



**HAL**  
open science

# Tissu adipeux et résistance tumorale aux thérapies ciblées

Aline Geneste

► **To cite this version:**

Aline Geneste. Tissu adipeux et résistance tumorale aux thérapies ciblées. Cancer. Université de Lyon, 2018. Français. NNT: 2018LYSE1115 . tel-01911229

**HAL Id: tel-01911229**

**<https://theses.hal.science/tel-01911229>**

Submitted on 2 Nov 2018

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

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

N°d'ordre NNT : 2018LYSE1115

# **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Opérée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N°340**  
**Biologie Moléculaire, Intégrative et cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Biologie

**Discipline** : Cancérologie

Soutenue publiquement le 06/07/2018, par :

**Aline GENESTE**

---

## **Tissu adipeux et résistance tumorale aux thérapies ciblées**

---

Devant le jury composé de :

CHARAFE-JAUFFRET Emmanuelle, Professeure des Universités-Praticien Hospitalier, Université Aix Marseille, Rapporteuse

VASSON Marie-Paule, Professeure des Universités-Praticien Hospitalier, Université Clermont Auvergne, Rapporteuse

MULLER Catherine, Professeure des Universités, Université Toulouse 3, Examinatrice

VIDAL Hubert, Directeur de Recherche INSERM, Université Lyon 1, Président du jury

DUMONTET Charles, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Lyon 1,

Directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE



## Titre : Tissu adipeux et résistance tumorales aux thérapies ciblées

Les thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de la tyrosine kinase ont permis d'améliorer le traitement du cancer du sein en ciblant HER2. Cependant, il a été observé que le lapatinib était moins efficace chez les patients obèses ou en surpoids que chez les patients de poids normal.

Nous avons d'abord reproduit l'effet de résistance des cellules de cancer du sein au lapatinib en présence de tissu adipeux tel qu'il a été observé pour d'autres thérapies. Les cellules tumorales qui surexpriment HER2 étaient partiellement résistantes au lapatinib mais également à d'autres inhibiteurs de la tyrosine kinase lorsqu'elles étaient en contact avec le milieu conditionné d'adipocytes. En implantant du tissu adipeux humain et des tumeurs humaines chez la souris, nous avons pu étudier la résistance du cancer du sein au lapatinib *in vivo*.

Pour comprendre le mécanisme de cette résistance, nous avons exposé les adipocytes à plusieurs modulateurs du métabolisme. La cytotoxicité cellulaire induite par le lapatinib était plus faible pour les cellules tumorales exposées à un milieu conditionné d'adipocytes préalablement incubés avec les alpha-bloquants qu'à un milieu conditionné à partir d'adipocytes seuls. De la même manière, cette toxicité était inférieure pour les agonistes des récepteurs alpha adrénergiques, pour les bêtabloquants et pour les inhibiteurs de lipolyse. Au contraire, la cytotoxicité a été augmentée pour les cellules tumorales en contact avec le milieu conditionné d'adipocytes exposés aux agonistes du récepteur bêta-adrénergiques.

Au niveau des cellules cancéreuses, l'arrêt du cycle cellulaire induit par

le lapatinib était réduit pour les cellules tumorales exposées au milieu conditionné d'adipocytes en ce qui concerne le pourcentage de cellules dans la phase G0/G1. Ceci s'est vérifié en étudiant l'expression des gènes codant pour plusieurs protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire.

Title: Adipose tissue and tumor resistance to targeted therapies

Targeted therapies as tyrosine kinase inhibitors permitted an improvement of breast cancer therapies by targeting HER2. However, resistance has been observed in obese patients for lapatinib treatment.

We reproduced the effect of resistance of breast cancer cells to lapatinib in presence of adipose tissue as observed for other therapies. Tumor cells overexpressing HER2 was partly resistant to lapatinib but also for other tyrosine kinase inhibitors when in contact with adipocyte-conditioned medium. By implanting human adipose tissue and human tumors in mice, we were able to study the resistance of breast tumor cells *in vivo*.

In order to elucidate the mechanism of such resistance, we exposed the adipocytes to several metabolism modulators. The lapatinib-induced cell cytotoxicity was lower for the tumor cells exposed to the conditioned medium from adipocytes earlier exposed to alpha blockers than to the conditioned medium from adipocytes alone. In the same manner, the toxicity was lower for the agonists of alpha-adrenergic receptors, for beta-blockers and for the lipolysis inhibitors. At the opposite, the cytotoxicity was enhanced for tumor cells in contact with the conditioned medium of adipocytes exposed to the agonists of beta adrenergic receptors.

At the tumor cell level, the lapatinib-induced cell cycle arrest was reduced for the tumor cells exposed to the conditioned medium regarding the G0/G1 phase. That was verified by the study of the expression of genes involved in the cell cycle progression.



**Mots clés :**

Tissu adipeux

Cancer

Résistance

Lapatinib

Thérapies ciblées

Bétabloquants

**Keywords:**

Adipose tissue

Cancer

Resistance

Lapatinib

Targeted therapies

Beta-blockers

Cette thèse a été préparée dans l'équipe Anticorps-Anticancer dirigée par le Professeur Charles DUMONTET, unité INSERM U1052, CNRS 5286 situé au 8 Avenue Rockefeller 69008 LYON.

## REMERCIEMENTS

*J'aimerais remercier en premier les membres du jury pour leur implication dans ce travail. Le Pr. Catherine Muller qui n'a malheureusement pas pu assister à cette soutenance mais merci quand même d'avoir accepté de faire partie du jury et également pour votre générosité et vos précieux conseils durant notre collaboration et par la suite. Merci au Pr. Marie-Paule Vasson avec qui la collaboration a également été très enrichissante et pour son rapport très positif sur ma thèse. Merci également au Pr. Emmanuelle Charafe-Jauffret pour son travail de rapportrice et pour sa présence. Merci beaucoup au Dr. Hubert Vidal qui, non seulement, a accepté de faire partie des membres du jury mais qui a aussi fait partie de mon comité de suivi de thèse. Avoir son soutien régulier durant ces trois années a été très bénéfique et précieux pour moi.*

*Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans le Pr. Charles Dumontet qui m'a accueilli et qui m'a proposé ce projet de recherche qui correspondait parfaitement à ce que je recherchais. Merci Charles de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidée tout en me laissant autonome. J'ai appris énormément de chose pendant ces années et je t'en suis extrêmement reconnaissante.*

*Un grand merci à tous les membres de l'équipe Anticorps Anticancer et tout particulièrement au Dr. Lars Petter Jordheim pour ses conseils avisés tout au long de ma thèse mais également pour son aide au moment de ma thèse de pharmacie, je sais que je t'ai donné quelques frayeurs à ce moment-là... Merci à Eva, Emeline, Sabine, Zineb et Aurore pour votre aide technique. Merci aux stagiaires qui ont travaillé avec moi Victoire, Maud et surtout Ludivine, mes six derniers mois de thèse ont été tellement plus simples grâce à toi... Merci également à tous les autres thésards pour les supers moments passés ensemble Ivana, Octavia, Chloé, Sarah, Juliette, David, Muhammad... Merci Kamel pour tes conseils et aussi pour nos parties de rigolades.*

*Un petit mot pour mes amis d'Amiens et de Lyon qui ont été d'un soutien vital et qui m'ont permis de me changer les idées.*

*Je voudrais également remercier mes parents qui m'ont soutenu pendant ces interminables années d'études même s'ils n'arrivaient plus trop à comprendre où me mènerait tout ça... La fierté dans vos yeux me fait avancer. Merci également à grand-père et Manou d'être des grands-parents aussi aimants et inspirants. Je n'oublie pas mes frères bien sûr Eric, Olivier et Philippe, les piliers de ma vie et de ma famille.*

*Merci Daniel, ta présence, ton amour, ton respect et ton admiration m'ont déjà aidé à réussir l'internat comme je le souhaitais il y a 5 ans et tu m'as, à nouveau, donné la force et la motivation de terminer cette thèse. Je sais qu'on peut tout réussir ensemble et je sens que l'avenir nous réserve une nouvelle vie à trois pleine de bonheur... Et merci aussi à tes parents, Nina et Gérard d'avoir accepté d'assister à cet événement si important pour moi. J'espère que nous partagerons encore beaucoup de choses ensemble.*



# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	19
1. Généralités sur le cancer .....	22
1.1. Epidémiologie .....	22
1.2. Traitements .....	22
2. Le cancer du sein.....	24
2.1. La classification des tumeurs mammaires .....	24
2.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase.....	25
2.3. Les thérapies ciblées dans le cancer du sein .....	28
2.3.1 Les anticorps monoclonaux.....	28
2.3.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase .....	28
2.3.3. Mécanismes de résistance aux traitements.....	29
3. Le tissu adipeux.....	33
3.1. Organisation du tissu adipeux-Les différents types de tissus adipeux.....	33
3.2. Différenciation adipocytaire ou adipogénèse.....	34
3.3. Morphologie et fonctions d'un adipocyte.....	36
3.3.1. Fonctions métaboliques du TA .....	36
3.3.2. Activité sécrétoire du TA .....	41
3.4. Le développement pathologique et l'altération du TA : l'obésité .....	44
4. Etude du rôle du TA dans la réponse aux traitements anticancéreux.....	47
4.1. Relation entre l'obésité et la réponse au traitement .....	47
4.2. Environnement adipocytaire et diminution de sensibilité aux traitements anticancéreux .....	49
4.2.1. Modèles murins <i>in vivo</i> .....	51
4.2.2. Modèles cellulaires <i>in vitro</i> .....	54
4.3. Mécanismes de résistance envisagés .....	61
4.3.1. Séquestration de principe actif par les adipocytes .....	61
4.3.2. Cycle cellulaire.....	62
4.3.3. Expression de gènes de survie.....	65
4.3.4. Autophagie .....	66

4.3.5. Fonction des pompes d'efflux .....	66
4.4. Facteurs responsables.....	69
4.4.2. Interleukine-6 .....	70
4.4.3. Hormones .....	71
4.4.4. Acides aminés .....	71
4.4.5. miARN .....	71
CONCLUSION .....	73
PARTIE EXPERIMENTALE.....	77
PARTIE I.....	78
Adipocyte-conditioned medium induces resistance of breast cancer cells to lapatinib .....	78
PARTIE II .....	115
Xenotransplantation of human adipose tissue in SCID mice: a model of proximity between adipose tissue and tumors.....	115
DISCUSSION GENERALE .....	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	153

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Risque relatif de survenue de différents cancers en fonction du statut pondéral.....	21
Tableau 2. Etudes démontrant une résistance aux agents cytotoxiques induite par le TA .....	50

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les protéines à activité tyrosine kinase .....	27
Figure 2. Les différents mécanismes de résistance d'une cellule tumorale pour un agent thérapeutique. ....	32
Figure 3. La différenciation adipocytaire. ....	35
Figure 4. Les mécanismes liant l'obésité et le cancer. ....	46
Figure 5. formation d'une tumeur accolée à un lipome .....	53
Figure 6. Systèmes d'exposition des cellules tumorales aux adipocytes ou leurs sécrétions .....	56
Figure 7. Evolution du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S pour les cellules eucaryotes.	64
Figure 8. Sécrétome adipocytes .....	68



## ABBREVIATIONS

IMC	Indice de Masse Corporelle
TA	Tissu Adipeux
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
5FU	5-fluorouracile
TKI/ITK	Tyrosine Kinase Inhibitor/Inhibiteur de Tyrosine Kinase
WHO/OMS	World Health Organization/Organisation Mondiale de la Santé
ER	Estrogen Receptor/récepteur aux œstrogènes
PR	Progesterone Receptor/récepteur à la progestérone
RTK	Receptor Tyrosine Kinase/récepteur à activité tyrosine kinase
EGF	Epidermal Growth Factor/facteur de croissance épidermique
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor/facteur de croissance épidermique
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases/protéines kinases activées par mitogénèse
PI3K	PhosphoInositide-3-phosphate kinase/kinase phosphoinositide-3-phosphate
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor/récepteur au facteur de croissance fibroblastique
FGF	Fibroblast Growth Factor/facteur de croissance fibroblastique
HGFR	Hepatocyte Growth Factor Receptor/récepteur au facteur de croissance hépatocytaire
HGF	Hepatocyte Growth Factor/facteur de croissance hépatocytaire
T-DM1	Trastuzumab-Emtansine
NK	Natural Killer
ADCC	Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity
HAS	Haute Autorité de Santé



PK	Pharmacocinétique
PD	Pharmacodynamie
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition/transition épithélio-mésenchymateuse
NRG1	Neureguline-1
TIMP-1	Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1
IL-6	Interleukine-6
TG	Triglycérides
TAG	Triacylglycérol
DAG	Diacyglycérol
MAG	Monoacylglycérol
AG	Acides Gras
AGL	Acide gras libre
HSL	Hormone sensitive lipase
ATGL	Adipose triglyceride lipase
TGH	Triacylglycerol hydrolase
MGL	Monoglyceride lipase
LPL	Lipoprotéine Lipase
CD36	Cluster de différenciation 36
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
IL-1	Interleukine-1
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
LAL	Leucémie Aigue Lymphoblastique
MM	Myélome multiple

LAM	Leucémie Aigue Myéloblastique
Chk1	Protéine Kinase Checkpoint-1
P-gp	Glycoprotéine-P
miARN	MicroARN
FCS	Fetal Calf Serum
CM	Conditioned Medium/milieu conditionné
#3T3	Adipocyte 3T3F442A matures
3T3	Prédipocytes 3T3F442A
Control Medium	Milieu contrôle
#medium	Milieu de différenciation
qPCR	Quantitative Polymerisation Chain Reaction/Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
IC50	Half maximal Inhibitory Concentration/Concentration nécessaire pour inhiber 50% de la croissance cellulaire



## INTRODUCTION

Les dernières données épidémiologiques montrent que la prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter à travers le monde. Les données épidémiologiques montrent qu'il y a trois fois plus de personnes obèses en 2016 qu'en 1975. Cela représente 13% de la population totale dont 11% d'hommes et 15% de femmes en 2016 (1). Les données statistiques ont clairement établi un lien entre l'obésité et l'augmentation d'incidence de nombreuses pathologies dont le cancer (2). En 2016, l'Agence internationale de recherche en cancérologie (IARC) a cité 13 types de cancers dont le risque de survenue augmente avec l'obésité dont le cancer du sein, le cancer colorectal, de l'endomètre, de l'œsophage, de la vésicule biliaire, du rein et du poumon (tableau 1) (3). Il a également été démontré que les adultes ayant conservé un poids normal et stable avaient moins de risque de développer des cancers tels que le cancer du sein post ménopause, le cancer colorectal, de l'endomètre et du rein que les personnes ayant pris du poids après l'âge de 25 ans (4). Une étude française a étudié les nouveaux cas de cancers sur l'année 2015 et a également trouvé une corrélation positive entre le poids des patients et la survenue de cancers avec 18500 cancers sur 350 000 imputables au surpoids et l'obésité (5). De plus, de nombreuses études ont démontré un lien entre l'obésité et une évolution péjorative de la maladie par rapport aux patients de poids normal atteints du même cancer. Ces critères d'évolution défavorables incluent une moins bonne qualité de vie du patient, un risque augmenté de progression et de rechute tumorale, notamment chez les patients atteints de cancer du sein, de la prostate et le cancer colorectal (6,7).

