut aussi envisager d'autres co-traitements. Récemment, une étude clinique montre une efficacité de l'Iniparib, un inhibiteur de PARP, sur des patients atteints de tumeurs triple-négatives (O'Shaughnessy J., *et al.* 2011).

Ces différents co-traitements pourraient être envisagés avec nos composés les plus efficaces sur les cellules MDA-MB-231. Par la suite, une étude sur des cellules en culture primaire issues de patientes résistantes aux traitements conventionnels pourra être entreprise. De plus, il est essentiel de mesurer l'effet anti-prolifératif sur des cellules saines. Nous disposons au laboratoire des cellules MCF-10A qui sont classiquement utilisées comme témoins cellules saines.

En outre, nous avons couplé notre étude de relation structure-activité par une étude de cytotoxicité sur des hépatocytes humains en culture primaire. De manière générale, tous les composés insaturés $\Delta 2$ sont moins toxiques que les composés parents. Nous supposons que la présence de la double liaison empêcherait la formation de métabolites de type glutathion et diminuerait donc la toxicité hépatique (Yokoi T. 2010 ; Saha S., *et al.* 2010a ; Alvares-Sanchez S., *et al.* 2006). Les composés désoxygénés sont moins toxiques puisque l'absence de l'oxygène en position 2 prévient la formation de métabolites réactifs de type quinone (Dixit VA. & Bharatam PV. 2011). Ce mécanisme pourrait également expliquer la toxicité réduite des composés portant une substitution du cycle chromane avec des groupements lipophiles. Comme attendu, le composé 5 méthylé en position 3 n'est pas hépatotoxique. Cette méthylation réduit la toxicité du noyau thiazolidinedione en limitant la formation de composés pris en charge par le glutathion.

Afin de compléter l'étude de toxicité hépatique, les hépatocytes humains en culture primaire pourront être soumis à une analyse par western blot pour évaluer la présence de marqueurs de stress du réticulum et d'apoptose en présence des différents composés 17, 18 et 5. Le foie des souris Nude traitées avec les différents composés sera analysé d'un point de vue histologique afin de confirmer l'absence de toxicité hépatique. Nous pourrions également analyser l'expression des marqueurs du stress du RE et de l'apoptose. L'alanine transaminase (ALT) exprimée plus particulièrement au niveau hépatique pourrait aussi être dosée dans le sérum des souris Nude traitées.

II. Meilleure compréhension des mécanismes d'action PPAR γ -indépendants impliqués dans la diminution de la prolifération

Au début de ce travail, l'effet pro-apoptotique des ligands de PPAR γ étaient bien établis (Fenner MH. & Elstner E. 2005). Par contre, les effets PPAR γ -indépendants étaient peu caractérisés sur les cellules cancéreuses mammaires. Nous avons établi par plusieurs approches que la $\Delta 2$ -TGZ induit la mort cellulaire par apoptose des lignées MCF-7 et MDA-MB-231 en accord avec les données sur les deux lignées de carcinomes de prostate (Shiau CW., *et al.* 2005). En effet, l'apoptose des cellules est détectée à 24 heures et plus fortement à 48 heures en réponse à un traitement à la $\Delta 2$ -TGZ. De plus, nous avons également montré que les gènes impliqués dans le stress du réticulum sont induits avec une phosphorylation de PERK dès 1,5 heure dans les cellules MCF-7 et un clivage d'XBP1 dès 3 heures dans les cellules MDA-MB-231 en présence de $\Delta 2$ -TGZ. Ces données montrent que l'apoptose est un processus qui intervient plus tardivement que le stress du réticulum. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre ces deux processus après un blocage des deux voies principales :

CHOP et JNK dans les cellules MCF-7. Tout d'abord, l'inhibition de CHOP, un acteur majeur du lien entre stress du réticulum endoplasmique et apoptose, ne bloque pas l'apoptose induite par la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MCF-7. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Wei menés avec un dérivé inactif de la $\Delta 2$ -CGZ, OSU-CG12, dans la lignée cancéreuse de prostate LNCaP (Wei S., *et al.* 2010). Par contre, ces résultats sont différents de ceux de Zang qui montre que l'induction de l'apoptose est en partie liée au stress du réticulum endoplasmique dans les deux lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 en réponse au TZD18 (Zang C., *et al.* 2009). Néanmoins, la structure du composé TZD18 est relativement différente puisqu'il s'agit d'un composé conçu pour une activité duale PPAR α/γ . La deuxième voie que nous avons bloquée est la voie JNK puisque son activation par un stress du RE peut conduire à la mort cellulaire par apoptose (Malhi H., *et al.* 2011). Nous n'avons pas observé de lien entre l'apoptose et le stress du réticulum comme les résultats décrits avec le TZD18. En effet, un inhibiteur de JNK atténue la diminution de la prolifération cellulaire en réponse au TZD18 mais ne bloque pas l'augmentation de l'expression de CHOP et des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Zang C., *et al.* 2009).

Nous avons enfin testé la voie du calcium. En effet, le laboratoire a montré précédemment que la $\Delta 2$ -TGZ induit une libération de calcium intracellulaire dans les cellules MCF-7 dès 3 heures de traitement (Chibcheb S., *et al.* 2011). Nous avons bloqué cette augmentation de calcium intracellulaire en utilisant un chélateur, le BAPTA-AM. Cependant, le temps nécessaire à l'étude de l'apoptose est au minimum de 24 heures ce qui est incompatible avec l'effet fortement cytotoxique du BAPTA-AM. Afin de déterminer si le calcium est responsable de l'effet anti-apoptotique des TZD, nous envisageons de bloquer spécifiquement les grandes voies de libération du calcium. Par exemple, nous pourrions utiliser la Xestospongin qui est un inhibiteur spécifique du récepteur principal du réticulum endoplasmique IP3R. Nous pourrions également bloquer les SOCs (Store Operated Channel) à l'aide de l'inhibiteur 2-APB (2-aminoéthoxydiphényl borate). En effet, il est décrit que le blocage des canaux calciques SOCs inhibe la prolifération cellulaire et l'initiation de la traduction induite par la TGZ et CGZ (Palakurthi SS., *et al.* 2001). Ces inhibiteurs atténuent également l'effet apoptotique induit par la CGZ (Chopra B., *et al.* 2009). Il est connu que le ligand naturel 15d-PGJ2 entraîne une augmentation du calcium intracellulaire qui mène à la production de ROS et à une induction de l'apoptose par déstabilisation de la membrane mitochondriale (Su RY., *et al.* 2008 ; Wang JJ., *et al.* 2011). Les ROS pourraient être également des effecteurs de l'effet anti-cancéreux des TZD.

Il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la prolifération induite par les TZD. Afin de préciser par quelle voie pro-apoptotique les composés agissent, nous étudierons différents marqueurs des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose

comme le clivage des caspases 8 et 10 et de Bid. Récemment, il a été décrit qu'une protéine de la membrane externe mitochondriale mitoNEET impliquée dans la phosphorylation oxydative peut lier les TZD comme la RGZ et PGZ (Geldenhuis WJ., *et al.* 2011 ; Wiley SE., *et al.* 2007). Dans un premier temps, nous pourrions caractériser l'expression de mitoNEET dans différentes lignées cancéreuses mammaires en réponse aux TZD. A l'aide des composés marqués à la rhodamine dont nous disposons, nous pourrions envisager une co-localisation avec la protéine mitoNEET par microscopie confocale. Enfin, une étude par interférence ARN ciblant mitoNEET permettra de déterminer son implication dans l'effet anti-prolifératif des TZD et notamment dans l'apoptose. Un deuxième récepteur couplé aux protéines G nommé GPR40 (G Protein Coupled Receptor 40) est également capable de lier les TZD (Stoddard LA., *et al.* 2007 ; Smith NJ., *et al.* 2009). Ce récepteur est activé par les acides gras à longue chaîne et est impliqué dans le métabolisme glucidique et dans la sécrétion de l'insuline (Alquier T., *et al.* 2009 ; Latour MG., *et al.* 2007). Récemment, il a été décrit que l'apoptose d'ostéocytes murins PPAR γ -indépendante induite par la RGZ et PGZ est lié à l'activation du récepteur GPR40 (Mieczkowska A., *et al.* 2012). A noter que l'apoptose des ostéocytes est dépendante de la voie ERK1-2 et p38 qui sont également activés par nos composés (Chibcheb S., *et al.* 2011). Nous envisageons de caractériser l'expression de GRP40 en réponse aux TZD puis d'étudier son implication dans l'effet anti-prolifératif des TZD par interférence ARN.

Une dernière piste à explorer est une induction de l'autophagie par les TZD. En effet, dans les cellules cancéreuses de la prostate, le composé OSU-CG12 induit une accumulation de LC3II qui peut être bloquée par l'inhibiteur de l'autophagie : 3-méthyl adénine (Wei S., *et al.*, 2010). Les résultats préliminaires au laboratoire montrent une phosphorylation de l'activateur AMPK en réponse à la Δ 2-TGZ et au composé 18. L'analyse d'autres marqueurs comme LC3 et la phosphorylation de l'inhibiteur mTor sont envisagés.