L'exposé comportera tout d'abord une partie bibliographique avec une brève description de la pathologie cancéreuse mammaire comprenant les caractéristiques et les traitements des cellules tumorales, puis du tissu adipeux, ses différentes formes, son organisation, ses fonctions où nous détaillerons principalement la lipolyse, la lipogenèse et la fonction sécrétrice et enfin le développement pathologique du tissu adipeux dans le cadre de l'obésité. Nous développerons ensuite un aperçu des données épidémiologiques reliant l'obésité et la résistance des traitements anticancéreux suivi des données expérimentales de la littérature concernant ce sujet. Puis, dans la partie expérimentale qui comportera deux articles, sera décrit l'ensemble des expériences et résultats obtenus lors du travail de recherche concernant le rôle des adipocytes dans la résistance des cellules tumorales aux thérapies anticancéreuses ainsi que la caractérisation de notre modèle

murin de proximité entre tissu adipeux et tumeur. Cette partie concernera essentiellement le lapatinib et le cancer du sein. Pour finir, une Discussion reprendra l'ensemble des données afin d'évaluer les résultats obtenus et de proposer des perspectives du projet. Ce travail a été effectué dans l'équipe Anticorps-Anticancer du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, sous la direction du Professeur Charles Dumontet et dans le cadre d'une thèse d'université.

Type de cancer ou localisation	Puissance de l'association chez l'homme	Risque relatif de la catégorie présentant le plus haut IMC versus celle avec un IMC normal (95% IC)
Adénocarcinome de l'œsophage	Suffisante	4.8 (3.0-7.7)
Estomac (cardia)	Suffisante	1.8 (1.3-2.5)
Colorectal	Suffisante	1.2 (1.3-1.4)
Foie	Suffisante	1.8 (1.6-2.1)
Vésicule biliaire	Suffisante	1.3 (1.2-1.4)
Pancréas	Suffisante	1.5 (1.2-1.8)
sein postménopause	Suffisante	1.1 (1.1-1.2)
Endomètre	Suffisante	7.1 (6.3-8.1)
Ovaire	Suffisante	1.1 (1.1-1.2)
Rein	Suffisante	1.8 (1.7-1.9)
Méningiome	Suffisante	1.5 (1.3-1.8)
Thyroïde	Suffisante	1.1 (1.0-1.1)
Myélome multiple	Suffisante	1.5 (1.2-2.0)
Cancer du sein chez l'homme	Limitée	NA
Cancer de la prostate fatal	Limitée	NA
Lymphome aigue à larges cellules B	Inadéquate	NA
Œsophage	Inadéquate	NA
Estomac (non cardia)	Inadéquate	NA
Voies biliaires extra hépatiques	Inadéquate	NA
Poumon	Inadéquate	NA
Peau	Inadéquate	NA
Testicules	Inadéquate	NA
Vessie	Inadéquate	NA
Gliome	Inadéquate	NA

**Tableau 1. Risque relatif de survenue de différents cancers en fonction du statut pondéral. De Lauby-Secretan et al (3))**

La puissance d'association (PA) entre le surpoids et une augmentation du risque relatif indique que l'Agence pour la Recherche en Cancérologie considère qu'il existe une relation préventive entre l'absence d'excès de TA et le risque de cancers chez l'homme. Le critère de jugement de la PA a été estimé par rapport aux biais et aux facteurs confondants des études sources. Ainsi, une PA suffisante a été observée à partir d'études dans lesquelles les biais et les facteurs confondants peuvent être écartés avec certitude. Une PA limitée indique que les facteurs et les biais des études à l'origine des résultats ne peuvent pas être écartés avec certitude. Enfin, une PA inadéquate signifie que les données disponibles proviennent d'études dont la qualité et la puissance statistique sont insuffisantes pour conclure en l'absence ou la présence d'une association entre IMC et risque de cancer. Le calcul du risque relatif a été calculé en cas de PA suffisante et non pour les autres car non applicable (NA).

Les risques relatifs calculés proviennent de méta-analyses ou d'analyses groupées.

## 1. Généralités sur le cancer

### 1.1. Epidémiologie

L'incidence des cancers ne cesse d'augmenter avec plus de 14 millions de nouveaux cas en 2012 (8). Malgré des progrès considérables dans le traitement de cette maladie et une augmentation de la survie des patients atteints de cancer (9), 8,2 millions de personnes en sont décédées en 2012 (8). Le cancer est la première cause de décès en France, devant les maladies cardiovasculaires. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme avec 1,7 millions de nouveaux cas dans le monde en 2012 (10). Cela représente environ 12% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer et 25% des nouveaux cas de cancer chez la femme.

### 1.2. Traitements

Les traitements anticancéreux ont fait l'objet de nombreuses recherches depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle et continuent d'essuyer un certain nombre d'échecs obligeant les stratégies thérapeutiques à évoluer et à rechercher de nouvelles approches (11). Aujourd'hui la chirurgie reste le traitement de première intention, associée aux technologies d'imagerie récentes pour de nombreux cancers. Le recours à l'irradiation permet de cibler de manière précise certaines tumeurs difficilement opérables. La chimiothérapie, découverte à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle est souvent utilisée en complément de la chirurgie et de l'irradiation afin de toucher les cellules à renouvellement rapide ayant essaimé à distance du foyer primitif. La capacité des cellules tumorales à muter et à développer des résistances aux molécules de chimiothérapie ainsi que les nombreux effets indésirables de ces traitements ont poussé les chercheurs à trouver des thérapies plus spécifiques ciblant uniquement la tumeur tout en préservant les tissus sains. Ces thérapies ciblées sont utilisées en fonction de l'expression de cibles moléculaires spécifiques de certains types tumoraux. De la même manière, des cancers sensibles aux hormones appelés hormono-dépendants peuvent être contrôlés grâce à l'utilisation de thérapies hormonales. Les

recommandations actuelles conseillent l'utilisation combinée de plusieurs approches thérapeutiques afin de ne pas permettre à la tumeur de développer des mécanismes d'échappement aux thérapeutiques.

### **La chimiothérapie**

La chimiothérapie cytotoxique est utilisée comme traitement systémique du cancer. Il s'agit d'agents thérapeutiques dont le mécanisme d'action principal est d'éradiquer les cellules en division. Les molécules de chimiothérapie sont regroupées en plusieurs classes selon leur mécanisme d'action.

- Les agents alkylants et apparentés tels que le cyclophosphamide, agent alkylant de la famille des moutardes à l'azote, qui forme des liaisons covalentes avec les nucléotides de l'ADN et inhibe ainsi sa réplication (12).
- Les antimétabolites, ces agents bloquent ou détournent une ou plusieurs voies de synthèse de l'ADN. Par exemple, la gemcitabine qui agit de manière dose et temps dépendante, est spécifique de la phase S du cycle cellulaire (13). En effet, elle s'incorpore au niveau de l'ADN et induit des erreurs de cadre de lecture au moment de la réplication. Le 5-fluorouracile (5FU) fait également partie de cette classe, il inhibe la synthèse de la thymidine, composant essentiel de l'ADN, par blocage de l'enzyme thymidilate synthase (14).
- Les agents intercalants de l'ADN comme les anthracyclines dont font partie la daunorubicine et la doxorubicine s'intercalent entre les bases de l'ADN, bloquant ainsi sa réplication.
- Les poisons du fuseau tels que les vinca alcaloïdes et les taxanes bloquent la division cellulaire en phase métaphasique. La vincristine est un alcaloïde qui empêche la polymérisation de la tubuline à forte concentration et donc la formation du fuseau mitotique rendant la division cellulaire impossible. Le paclitaxel agit également à ce niveau en stabilisant la tubuline sous sa forme polymérisée (15).

Des traitements plus spécifiques peuvent être utilisés en fonction du type de cancer :

**Les thérapies hormonales** utilisées dans le traitement de certains cancers comme celui du sein chez la femme ou de la prostate chez l'homme (16,17). Certaines tumeurs telles que le cancer du sein ou de l'endomètre sont sensibles aux estrogènes et/ou à la progestérone tandis que le cancer



de la prostate est sensible à la testostérone. Plusieurs inhibiteurs agissant sur la production de ces hormones ou leur interaction avec les récepteurs ont été développés.

**Les thérapies ciblées** sont apparues grâce à la biologie moléculaire qui a permis d'identifier des biomarqueurs spécifiques des cellules tumorales qui pourront être ciblés spécifiquement. Il en existe plusieurs sortes telles que les anticorps monoclonaux ou les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). Les anticorps monoclonaux peuvent être dirigés contre une molécule membranaire telle que HER2 dans le cancer du sein ou contre un facteur de croissance comme le facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF responsable de l'angiogenèse (18).

#### **L'inhibiteur de protéasome, le bortezomib.**

Le protéasome est une structure au sein du cytoplasme qui permet de recycler les déchets de la cellule. Son inhibition entraîne donc l'accumulation de déchets qui deviennent toxiques pour la cellule ainsi que d'autres processus tels que le stress du réticulum endoplasmique à l'origine de la mort cellulaire (19).

## 2. Le cancer du sein

### 2.1. La classification des tumeurs mammaires

Les tumeurs mammaires, comme toutes les tumeurs, sont d'abord classées selon leur taille, l'atteinte ganglionnaires et la présence de métastases (classification TNM). Elles sont également classées en fonction de leurs types histologiques et de l'expression de certains biomarqueurs moléculaires tels que les récepteurs hormonaux et Her2. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a décrit 20 types histologiques de tumeurs mammaires qui ne sont plus utilisés aujourd'hui mais qui reflètent la grande diversité de ces tumeurs (20).

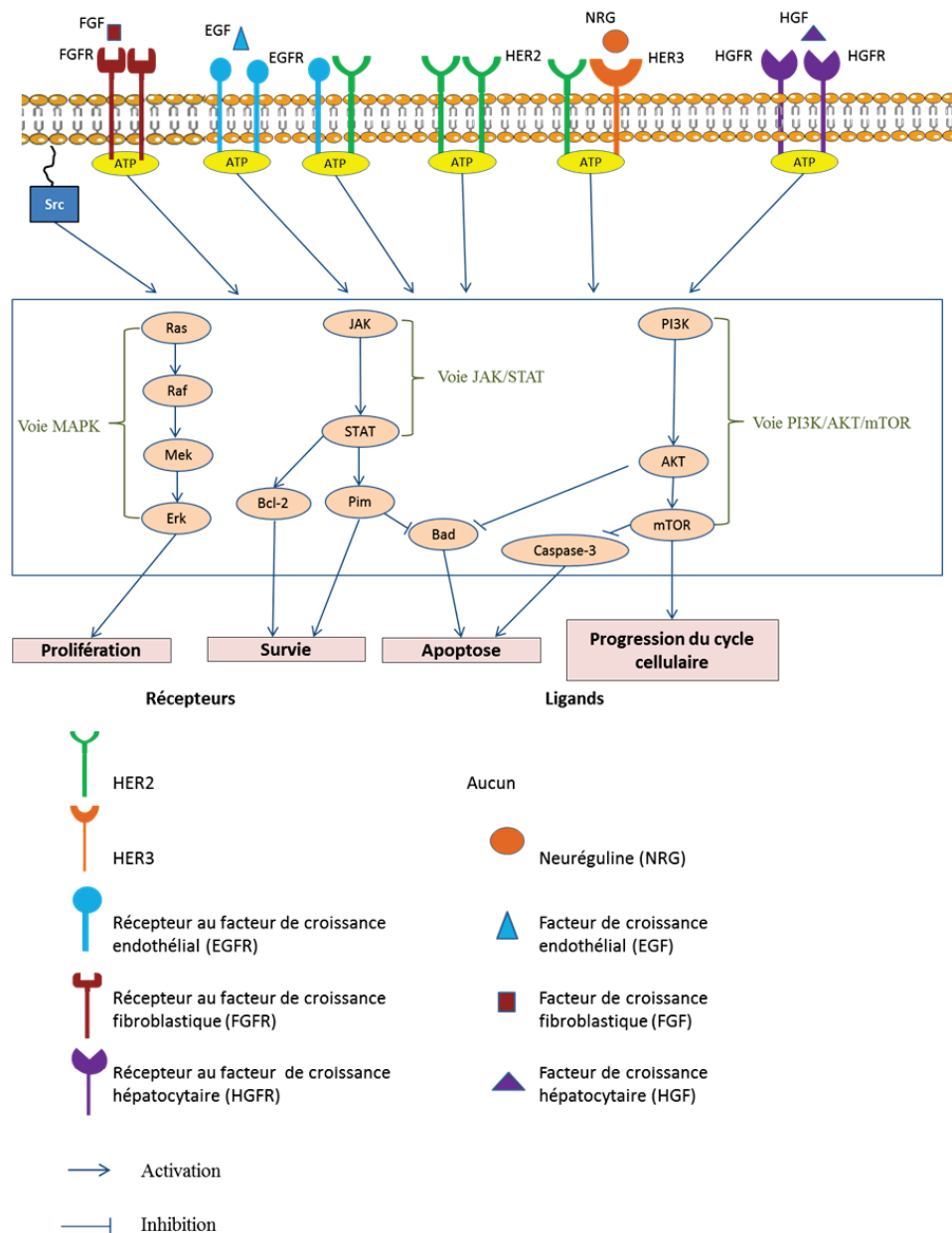
Les biomarqueurs actuellement identifiés et évalués en clinique pour la prise en charge des personnes atteintes de cancer du sein sont les récepteurs aux estrogènes (ER), à la progestérone (PR) et la protéine HER2. La présence de récepteurs aux hormones ER et PR est retrouvée dans 80% des cas et orientera le traitement vers une hormonothérapie (21). HER2 est une protéine membranaire surexprimée dans 15 à 20% des cancers du sein et cette surexpression est associée à un plus mauvais pronostic en l'absence de traitement spécifique et à un plus grand risque de

rechute après traitement (22,23). L'activité de cette protéine est médiée par son domaine intracytoplasmique à activité tyrosine kinase, le classant dans la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase même si l'absence de ligand ne permet pas de définir HER2 comme un récepteur. Beaucoup d'efforts ont été fournis afin de développer des thérapeutiques ciblant spécifiquement cette protéine, dont des anticorps monoclonaux et des inhibiteurs de tyrosine kinase.

## 2.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des protéines qui comportent un domaine extracellulaire, une boucle unique membranaire et une partie intracellulaire. Le ligand se fixe sur le domaine extracellulaire et la partie intracellulaire transmet le message via l'activation de la tyrosine kinase. HER2 appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinase car il possède la structure et la fonctionnalité d'un récepteur à activité ligand même si aucun ligand endogène ne lui a été attribué à ce jour et qu'il ne peut donc pas être considéré comme un récepteur. Il a été décrit quatre membres dans cette famille, à savoir HER1 également appelé EGFR ou ERBB1, HER2 ou ERBB2, HER3 et HER4. Du fait de l'absence de ligand, HER2 est constitutionnellement sous forme active et son activité de transduction du signal se fait après homodimérisation entre deux protéines HER2 (24). L'hétérodimérisation avec un autre récepteur de la même famille est possible aussi, le partenaire privilégié de HER2 étant EGFR qui est activé en présence de son ligand, le facteur de croissance épidermique (EGF). Dans le cas du cancer du sein surexprimant HER2, les capacités de dimérisation et de transduction de signaux intracellulaires sont donc augmentées. La dimérisation des récepteurs à activité tyrosine kinase a pour résultat la fixation d'une molécule d'ATP suivie d'une cascade de phosphorylation de plusieurs voies de signalisation (figure 1). Celles-ci comprennent la voie des protéines kinases activées par mitogénèse (MAPK) et la voie de la kinase phosphatidylinositol-3 (PI3K)/AKT/mTOR, ces voies contrôlent la prolifération et la survie cellulaire (24,25). Il existe d'autres RTK exprimés de manière ubiquitaire et plus particulièrement à la membrane des cellules de cancer du sein. Parmi ces RTK, nous parlerons du récepteur de facteur de croissance fibroblastique (FGFR) qui a pour ligand le facteur de croissance fibroblastique (FGF) et du récepteur de facteur de croissance hépatocytaire (HGFR ou c-Met) dont le ligand est le facteur de

croissance hépatocytaire (HGF) (26,27). Des protéines à activité tyrosine kinase peuvent activer les voies de signalisation, c'est le cas de Src qui peut être activé par EGFR par exemple. Les différents RTK se différencient par leur ligand mais également par leur pouvoir catalytique. Ainsi, HER2 a l'activité catalytique la plus importante des RTK de la famille des ERBB. A l'inverse, HER4 n'active aucune voie de signalisation par lui-même.



**Figure 1. Les protéines à activité tyrosine kinase**

La dimérisation des récepteurs à activité protéine kinase entraîne la fixation d'une molécule d'ATP puis une cascade de phosphorylation de divers acteurs des voies de signalisation intracellulaire des MAPK, de PI3k/AKT/mTOR et de JAK/STAT qui résulte en la prolifération, la survie cellulaire et la progression du cycle cellulaire. D'autres protéines à activité tyrosine kinase peuvent activer ces voies intracellulaires, c'est le cas de Src.

### 2.3. Les thérapies ciblées dans le cancer du sein

Les premières thérapies ciblées développées dans le cancer du sein étaient dirigées contre les récepteurs aux hormones ou la synthèse d'hormones directement. Nous ne développerons ici que les thérapies ciblant HER2 qui comprennent les anticorps monoclonaux et les ITK.

#### 2.3.1 Les anticorps monoclonaux

Plusieurs anticorps monoclonaux ont été mis au point et approuvés pour le traitement des tumeurs mammaires dont le trastuzumab, le pertuzumab et le trastuzumab-emtansine (T-DM1). Le trastuzumab possède un mécanisme d'action qui n'est pas encore totalement compris. Il se fixe au domaine extracellulaire de HER2 et une partie de son action se fait par inhibition de la signalisation de HER2 (28). Il agit également par recrutement de cellules de l'immunité, les cellules Natural Killer (NK) qui vont être responsables du mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Le pertuzumab se fixe également sur le domaine extracellulaire de HER2 mais pas sur le même site que le trastuzumab, et est considéré comme un inhibiteur de dimérisation (29). Le trastuzumab-emtansine, quant à lui, est un dérivé du trastuzumab auquel a été greffé un agent cytotoxique, inhibiteur des microtubules. L'internalisation du complexe HER2/T-DM1 permet de libérer l'agent cytotoxique dans la cellule où il exercera son action (30).

#### 2.3.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Les ITK se fixent sur le domaine intracellulaire des protéines à activité tyrosine kinase afin d'empêcher la fixation de la molécule d'ATP, ce qui inhibe l'activation des voies de signalisation. Plusieurs ITK ont été développés pour le traitement des cancers et sont actuellement approuvés en clinique. C'est le cas, par exemple, du sorafenib qui est indiqué dans le traitement du carcinome hépatocellulaire et du carcinome rénal, le vemurafenib qui est utilisé dans le traitement de certains mélanomes ou encore le dasatinib qui est approuvé pour le traitement de leucémies (31). Dans le cas du cancer du sein plusieurs ITK ont été envisagés comme les inhibiteurs d'EGFR, tels que le gefitinib et l'erlotinib (32). Cependant, étant donné la capacité de formation d'hétérodimères de HER2 avec des RTK, le ciblage de plusieurs RTK simultanément par le

lapatinib qui se lie de manière réversible à la fois à EGFR et à HER2 a été étudié dans les cancers du sein Her2+. Afin d'effectuer un blocage encore plus complet, des ITK tels que l'afatinib ont été mis au point. L'afatinib bloque de manière irréversible à la fois EGFR, HER2 et HER4 (33).

Alors que l'afatinib est approuvé et utilisé dans le cancer du poumon depuis 2013, le lapatinib est, à ce jour, le seul ITK à être approuvé et utilisé dans le traitement du cancer du sein (31,34). Il se fixe spécifiquement et de manière réversible au niveau du domaine intracellulaire de HER2 mais également d'EGFR, bloquant ainsi l'homo- et l'hétéro-dimérisation de HER2. *In vitro*, son activité est visible par une diminution de la prolifération et de la mort cellulaire qui s'accompagne de la diminution de l'activité des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT/mTOR et par la modification d'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (35–37).

La diversité des agents thérapeutiques et les nouvelles thérapies ciblées ont permis d'améliorer considérablement la prise en charge des patients. Cependant, cela implique de prendre certaines précautions afin d'être le plus efficace possible et d'éviter les rechutes. En effet, le traitement des cancers se fait selon des protocoles très précis, définis par l'Haute Autorité de Santé (HAS) en France. Par exemple, il est indispensable d'associer plusieurs molécules de chimiothérapie agissant sur des cibles différentes, au cours de plusieurs cycles ainsi, même si la cellule mute le gène codant pour une de ces cibles, les autres sont encore touchées. Cela limite l'apparition de résistances aux traitements que nous allons décrire maintenant.

### 2.3.3. Mécanismes de résistance aux traitements

Plusieurs mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses ont été décrits, ces résistances peuvent être de nature constitutive ou acquise. Comme décrit dans la Figure 2, une molécule thérapeutique présente dans l'organisme des caractéristiques pharmacocinétique (PK) et de pharmacodynamie (PD) qui lui sont propres (38). La cellule tumorale peut résister de multiples manières à l'effet de cette molécule thérapeutique. Elle peut tout d'abord empêcher l'activation de la molécule si cette molécule nécessite d'être activée par phosphorylation par exemple ou, au contraire, la cellule peut inactiver l'agent thérapeutique.

Ensuite, une cellule tumorale peut moduler l'expression de la cible de la molécule thérapeutique. C'est le cas du 5FU pour lequel les cellules cancéreuses compensent l'inhibition de la thymidylate synthase en augmentant sa production. Elle peut aussi modifier l'expression de la cible par mutation, cela a été décrit comme mécanisme de résistance à l'ITK gefitinib par exemple, via la mutation d'EGFR (39–41) ou encore augmenter l'expression et l'action de ses mécanismes d'élimination des toxiques. Il s'agit des pompes d'efflux comme la BCRP dont la surexpression est connue dans la résistance des tumeurs mammaires à certaines chimiothérapies (42).

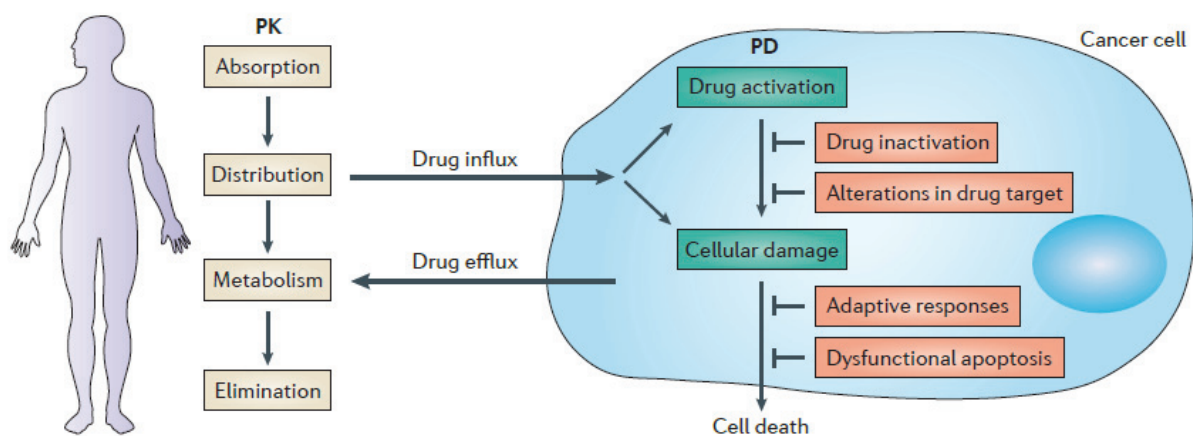
La cellule cancéreuse peut également compenser les effets d'une molécule cytotoxique en optimisant ses mécanismes de réparation de l'ADN ou en agissant en aval de l'altération de l'ADN en augmentant sa résistance à l'apoptose, ou ses capacités d'autophagie. Nous reparlerons de ces mécanismes dans le chapitre 4.3. D'autre part, la cellule tumorale peut résister aux dommages qui lui sont causés en augmentant l'expression de signaux de survie cellulaire, ce phénomène ayant notamment été observé dans les expériences de notre équipe (43) ou en compensant l'altération d'une voie en augmentant l'activation d'une autre voie complémentaire. C'est le cas, par exemple, des thérapeutiques qui ciblent EGFR pour lesquelles les cellules peuvent, non seulement, muter le gène codant ce récepteur pour en modifier la forme comme vu précédemment, mais également augmenter l'activité d'un autre récepteur ou d'une autre protéine à activité tyrosine kinase qui aura une activité complémentaire à celle d'EGFR (44–46).

Un autre mécanisme décrit de résistance des cellules tumorales aux agents anticancéreux est la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui permet aux cellules de modifier leur phénotype et d'augmenter leur capacité de migration et d'invasion tumorale et d'avoir une meilleure résistance face aux agents anticancéreux dont les ITK (47,48).

Il a également été démontré que le microenvironnement tumoral pouvait conférer des capacités de résistance des cellules tumorales aux différents agents anticancéreux (49), du fait notamment d'une forte présence d'intégrines capables de moduler les voies de signalisations telle que la voie PI3K/AKT (50). Ainsi l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  a été identifiée comme marqueur pronostique de la réponse des cellules de cancer du sein au trastuzumab (51). Le microenvironnement est également riche en cytokines et en facteurs de croissance libérés par les

cellules environnantes et qui peuvent agir de manière autocrine, paracrine et endocrine pour moduler les voies de signalisation touchées par les agents thérapeutiques. C'est le cas, notamment de HGF, FGF et la neureguline 1 (NRG1). Il a été démontré que ces cytokines pouvaient augmenter l'activation des voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK, réduisant l'activité d'ITK (52). L'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase 1 (TIMP-1) et l'IL-6 ont été associés à une chimiorésistance (53). Certaines de ces molécules ont été décrites comme jouant un rôle dans la résistance aux traitements anticancéreux induites par le TA, nous en reparlerons plus tard, dans le chapitre Discussion générale.





**Figure 2. Les différents mécanismes de résistance d'une cellule tumorale pour un agent thérapeutique (d'après Holohan, Van Schaeybroeck, Longley and Johnston (44)).**

Un résumé des étapes de la pharmacocinétique (PK) d'une molécule thérapeutique administrée ainsi que sa pharmacodynamie (PD) une fois qu'elle a atteint sa cible dans le but d'induire la mort cellulaire (cell death). Les cellules tumorales peuvent résister à l'action de cette molécules en stimulant l'excrétion de la molécule (drug efflux), en l'inactivant (drug inactivation), en altérant la cible de cette molécule (alterations in drug target). Elles peuvent aussi agir après l'action de la molécule en augmentant sa capacité de réparation de l'ADN ou en mettant en place des voies alternatives de celle ciblée (adaptive responses) ou encore échapper à l'apoptose induite par la molécule cytotoxique en inhibant les mécanismes proapoptotiques (dysfunctional apoptosis).

### 3. Le tissu adipeux

Le TA est un organe constitué de plusieurs dépôts tissulaires qui présentent un phénotype et une fonction différente selon leur localisation et leur environnement (54). Il représente 15 à 25% du poids total d'un individu normopondéral, et cette proportion peut s'élever jusqu'à 50% dans les cas d'obésité morbide. Le TA joue, d'une part, le rôle de tissu de soutien et de protection, d'autre part, il représente la plus grosse réserve énergétique de l'organisme via le métabolisme des lipides. Par ailleurs, sa grande plasticité et sa capacité de synthèse et de sécrétion d'adipokines pouvant agir au niveau local ou systémique le classe dans les organes endocrines. Nous verrons brièvement l'organisation du TA ainsi que l'anatomie et la différenciation d'un adipocyte, ses fonctions métaboliques et sécrétoires et enfin son développement anormal conduisant à l'obésité.

#### 3.1. Organisation du tissu adipeux-Les différents types de tissus adipeux

Le TA a traditionnellement été décrit deux types de TA : le TA blanc situé en sous-cutané et dans la paroi abdominale et le TA brun présent surtout chez le nouveau-né dans la région sous-clavière, autour des gros vaisseaux et des reins. Il existe également du TA jaune situé dans la moelle osseuse ainsi que le rose se formant dans la glande mammaire, dont les propriétés biochimiques et fonctionnelles sont distinctes et complémentaires.

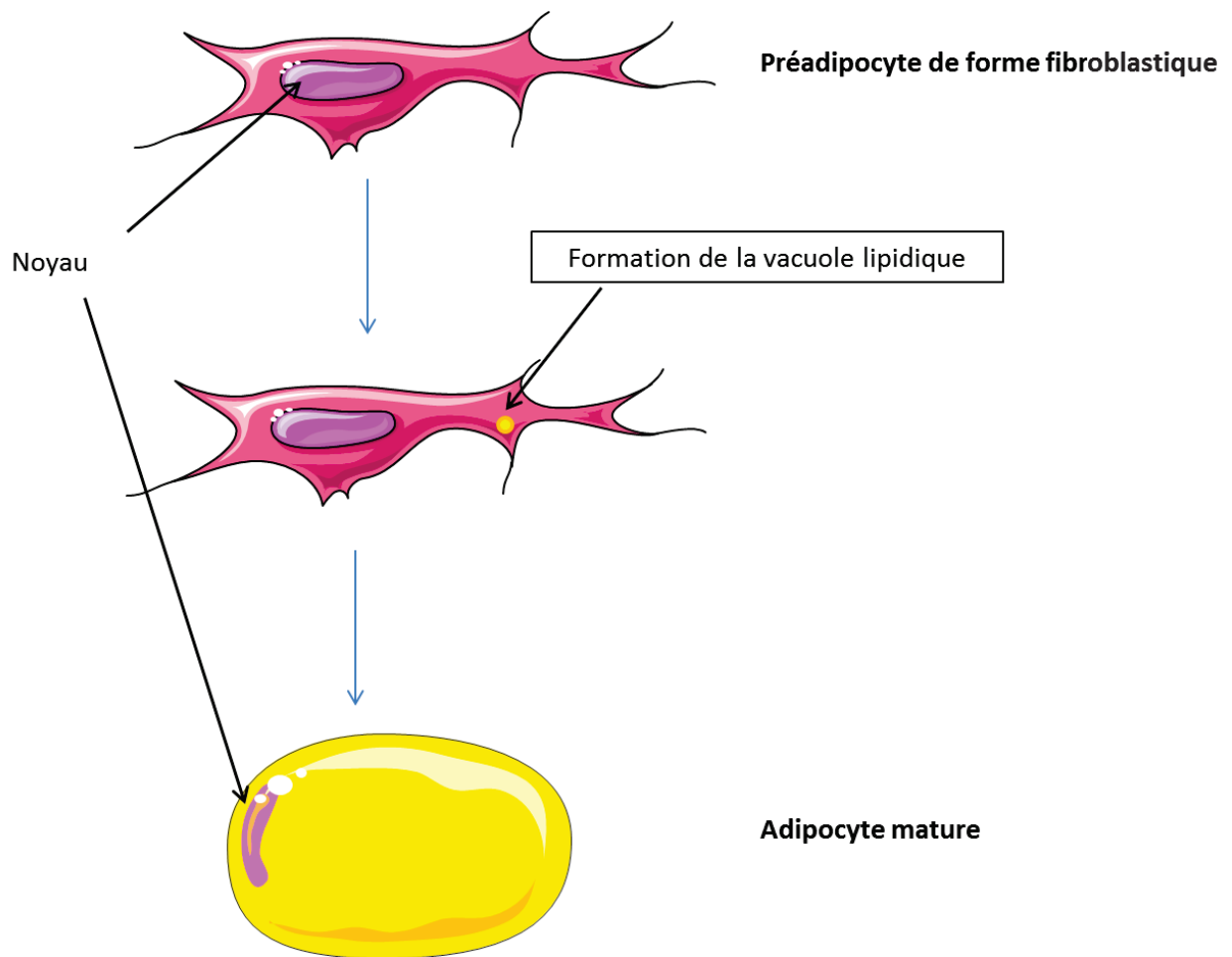
Le TA blanc est principalement formé d'adipocytes appelés adipocytes blancs, constitués d'une grosse vacuole lipidique unique, dont le rôle principal est de stocker l'énergie et de former des dépôts graisseux. A l'inverse, le TA brun, dont la couleur est due à un nombre important de mitochondries localisées autour de multiples petites vacuoles lipidiques, est spécialisé dans la gestion de la thermogénèse et dans la libération de l'énergie sous forme de chaleur.