III. Augmentation de l'efficacité du ligand naturel prostaglandine 15d-PGJ2 par biotinylation

Les effets anti-cancéreux de la prostaglandine sont bien connus. Par ailleurs, la 15d-PGJ2 ne montre pas d'effets hépatotoxiques notables. Suite aux résultats de relation structure-activité obtenus avec la b- Δ 2-TGZ, nous avons analysé l'effet de la 15d-PGJ2-B sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. L'ajout d'un groupement biotine améliore l'effet anti-prolifératif du ligand naturel. En présence de 15d-PGJ2, l' EC_{50} ne peut être atteinte à 50 μ M alors qu'elle est de 9,8 et 6 μ M pour la 15-PGJ2-B dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement. Comme pour la b- Δ 2-TGZ, l'efficacité accrue de la 15d-PGJ2-B ne semble pas être liée à la présence de la biotine puisqu'une

compétition avec de la biotine libre n'altère pas l'effet anti-prolifératif de la 15d-PGJ2-B. Cette inhibition de prolifération s'accompagne d'un stress du réticulum endoplasmique et d'une apoptose dans les cellules MCF-7. L'apoptose dans les cellules MDA-MB-231 reste à confirmer. Dans les cellules MCF-7, le stress du RE est partiellement dépendant de PPAR γ alors que l'apoptose semble être un mécanisme indépendant de PPAR γ . En effet, concernant le stress du RE, le siRNA PPAR γ bloque une des deux voies du stress du RE étudiées, la voie PERK. L'apoptose n'est, quant à elle, pas inhibée par le siRNA PPAR γ . Un résultat surprenant est que l'ajout du groupement biotine renforce la stimulation de PPAR γ . Une étude de docking a permis de préciser le mode de liaison de la 15d-PGJ2-B qui apparaît fonctionner comme un agoniste partiel de PPAR γ .

Afin d'évaluer si la 15d-PGJ2-B peut s'avérer être un composé prometteur, nous devons vérifier sa toxicité hépatique sur des cultures d'hépatocytes primaires en comparaison avec les dérivés TZD, composé 17, composé 18 et composé 5. Si ce composé s'avère peu hépatotoxique, nous pourrons évaluer son efficacité *in vivo*.

Chapitre 4



Références bibliographiques

Références bibliographiques

➤ **A**

- Aci-Sèche, S., Genest, M., Garnier, N., 2011. Ligand entry pathways in the ligand binding domain of PPAR γ receptor. *FEBS Lett.* 585, 2599–2603.
- Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A., Chatterjee, V.K., 1997. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J. Biol. Chem.* 272, 5128–5132.
- Akasaki, Y., Liu, G., Matundan, H.H., Ng, H., Yuan, X., Zeng, Z., Black, K.L., Yu, J.S., 2006. A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, troglitazone, facilitates caspase-8 and -9 activities by increasing the enzymatic activity of protein-tyrosine phosphatase-1B on human glioma cells. *J. Biol. Chem.* 281, 6165–6174.
- Akinyeke, T.O., Stewart, L.V., 2011. Troglitazone suppresses c-Myc levels in human prostate cancer cells via a PPAR γ -independent mechanism. *Cancer Biol. Ther.* 11, 1046–1058.
- Al-Alem, L., Southard, R.C., Kilgore, M.W., Curry, T.E., 2011. Specific thiazolidinediones inhibit ovarian cancer cell line proliferation and cause cell cycle arrest in a PPAR γ independent manner. *PLoS ONE* 6, e16179.
- Alquier, T., Peyot, M.-L., Latour, M.G., Kebede, M., Sorensen, C.M., Gesta, S., Ronald Kahn, C., Smith, R.D., Jetton, T.L., Metz, T.O., Prentki, M., Poitout, V., 2009. Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes* 58, 2607–2615.
- Alvarez-Sanchez, R., Montavon, F., Hartung, T., Pähler, A., 2006. Thiazolidinedione bioactivation: a comparison of the bioactivation potentials of troglitazone, rosiglitazone, and pioglitazone using stable isotope-labeled analogues and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1106–1116.
- Aouali, N., Palissot, V., El-Khoury, V., Moussay, E., Janji, B., Pierson, S., Brons, N.H.C., Kellner, L., Bosseler, M., Van Moer, K., Berchem, G., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists potentiate the cytotoxic effect of valproic acid in multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.* 147, 662–671.
- Armstrong, J.L., Flockhart, R., Veal, G.J., Lovat, P.E., Redfern, C.P.F., 2010. Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells. *J. Biol. Chem.* 285, 6091–6100.

➤ **B**

- Bae, M.-A., Song, B.J., 2003. Critical role of c-Jun N-terminal protein kinase activation in troglitazone-induced apoptosis of human HepG2 hepatoma cells. *Mol. Pharmacol.* 63, 401–408.
- Ban, J.O., Oh, J.H., Son, S.M., Won, D., Song, H.S., Han, S.B., Moon, D.C., Kang, K.W., Song, M.J., Hong, J.T., 2011. Troglitazone, a PPAR agonist, inhibits human prostate cancer cell growth through inactivation of NF κ B via suppression of GSK-3 β expression. *Cancer Biol. Ther.* 12, 288–296.

- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., Evans, R.M., 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4, 585–595.
- Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2004. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* 23, 1207–1216.
- Beatson, G., 1896. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet* 148, 162–165.
- Benghiat, A., Cassidy, S.A., Davidson, H.E., Mancero, F.S., Pickard, J.G., Tyrrell, C.J., 1986. Megestrol acetate in the treatment of advanced post-menopausal breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 12, 43–45.
- Berger, J.P., Petro, A.E., Macnaul, K.L., Kelly, L.J., Zhang, B.B., Richards, K., Elbrecht, A., Johnson, B.A., Zhou, G., Doebber, T.W., Biswas, C., Parikh, M., Sharma, N., Tanen, M.R., Thompson, G.M., Ventre, J., Adams, A.D., Mosley, R., Surwit, R.S., Moller, D.E., 2003. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. *Mol. Endocrinol.* 17, 662–676.
- Bieganski, R.M., Yarmush, M.L., 2011. Novel ligands that target the mitochondrial membrane protein mitoNEET. *J. Mol. Graph. Model.* 29, 965–973.
- Blanquicett, C., Roman, J., Hart, C.M., 2008. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 6, 25–34.
- Bodmer, A., Goetsch, L., Favet, L., Bailly, C., Corvaia, N., Dietrich, P.-Y., 2009. [The potential of monoclonal antibodies in cancer : established trastuzumab and cetuximab and promising targets IGF-1R and c-MET]. *Med Sci (Paris)* 25, 1090–1098.
- Bogoyevitch, M.A., Kobe, B., 2006. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1061–1095.
- Brain, E.G., Misset, J.L., Rouëss, J., 1999. Primary chemotherapy or hormonotherapy for patients with breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 25, 187–197.
- Brennan, M., Wilcken, N., French, J., Ung, O., Boyages, J., 2005. Management of early breast cancer--the current approach. *Aust Fam Physician* 34, 755–760.
- Bruedigam, C., Koedam, M., Chiba, H., Eijken, M., van Leeuwen, J.P.T.M., 2008. Evidence for multiple peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcripts in bone: fine-tuning by hormonal regulation and mRNA stability. *FEBS Lett.* 582, 1618–1624.
- Burgermeister, E., Chuderland, D., Hanoch, T., Meyer, M., Liscovitch, M., Seger, R., 2007. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 27, 803–817.
- Burns, K.A., Vanden Heuvel, J.P., 2007. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 952–960.
- Burstein, H.J., Demetri, G.D., Mueller, E., Sarraf, P., Spiegelman, B.M., Winer, E.P., 2003. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res. Treat.* 79, 391–397.

➤ C

- Cantello, B.C., Cawthorne, M.A., Cottam, G.P., Duff, P.T., Haigh, D., Hindley, R.M., Lister, C.A., Smith, S.A., Thurlby, P.L., 1994. [[omega-(Heterocycllamino)alkoxy]benzyl]-2,4-thiazolidinediones as potent antihyperglycemic agents. *J. Med. Chem.* 37, 3977–3985.
- Carey, L.A., Rugo, H.S., Marcom, P.K., Mayer, E.L., Esteva, F.J., Ma, C.X., Liu, M.C., Storniolo, A.M., Rimawi, M.F., Forero-Torres, A., Wolff, A.C., Hobday, T.J., Ivanova, A., Chiu, W.-K., Ferraro, M., Burrows, E.,