Les adipocytes blancs pourraient être convertis, de manière transitoire, en adipocytes brun ou roses en fonction de l'exposition hormonale ou thermique (55). Le fait que ces différents adipocytes possèdent des voies de développement communes ou non de ces adipocytes est fortement discuté, principalement du fait du manque de marqueurs spécifiques des précurseurs adipocytaires (56).

Le TA est composé majoritairement d'adipocytes matures remplis de lipides, ainsi que de leurs précurseurs, les pré-adipocytes et d'une fraction stroma-vasculaire qui contient des cellules sanguines, des cellules endothéliales et des macrophages (57). Ce sont les adipocytes matures, principalement du TA blanc, qui assurent la fonction métabolique du tissu en stockant et dégradant des triglycérides (TG) constitués de trois AG liés à une molécule de glycérol.

### 3.2. Différenciation adipocytaire ou adipogénèse

Les changements dans l'expression de gènes au cours de la différenciation ont été principalement caractérisés *in vitro*, en utilisant des lignées cellulaires de préadipocytes (58). Nous décrivons ici les changements morphologiques et fonctionnels apparaissant au cours des différentes phases de la différenciation adipocytaire (Figure 3). Deux phases ont été définies pour décrire ce processus qui suit l'arrêt de prolifération cellulaire du précurseur adipocytaire (59). Le précurseur adipocytaire est une cellule d'aspect fibroblastique qui prolifère de manière exponentielle. Une fois le stade de confluence cellulaire atteint, la prolifération s'arrête et le précurseur devient préadipocyte. Survient ensuite la phase d'expansion clonale par simples mitoses successives du préadipocyte qui passe d'une forme fibroblastique allongée à une forme sphérique et devient adipocyte. Enfin, c'est lors de la phase terminale de différenciation que l'adipocyte acquiert sa capacité de métabolisme des lipides et devient mature.



**Figure 3. La différenciation adipocytaire.**

Au stade de précurseur, le préadipocyte possède une forme fibroblastique. Au cours de sa différenciation, des lipides sont stockés dans une vacuole lipidique sous forme de triglycéride et cette vacuole se remplit jusqu'à prendre tout l'espace cellulaire, repoussant le noyau à la périphérie et réduisant le cytoplasme à une fine lamelle en marge du cytoplasme.

### 3.3. Morphologie et fonctions d'un adipocyte

L'adipocyte du TA blanc est une cellule de grande taille, de diamètre moyen de 70  $\mu\text{m}$  pour un sujet normo-pondéral, son unique vacuole lipidique contenant des triglycérides occupe la quasi-totalité du cytoplasme, repoussant le noyau à la périphérie et limitant le cytoplasme à une mince lanière. Cette organisation donne une morphologie ronde à la cellule et permet de bien les différencier des autres cellules du tissu.

#### 3.3.1. Fonctions métaboliques du TA

Une des fonctions principales du TA est de stocker l'énergie en excès sous forme de TG par le mécanisme appelé lipogénèse. Les AG peuvent ensuite être libérés par le TA lors de la lipolyse afin d'être utilisés par d'autres tissus en réponse à des besoins métaboliques au cours des périodes de restriction alimentaire ou de besoins accrus en énergie.

#### *La lipolyse ou hydrolyse des triglycérides et ses différents acteurs*

Les triglycérides du tissu adipeux blanc sont la majeure source de réserve d'énergie chez les eucaryotes. Le pool de lipides est constamment fluctuant, résultant d'un cycle de lipolyse et de réestérification. Durant les moments de privation en énergie, le TA augmente sa fonction de lipolyse qui peut être définie comme l'hydrolyse des TG pour générer des acides gras libres (AGL) et du glycérol libéré dans la vascularisation pour l'usage par d'autres organes comme substrat énergétique. La lipolyse se déroule d'une manière ordonnée et régulée, avec l'action de différentes enzymes à chaque étape. Les TG ou triacylglycérols (TAG) sont hydrolysés séquentiellement pour former des diacylglycérols (DAG) puis des monoacylglycérols (MAG) avec la libération d'AG à chaque étape. Les MAG sont hydrolysés et les dernier AG et le glycérol sont libérés. Le stockage d'énergie sous forme de TG par les adipocytes est aussi important pour fournir des substrats pour la synthèse hépatique de lipoprotéines impliquées dans le métabolisme du cholestérol, les VLDL

(60,61). Les AG circulants sont une source majeure de substrats pour la synthèse hépatique de lipoprotéines riches en TG et la réduction de la lipolyse adipocytaire altère la production de VLDL. Les altérations de la lipolyse sont fréquemment associées avec l'obésité car l'augmentation des taux de base de la lipolyse peut contribuer au développement de résistance à l'insuline et donc à une réponse altérée de stimulation de la lipolyse (62,63).

### **Les étapes de la lipolyse**

La première étape de l'hydrolyse des TAG est majoritairement contrôlée par l'hormone sensitive lipase (HSL) qui est une protéine cytoplasmique de 84kDa. Elle a initialement et pendant de nombreuses années été considérée comme la seule lipase capable d'initier la lipolyse. 4329108 Des études utilisant des souris pour lesquelles le gène codant pour HSL est inactivé (HSL KO) présentaient bien une diminution de la libération d'AG et de glycérol dans la circulation. Cependant, en observant les stocks des vésicules lipidiques, il a été mis en évidence une accumulation de DAG et non de TAG comme attendue supposant qu'il existait d'autres enzymes capables de catalyser cette réaction (64,65). Depuis, plusieurs de ces lipases ont été identifiées comme la desnutrine ou adipose triglyceride lipase (ATGL) en 2004 (66). Sa surexpression dans les adipocytes *in vitro* résultait en une augmentation de libération d'AG et de glycérol tout en diminuant spécifiquement les taux de TAG et l'inverse était observé en cas de l'inhibition de l'action de cette protéine (66). Une coopération entre HSL et desnutrine/ATGL et un effet synergique des deux lipases sur l'hydrolyse des TAG a également été mis en évidence (67).

D'autres enzymes impliquées dans cette étape de la lipolyse semblent indépendantes de HSL, telle que la triacylglycerol hydrolase (TGH) (68). Son expression a été observée dans des cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes par rapport aux préadipocytes de la même lignée (69). De plus, l'inhibition de l'activité de TGH via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou par short hairpin RNA sur des cellules 3T3-L1 a induit la diminution de libération d'AG et de glycérol ainsi que l'accumulation de TAG dans les cellules. Ces résultats ont été trouvés en l'absence de stimulation de la lipolyse et l'activité lipolytique était restaurée en présence de stimulateurs de lipolyse, ce qui prouve le rôle de la TGH dans la lipolyse de base (notion détaillée dans le prochain chapitre) (70). D'autres enzymes telles que l'adiponutrin et la GS2 ont été identifiées comme jouant un rôle dans cette première étape de la lipolyse mais ce rôle dans le TA n'est pas encore élucidé (71,72).

La deuxième étape de la lipolyse est l'hydrolyse des DAG nouvellement formés. Seule la HSL a été décrite comme lipase régulant l'hydrolyse des DAG qui génère les MAG et la libération d'AG et ceci est confirmé par l'accumulation de DAG dans le cytoplasme des souris HSL KO (64). Cependant, dans des conditions de jeun prolongé, les souris KO HSL présentaient des taux d'AG et de glycérol identiques, voir supérieurs à ceux de souris non mutées, 10639158 Cela suggère la présence d'autres lipases encore non identifiées.

Enfin, l'hydrolyse des MAG est régulée par la monoglycéride lipase (MGL) qui possède à la fois une activité lipase et estérase sur les MAG et permet donc la libération d'AG et de glycérol. Il s'agit d'une hydrolase de 33kDa qui a été isolée pour la première fois de TA de rat en 1975 (73).

### **Le rôle des protéines associées aux gouttelettes lipidiques dans la lipolyse**

La réaction d'hydrolyse des TAG s'effectue au sein des gouttelettes lipidiques dans les adipocytes matures, Cependant, l'accès des lipases à leur substrat très hydrophobe est modulé par l'intervention de protéines pouvant se localiser sur la membrane des gouttelettes lipidiques après stimulation ou non pour moduler l'ancrage et le transport de ces lipases. La principale protéine associée aux gouttelettes lipidiques est la périlipine A (74). Cependant, l'analyse des adipocytes d'ovaire de hamster chinois par spectrométrie de masse a identifié, en plus des périlipines, plus de 40 protéines structurales et de signalisation telles que des enzymes impliquées dans la synthèse, le stockage et l'utilisation des lipides (75).

Les périlipines A et B ont été identifiées comme protéines associées aux gouttelettes lipidiques mais l'isoforme A est la plus courante et a fait l'objet de plus d'études que l'isoforme B (76). La délocalisation de ces protéines sur les membranes des gouttelettes répond à un stimulus inhibiteur de lipolyse. De ce fait, les périlipines protègent les gouttelettes de l'arrivée des lipases HSL et desnutrine/ATGL en formant une barrière. Cette hypothèse est confirmée par le fait que les souris qui n'expriment pas cette protéine ont une lipolyse basale plus élevée que les souris qui l'expriment (77). De la même manière, les cellules 3T3-L1 exprimant de façon ectopique la périlipine A stockent de manière importante les TG que les cellules contrôles du fait d'une réduction de la lipolyse (78). Ces travaux ont fait de la périlipine A une cible convoitée pour lutter contre l'obésité étant donné que les souris ne l'exprimant pas résistaient à l'induction de l'obésité par l'alimentation. Cependant, la lipolyse basale et la lipolyse faisant suite à un signal de stimulation ont mon-

tré des fonctionnement très différents et paradoxaux. Suite à l'activation, via les récepteurs bêta-adrénergiques de la voie adénylate cyclase, la périlipine A subi une phosphorylation dépendante de la PKA. Cette phosphorylation est nécessaire au recrutement maximal de HSL au niveau des membranes des gouttelettes lipidiques et à une fonction lipolytique maximale (79). Etant donné que la lipolyse après stimulation donne une hydrolyse des TAG bien plus rapide et efficace que la lipolyse basale, la périlipine paraît finalement intéressante à conserver, même dans le cadre de la lutte contre l'obésité.

Les protéines liant les AG (FABP4) sont également nécessaires au maintien de la lipolyse. En effet, ils permettent la sortie des AG des gouttelettes lipidiques après l'hydrolyse des TG ce qui évite l'accumulation de ces AG qui seraient responsables d'un signal de rétrocontrôle négatif ralentissant la lipolyse (80).

Les protéines cavéolaires jouent elles aussi un rôle dans la régulation de la lipolyse et en particulier la caveolin 1 qui a été la plus étudiée. Cette protéine est retrouvée dans le cytoplasme mais également dans les gouttelettes lipidiques (81,82). Elle se fixe à une sous-unité de la PKA pour en empêcher l'action de phosphorylation, inhibant de ce fait l'action de la périlipine (81).

D'autres protéines ont été décrites comme étant associées aux gouttelettes lipidiques mais leur rôle exact et leur fonctionnement n'est pas encore clair. C'est le cas de l'aquaporine 7 qui semble jouer un rôle dans l'obésité et les désordres métaboliques (72,83). La lipotransine a été identifiée comme interagissant avec HSL, elle aurait une action sur son transport du cytoplasme jusqu'à la gouttelette lipidique (84). Enfin, TIP47 est une protéine associée aux gouttelettes lipidique de fonction inconnue. Elle inhibe l'hydrolyse des esters de retinyl par GS2 et HSL dans les kératinocytes humains, suggérant que dans les adipocytes, elle pourrait partager une fonction antilipolytique similaire avec d'autres telles que la périlipine ou les protéines reliées à la différenciation adipocytaire (85).



## **Lipolyse stimulée et lipolyse basale dans les adipocytes**

La lipolyse est stimulée en situation de jeun ou en cas de besoin énergétique urgent principalement via les récepteurs bêta-adrénergiques couplés à une protéine G. La fixation de catécholamines sur ces récepteurs active la voie adényl cyclase et résulte en la formation d'AMPc. L'AMPc phosphoryle la PKA qui, à son tour, phosphoryle HSL et les périlipines ce qui entraîne l'hydrolyse des TAG comme décrit plus haut (86). Le glucagon, bien que son action principale se situe au niveau du foie peut également stimuler la lipolyse dans les adipocytes par fixation à ses récepteurs membranaires qui engendre une augmentation de l'AMPc intracellulaire (87).

Cette stimulation est donc sous le contrôle du système nerveux sympathique, à l'inverse de la lipolyse basale, qui fait suite à l'action du système nerveux parasympathique via les récepteurs alpha2-adrénergiques (88).

### *Le stockage des lipides : la lipogenèse*

Les TG stockés dans les adipocytes sont synthétisés à partir d'acides gras (AG) et de glycérol, au niveau du réticulum endoplasmique. Les AG, proviennent de l'alimentation, ils sont captés et circulent sous forme de vésicules lipidiques produites par l'intestin ou par le foie. La lipoprotéine lipase (LPL), protéine produite et sécrétée par les adipocytes, ancrée à la surface des cellules endothéliales hydrolyse les vésicules afin de libérer les AG qui sont ensuite captés par l'adipocyte (89). L'expression de la LPL est un acteur de la régulation de la lipogenèse, elle est augmentée en cas de régime alimentaire riche en glucose sous l'action de l'insuline et quasiment non exprimée en cas de jeun. Les transporteurs d'AG, tels que le cluster de différenciation 36 (CD36) et la protéine de la membrane plasmique liant les AG 4 (FABP4) sont également souvent impliqués dans cette régulation.

Notons qu'il existe également une synthèse de novo des TG à partir des AG provenant de la lipolyse dans le foie et le TA mais elle est peu importante dans le TA.

### 3.3.2. Activité sécrétoire du TA

Le TA est maintenant reconnu comme un organe endocrinien capable d'intégrer des signaux hormonaux venant de différentes parties de l'organisme et d'y répondre en sécrétant ses propres peptides de signalisation appelés adipokines. A l'heure actuelle, nous savons qu'il existe une grande variété de ces facteurs sécrétés et qu'ils ont des rôles divers au sein de l'organisme (90,91). Les facteurs plus souvent étudiés dans la littérature sont la leptine et l'adiponectine, la résistine, l'angioprotéin-like protein 4 et le preadipocyte factor 1 du fait de leur rôle dans la prise alimentaire, la régulation énergétique et les troubles métaboliques associés. Des agents pro-inflammatoires tels que le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 1 (IL-1) et l'IL-6 ou anti-inflammatoires dont le TGF $\beta$ , MCP1 et PAI1 ont également été largement étudiés pour leur implication dans le processus d'inflammation locale et systémique et les diverses maladies engendrées. Enfin, les hormones sexuelles telles que la testostérone et les œstrogènes sécrétés par le TA ont aussi été incriminées dans le processus de nombreuses maladies dont certains cancers. Nous ne développerons ici que les facteurs ayant un rôle dans la résistance des cancers aux agents thérapeutiques et nous les classerons selon leur rôle principal au sein du TA, à savoir la régulation de la balance énergétique, l'inflammation et le cas particulier des hormones sexuelles (90).

#### *Adipokines et régulation de la balance énergétique*

L'homéostasie énergétique est un rôle majeur du TA et il est capable de synthétiser et sécréter des facteurs pour assurer cette mission. Ceux-ci peuvent être de nature enzymatique comme la LPL décrite précédemment mais également hormonale dont les deux principales sont la leptine et l'adiponectine.

La leptine est une hormone principalement sécrétée par le TA capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et de se lier à ses récepteurs ObR au niveau de l'hypothalamus, cette liaison engendre des signaux de satiété et induit la diminution de la prise alimentaire (92). Il a également été observé une augmentation de la lipolyse et une inhibition de la lipogenèse du fait de la présence des récepteurs pour cette cytokine au niveau périphérique (93).

L'adiponectine est principalement sécrétée par le TA, dans les adipocytes matures et son expression augmente au cours de la différenciation adipocytaire. L'adiponectine est une hormone insuli-

no-sensible car l'augmentation des taux d'insuline provoque la libération d'adiponectine par le TA dans la circulation sanguine (94). Elle se lie ensuite à ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, exprimés par différents organes tels que le foie, le TA, les muscles, les macrophages, et les cellules pancréatiques sécrétrices d'insuline. La liaison à ces récepteurs engendre l'augmentation de l'entrée de glucose et de la  $\beta$ -oxydation des TG. Ces données ont été mises en évidence grâce à des modèles murins obèses, le plus connu de tous étant le modèle de souris n'exprimant pas le gène codant pour la leptine, la souris ob/ob. Ces souris développent une obésité spontanée avec hyperphagie, réduction de la dépense énergétique et hypothermie (95). Deux modèles aux phénotypes similaires sont le modèle murin n'exprimant pas le gène codant pour le récepteur à la leptine, ou souris db/db et celui exprimant des récepteurs à leptine non fonctionnels, le modèle s/s (96–98).

### *Adipokines et inflammation*

Le TNF $\alpha$  est principalement sécrété par les macrophages et de façon marginale par les adipocytes. Il a été démontré que les taux circulants de cette adipokine augmentent en cas d'obésité et qu'elle possède plusieurs fonctions, notamment dans la croissance cellulaire, la cytotoxicité, l'inflammation et l'immunomodulation (99). De plus, il semblerait qu'au niveau des adipocytes, le TNF $\alpha$  joue également un rôle dans le métabolisme lipidique comme en témoigne les expériences de suppression d'expression du gène codant pour ce facteur chez la souris. En effet, il a été démontré que les souris avec absence d'expression du gène codant pour le TNF $\alpha$  présentaient une diminution du taux plasmatique des AG et des TG ainsi qu'une masse grasse inférieure aux souris exprimant ce gène (100).

L'IL-6 est décrite comme facteur sécrété majoritairement par les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes et ayant des rôles pro et anti-inflammatoires. L'IL-6 est également sécrétée par les adipocytes, et comme le TNF $\alpha$ , son taux varie en fonction du poids (101). Il est probable que l'IL-6 modifie l'activité métabolique lipidique de l'adipocyte en stimulant la lipolyse (102).

### *Hormones sexuelles*

Les adipocytes possèdent toutes les enzymes nécessaires au métabolisme des hormones sexuelles. Bien que le TA ne soit pas l'organe principal assurant cette activité métabolique, sa contribution

est relativement importante. Le TA est responsable de 100% des taux d'œstrogènes circulants chez la femme après la ménopause du fait de l'arrêt de l'activité des gonades et de 50% des taux de testostérone circulants chez la femme avant la ménopause (103,104). Chez l'homme, la leptine sécrétée par le TA agit au niveau des testicules pour la production de testostérone et le TA et les androgènes influencent le bon fonctionnement de l'un et de l'autre (105).

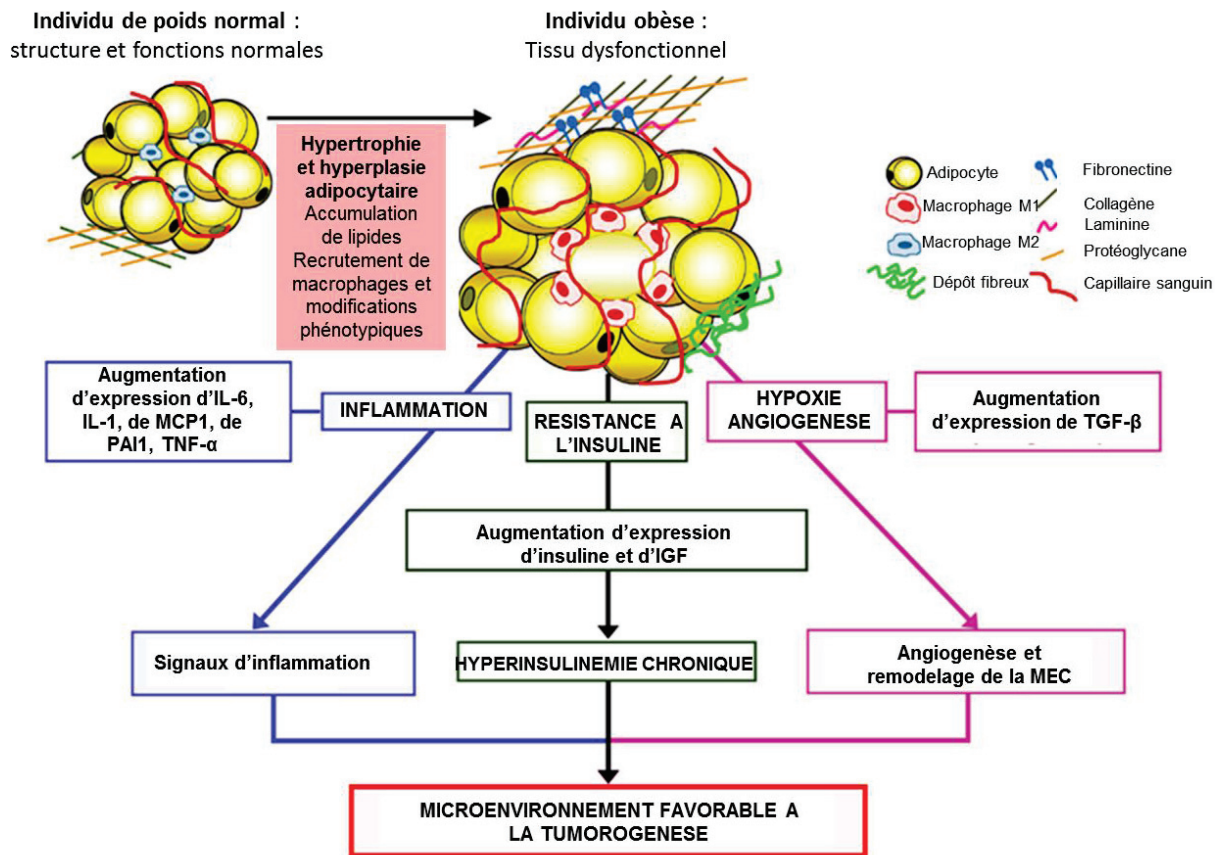
### 3.4. Le développement pathologique et l'altération du TA : l'obésité

L'obésité et le surpoids sont définis par l'OMS comme "une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé" (106) Les patients peuvent être classés selon leur morphologie grâce à deux systèmes. Le premier est le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) obtenu en divisant le poids en kilogrammes par la taille en centimètres au carré., il représente le système officiel de l'OMS. Une valeur comprise entre 18,5 et 24,9 caractérise une personne de poids normal, en surpoids ou en préobésité entre 25 et 29,9, en obésité de type 1 de 30 à 34,9, de type 2 de 35 à 39,9 et de classe 3 au-delà de 40 kg/cm<sup>2</sup>. Un autre système consiste à prendre en compte le tour de hanche et le tour de taille, ce qui permet de mieux prendre en compte la morphologie de chaque personne ainsi que la répartition du TA au niveau abdominal, connu pour être le gras à l'origine des troubles métaboliques. Ainsi, une femme devrait avoir un rapport taille/hanche inférieur à 0,8, l'obésité de type gynoïde étant décrite au-delà de 0,8 tandis qu'un homme se verra classé en obésité androïde pour un rapport supérieur à 0,9. L'excès de poids est bien souvent dû à une augmentation des apports caloriques par l'alimentation avec une diminution des dépenses énergétiques. Cependant, l'obésité est une maladie multifactorielle et peut également présenter une composante génétique et, de ce fait, héréditaire. Une revue récente répertorie les facteurs d'obésité environnementaux et génétiques de l'obésité (107). Les mutations génétiques incluent celle du gène codant pour la leptine et ses récepteurs mais aussi pour beaucoup d'autres. Les obésités d'origine génétiques sont divisées en deux catégories, les formes syndromiques et les formes non-syndromiques. Les formes syndromiques surviennent après un réarrangement chromosomique et se traduisent par une maladie telle que le syndrome de Prader-Willi ou après une mutation pléiotropique comme dans le cas du syndrome de l'X fragile. Les formes non-syndromiques sont issues de mutations génétiques soit monogéniques comme pour le cas de la leptine, l'obésité sera alors très sévère et d'apparition très précoce, dans l'enfance. Les mutations polygéniques donnent des formes plus modérées d'obésité mais également plus complexes à étudier car très différentes d'une personne à l'autre. Ces mutations génétiques associées à une mauvaise hygiène de vie et une mauvaise alimentation aura pour résultat une aggravation du tableau clinique, de l'obésité et de ses complications.

Au niveau morphologique, le TA d'une personne obèse présente des adipocytes hypertrophiés qui correspondent à une augmentation de volume adipocytaire avec un diamètre pouvant atteindre 200  $\mu\text{m}$  liée à une forte accumulation de TG dans la vacuole. Cette hypertrophie s'accompagne d'une hypoxie, d'une inflammation et d'une résistance à l'insuline. Dans des cas d'obésité avancée, une hyperplasie des adipocytes peut survenir avec la création de nouvelles cellules adipocytaires. L'origine de ces nouvelles cellules est encore discutée mais les données les plus récentes sont en faveur d'une origine médullaire avec production de précurseurs pouvant se différencier en adipocytes. Ce mécanisme serait d'autant plus important que le gain de poids de corps est élevé (108).

La fonctionnalité des adipocytes en terme de métabolisme des lipides ou de l'activité sécrétoire dépend de l'indice de masse corporelle. D'une part, le TA d'une personne obèse verra sa fonction de lipogénèse augmentée par rapport à une personne de poids normal (109). D'autre part, il est observé une augmentation de sécrétion de plusieurs adipokines telles que la leptine, l'IL-6 et le TNF $\alpha$  en cas d'obésité contrairement à l'adiponectine dont les taux circulants diminuent dans le plasma du sujet obèse par rapport au sujet de poids normal (110).

Au niveau du microenvironnement, l'altération du TA entraîne, entre autres, un contexte d'inflammation au sein du tissu. En effet, les cytokines sécrétées par les adipocytes peuvent attirer et activer des cellules de l'immunité dont les macrophages de type M1 proinflammatoires qui sont alors retrouvés en plus forte proportion dans le TA (111) (Figure 4).



**Figure 4. Les mécanismes liant l'obésité et le cancer (selon Perez-Hernandez et al. (78)).**

L'excès de TA est lié à des modifications de la concentration circulante de lipides et du profil de sécrétions d'adipokines et d'hormones. L'hypertrophie et l'hypoxie entraîne un état d'inflammation. De plus, les taux de cytokines proinflammatoires sécrétées par le TA, de facteurs angiogéniques et la quantité de macrophages infiltrants M1 augmentent dans le TA en cas d'obésité. L'association avec la résistance à l'insuline peut favoriser la formation d'un microenvironnement favorable à la tumorigenèse. MCP1 : Protéine de chimio-attraction des monocytes-1, PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, TGF- $\beta$  : facteur de croissance transformant-  $\beta$ , TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumoral

## 4. Etude du rôle du TA dans la réponse aux traitements anticancéreux

### 4.1. Relation entre l'obésité et la réponse au traitement

En ce qui concerne les résistances aux traitements, nous détaillerons principalement les données concernant la survie globale, la durée de survie sans rechute après traitement en fonction de l'excès de TA et les données de réponse aux traitements.

Un risque de rechute et d'échec de traitement plus élevé en cas d'obésité a été décrit chez les patients atteints de cancer de la prostate après traitement par radiothérapie dans certaines études épidémiologiques (112,113). En effet, l'IMC élevé représenterait un facteur de risque indépendant significatif d'échec du traitement au niveau biochimique de 1,04. Au niveau clinique, les patients obèses traités pour un cancer de la prostate présentaient plus d'échecs du traitement que les patients non obèses traités pour le même cancer. Dans d'autres études, le lien entre obésité et rechute après la radiothérapie pour le cancer de la prostate n'a été observé que pour les quatre premières années de suivi puis les risques de rechute se sont équilibrés entre les patients obèses et non obèses (114). D'autres études n'ont pas montré de lien entre obésité et survie après traitement par radiothérapie (115).

Pour d'autres cancers comme l'adénocarcinome de l'œsophage (116) et le cancer des testicules (117), il n'a pas pu être démontré de lien entre l'obésité et la survie après traitement sans rechute.