- Bernard, P.S., Hoadley, K.A., Perou, C.M., Winer, E.P., 2012. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 30, 2615–2623.
- Cariou, B., Charbonnel, B., Staels, B., 2012. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 205–215.
- Carmona, M.C., Louche, K., Lefebvre, B., Pilon, A., Hennuyer, N., Audinot-Bouchez, V., Fievet, C., Torpier, G., Formstecher, P., Renard, P., Lefebvre, P., Dacquet, C., Staels, B., Casteilla, L., Pénicaud, L., Consortium of the French Ministry of Research and Technology, 2007. S 26948: a new specific peroxisome proliferator activated receptor gamma modulator with potent antidiabetes and antiatherogenic effects. *Diabetes* 56, 2797–2808.
- Cazanave, S.C., Elmi, N.A., Akazawa, Y., Bronk, S.F., Mott, J.L., Gores, G.J., 2010. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G236–243.
- Cerquetti, L., Sampaoli, C., Amendola, D., Bucci, B., Masuelli, L., Marchese, R., Misiti, S., De Venanzi, A., Poggi, M., Toscano, V., Stigliano, A., 2011. Rosiglitazone induces autophagy in H295R and cell cycle deregulation in SW13 adrenocortical cancer cells. *Exp. Cell Res.* 317, 1397–1410.
- Chajès, V., Thiébaud, A.C.M., Rotival, M., Gauthier, E., Maillard, V., Boutron-Ruault, M.-C., Joulin, V., Lenoir, G.M., Clavel-Chapelon, F., 2008. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am. J. Epidemiol.* 167, 1312–1320.
- Chang, A.J., Song, D.H., Wolfe, M.M., 2006. Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) mediates gastrin-stimulated colorectal cancer cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 281, 14700–14710.
- Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Gavrilova, O., Reitman, M.L., 2000. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 106, 1221–1228.
- Chbicheb, S., Yao, X., Rodeau, J.-L., Salamone, S., Boisbrun, M., Thiel, G., Spohn, D., Grillier-Vuissoz, I., Chapleur, Y., Flament, S., Mazerbourg, S., 2011. EGR1 expression: a calcium and ERK1/2 mediated PPAR γ -independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1087–1097.
- Chen, C.-H., Huang, P.-H., Chu, P.-C., Chen, M.-C., Chou, C.-C., Wang, D., Kulp, S.K., Teng, C.-M., Wang, Q., Chen, C.-S., 2011. Energy restriction-mimetic agents induce apoptosis in prostate cancer cells in part through epigenetic activation of KLF6 tumor suppressor gene expression. *J. Biol. Chem.* 286, 9968–9976.
- Chen, X., Yang, L., Zhai, S., 2012. Risk of cardiovascular disease and all-cause mortality among diabetic patients prescribed rosiglitazone or pioglitazone: a meta-analysis of retrospective cohort studies. *Chin. Med. J.* 125, 4301–4306.
- Chojkier, M., 2005. Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology* 41, 237–246.
- Chopra, B., Georgopoulos, N.T., Nicholl, A., Hinley, J., Oleksiewicz, M.B., Southgate, J., 2009. Structurally diverse peroxisome proliferator-activated receptor agonists induce apoptosis in human uro-epithelial cells by a receptor-independent mechanism involving store-operated calcium channels. *Cell Prolif.* 42, 688–700.
- Ciardi, T., Henry, R.R., 1997. Thiazolidinediones and their effects on glucose transporters. *Eur. J. Endocrinol.* 137, 610–612.

- Clay, C.E., Namen, A.M., Atsumi, G., Willingham, M.C., High, K.P., Kute, T.E., Trimboli, A.J., Fonteh, A.N., Dawson, P.A., Chilton, F.H., 1999. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20, 1905–1911.
- Colca, J.R., McDonald, W.G., Waldon, D.J., Leone, J.W., Lull, J.M., Bannow, C.A., Lund, E.T., Mathews, W.R., 2004. Identification of a novel mitochondrial protein (“mitoNEET”) cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E252–260.
- Colley, S.M., Leedman, P.J., 2009. SRA and its binding partners: an expanding role for RNA-binding coregulators in nuclear receptor-mediated gene regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 25–33.
- Copland, J.A., Marlow, L.A., Kurakata, S., Fujiwara, K., Wong, A.K.C., Kreinest, P.A., Williams, S.F., Haugen, B.R., Klopper, J.P., Smallridge, R.C., 2006. Novel high-affinity PPARgamma agonist alone and in combination with paclitaxel inhibits human anaplastic thyroid carcinoma tumor growth via p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 25, 2304–2317.
- Cravedi, J.-P., Zalko, D., Savouret, J.-F., Menuet, A., Jégou, B., 2007. [The concept of endocrine disruption and human health]. *Med Sci (Paris)* 23, 198–204.
- Cronet, P., Petersen, J.F., Folmer, R., Blomberg, N., Sjöblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E.L., Bamberg, K., 2001. Structure of the PPARalpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure* 9, 699–706.
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., Hajnóczky, G., 2010. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol. Cell* 39, 121–132.
- Cyr, D.M., Hebert, D.N., 2009. Protein quality control—linking the unfolded protein response to disease. Conference on “From Unfolded Proteins in the Endoplasmic Reticulum to Disease”. *EMBO Rep.* 10, 1206–1210.

➤ D

- Davies, G.F., Ross, A.R., Arnason, T.G., Juurlink, B.H.J., Harkness, T.A.A., 2010. Troglitazone inhibits histone deacetylase activity in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 288, 236–250.
- De Almagro, M.C., Vucic, D., 2012. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp. Oncol.* 34, 200–211.
- Debrock, G., Vanhentenrijk, V., Scot, R., Debiec-Rychter, M., Oyen, R., Van Oosterom, A., 2003. A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br. J. Cancer* 89, 1409–1412.
- Delozier, T., 2010. [Hormonal treatment in breast cancer]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 39, F71–78.
- Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M., Singer, S., 1999. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3951–3956.
- Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649–688.
- Dixit, V.A., Bharatam, P.V., 2011. Toxic metabolite formation from Troglitazone (TGZ): new insights from a DFT study. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1113–1122.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., Wahli, W., 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, 879–887.
- Duan, S.Z., Usher, M.G., Mortensen, R.M., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ. Res.* 102, 283–294.

Dumitrescu, R.G., Cotarla, I., 2005. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med.* 9, 208–221.

Duran-Sandoval, D., Thomas, A.-C., Bailleul, B., Fruchart, J.-C., Staels, B., 2003. [Pharmacology of PPARalpha, PPARgamma and dual PPARalpha/gamma agonists in clinical development]. *Med Sci (Paris)* 19, 819–825.

➤ E

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687–1717.

Eckenrode, E.F., Yang, J., Velmurugan, G.V., Foskett, J.K., White, C., 2010. Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 13678–13684.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., Lluch, A., 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 38, 698–707.

European Medicines Agency. 2012. http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000582/WC500029260.pdf

➤ F

Fan, Y.-H., Chen, H., Natarajan, A., Guo, Y., Harbinski, F., Iyasere, J., Christ, W., Aktas, H., Halperin, J.A., 2004. Structure-activity requirements for the antiproliferative effect of troglitazone derivatives mediated by depletion of intracellular calcium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 2547–2550.

Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W., 2006. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid Res.* 45, 120–159.

Feige, J.N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., Desvergne, B., 2005. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J. Biol. Chem.* 280, 17880–17890.

Feinstein, D.L., Spagnolo, A., Akar, C., Weinberg, G., Murphy, P., Gavriluk, V., Dello Russo, C., 2005. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key? *Biochem. Pharmacol.* 70, 177–188.

Fenner, M.H., Elstner, E., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 14, 557–568.

Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., Tschachler, E., 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 722–726.

Floyd, Z.E., Stephens, J.M., 2002. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 4062–4068.

Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M., 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803–812.

Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demaurex, N., Krause, K.H., 2000. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5723–5728.

- Freudlsperger, C., Thies, A., Pfüller, U., Schumacher, U., 2007. The proteasome inhibitor bortezomib augments anti-proliferative effects of mistletoe lectin-I and the PPAR-gamma agonist rosiglitazone in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 27, 207–213.
- Fu, H.Y., Okada, K., Liao, Y., Tsukamoto, O., Isomura, T., Asai, M., Sawada, T., Okuda, K., Asano, Y., Sanada, S., Asanuma, H., Asakura, M., Takashima, S., Komuro, I., Kitakaze, M., Minamino, T., 2010. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 122, 361–369.
- Fujita, M., Yagami, T., Fujio, M., Tohji, C., Takase, K., Yamamoto, Y., Sawada, K., Yamamori, M., Okamura, N., 2011. Cytotoxicity of troglitazone through PPAR γ -independent pathway and p38 MAPK pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 312, 219–227.
- Fujita, T., Sugiyama, Y., Taketomi, S., Sohda, T., Kawamatsu, Y., Iwatsuka, H., Suzuoki, Z., 1983. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes* 32, 804–810.

➤ G

- Gale, E.A.M., 2006. Troglitazone: the lesson that nobody learned? *Diabetologia* 49, 1–6.
- Galli, A., Ceni, E., Crabb, D.W., Mello, T., Salzano, R., Grappone, C., Milani, S., Surrenti, E., Surrenti, C., Casini, A., 2004. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPAR γ independent mechanisms. *Gut* 53, 1688–1697.
- Gampe, R.T., Jr, Montana, V.G., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Willson, T.M., Xu, H.E., 2000. Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell* 5, 545–555.
- Gani, O.A.B.S.M., Sylte, I., 2008. Ligand-induced stabilization and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Chem Biol Drug Des* 72, 50–57.
- Gardner, O.S., Shiau, C.-W., Chen, C.-S., Graves, L.M., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 280, 10109–10118.
- Geldenhuis, W.J., Funk, M.O., Awale, P.S., Lin, L., Carroll, R.T., 2011. A novel binding assay identifies high affinity ligands to the rosiglitazone binding site of mitoNEET. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 5498–5501.
- Giam, M., Huang, D.C.S., Bouillet, P., 2008. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 27 Suppl 1, S128–136.
- GLOBOCAN. (2008). <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>
- Glorian, M., Duplus, E., Beale, E.G., Scott, D.K., Granner, D.K., Forest, C., 2001. A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie* 83, 933–943.
- Gonzalez, I.C., Lamar, J., Iradier, F., Xu, Y., Winneroski, L.L., York, J., Yumibe, N., Zink, R., Montrose-Rafizadeh, C., Etgen, G.J., Broderick, C.L., Oldham, B.A., Mantlo, N., 2007. Design and synthesis of a novel class of dual PPAR γ /delta agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1052–1055.
- Göttlicher, M., Widmark, E., Li, Q., Gustafsson, J.A., 1992. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4653–4657.

- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134–139.
- Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J., 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150–1154.
- Greene, M.E., Blumberg, B., McBride, O.W., Yi, H.F., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G., Nimer, S.D., 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 4, 281–299.
- Grillier-Vuissoz, I., Mazerbourg, S., Boisbrun, M., Kuntz, S., Chapleur, Y., Flament, S., 2013. In press. PPAR γ -independent Activity of Thiazolidinediones: A Promising Mechanism of Action for Anticancer Drugs? *J. Carcinogene Mutagene*.
- Grommes, C., Landreth, G.E., Heneka, M.T., 2004. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.* 5, 419–429.
- Grommes, C., Landreth, G.E., Sastre, M., Beck, M., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Schlegel, U., Heneka, M.T., 2006. Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. *Mol. Pharmacol.* 70, 1524–1533.
- Guedj, M., Marisa, L., de Reynies, A., Orsetti, B., Schiappa, R., Bibeau, F., MacGrogan, G., Lerebours, F., Finetti, P., Longy, M., Bertheau, P., Bertrand, F., Bonnet, F., Martin, A.L., Feugeas, J.P., Bièche, I., Lehmann-Che, J., Lidereau, R., Birnbaum, D., Bertucci, F., de Thé, H., Theillet, C., 2012. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* 31, 1196–1206.
- Guh, J.-H., Chang, W.-L., Yang, J., Lee, S.-L., Wei, S., Wang, D., Kulp, S.K., Chen, C.-S., 2010. Development of novel adenosine monophosphate-activated protein kinase activators. *J. Med. Chem.* 53, 2552–2561.

➤ H

- Haffner, S.M., Greenberg, A.S., Weston, W.M., Chen, H., Williams, K., Freed, M.I., 2002. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106, 679–684.
- Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., Papa, F.R., 2009. IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 138, 562–575.
- Han, S., Sidell, N., Fisher, P.B., Roman, J., 2004. Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human lung carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 10, 1911–1919.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271–274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., Ron, D., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619–633.
- Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H.M., Mueller, E., Spiegelman, B.M., 2000. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J. Biol. Chem.* 275, 18527–18533.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M.G., Yin, Y., Khramtsov, A.I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R.I., Brown, P.H., Green, J.E., Kopelovich, L., Furth, P.A., Palazzo, J.P., Olopade, O.I.,

- Bernard, P.S., Churchill, G.A., Van Dyke, T., Perou, C.M., 2007. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.
- Herynk, M.H., Fuqua, S.A.W., 2004. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* 25, 869–898.
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., Korsmeyer, S.J., 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312, 572–576.
- Hewitt, N.J., Lloyd, S., Hayden, M., Butler, R., Sakai, Y., Springer, R., Fackett, A., Li, A.P., 2002. Correlation between troglitazone cytotoxicity and drug metabolic enzyme activities in cryopreserved human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 142, 73–82.
- Higgins, L.S., Depaoli, A.M., 2010. Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 267S–272S.
- Hollien, J., Weissman, J.S., 2006. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 313, 104–107.
- Home, P.D., Pocock, S.J., Beck-Nielsen, H., Curtis, P.S., Gomis, R., Hanefeld, M., Jones, N.P., Komajda, M., McMurray, J.J.V., RECORD Study Team, 2009. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet* 373, 2125–2135.
- Horvitz, H.R., 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59, 1701s–1706s.
- Houssami, N., Cuzick, J., Dixon, J.M., 2006. The prevention, detection, and management of breast cancer. *Med. J. Aust.* 184, 230–234.
- Howell, A., 2005. The future of fulvestrant (“Faslodex”). *Cancer Treat. Rev.* 31 Suppl 2, S26–33.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I.S., Jäättelä, M., 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol. Cell* 25, 193–205.
- Høyer-Hansen, M., Jäättelä, M., 2007. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 14, 1576–1582.
- Hsu, M.H., Palmer, C.N., Song, W., Griffin, K.J., Johnson, E.F., 1998. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J. Biol. Chem.* 273, 27988–27997.
- Huang, J.-W., Shiau, C.-W., Yang, J., Wang, D.-S., Chiu, H.-C., Chen, C.-Y., Chen, C.-S., 2006. Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents. *J. Med. Chem.* 49, 4684–4689.
- Huang, J.-W., Shiau, C.-W., Yang, Y.-T., Kulp, S.K., Chen, K.-F., Brueggemeier, R.W., Shapiro, C.L., Chen, C.-S., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 67, 1342–1348.



- Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W., Desvergne, B., 1997. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J. Biol. Chem.* 272, 20108–20117.

Ikeda, H., Taketomi, S., Sugiyama, Y., Shimura, Y., Sohda, T., Meguro, K., Fujita, T., 1990. Effects of pioglitazone on glucose and lipid metabolism in normal and insulin resistant animals. *Arzneimittelforschung* 40, 156–162.

INCa. Institut National du Cancer. Le cancer du sein : état des lieux en 2012. (2012).

http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=inca%2Btraitement%2Bhormonal%2Bsubstitutif%2Brisque%2Bcancer%2Bsein&source=web&cd=3&cad=rja&ved=0CEEQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.e-cancer.fr%2Fcomponent%2Fdocman%2Fdoc_download%2F9001-le-cancer-du-sein--etat-des-lieux-en-2012&ei=qhHIUfaGCMrY0QXfgYGQBw&usq=AFQjCNECXvtEY50vGLL3dTuaabx6Hj6JQ&bvm=bv.48705608,d.d2k

InVS. Institut de Veille Sanitaire. Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. Rapport technique. . (2011).

http://www.invs.sante.fr/content/download/12524/76003/version/1/file/rapport_mortalite_cancer.pdf

Issemann, I., Green, S., 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645–650.

Iwamoto, F., Umemoto, T., Motojima, K., Fujiki, Y., 2011. Nuclear transport of peroxisome-proliferator activated receptor alpha; *J. Biochem.* 149, 311–319.

Iwata, Y., Miyamoto, S., Takamura, M., Yanagisawa, H., Kasuya, A., 2001. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its agonists: docking study of oximes having 5-benzyl-2,4-thiazolidinedione. *J. Mol. Graph. Model.* 19, 536–542, 598–600.

➤ J

Jan, H.-J., Lee, C.-C., Lin, Y.-M., Lai, J.-H., Wei, H.-W., Lee, H.-M., 2009. Rosiglitazone reduces cell invasiveness by inducing MKP-1 in human U87MG glioma cells. *Cancer Lett.* 277, 141–148.

Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B., 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82–86.

Jin, Z., El-Deiry, W.S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 4, 139–163.

➤ K

Kagawa, S., Gu, J., Honda, T., McDonnell, T.J., Swisher, S.G., Roth, J.A., Fang, B., 2001. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin. Cancer Res.* 7, 1474–1480.

Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.-L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Pollack, J.R., 2009. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS ONE* 4, e6146.

Kar, R., Singha, P.K., Venkatachalam, M.A., Saikumar, P., 2009. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells. *Oncogene* 28, 2556–2568.

Kassahun, K., Pearson, P.G., Tang, W., McIntosh, I., Leung, K., Elmore, C., Dean, D., Wang, R., Doss, G., Baillie, T.A., 2001. Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates in vitro and in vivo. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 62–70.

- Kaufmann, T., Strasser, A., Jost, P.J., 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 19, 42–50.
- Kebebew, E., Peng, M., Reiff, E., Treseler, P., Woeber, K.A., Clark, O.H., Greenspan, F.S., Lindsay, S., Duh, Q.-Y., Morita, E., 2006. A phase II trial of rosiglitazone in patients with thyroglobulin-positive and radioiodine-negative differentiated thyroid cancer. *Surgery* 140, 960–966; discussion 966–967.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Keshamouni, V.G., Arenberg, D.A., Reddy, R.C., Newstead, M.J., Anthwal, S., Standiford, T.J., 2005. PPAR-gamma Activation Inhibits Angiogenesis by Blocking ELR+CXC Chemokine Production in Non-small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* 7, 294–301.
- Khorasanizadeh, S., Rastinejad, F., 2001. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 384–390.
- Kim, B.M., Maeng, K., Lee, K.-H., Hong, S.H., 2011. Combined treatment with the Cox-2 inhibitor niflumic acid and PPAR γ ligand ciglitazone induces ER stress/caspase-8-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Cancer Lett.* 300, 134–144.
- Kim, K.W., Moretti, L., Mitchell, L.R., Jung, D.K., Lu, B., 2010. Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by perk-eIF2 α in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene* 29, 3241–3251.
- Kim, K.Y., Kim, S.S., Cheon, H.G., 2006. Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 72, 530–540.
- Kim, Y., Suh, N., Sporn, M., Reed, J.C., 2002. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 22320–22329.
- Kim, Y.H., Jung, E.M., Lee, T.-J., Kim, S.H., Choi, Y.H., Park, J.W., Park, J.-W., Choi, K.S., Kwon, T.K., 2008. Rosiglitazone promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptor 5 and down-regulation of c-FLIP. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1055–1068.
- Klee, M., Pallauf, K., Alcalá, S., Fleischer, A., Pimentel-Muiños, F.X., 2009. Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J.* 28, 1757–1768.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., Lehmann, J.M., 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813–819.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., Evans, R.M., 1992. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771–774.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., Momoi, T., 2007. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14, 230–239.
- Kulke, M.H., Demetri, G.D., Sharpless, N.E., Ryan, D.P., Shivdasani, R., Clark, J.S., Spiegelman, B.M., Kim, H., Mayer, R.J., Fuchs, C.S., 2002. A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 8, 395–399.