Concernant le cancer du sein, il a été constaté que la survie globale sans rechute était meilleure après 5 ans pour les patientes non obèses que pour les obèses ayant été traitées pour le cancer du sein. De la même manière, un taux de survie significativement plus faible était observé après 10 ans pour les patientes obèses en comparaison avec les patientes non obèses (0,63 vs 0.71  $p=0.011$ ) (118). Cependant, étant donné la grande diversité des tumeurs et leur éventuelle sensibilité aux hormones, il paraît important de préciser le statut ménopausique des patientes pour prédire l'incidence du cancer du sein. En réalité, certaines études ont, effectivement, démontré que les patientes ménopausées présenteraient plus de risque de rechute après traitement que les autres alors qu'il a également été démontré que les patientes obèses présenteraient plus de risque de



rechute que les patientes non obèses, quel que soit leur statut ménopausique (118,119). Ces données supposent que le statut ménopausique des femmes atteintes de cancer du sein est moins corrélié à la survie que le statut pondéral. Il a également été suggéré que certaines thérapies ciblées, telles que le trastuzumab pourraient être moins efficaces pour les patientes obèses que pour les non-obèses en prenant comme critère la survie globale. En effet, la survie des patientes obèses ayant été soignées pour un cancer du sein par le trastuzumab était 38% inférieur à 10 ans à celle des patientes non obèses (120). Bien que la significativité statistique n'était pas toujours atteinte, la tendance pour la survie globale et la survie sans rechute était à l'augmentation pour les patientes non obèses par rapport aux obèses (121).

Pour le cancer colorectal, il a été observé que les patients recevant le bevacizumab, en plus de la chimiothérapie classique avait une survie globale plus longue alors qu'une telle différence n'a pas été observée dans une autre étude (122–124).

Globalement, les données épidémiologiques sont en faveur d'une diminution de sensibilité aux traitements pour les cancers en cas d'obésité mais ces données sont à prendre avec précaution. En effet, de nombreux facteurs concernant le mode de vie, par exemple, pouvant influencer la survie tels que l'activité physique et la consommation d'alcool ne sont pas toujours pris en compte (119). De plus, la technique d'évaluation de l'hyperadiposité peut influencer les résultats, le calcul de l'IMC n'étant pas toujours représentatif de l'obésité, d'autres méthodes comme la mesure du taux de TA viscéral par système d'imagerie peuvent être utilisées (125). Dans une étude, il a été démontré que la survie globale de patients atteints de cancer colorectal était réduite en fonction de l'augmentation du TA viscéral après traitement alors qu'aucune différence significative n'a été observée en fonction de l'IMC (123).

D'autres facteurs doivent être pris en compte tels que l'hygiène de vie, l'activité physique, la présence d'autres pathologies liées à l'obésité telles que le diabète ainsi que les traitements associés. Ces facteurs sont parfois manquants dans les études décrites ici. Par ailleurs, des mesures sont parfois prises pour améliorer la réponse de traitement par les patients obèses telles qu'une dose de chimiothérapie plus élevée (114,124), ou bien un dispositif particulier pour bien cibler la tumeur par les rayons ionisants ou encore l'ajout de thérapies ciblées (114,123,124). Ces dispositifs sont bien souvent très efficaces et, s'ils ne sont pas également utilisés chez les patients non obèses,

pourraient engendrer une meilleure réponse aux traitements pour les patients obèses que pour les non obèses.

#### 4.2. Environnement adipocytaire et diminution de sensibilité aux traitements anticancéreux

Afin de comprendre et surtout d'agir sur la résistance des patients obèses aux thérapeutiques anticancéreuses, de nombreuses études ont été réalisées. Pour ce faire, des chercheurs ont mis au point, d'une part, des modèles *in vivo*, chez la souris et d'autre part, différents modèles *in vitro*. Ces modèles précliniques ont permis de montrer que les cellules tumorales possédaient une sensibilité réduite pour divers agents anticancéreux quand elles se trouvaient dans un environnement adipeux, de nombreuses hypothèses ayant été avancées quant aux possibles mécanismes et facteurs responsables de ce phénomène. Nous décrivons les résultats obtenus dans les différentes études tout d'abord chez la souris puis *in vitro*. Nous évoquerons ensuite les mécanismes et facteurs supposés être responsables des phénomènes observés (tableau 2).

Modèles tumoraux	Modèles adipocytes	Culture in vitro	Agents thérapeutiques	Mécanismes	Références
Lignées cellulaire d'origine humaine de leucémie aigue lymphoblastique (LAL)	Lignée cellulaire d'adipocytes d'origine murine	Coculture directe et indirecte	Daunorubicine	Diminution de clivage de caspases et de PARP et diminution de l'apoptose dues à un stress oxydant	133
Lignées cellulaire d'origine murine et humaine de LAL	Lignées cellulaire d'origine murine de préadipocytes	Coculture direct et indirecte	Vincristine, dexaméthasone et daunorubicin	Augmentation d'expression de gènes antiapoptotiques Bcl-2 et Pim	127
	Lignée d'adipocytes de moelle osseuse murine			Bloquage en phase G0/G1	
Lignées cellulaire d'origine murine et humaine de LAL	Lignées cellulaire d'origine murine de préadipocytes	Coculture direct et indirecte	L-asparaginase	La glutamine sécrétée par les adipocytes entrent en compétition avec le substrat de la L-asparaginase	128
	Lignée d'adipocytes de moelle osseuse murine				
Lignée cellulaire humaine de myélome multiple (MM)	Lignée cellulaire d'adipocytes d'origine humaine.	Coinjection d'adipocytes et de cellules de MM dans le fémur de souris	Melphalan, bortezomib, dexaméthasone et doxorubicine	Les adipokines leptine, adiponectine sécrétées par les adipocytes induisent l'augmentation du processus d'autophagie	131
Cellules isolées de moelle osseuse de patients atteints de MM	Adipocytes isolés de moelle osseuse et de tissus sous-cutané de patients	Coculture directe et indirecte. Milieu conditionné d'adipocytes			
Lignées cellulaire d'origine humaine de MM	Adipocytes isolés de moelle osseuse de patients	Coculture directe	Melphalan, bortezomib, dexaméthasone et doxorubicine	La leptine sécrétée par les adipocytes inhibe le blocage du cycle cellulaire et l'apoptose	134
	Lignée cellulaire d'adipocytes d'origine murine				
Lignées cellulaire d'origine murine et humaine de cancer du sein	Lignée cellulaire d'adipocytes d'origine murine	Coculture indirecte	Radiothérapie	L'interleukine-6 sécrétée par les adipocytes augmentate les voies de réparation de l'ADN	135
Lignées cellulaire d'origine murine et humaine de cancer du sein	Lignée cellulaire d'adipocytes d'origine humaine	Coculture direct et milieux conditionnés d'adipocytes	Trastuzumab et T-DM1	Le dysfonctionnement de la voie PI3K/AK T/mTOR entraine l'augmentation d'expression de gènes antiapoptotiques	43
	Lignées cellulaire d'origine murine de préadipocytes				
Lignées cellulaire d'origine murine et humaine de cancer du sein	Lignées cellulaire d'origine murine de préadipocytes	Milieu conditionné d'adipocytes	Gemcitabine	L'altération du métabolisme nucléosidique lié à l'excès de TA altère la biodisponibilité de la gemcitabine	130
Lignées cellulaire d'origine humaine de cancer des ovaires	Adipocytes isolés de tissu adipeux de patients	Milieu conditionné d'adipocytes	Paclitaxel	Transfert de microARN via les exosomes	136
Lignées cellulaire d'origine murine de mélanome	Souris obèses	Milieu conditionné d'adipocytes	Dacarbazine	Mécanisme d'efflux par la P-gp	129

**Tableau 2. Etudes démontrant une résistance aux agents cytotoxiques induite par le TA**

Etudes décrivant des mécanismes de résistance tumorales *in vitro* pour différentes thérapies anticancéreuses. Ces résistances ont toujours un lien avec les adipocytes humains ou murins, que ce soit en contact direct, en coculture indirecte ou via les sécrétions adipocytaires.

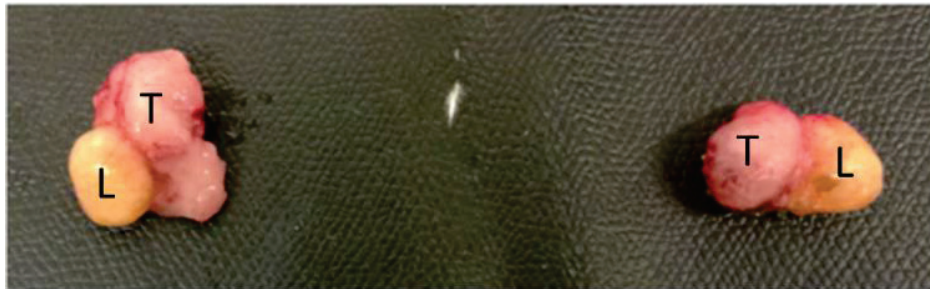
#### 4.2.1. Modèles murins *in vivo*

La souris est un animal couramment utilisé dans les laboratoires de recherche pour étudier l'obésité. Il est possible de rendre certaines souches de souris obèses ou en surpoids en les nourrissant avec une alimentation enrichie en lipides. L'injection de cellules tumorales ou l'implantation de tumeurs dans ces souris permet de créer un bon modèle d'étude du contexte de cancer dans un environnement d'hyperadiposité. En utilisant ce genre de modèle, il a pu être mis en évidence un phénomène de résistance pour de nombreuses molécules en lien avec un excès de TA. La posologie des traitements administrés aux souris dans les études suivantes sont toujours calculées en fonction du poids de chaque souris afin de ne pas sous-doser les souris obèses qui présentent un volume de distribution plus important.

Une étude publiée en 2009 a démontré que des souris obèses atteintes de leucémies, suite à l'injection de cellules tumorales par voie intraveineuse, étaient moins sensibles au traitement par la vincristine que les souris non obèses. En effet, pour 9 souris obèses sur 12, la leucémie aiguë s'est compliquée en leucémie chronique malgré le traitement contre 3 sur 12 pour les souris non obèses (126). D'autre part, si l'on s'intéresse à la survie de souris atteintes de leucémies, le traitement à la L-asparaginase prolongeait la survie des souris non obèses, de 8 jours en moyenne alors que le même traitement n'a eu aucun effet sur la durée de survie des souris obèses (127). Une telle diminution de sensibilité a également été constatée dans le cas de mélanomes avec la dacarbazine (128). En effet, le traitement à la dacarbazine chez les souris non obèses a permis de limiter la croissance tumorale à environ 300 mm<sup>3</sup> contre 800 mm<sup>3</sup> pour les mêmes souris non traitées alors que le volume des tumeurs chez les souris obèses a dépassé 2000 mm<sup>3</sup> après le traitement à la dacarbazine. Toutes les souris ont été traitées pendant la même durée et le poids des tumeurs pour les souris de chaque groupe suivait la même tendance. De la même manière, alors que le volume des tumeurs mammaires de souris non obèses a diminué d'un facteur deux après quatre semaines de traitement à la gemcitabine, aucune diminution du volume tumoral n'a été observé chez les souris obèses après la même durée de traitement à la gemcitabine (129).

D'autres modèles ont été élaborés afin d'étudier les interactions entre le TA et les cellules tumorales chez la souris. Il est possible d'injecter un mélange de cellules tumorales et d'adipocytes de façon orthotopique. Par exemple, l'injection de cellules de myélome multiple (MM) seules ou avec des adipocytes dans des fémurs de souris a permis de développer des MM chez les souris en gardant un microenvironnement enrichi en adipocytes (130). Ce modèle a permis de mettre en évidence la diminution d'efficacité du melphalan dans le traitement du myélome multiple lorsqu'il se développe en contact avec des adipocytes. Ce phénomène a été démontré en regardant le pourcentage de cellules de MM récupérées de la moelle osseuse des souris après une période de traitement au melphalan ainsi que le pourcentage d'apoptose de ces cellules. Il s'est avéré que la moelle osseuse des souris ayant reçu des adipocytes contenait une plus grande quantité de cellule de MM que celle des souris n'ayant reçu que les cellules de MM, traduisant une plus grande prolifération tumorale. Parmi ces cellules, il y avait environ deux fois plus d'apoptose pour celles issues de souris n'ayant reçu que des cellules de MM par rapport à celles issues de souris ayant reçu des adipocytes en plus des cellules de MM (130), données qui pourrait être interprétées comme une diminution de sensibilité au melphalan en cas de proximité avec les adipocytes.

Un autre modèle original reproduisant la proximité entre le TA et la tumeur chez la souris consiste à implanter, en sous-cutané, du TA abdominal humain sur des souris, soit un équivalent de PDX adipeux humain, que nous désignerons par la suite sous le terme de « lipome » (Figure 5). Ce lipome forme alors une entité stable près de laquelle peut être greffée une tumeur qui se développera au contact immédiat de tissu adipeux. Ce dernier modèle a permis à notre équipe de mettre en évidence la diminution de sensibilité des tumeurs mammaires pour le trastuzumab en présence de TA. En effet, les souris porteuses de tumeurs seules présentaient une réduction du volume tumoral après traitement plus importante que les souris porteuses de tumeurs et de lipomes (43).



L : lipome  
T : tumeur

**Figure 5. Formation d'une tumeur accolée à un lipome (48)**

L'injection de TA humain en sous-cutané chez des souris conduit à la formation d'une entité stable que l'on appellera lipome. La greffe d'une tumeur au contact du lipome permet d'observer la croissance de la tumeur lorsqu'elle est en contact avec du TA.

#### 4.2.2. Modèles cellulaires *in vitro*

Les effets de résistance des tumeurs aux traitements ayant été mis en évidence chez l'animal en surpoids ou au contact immédiat de tissu adipeux, différents systèmes *in vitro* sont également utilisables afin de comprendre le mécanisme de résistance des cellules tumorales aux divers agents thérapeutiques en présence de TA. Ces systèmes utilisent d'une part des adipocytes aux origines et aux caractéristiques diverses et de l'autre des cellules tumorales d'origines diverses. Les cellules tumorales ainsi que les adipocytes peuvent être d'origine humaine ou animale. Les modèles adipocytaires peuvent soit être des lignées différenciées en adipocytes *in vitro* ou des adipocytes obtenus à partir de tissus frais.

##### *Culture cellulaire et conditions expérimentales in vitro*

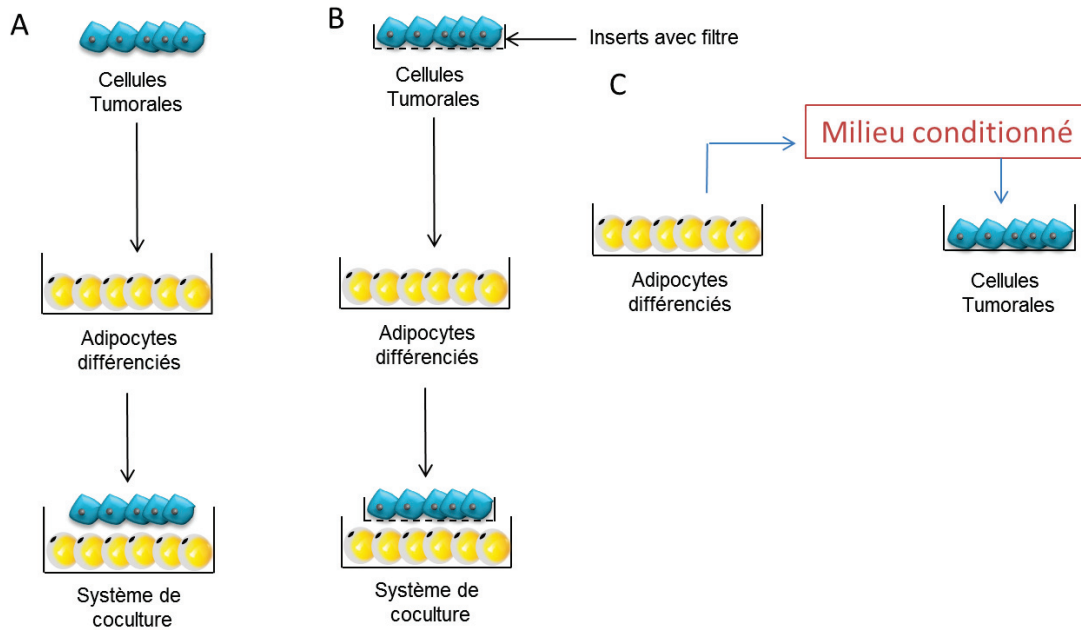
Lors de la culture des adipocytes *in vitro*, ces cellules nécessitent une phase de maturation d'environ 14 jours. Ils sont tout d'abordensemencés au stade de préadipocytes. Une fois à confluence, un cocktail d'inducteurs de différenciation variables selon les lignées cellulaires sont ajoutés au milieu de culture. Le but étant d'observer l'accumulation de gouttelettes lipidiques qui témoigne du degré de maturation adipocytaire est qui est visible au microscope. Toutes les lignées adipocytaires nécessitent de l'insuline pour se différencier en adipocytes. La lignée 3T3F442A n'a d'ailleurs besoin de rien d'autre, contrairement à la lignée humaine HMADS qui est également exigeante en facteur de croissance FGF2, en 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), en triiodothyronine et en dexaméthasone. Les cellules de lignée 3T3-L1 ont également besoin d'IBMX et de dexaméthasone pour se différencier en adipocytes.