- Lacassagne, A., 1936. Hormonal Pathogenesis of Adenocarcinoma of the Breast. *The American Journal of Cancer* 27, 217–228.
- Lalloyer, F., Staels, B., 2010. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 894–899.
- Lamote, I., Meyer, E., Massart-Leën, A.M., Burvenich, C., 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids* 69, 145–159.
- Latour, M.G., Alquier, T., Oseid, E., Tremblay, C., Jetton, T.L., Luo, J., Lin, D.C.-H., Poitout, V., 2007. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 56, 1087–1094.
- Laudet, V., 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 207–226.
- Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H., 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115, 2665–2672.
- lecerveau.ca. http://lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html
- Lecomte, J., Flament, S., Salamone, S., Boisbrun, M., Mazerbourg, S., Chapleur, Y., Grillier-Vuissoz, I., 2008. Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 112, 437–451.
- Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmann, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R.M., Chen, J.-L., Li, Y., 2002. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J. Biol. Chem.* 277, 19649–19657.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., Kaufman, R.J., 2002. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 16, 452–466.
- Lee, K.-H., Hsu, E.-C., Guh, J.-H., Yang, H.-C., Wang, D., Kulp, S.K., Shapiro, C.L., Chen, C.-S., 2011. Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator. *J. Biol. Chem.* 286, 39247–39258.
- Leesnitzer, L.M., Parks, D.J., Bledsoe, R.K., Cobb, J.E., Collins, J.L., Consler, T.G., Davis, R.G., Hull-Ryde, E.A., Lenhard, J.M., Patel, L., Plunket, K.D., Shenk, J.L., Stimmel, J.B., Therapontos, C., Willson, T.M., Blanchard, S.G., 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 41, 6640–6650.
- Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M., Kliewer, S.A., 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 272, 3406–3410.
- Lei, K., Davis, R.J., 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2432–2437.
- Li, G., Mongillo, M., Chin, K.-T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R., Tabas, I., 2009. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 186, 783–792.
- Li, G., Scull, C., Ozcan, L., Tabas, I., 2010. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J. Cell Biol.* 191, 1113–1125.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501.

- Li, J., Lee, B., Lee, A.S., 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J. Biol. Chem.* 281, 7260–7270.
- Liao, W., Nguyen, M.T.A., Yoshizaki, T., Favelyukis, S., Patsouris, D., Imamura, T., Verma, I.M., Olefsky, J.M., 2007. Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E219–227.
- Lim, H.J., Moon, I., Han, K., 2004. Transcriptional cofactors exhibit differential preference toward peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in uterine cells. *Endocrinology* 145, 2886–2895.
- Lin, H.-Y., Kuo, Y.-C., Weng, Y.-I., Lai, I.-L., Huang, T.H.-M., Lin, S.-P., Niu, D.-M., Chen, C.-S., 2012. Activation of silenced tumor suppressor genes in prostate cancer cells by a novel energy restriction-mimetic agent. *Prostate* 72, 1767–1778.
- Lipscombe, L.L., Gomes, T., Lévesque, L.E., Hux, J.E., Juurlink, D.N., Alter, D.A., 2007. Thiazolidinediones and cardiovascular outcomes in older patients with diabetes. *JAMA* 298, 2634–2643.
- Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J.H., Walter, P., Reed, J.C., Glimcher, L.H., Hetz, C., 2009. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol. Cell* 33, 679–691.
- Liu, H., Zang, C., Fenner, M.H., Liu, D., Possinger, K., Koeffler, H.P., Elstner, E., 2006. Growth inhibition and apoptosis in human Philadelphia chromosome-positive lymphoblastic leukemia cell lines by treatment with the dual PPARalpha/gamma ligand TZD18. *Blood* 107, 3683–3692.
- Liu, H., Zang, C., Fenner, M.H., Possinger, K., Elstner, E., 2003. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* 79, 63–74.
- Liu, J., Lu, H., Huang, R., Lin, D., Wu, Xiangyuan, Lin, Q., Wu, Xinyao, Zheng, J., Pan, X., Peng, J., Song, Y., Zhang, M., Hou, M., Chen, F., 2005. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induced cell growth inhibition and its influence on matrix metalloproteinase activity in human myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56, 400–408.
- Liu, L.S., Tanaka, H., Ishii, S., Eckel, J., 1998. The new antidiabetic drug MCC-555 acutely sensitizes insulin signaling in isolated cardiomyocytes. *Endocrinology* 139, 4531–4539.
- Lloyd, S., Hayden, M.J., Sakai, Y., Fackett, A., Silber, P.M., Hewitt, N.J., Li, A.P., 2002. Differential in vitro hepatotoxicity of troglitazone and rosiglitazone among cryopreserved human hepatocytes from 37 donors. *Chem. Biol. Interact.* 142, 57–71.
- Loi, C.M., Alvey, C.W., Vassos, A.B., Randinitis, E.J., Sedman, A.J., Koup, J.R., 1999. Steady-state pharmacokinetics and dose proportionality of troglitazone and its metabolites. *J Clin Pharmacol* 39, 920–926.
- Lu, M., Kwan, T., Yu, C., Chen, F., Freedman, B., Schafer, J.M., Lee, E.-J., Jameson, J.L., Jordan, V.C., Cryns, V.L., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists promote TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 280, 6742–6751.
- Luo, D., He, Y., Zhang, H., Yu, L., Chen, H., Xu, Z., Tang, S., Urano, F., Min, W., 2008. AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* 283, 11905–11912.

➤ M

- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., Hendershot, L.M., 2002. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* 318, 1351–1365.

- Magenta, G., Borenstein, X., Rolando, R., Jasnis, M.A., 2008. Rosiglitazone inhibits metastasis development of a murine mammary tumor cell line LMM3. *BMC Cancer* 8, 47.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., Kroemer, G., 2007. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, 374–376.
- Malhi, H., Kaufman, R.J., 2011. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J. Hepatol.* 54, 795–809.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–3077.
- Martinet, J., and Houdebine, LM. (1993). *Biologie de la lactation*. INSERM INRA.
- Marx, N., Schönbeck, U., Lazar, M.A., Libby, P., Plutzky, J., 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 83, 1097–1103.
- Masubuchi, Y., 2006. Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 347–356.
- Mathai, J.P., Germain, M., Shore, G.C., 2005. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 280, 23829–23836.
- Mathivat, A., Cottet, J., 1953. [Clinical trials on the hypocholesteremia-producing effect of 2-phenylbutyric acid]. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 69, 1030–1048.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259.
- Metzger, D., Imai, T., Jiang, M., Takukawa, R., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., 2005. Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 51–58.
- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O’Rahilly, S., Palmer, C.N.A., Plutzky, J., Reddy, J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B., Wahli, W., 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 726–741.
- Mieczkowska, A., Baslé, M.F., Chappard, D., Mabileau, G., 2012. Thiazolidinediones induce osteocyte apoptosis by a G protein-coupled receptor 40-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 287, 23517–23526.
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., Davidson, N.E., 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 2666–2676.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799–1805.
- Mohan, M., Malayer, J.R., Geisert, R.D., Morgan, G.L., 2002. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biol. Reprod.* 66, 692–700.
- Monami, M., Lamanna, C., Marchionni, N., Mannucci, E., 2008. Rosiglitazone and risk of cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care* 31, 1455–1460.

- Morán-Salvador, E., Titos, E., Rius, B., González-Pérez, A., García-Alonso, V., López-Vicario, C., Miquel, R., Barak, Y., Arroyo, V., Clària, J., 2013. Cell-specific PPAR γ deficiency establishes antiinflammatory and antifibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells. *J. Hepatol.*
- Motomura, W., Okumura, T., Takahashi, N., Obara, T., Kohgo, Y., 2000. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 60, 5558–5564.
- Motomura, W., Takahashi, N., Nagamine, M., Sawamukai, M., Tanno, S., Kohgo, Y., Okumura, T., 2004. Growth arrest by troglitazone is mediated by p27Kip1 accumulation, which results from dual inhibition of proteasome activity and Skp2 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 108, 41–46.
- Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S., Spiegelman, B.M., 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol. Cell* 1, 465–470.
- Mueller, E., Smith, M., Sarraf, P., Kroll, T., Aiyer, A., Kaufman, D.S., Oh, W., Demetri, G., Figg, W.D., Zhou, X.P., Eng, C., Spiegelman, B.M., Kantoff, P.W., 2000. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10990–10995.
- Murata, T., He, S., Hangai, M., Ishibashi, T., Xi, X.P., Kim, S., Hsueh, W.A., Ryan, S.J., Law, R.E., Hinton, D.R., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2309–2317.