Plusieurs systèmes d'interaction entre les deux types cellulaires ont été décrits dans la littérature, avec ou sans contact direct (Figure 6). La mise en contact directe consiste à ajouter les cellules tumorales au milieu de culture des adipocytes, eux-mêmesensemencés au préalable et ayant adhéré. Les cellules tumorales et les adipocytes peuvent également interagir indirectement à l'aide d'inserts qui permettent les échanges entre les deux types cellulaires en l'absence de contact direct et par le biais de molécules sécrétées dans le surnageant. En effet, le contact direct a été décrit, par exemple, comme responsable d'échanges de lipides et de composants membranaires entre les adipocytes et les cellules tumorales (131). Une autre méthode permet

d'étudier l'effet des sécrétions adipocytaires seules sur les cellules tumorales en évitant les échanges bidirectionnels entre les deux types cellulaires. Il s'agit de prélever le milieu de culture des adipocytes et de l'ajouter à celui des cellules cancéreuses. Les cellules de ces systèmes sont ensuite exposées à divers agents thérapeutiques pendant des durées variables. De nombreux tests peuvent alors être réalisés sur les cellules tumorales afin, dans un premier temps, d'évaluer leur sensibilité aux molécules thérapeutiques étudiées et dans un deuxième temps d'explorer les éventuelles modifications au niveau moléculaire, protéique, génétique ou encore métabolique.

Nous allons ici résumer une partie des données présentes dans la littérature évoquant une résistance des cellules cancéreuses dans les différents systèmes de culture décrits pour divers agents utilisés en clinique dans le traitement des cancers. Ils seront classés par systèmes de culture et par types de cancers et la nature de l'agent thérapeutique utilisé pour chaque étude sera précisée.





**Figure 6. Systèmes d'exposition des cellules tumorales aux adipocytes ou leurs sécrétions**

Différents systèmes ont été mis au point afin d'étudier l'impact de l'exposition des cellules tumorales aux adipocytes ou leurs sécrétions. (A) Elles peuvent être directementensemencées dans les puits contenant les cellules adipeuses qui auront eu le temps d'adhérer au fond des puits, il s'agit d'un système de coculture directe. (B) Elles peuvent également êtreensemencées au préalable dans des inserts dont le fond est constitué d'un filtre ne laissant pas passer les cellules mais permettant le libre-échange de facteurs sécrétés, on appellera ce système une coculture en inserts ou indirecte. (C) Enfin, le milieu conditionné des adipocytes peut être prélevé et ajouter au milieu de culture des cellules tumorales, il n'y aura alors aucun contact entre les cellules tumorales et les adipocytes.

### *Résultats des études utilisant la co-culture directe et indirecte*

Le système de co-culture directe décrit dans la figure 6, avec contact entre les cellules tumorales et les adipocytes, a permis de mettre en évidence la résistance des thérapies anticancéreuses liée au TA à plusieurs reprises. Ce fut le cas avec des cellules de leucémie aigue lymphoblastique (LAL) pour la vincristine, la dexaméthasone et la daunorubicine (129,132), ainsi que la L-asparaginase (127). En effet, le nombre de cellules viables était augmenté d'environ 5 fois après exposition à la vincristine et à la dexaméthasone, 15 fois après exposition à la daunorubicine et 3,5 fois après exposition à la L-asparaginase pour les cellules tumorales en présence d'adipocytes comparées aux cellules tumorales en absence d'adipocytes. Le système de co-culture indirecte à l'aide d'inserts a également permis de démontrer la résistance de plusieurs lignées cellulaires de LAL à la vincristine (126), à la L-asparaginase (127), à la doxorubicine et à la daunorubicine après exposition aux adipocytes (132). Cette résistance a été démontrée, une fois de plus, par l'augmentation du nombre de cellules viables pour les cellules tumorales en présence d'adipocytes que pour celles en absence d'adipocytes après exposition à l'agent cytotoxique. L'augmentation du nombre de cellules viables allait jusqu'à un facteur trois pour la vincristine et la doxorubicine, deux pour la L-asparaginase et huit pour la daunorubicine selon les lignées cellulaires entre les cellules tumorales cultivées en absence d'adipocytes et celles cultivées en présence d'adipocytes.

Dans le cas du MM, l'exposition au melphalan et au bortezomib a induit jusqu'à six fois moins de mort cellulaire pour les cellules tumorales cultivées directement avec les adipocytes que pour celles cultivées seules (130). Il a aussi été démontré une diminution de l'apoptose induite par le bortezomib et la dexaméthasone de deux lignées cellulaires de MM en cas d'exposition aux adipocytes par coculture directe par rapport aux cellules non exposées aux adipocytes (133). Du fait de la présence d'adipocytes, le pourcentage de cellules en apoptose, en prenant la moyenne des deux lignées cellulaires de MM, passait de 15,84% à 2,86% et de 6,4% à 3,2% après exposition bortezomib et à la dexaméthasone, respectivement. De plus, la coculture indirecte a permis de montrer la baisse de sensibilité des cellules de MM pour le melphalan en présence

d'adipocytes avec la réduction par deux de la quantité de cellules apoptotiques après exposition au melphalan (130).

Dans le cas du cancer du sein, il a été démontré que les adipocytes protégeaient les cellules tumorales des rayons ionisants utilisés en radiothérapie (134). Pour une même dose de rayons ionisants, les cellules tumorales présentaient une fraction de survie plus élevée quand elles étaient incubées avec les adipocytes. Il a également été prouvé que la cytotoxicité du trastuzumab était réduite d'environ 30% inférieure lorsque les cellules tumorales étaient incubées avec des adipocytes (43).

### *Résultats des études utilisant les milieux conditionnés*

Le milieu conditionné d'adipocytes obtenu par prélèvement du milieu de culture des adipocytes s'est également révélé protecteur pour les cellules tumorales vis-à-vis de divers agents thérapeutiques. En effet, plusieurs lignées cellulaires de MM ont présenté une résistance au melphalan, au bortezomib, à la dexaméthasone et à la doxorubicine (130,133) lorsqu'elles sont en contact avec du milieu conditionné d'adipocytes comme vu précédemment dans le cadre des cocultures. L'augmentation du nombre de cellules viables pour les cellules de MM incubées dans le milieu conditionné que pour celles incubées dans leur milieu de culture habituel au moment de l'exposition aux agents anticancéreux était en accord avec celle observée dans les systèmes de coculture. Dans le cas du cancer du sein, l'effet du trastuzumab et du T-DM1 (43) et de la gemcitabine (129) s'est montrée réduite pour les cellules de cancer mammaire incubées avec du milieu conditionné d'adipocytes que pour les autres cellules. L'étude utilisant des cellules de mélanome a mis en évidence que la dacarbazine induisait moins de mort cellulaire pour les cellules incubées dans du milieu conditionné d'adipocytes que celles cultivées dans du milieu de culture classique (128). En effet, l'IC50 de ces cellules pour la dacarbazine passe de 649  $\mu\text{M}$  à 3251  $\mu\text{M}$  après exposition au milieu conditionné.

### *Conclusion*

L'ensemble de ces données établit de manière solide que les adipocytes différenciés, ainsi que leurs sécrétions protègent les cellules tumorales de l'activité de divers agents cytotoxiques utilisés en clinique dans le traitement des cancers. A noter que certaines études décrivent ce phénomène de protection uniquement pour les adipocytes après différenciation (128) alors que d'autres le décrivent également pour les préadipocytes (43,134) (48,103).

Plusieurs études n'utilisent pas de cellules contrôles en parallèle des adipocytes afin de vérifier que l'effet observé ne serait pas dû au fait de cultiver les cellules tumorales avec d'autres cellules dans le cadre de la coculture directe ou indirecte ou de sécrétion d'autres cellules pour les milieux conditionnés (133–136). La possibilité que le mécanisme observé ne soit pas spécifique des adipocytes est donc envisageable. En revanche d'autres précisent utiliser des fibroblastes comme cellules contrôles (41,128,129) ou encore des préadipocytes avant différenciation (125,126).

Etant donné que les préadipocytes ont été décrits comme ayant un effet de protection par certains (41,131), le choix de ces cellules comme contrôle pourrait être discutable. Le fait que les adipocytes doivent être vivants et fonctionnels a également été exploré par fixation des adipocytes au paraformaldéhyde où la protection n'a pas été retrouvée. Il s'agit donc bien d'une interaction active entre adipocytes et cellules tumorales (126).

Dans les études *in vitro* mentionnées ci-dessus, la plupart des auteurs utilisent des lignées cellulaires murines de préadipocytes (126,128,129,132–134) décrites comme reproduisant les fonctions des adipocytes *in vivo*, à savoir le stockage des lipides et la sécrétion d'adipokines. Cependant, ces cellules n'ont pas été décrites comme appartenant à un type de TA ou un autre, alors que, nous l'avons vu plus haut, il existe plusieurs types de TA avec des fonctions différentes (57). Certaines de ces études ont également testé des lignées cellulaires de TA humain (43,132) afin de s'approcher des conditions *in vivo* humaines, obtenant des résultats qui vont dans le même sens. Cela permet de déduire que les lignées murines sont bien représentatives de l'effet de résistance observée avec les lignées humaines et inversement, nous permettant d'utiliser l'une ou l'autre lignée comme modèle d'étude sur ce sujet. Les cellules de lignées murines étant plus faciles à cultiver et différencier en adipocytes matures sont majoritairement utilisées pour les expériences *in vitro*.

Dans le cadre des hémopathies malignes telles que la LAL ou le MM, certaines études ont décrit des tests avec des adipocytes de moelle osseuse (126,130,133) dont les résultats et le phénomène de résistance se sont révélés similaires à ceux utilisant des adipocytes d'origine différente. Quelques études décrivent des expériences et des résultats allant dans le même sens avec des adipocytes isolés directement de TA humain, de la moelle osseuse (130,133) ou du TA abdominal (43). Cette reproductibilité des résultats suggère que le phénomène de résistance observé des adipocytes sur les cellules cancéreuses pour de nombreux agents thérapeutiques ne serait pas spécifique d'un type d'adipocytes. La grande diversité de cellules tumorales utilisées dans l'ensemble de la littérature, en fonction du type cancéreux et de son processus d'obtention, souligne le fait que cette résistance est retrouvée par de nombreux auteurs et qu'il est important d'en comprendre les mécanismes.

### 4.3. Mécanismes de résistance envisagés

#### 4.3.1. Séquestration de principe actif par les adipocytes

De par leur rôle de stockage, les adipocytes ont souvent été décrits comme stockant les principes actifs des agents thérapeutiques et plus particulièrement les molécules lipophiles (137,138). Ce stockage provoquerait une diminution des concentrations de la molécule d'intérêt et donc une diminution d'efficacité responsable d'une plus grande résistance aux traitements en cas d'hyperadiposité. Cette hypothèse a été à l'origine de nombreuses recherches *in vitro* et *in vivo* visant à expliquer les résistances aux traitements décrits précédemment. Il a été prouvé que les souris obèses présentent un plus grand volume de distribution pour la vincristine et une demi-vie plus courte que les souris de poids normal malgré l'adaptation de posologie au poids de chaque souris (137). Cependant, les taux circulants de vincristine n'ont pas été retrouvés significativement différents entre les souris en surpoids ou non après l'administration de doses adaptées à la masse corporelle de chaque souris.

*In vitro*, il a été mis en évidence que les adipocytes internalisaient plus de vincristine que les cellules fibroblastiques contrôles (126). Or, les quantités de vincristine retrouvées dans les milieux de culture des adipocytes ou des cellules contrôles n'étaient pas significativement différents. Ces résultats ont été expliqués par des raisons techniques, de volume de milieux et ne permettent pas d'expliquer la modification d'efficacité de la vincristine sur les cellules tumorales en présence ou en absence d'adipocytes.

Il est donc possible que le TA séquestre une partie des molécules actives mais cela ne prouve pas que ce phénomène ait un impact sur la sensibilité des tumeurs aux traitements. De plus, la cinétique de la vincristine est très complexe et il n'a pas été prouvé que ses taux circulants soient corrélés à son efficacité. De plus, une partie des phénomènes de résistances des cellules tumorales aux différents agents thérapeutiques en présence de milieux conditionnés d'adipocytes décrits précédemment ne peuvent pas être expliqués par la séquestration des molécules actives par les adipocytes car ils ont été observés avec les milieux conditionnés d'adipocytes. Il paraît important de regarder ce qui se passe au sein de la cellule tumorale lorsqu'elle est exposée aux sécrétions adipocytaires afin de comprendre sa capacité de résistance aux agents anticancéreux.

### 4.3.2. Cycle cellulaire

L'effet cytotoxique des agents anticancéreux induit, pour la plupart d'entre eux, un arrêt du cycle cellulaire qui se traduit par une augmentation de cellules en phase G0/G1 ou en G2/M, et une diminution du nombre de cellules en phase S (139). Les cellules ainsi arrêtées, si elles ne sont pas en mesure de réparer leurs propres dommages à l'ADN, vont entrer dans le processus de l'apoptose ou de mort cellulaire afin de ne pas répliquer un ADN altéré.

Durant l'évolution du cycle cellulaire, plusieurs protéines jouent un rôle majeur (Figure 7). C'est le cas des cyclines, comme la cycline D1, dont la transcription est médiée, entre autre, par le facteur E2F3. Les cyclines contrôlent directement la progression du cycle cellulaire à plusieurs niveaux et souvent couplées à des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK). La protéine AKT, qui fait partie de la voie de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR, voie clé de la prolifération et de la survie cellulaire, participe au contrôle de la progression du cycle cellulaire de manière indirecte. AKT agit en amont des cyclines par inactivation de la protéine P27, qui a pour rôle d'inhiber l'action des cyclines et donc, de bloquer le cycle cellulaire. Le profil d'expression classique des gènes codant pour ces protéines dans une cellule exposée à un agent cytotoxique sera donc une diminution d'expression des gènes codant pour AKT, E2F3 et cycline D1 ainsi qu'une augmentation d'expression du gène codant pour P27. Les protéines STAT3 sont également des acteurs importants de la régulation du cycle car leur présence est nécessaire à l'activité de la cycline D1 (140). Le complexe STAT3 fait partie d'une autre voie importante dans la survie cellulaire, la voie JAK/STAT. L'activation de STAT3 fait suite à la phosphorylation des tyrosines kinases après activation des RTK par la fixation de facteurs de croissance ou d'interleukine-6.