➤ N

- Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., Evans, R.M., 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373–380.
- Nagy, L., Schwabe, J.W.R., 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 29, 317–324.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., Evans, R.M., 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229–240.
- Nahta, R., Esteva, F.J., 2006. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.* 8, 215.
- Nakata, S., Yoshida, T., Shiraishi, T., Horinaka, M., Kouhara, J., Wakada, M., Sakai, T., 2006. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J(2) induces death receptor 5 expression through mRNA stabilization independently of PPARgamma and potentiates TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1827–1835.
- Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., Rossetti, L., Scherer, P.E., 2006. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* 281, 2654–2660.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., Milburn, M.V., 1998. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137–143.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J. Cell Biol.* 153, 1011–1022.

- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., Ron, D., 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22, 1180–1187.
- Nwankwo, J.O., Robbins, M.E., 2001. 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.

➤ O

- O'Shaughnessy, J., Osborne, C., Pippen, J.E., Yoffe, M., Patt, D., Rocha, C., Koo, I.C., Sherman, B.M., Bradley, C., 2011. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 364, 205–214.
- Oakes, S.A., Lin, S.S., Bassik, M.C., 2006. The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr. Mol. Med.* 6, 99–109.
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2005. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 105–110.
- Oberfield, J.L., Collins, J.L., Holmes, C.P., Goreham, D.M., Cooper, J.P., Cobb, J.E., Lenhard, J.M., Hull-Ryde, E.A., Mohr, C.P., Blanchard, S.G., Parks, D.J., Moore, L.B., Lehmann, J.M., Plunket, K., Miller, A.B., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Willson, T.M., 1999. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6102–6106.
- Odani, N., Negishi, M., Takahashi, S., Kitano, Y., Kozutsumi, Y., Ichikawa, A., 1996. Regulation of BiP gene expression by cyclopentenone prostaglandins through unfolded protein response element. *J. Biol. Chem.* 271, 16609–16613.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F., Imaizumi, K., 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9220–9231.
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., Mori, M., 2002. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 525–532.

➤ P

- Palakurthi, S.S., Aktas, H., Grubisich, L.M., Mortensen, R.M., Halperin, J.A., 2001. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res.* 61, 6213–6218.
- Panigrahy, D., Singer, S., Shen, L.Q., Butterfield, C.E., Freedman, D.A., Chen, E.J., Moses, M.A., Kilroy, S., Duensing, S., Fletcher, C., Fletcher, J.A., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Folkman, J., Kaipainen, A., 2002. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 110, 923–932.
- Park, B.-H., Lee, S.-B., Stolz, D.B., Lee, Y.J., Lee, B.-C., 2011. Synergistic interactions between heregulin and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) agonist in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 286, 20087–20099.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 2005. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759–763.

- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Peng, T.-I., Jou, M.-J., 2010. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 183–188.
- Perissi, V., Rosenfeld, M.G., 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 542–554.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
- Pishvaian, M.J., Marshall, J.L., Wagner, A.J., Hwang, J.J., Malik, S., Cotarla, I., Deeken, J.F., He, A.R., Daniel, H., Halim, A.-B., Zahir, H., Copigneaux, C., Liu, K., Beckman, R.A., Demetri, G.D., 2012. A phase 1 study of efatutazone, an oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, administered to patients with advanced malignancies. *Cancer* 118, 5403–5413.
- Plissonnier, M.-L., Fauconnet, S., Bittard, H., Lascombe, I., 2011. The antidiabetic drug ciglitazone induces high grade bladder cancer cells apoptosis through the up-regulation of TRAIL. *PLoS ONE* 6, e28354.
- Plissonnier, M.L., Fauconnet, S., Bittard, H., Lascombe, I., 2010. Insights on distinct pathways of thiazolidinediones (PPARgamma ligand)-promoted apoptosis in TRAIL-sensitive or -resistant malignant urothelial cells. *Int. J. Cancer* 127, 1769–1784.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., Perou, C.M., 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R68.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., Strasser, A., 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349.

➤ R

- Ramachandran, V., Kostrubsky, V.E., Komoroski, B.J., Zhang, S., Dorko, K., Esplen, J.E., Strom, S.C., Venkataramanan, R., 1999. Troglitazone increases cytochrome P-450 3A protein and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 27, 1194–1199.
- Rashid-Kolvear, F., Taboski, M.A.S., Nguyen, J., Wang, D.-Y., Harrington, L.A., Done, S.J., 2010. Troglitazone suppresses telomerase activity independently of PPARgamma in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *BMC Cancer* 10, 390.
- Read, W.L., Baggstrom, M.Q., Fracasso, P.M., Govindan, R., 2008. A phase I study of bexarotene and rosiglitazone in patients with refractory cancers. *Chemotherapy* 54, 236–241.
- Regula, K.M., Kirshenbaum, L.A., 2005. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 3–13.
- Rieusset, J., Wahli, W., Desvergne, B., 2001. Les récepteurs nucléaires PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) : trois isotypes pour de multiples fonctions. *Médecine thérapeutique* 7, 656–64.
- Ringa, V., Fournier, A., 2008. [Did the decrease in use of menopausal hormone therapy induce a decrease in the incidence of breast cancer in France (and elsewhere)?]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 297–301.

- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., Zecchini, E., Pinton, P., 2009. Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1342–1351.
- Robert, N.J., Diéras, V., Glaspy, J., Brufsky, A.M., Bondarenko, I., Lipatov, O.N., Perez, E.A., Yardley, D.A., Chan, S.Y.T., Zhou, X., Phan, S.-C., O’Shaughnessy, J., 2011. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1252–1260.
- Roche-Lestienne, C., Mahon, F.-X., Preudhomme, C., 2004. [Origin of resistance to Imatinib mesylate: lessons learned from this experience]. *Med Sci (Paris)* 20, 1125–1130.
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., Mortensen, R.M., 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–617.
- Russell-Jones, G., McTavish, K., McEwan, J., Rice, J., Nowotnik, D., 2004. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1625–1633.
- Russo, J., Russo, I.H., 2004. Development of the human breast. *Maturitas* 49, 2–15.

➤ S

- Saha, S., New, L.S., Ho, H.K., Chui, W.K., Chan, E.C.Y., 2010a. Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 192, 141–149.
- Saha, S., New, L.S., Ho, H.K., Chui, W.K., Chan, E.C.Y., 2010b. Direct toxicity effects of sulfo-conjugated troglitazone on human hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 195, 135–141.
- Sahi, J., Hamilton, G., Sinz, M., Barros, S., Huang, S.M., Lesko, L.J., LeCluyse, E.L., 2000. Effect of troglitazone on cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Xenobiotica* 30, 273–284.
- Saito, S., Takahashi, S., Takagaki, N., Hirose, T., Sakai, T., 2003. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 induces apoptosis through activation of the CHOP gene in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 17–23.
- Saraf, N., Sharma, P.K., Mondal, S.C., Garg, V.K., Singh, A.K., 2012. Role of PPARγ2 transcription factor in thiazolidinedione-induced insulin sensitization. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 161–171.
- Satoh, T., Toyoda, M., Hoshino, H., Monden, T., Yamada, Masanobu, Shimizu, H., Miyamoto, K., Mori, Masatomo, Yamada, Masanabu, Mori, Matsumoto, 2002. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene* 21, 2171–2180.
- Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J., El-Deiry, W.S., 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell Biol.* 4, 842–849.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 93–109.
- Schultze, K., Böck, B., Eckert, A., Oevermann, L., Ramacher, D., Wiestler, O., Roth, W., 2006. Troglitazone sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via down-regulation of FLIP and Survivin. *Apoptosis* 11, 1503–1512.

- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139.
- Seeler, J.-S., Dejean, A., 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 690–699.
- Semple, R.K., Chatterjee, V.K.K., O’Rahilly, S., 2006. PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 116, 581–589.
- Serfaty, D. (2011). *Contraception 4 ème édition*. Elsevier-Masson.
- Shao, D., Rangwala, S.M., Bailey, S.T., Krakow, S.L., Reginato, M.J., Lazar, M.A., 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* 396, 377–380.
- Shearer, B.G., Billin, A.N., 2007. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1082–1093.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., Prywes, R., 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.
- Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W., Gonzalez, F.J., 1993. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598–5604.
- Shiau, C.-W., Yang, C.-C., Kulp, S.K., Chen, K.-F., Chen, Chang-Shi, Huang, J.-W., Chen, Ching-Shih, 2005. Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res.* 65, 1561–1569.
- Shibue, T., Taniguchi, T., 2006. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int. J. Cancer* 119, 2036–2043.
- Shimazaki, N., Togashi, N., Hanai, M., Isoyama, T., Wada, K., Fujita, T., Fujiwara, K., Kurakata, S., 2008. Anti-tumour activity of CS-7017, a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist of thiazolidinedione class, in human tumour xenografts and a syngeneic tumour implant model. *Eur. J. Cancer* 44, 1734–1743.
- Shore, G.C., Papa, F.R., Oakes, S.A., 2011. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 143–149.
- Smallridge, R.C., Copland, J.A., Brose, M.S., Wadsworth, J.T., Houvras, Y., Menefee, M.E., Bible, K.C., Shah, M.H., Gramza, A.W., Klopper, J.P., Marlow, L.A., Heckman, M.G., Von Roemeling, R., 2013. Efatutazone, an oral PPAR-γ agonist, in combination with paclitaxel in anaplastic thyroid cancer: results of a multicenter phase 1 trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2392–2400.
- Smith, N.J., Stoddart, L.A., Devine, N.M., Jenkins, L., Milligan, G., 2009. The action and mode of binding of thiazolidinedione ligands at free fatty acid receptor 1. *J. Biol. Chem.* 284, 17527–17539.
- Sohda, T., Mizuno, K., Imamiya, E., Sugiyama, Y., Fujita, T., Kawamatsu, Y., 1982. Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 30, 3580–3600.
- Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S., Kaufman, R.J., 2008. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest.* 118, 3378–3389.
- Sozio, M.S., Lu, C., Zeng, Y., Liangpunsakul, S., Crabb, D.W., 2011. Activated AMPK inhibits PPAR- α and PPAR- γ transcriptional activity in hepatoma cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G739–747.
- Spiegelman, B.M., 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47, 507–514.

- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., Brewer, J.W., 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 167, 35–41.
- Stevenson, R.W., Hutson, N.J., Krupp, M.N., Volkman, R.A., Holland, G.F., Egger, J.F., Clark, D.A., McPherson, R.K., Hall, K.L., Danbury, B.H., 1990. Actions of novel antidiabetic agent englitazone in hyperglycemic hyperinsulinemic ob/ob mice. *Diabetes* 39, 1218–1227.
- Stoddart, L.A., Brown, A.J., Milligan, G., 2007. Uncovering the pharmacology of the G protein-coupled receptor GPR40: high apparent constitutive activity in guanosine 5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding studies reflects binding of an endogenous agonist. *Mol. Pharmacol.* 71, 994–1005.
- Su, R.-Y., Chi, K.-H., Huang, D.-Y., Tai, M.-H., Lin, W.-W., 2008. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 up-regulates death receptor 5 gene expression in HCT116 cells: involvement of reactive oxygen species and C/EBP homologous transcription factor gene transcription. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3429–3440.
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., Tang, P., 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)* 4, 35–41.
- Sugimura, A., Kiriya, Y., Nochi, H., Tsuchiya, H., Tamoto, K., Sakurada, Y., Ui, M., Tokumitsu, Y., 1999. Troglitazone suppresses cell growth of myeloid leukemia cell lines by induction of p21WAF1/CIP1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 833–837.
- Suh, N., Wang, Y., Honda, T., Gribble, G.W., Dmitrovsky, E., Hickey, W.F., Maue, R.A., Place, A.E., Porter, D.M., Spinella, M.J., Williams, C.R., Wu, G., Dannenberg, A.J., Flanders, K.C., Letterio, J.J., Mangelsdorf, D.J., Nathan, C.F., Nguyen, L., Porter, W.W., Ren, R.F., Roberts, A.B., Roche, N.S., Subbaramaiah, K., Sporn, M.B., 1999. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res.* 59, 336–341.
- Sundvold, H., Lien, S., 2001. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 383–390.

➤ T

- Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190.
- Tack, C.J., Smits, P., Demacker, P.N., Stalenhoef, A.F., 1998. Troglitazone decreases the proportion of small, dense LDL and increases the resistance of LDL to oxidation in obese subjects. *Diabetes Care* 21, 796–799.
- Takahashi, S., Odani, N., Tomokiyo, K., Furuta, K., Suzuki, M., Ichikawa, A., Negishi, M., 1998. Localization of a cyclopentenone prostaglandin to the endoplasmic reticulum and induction of BiP mRNA. *Biochem. J.* 335 (Pt 1), 35–42.
- Tarrade, A., Schoonjans, K., Guibourdenche, J., Bidart, J.M., Vidaud, M., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., Evain-Brion, D., 2001. PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 142, 4504–4514.
- Testino, G., 2011. The burden of cancer attributable to alcohol consumption. *Maedica (Buchar)* 6, 313–320.
- Tettey, J.N., Maggs, J.L., Rapeport, W.G., Pirmohamed, M., Park, B.K., 2001. Enzyme-induction dependent bioactivation of troglitazone and troglitazone quinone in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 965–974.
- Thorp, J.M., Waring, W.S., 1962. Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature* 194, 948–949.

- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.
- Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B.M., Sarraf, P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., Brun, R.P., Mueller, E., Altiock, S., Oppenheim, H., Evans, R.M., Spiegelman, B.M., 1997. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 237–241.
- Treuter, E., Albrechtsen, T., Johansson, L., Leers, J., Gustafsson, J.A., 1998. A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol. Endocrinol.* 12, 864–881.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., Green, S., 1992. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11, 433–439.

➤ U

- Uchida, K., Shibata, T., 2008. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic trigger of cellular responses. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 138–144.
- Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeborg, L., Berkenstam, A., 1998. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J. Biol. Chem.* 273, 31108–31112.
- Upton, J.-P., Austgen, K., Nishino, M., Coakley, K.M., Hagen, A., Han, D., Papa, F.R., Oakes, S.A., 2008. Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3943–3951.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.

➤ V

- Van Beekum, O., Fleskens, V., Kalkhoven, E., 2009. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* 17, 213–219.
- Vattem, K.M., Wek, R.C., 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11269–11274.
- Vignati, L., Turlizzi, E., Monaci, S., Grossi, P., Kanter, R. de, Monshouwer, M., 2005. An *in vitro* approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* 216, 154–167.
- Vogt, C., 1842. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothurn: Jent und Gassmann.
- Von Knethen, A., Tzieply, N., Jennewein, C., Brüne, B., 2010. Casein-kinase-II-dependent phosphorylation of PPARgamma provokes CRM1-mediated shuttling of PPARgamma from the nucleus to the cytosol. *J. Cell. Sci.* 123, 192–201.
- Von Schwarzenberg, K., Held, S.A.E., Schaub, A., Brauer, K.M., Bringmann, A., Brossart, P., 2009. Proteasome inhibition overcomes the resistance of renal cell carcinoma cells against the PPARgamma ligand troglitazone. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1295–1308.

➤ W

- Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Fujimoto, Y., Maebara, K., Kamiya, N., Jingami, H., Morikawa, K., 2009. Structural insight into PPAR γ activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J. Mol. Biol.* 385, 188–199.
- Wang, D., Chu, P.-C., Yang, C.-N., Yan, R., Chuang, Y.-C., Kulp, S.K., Chen, C.-S., 2012. Development of a novel class of glucose transporter inhibitors. *J. Med. Chem.* 55, 3827–3836.
- Wang, J.-J., Mak, O.-T., 2011. Induction of apoptosis by 15d-PGJ₂ via ROS formation: an alternative pathway without PPAR γ activation in non-small cell lung carcinoma A549 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 94, 104–111.
- Wang, P.-S., Chou, F.-S., Porchia, L., Saji, M., Pinzone, J.J., 2008. Troglitazone inhibits cell migration, adhesion, and spreading by modulating cytoskeletal rearrangement in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 47, 905–915.
- Wang, X., Olberding, K.E., White, C., Li, C., 2011. Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 38–47.
- Wang, X.Z., Kuroda, M., Sok, J., Batchvarova, N., Kimmel, R., Chung, P., Zinszner, H., Ron, D., 1998. Identification of novel stress-induced genes downstream of chop. *EMBO J.* 17, 3619–3630.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.
- Wei, S., Kulp, S.K., Chen, C.-S., 2010. Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones. *J. Biol. Chem.* 285, 9780–9791.
- Wei, S., Lin, L.-F., Yang, C.-C., Wang, Y.-C., Chang, G.-D., Chen, H., Chen, C.-S., 2007. Thiazolidinediones modulate the expression of beta-catenin and other cell-cycle regulatory proteins by targeting the F-box proteins of Skp1-Cul1-F-box protein E3 ubiquitin ligase independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Pharmacol.* 72, 725–733.
- Wei, S., Yang, H.-C., Chuang, H.-C., Yang, J., Kulp, S.K., Lu, P.-J., Lai, M.-D., Chen, C.-S., 2008. A novel mechanism by which thiazolidinediones facilitate the proteasomal degradation of cyclin D1 in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283, 26759–26770.
- Wei, Y., Sinha, S., Levine, B., 2008. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4, 949–951.
- Weng, J.-R., Chen, C.-Y., Pinzone, J.J., Ringel, M.D., Chen, C.-S., 2006. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 401–413.
- Werman, A., Hollenberg, A., Solanes, G., Bjorbaek, C., Vidal-Puig, A.J., Flier, J.S., 1997. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). Differential activity of PPAR γ 1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J. Biol. Chem.* 272, 20230–20235.
- Westin, S., Kurokawa, R., Nolte, R.T., Wisely, G.B., McInerney, E.M., Rose, D.W., Milburn, M.V., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 1998. Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 395, 199–202.
- Wiley, S.E., Murphy, A.N., Ross, S.A., van der Geer, P., Dixon, J.E., 2007. MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5318–5323.
- Willis, S.N., Adams, J.M., 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 617–625.

Wright, H.M., Clish, C.B., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., Serhan, C.N., Spiegelman, B.M., 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 275, 1873–1877.

➤ X

Xin, X., Yang, S., Kowalski, J., Gerritsen, M.E., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 9116–9121.

Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Plunket, K.D., Moore, L.B., Collins, J.L., Oplinger, J.A., Kliewer, S.A., Gampe, R.T., Jr, McKee, D.D., Moore, J.T., Willson, T.M., 2001. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13919–13924.

Xu, W., Cho, H., Kadam, S., Banayo, E.M., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, Emerson, B.M., Evans, R.M., 2004. A methylation-mediator complex in hormone signaling. *Genes Dev.* 18, 144–156.

Xue, Y., Daly, A., Yngvadottir, B., Liu, M., Coop, G., Kim, Y., Sabeti, P., Chen, Y., Stalker, J., Huckle, E., Burton, J., Leonard, S., Rogers, J., Tyler-Smith, C., 2006. Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 659–670.

➤ Y

Yamaguchi, H., Wang, H.-G., 2004. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279, 45495–45502.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K., 2007. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev. Cell* 13, 365–376.

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

Yamamoto, Y., Yamazaki, H., Ikeda, T., Watanabe, T., Iwabuchi, H., Nakajima, M., Yokoi, T., 2002. Formation of a novel quinone epoxide metabolite of troglitazone with cytotoxicity to HepG2 cells. *Drug Metab. Dispos.* 30, 155–160.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., Kadowaki, T., 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769.

Yan, J., Yang, H., Wang, G., Sun, L., Zhou, Y., Guo, Y., Xi, Z., Jiang, X., 2010. Autophagy augmented by troglitazone is independent of EGFR transactivation and correlated with AMP-activated protein kinase signaling. *Autophagy* 6, 67–73.

Yang, F., Zhang, Z., Xin, D., Shi, C., Wu, J., Guo, Y., Guan, Y., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 753–761.

Yang, J., Wei, S., Wang, D.-S., Wang, Y.-C., Kulp, S.K., Chen, C.-S., 2008. Pharmacological exploitation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ciglitazone to develop a novel class of androgen receptor-ablative agents. *J. Med. Chem.* 51, 2100–2107.

Yang, W., Cheng, Y., Xu, T., Wang, X., Wen, L.-P., 2009. Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. *Eur J Med Chem* 44, 862–868.

- Yang, Y.-C., Ho, T.-C., Chen, S.-L., Lai, H.-Y., Wu, J.-Y., Tsao, Y.-P., 2007. Inhibition of cell motility by troglitazone in human ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer* 7, 216.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364.
- Yee, L.D., Williams, N., Wen, P., Young, D.C., Lester, J., Johnson, M.V., Farrar, W.B., Walker, M.J., Povoski, S.P., Suster, S., Eng, C., 2007. Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. *Clin. Cancer Res.* 13, 246–252.
- 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.
- Yokoi, T., 2010. Troglitazone. *Handb Exp Pharmacol* 419–435.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., Tohyama, M., 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* 276, 13935–13940.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881–891.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., Mori, K., 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 172, 565–575.
- Yoshikawa, T., Brkanac, Z., Dupont, B.R., Xing, G.Q., Leach, R.J., Detera-Wadleigh, S.D., 1996. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPAR δ), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics* 35, 637–638.
- Yu, H.-N., Lee, Y.-R., Noh, E.-M., Lee, K.-S., Kim, J.-S., Song, E.-K., Han, M.-K., Lee, Y.-C., Kwon, K.-B., Lee, S.-J., Youn, H.J., Jung, S.H., 2008. Induction of G1 phase arrest and apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by troglitazone, a synthetic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligand. *Cell Biol. Int.* 32, 906–912.
- Yu, J.W., Shi, Y., 2008. FLIP and the death effector domain family. *Oncogene* 27, 6216–6227.
- Yue, W., Yager, J.D., Wang, J.-P., Jupe, E.R., Santen, R.J., 2013. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 78, 161–170.

➤ Z

- Zang, C., Liu, H., Bertz, J., Possinger, K., Koeffler, H.P., Elstner, E., Eucker, J., 2009. Induction of endoplasmic reticulum stress response by TZD18, a novel dual ligand for peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma, in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2296–2307.
- Zang, C., Liu, H., Waechter, M., Eucker, J., Bertz, J., Possinger, K., Koeffler, H.P., Elstner, E., 2006. Dual PPARalpha/gamma ligand TZD18 either alone or in combination with imatinib inhibits proliferation and induces apoptosis of human CML cell lines. *Cell Cycle* 5, 2237–2243.
- Zhang, B., Szalkowski, D., Diaz, E., Hayes, N., Smith, R., Berger, J., 1994. Potentiation of insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by thiazolidinedione-derived antidiabetic agents in Chinese hamster ovary cells expressing human insulin receptors and L6 myotubes. *J. Biol. Chem.* 269, 25735–25741.
- Zhang, K., Kaufman, R.J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455–462.

- Zhang, W., Wu, N., Li, Z., Wang, L., Jin, J., Zha, X.-L., 2006. PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via upregulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1008–1014.
- Zhou, Y.-M., Wen, Y.-H., Kang, X.-Y., Qian, H.-H., Yang, J.-M., Yin, Z.-F., 2008. Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, induces growth inhibition and apoptosis of HepG2 human liver cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 14, 2168–2173.
- Zhu, Z., Wang, X., Shen, Z., Lu, Y., Zhong, S., Xu, C., 2013. Risk of bladder cancer in patients with diabetes mellitus: an updated meta-analysis of 36 observational studies. *BMC Cancer* 13, 310.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D., 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12, 982–995.
- Zong, W.-X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.-C., Yuan, J., Thompson, C.B., 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162, 59–69.
- Zou, W., Liu, X., Yue, P., Khuri, F.R., Sun, S.-Y., 2007. PPARgamma ligands enhance TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and c-FLIP downregulation in human lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 6, 99–106.

RESUME

L'un des enjeux majeurs de la recherche anti-cancéreuse est de développer de nouvelles thérapies en direction des tumeurs réfractaires aux traitements conventionnels. Dans ce contexte, l'identification récente de l'activité anti-tumorale PPAR γ -indépendante des thiazolidinediones ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques. Au sein du laboratoire, il a été montré qu'un analogue inactif de la TGZ, la Δ 2-TGZ, induit une dégradation protéasome-dépendante du récepteur α aux œstrogènes de manière PPAR γ -indépendante. A partir de ces données, les objectifs de ma thèse ont été **1)** de participer à la caractérisation de nouveaux composés à activité anti-cancéreuse **2)** de mieux comprendre les mécanismes PPAR γ -indépendants mis en jeu dans l'effet anti-cancéreux des TZD.

Lors de ce travail de thèse, nous avons caractérisé de nouveaux composés plus efficaces que la Δ 2-TGZ pour l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 et faiblement toxiques sur des cultures primaires d'hépatocytes humains. De plus, nous avons montré que la Δ 2-TGZ est capable d'induire un stress du réticulum endoplasmique à des temps précoces dès 3 heures et une apoptose à des temps plus tardifs 48 heures. Cependant, nous n'avons pas pu conclure à l'existence d'un lien entre les deux mécanismes. Enfin, nous avons montré que la biotinylation d'un ligand naturel de PPAR γ , la 15d-PGJ2, accroît son effet anti-prolifératif sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 et conduit à un stress du réticulum endoplasmique et à une mort par apoptose. Ces effets sont partiellement dépendants de PPAR γ pour le stress du réticulum endoplasmique mais strictement PPAR γ -indépendants pour l'apoptose.

Ce travail pourrait permettre de constituer de nouveaux outils thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein.

Mots-clés : cancer mammaire, PPAR γ -indépendants, thiazolidinediones, apoptose, stress du réticulum endoplasmique.

ABSTRACT

One of the main goals of the anti-cancer research is to develop new therapeutic option for resistant tumor. In this context, the recent discovery of thiazolidinedione devoid of PPAR γ activity with a strong anti-cancer effect opens new perspectives. In a previous study, the laboratory showed that an inactive derivative of PPAR γ , the Δ 2-TGZ, induce a proteasome-dependent degradation of estrogen receptor α in PPAR γ -independent way. Thus, during my thesis we aimed **1)** to participate in the study of new compounds less toxic and more effective to inhibit the proliferation of mammary cancer cells, **2)** to better understand PPAR γ -independent mechanisms involved in the anti-cancer effect of the TZD.

In the present work, we characterise new compounds more effective than Δ 2-TGZ to inhibit the proliferation of the breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 and are less toxic on primary culture of human hepatocytes. We pursued the study on mechanisms involved in PPAR γ -independent anti-proliferative activity of Δ 2-TGZ. We showed that Δ 2-TGZ is able to induce endoplasmic reticulum stress as soon as 3 hours and apoptosis in later times 48 hours of treatment. Nevertheless we could not conclude of the existence of a link between these two pathways. Finally, we studied the effect of the biotinylation of a natural ligand of PPAR γ : the 15d-PGJ2. This modification drive to an increased effect of the 15d-PGJ2 on the anti-proliferative effect of breast cancer cells, reticulum endoplasmic stress and death by apoptosis. These effects are partially PPAR γ -dependent for reticulum endoplasmic stress and only PPAR γ -independent for apoptosis.

This work highlighted new promising tools of breast cancers treatment.

Key words: breast cancer, PPAR γ -independent, thiazolidinedione, apoptosis, endoplasmic reticulum stress.