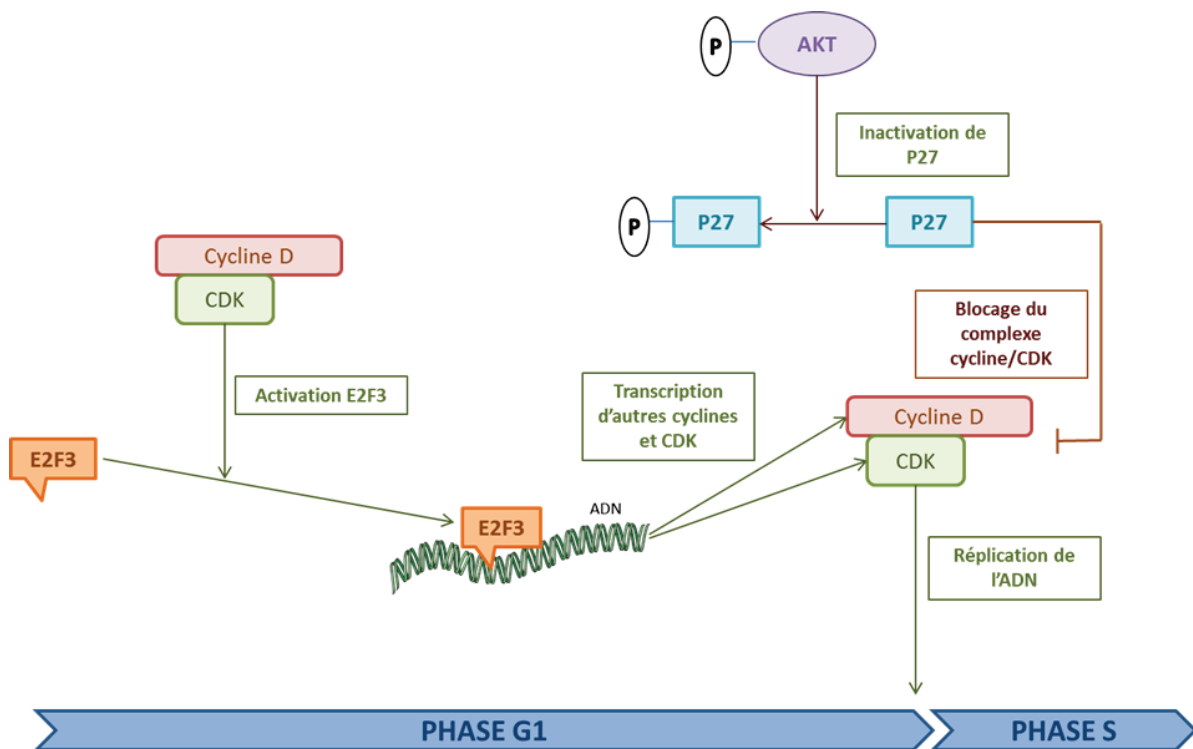
Il a été mis en évidence que la coculture directe entre cellules de MM et adipocytes, sans ajout d'agent thérapeutique, entraînait une diminution du nombre de cellules en phase G1 et une augmentation de cellules en phase S par rapport aux cellules tumorales cultivées seules (133). De plus, l'expression des protéines cycline D1, STAT3 et AKT phosphorylées, était augmentée en comparaison avec celle des cellules tumorales cultivées seules (133). Ces modifications au sein des cellules tumorales sont inverses à celles observées après l'exposition à un agent cytotoxique et pourrait expliquer l'inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire induite par les agents cytotoxiques

pour les cellules tumorales en présence d'adipocytes. De manière cohérente avec cette hypothèse, il a été démontré que le traitement par la dacarbazine entraînait également une augmentation d'expression du gène codant pour la cycline D1 chez les souris obèses alors qu'elle est diminuée chez les souris non obèses (128).

Le blocage du cycle cellulaire a aussi été décrit pour des cellules de LAL après exposition à la vincristine (126). Le blocage était moins important pour les cellules tumorales en présence d'adipocytes en coculture indirecte et s'accompagnait d'une résistance à la vincristine.

La modification du cycle cellulaire semble donc bien être impliquée dans le mécanisme de la résistance induite par le TA sur les cellules tumorales.





**Figure 7. Evolution du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S pour les cellules eucaryotes.**

Les cyclines forment des complexes avec les kinases dépendantes des cyclines (CDK) afin d'activer leur propre transcription via l'activation du facteur de transcription E2F3 et de déclencher la réplication de l'ADN qui va avoir pour conséquence de faire progresser le cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. Les complexes cyclines/CDK peuvent être inactivés par la protéine P27 active sous forme non phosphorylée. La protéine AKT, après activation par phosphorylation pourra inhiber la P27 en la phosphorylant à son tour.

Cependant, ces données ne nous permettent pas de dire que les sécrétions adipocytaires ont comme effet de modifier l'évolution du cycle cellulaire et donc de diminuer l'efficacité des thérapies sur les cellules tumorales. En effet, cela pourrait être, par exemple, la conséquence d'une altération du phénomène d'apoptose médiée par un autre mécanisme.

#### 4.3.3. Expression de gènes de survie

L'arrêt du cycle cellulaire est accompagné de régulation de plusieurs gènes favorisant l'apoptose. Ces gènes sont appelés gènes d'induction de mort cellulaire ou proapoptotique (tels que Bad) et favorisent l'arrêt du cycle cellulaire pour les cellules ayant subi des dommages dans leur ADN et donc activent l'apoptose. A l'inverse, des gènes de survie cellulaire ou antiapoptotiques de la famille du Bcl2 permettent à la cellule d'échapper à l'apoptose (Figure 1).

Il a été démontré que l'exposition des cellules de LAL à la vincristine provoquait une diminution d'expression du gène codant pour la protéine Pim. Pim a pour action de phosphoryler Bad et de le rendre inactif, cette diminution d'expression était donc accompagnée d'augmentation des taux de Bad sous sa forme active. Les cellules de LAL cocultivées avec les adipocytes, en plus d'avoir une mortalité réduite après exposition à la vincristine, ne présentaient pas non plus ces effets du traitement sur l'expression des gènes pro- et antiapoptotiques (126). La mise en contact des cellules tumorales avec les adipocytes a également engendré une augmentation d'expression de Bcl-2 dans les cellules de MM (133) et de leucémie aigue myéloblastique (LAM) (126). De plus, le clivage de la caspase-3 joue un rôle important dans la mise en place de l'apoptose. En effet, il a été observé que cette caspase était moins clivée dans les cellules de LAL (132) et de MM (136) cocultivées avec les adipocytes après exposition à la daunorubicine et au bortezomib, respectivement, que dans les cellules tumorales cultivées seules.

Ces résultats sont en faveur d'une diminution de l'apoptose pour les cellules tumorales en présence d'adipocytes ou de leurs sécrétions. Cependant, les protéines décrites ici impliquées dans ce phénomène ne sont pas toutes spécifiques de l'apoptose. Le clivage de la caspase-3, par exemple, est également retrouvé dans le processus d'autophagie.

#### 4.3.4. Autophagie

L'autophagie a été décrite comme un mécanisme responsable de la protection des cellules tumorales via les sécrétions adipocytaires. Il s'agit d'un processus de dégradation par lequel des éléments anormaux ou ayant subi des dommages contenus dans la cellule sont détruits sans pour autant tuer la cellule. Une cellule tumorale ayant subi des agressions suite à l'exposition à des agents anticancéreux va, grâce à ce mécanisme, échapper à la mort cellulaire si elle parvient à réparer suffisamment ses lésions structurales. Le clivage de la caspase-9 et -3 ainsi que des PARP sont des étapes cruciales de l'autophagie et une augmentation des protéines Atg3, Atg5 et LC3-I/II, des protéines spécifiques de l'autophagie, est observée au cours de ce processus.

La surexpression de ces protéines a été mise en évidence dans des cellules de MM exposées à du milieu conditionné d'adipocytes ainsi qu'au melphalan et au bortezomib (130). De plus, l'ajout d'inhibiteurs de l'autophagie à ces mêmes cellules de MM en présence de milieu conditionné d'adipocytes a permis de rétablir la sensibilité des cellules tumorales au melphalan et au bortezomib (130). De manière cohérente avec ces résultats, l'extinction du gène codant pour la protéine Atg5 dans les cellules de MM a permis de les resensibiliser au melphalan (130). Les clivages des PARP caspase-3 et -9 qui devraient être augmentés au sein des cellules exposées aux agents cytotoxiques sont moins, voire plus du tout, visible dans les cellules de LAL et de MM incubées en présence de sécrétions adipocytaires après l'exposition à la daunorubicine et au melphalan respectivement (130,132).

De plus, il a été observé que l'exposition de cellules de MM à la leptine et à l'adiponectine augmentait l'activation du processus de l'autophagie et diminuait leur sensibilité au melphalan et au bortezomib d'environ 20%, de manière similaire à l'exposition au milieu conditionné d'adipocytes.

#### 4.3.5. Fonction des pompes d'efflux

L'efflux de molécules actives peut également être à l'origine de résistances aux traitements des cellules tumorales *in vitro*. Cet efflux s'exerce via la surexpression de pompes d'efflux telle que la glycoprotéine-P (P-gp). La P-gp a été retrouvée fortement exprimée dans les tumeurs des souris obèses atteintes de mélanomes et elle augmente encore au moment du traitement à la dacarbazine

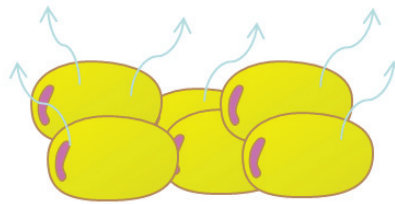
(DTIC) (128). A l'inverse, l'expression de la P-gp était diminuée dans les tumeurs de souris non obèses après traitement à la DTIC. Selon l'hypothèse de la surexpression des pompes d'efflux dans les cellules des souris obèses, on s'attendrait à observer des taux circulants de DTIC supérieurs chez ces souris par rapport aux souris de poids normal du fait d'un efflux plus important. Les taux de DTIC circulants ont, en effet été retrouvés deux à trois fois plus élevés pour les souris obèses alors qu'ils sont plus de six fois moins élevés dans les tumeurs des souris obèses par rapport à celles des souris non obèses. Des données cohérentes ont également été décrites *in vitro* avec des cellules tumorales en contact avec des sécrétions adipocytaires. Ces cellules exprimaient plus de P-gp à leur membrane plasmatique que celles non exposées aux milieux conditionnés d'adipocytes (128). De plus, le fait de bloquer P-gp a permis de rétablir, en partie, la sensibilité des cellules tumorales à la DTIC. Les cellules tumorales, en présence de TA, seraient donc plus aptes à surexprimer les pompes d'efflux et, par conséquent, à excréter les molécules cytotoxiques des agents anticancéreux.

Grâce à toutes ces données, nous pouvons conclure que le mécanisme de la résistance des cellules tumorales aux agents cytotoxiques anticancéreux, en relation avec le TA, se fait de manière complexe et à différents niveaux. En effet, la cellule serait capable de moduler l'expression de ces pompes d'efflux afin d'excréter la molécule cytotoxique d'une part. D'autre part, il a été rapporté des modifications de contrôle du cycle cellulaire mais aussi des différentes voies d'apoptose et de mort cellulaire qui pourraient également être expliquées par un efflux de l'agent cytotoxique par l'action des pompes d'efflux.

La mise en évidence de tels mécanismes a permis d'approfondir l'identification des facteurs sécrétés responsables de la résistance des cellules tumorales. Les facteurs sécrétés par les adipocytes sont très nombreux et de natures diverses mais les principaux évalués ont été la leptine, l'adiponectine et l'interleukine-6 car leurs concentrations étaient modifiées dans le plasma de patients obèses comparé à celui de patients non obèses.

### Facteurs pro- et anti-inflammatoires

TNF $\alpha$   
IL-1  
IL-6  
TGF $\beta$   
MCP1  
PAI1



### Lipolyse

Glycérol  
Acides gras  
Glutamine  
Adénosine  
Lactate  
Prostaglandines

### Adipokines

Leptine  
Adiponectine  
Resistine  
Protéine angiopoietine like 4  
Facteur préadipocytaire

### Hormones sexuelles

Œstrogènes  
Progestérone  
Androgènes

### exosomes

miRNA

**Figure 8. Sécrétome adipocytes**

Le tissu adipeux sécrète des facteurs pro et antiinflammatoires tel que le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), les interleukines 1 et 6 (IL-1, IL-6), le Tumor Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), la Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) et le Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1). Les adipokines spécifiques du tissu adipeux et les hormones sexuelles font aussi partie de ce sécrétome. On y retrouve également les produits du métabolisme des adipocytes et donc des produits de dégradation de la lipolyse.

#### 4.4. Facteurs responsables

Les facteurs sécrétés des adipocytes sont très variés et certainement pas tous identifiés à ce jour (91). Les adipocytes sécrètent des facteurs protéiques tels que les adipokines mais également des interleukines, des métalloprotéines, du TGF $\beta$  et TNF $\alpha$ , des facteurs impliqués dans le processus d'inflammation. Des hormones sont également retrouvées dans le secrétome des adipocytes, ainsi que des facteurs de la lipolyse. Ces facteurs peuvent être libérés directement dans le milieu ou enfermés dans des vésicules lipidiques, les exosomes (Figure 7).

##### 4.4.1. Leptine/adiponectine

La leptine et l'adiponectine ont été largement mentionnées dans le cadre de résistance aux traitements induites par l'obésité, ces deux facteurs ont donc fait l'objet de plusieurs études. L'adipsine représente également un facteur émergent dans les équipes de recherche sur le thème obésité et cancer.

*In vitro*, le blocage de l'action de la leptine au moyen d'inhibiteurs, directement ajoutés dans le milieu de culture de cellules de MM en présence d'adipocytes, a permis de rétablir la sensibilité des cellules tumorales aux agents thérapeutiques (133). De la même manière, l'exposition des cellules de MM à la leptine, à forte doses, a permis d'observer les mêmes modifications que celles observées suite à l'exposition aux sécrétions adipocytaires (133). D'autre part, il a été mis en évidence que l'exposition à la leptine et à l'adipsine avaient le même effet que le milieu conditionné d'adipocytes sur l'expression des protéines de l'autophagie dans les cellules de MM (130). De plus, les cellules de cancer colorectal sont plus résistantes au 5-FU lorsqu'elles sont exposées à la leptine. Le taux de cellules viables augmente de 20% pour les cellules tumorales exposées à la leptine après ajout de 5-FU par rapport à celles cultivées sans leptine. Les modifications de phosphorylation d'AKT sont également observées dans les cellules exposées à cette cytokine. L'ajout d'un inhibiteur de la voie PI3K/AKT à ces conditions a permis de rétablir la sensibilité des cellules de cancer colorectal au 5-FU et le niveau de phosphorylation d'AKT pour les cellules exposées à la leptine (141). Ces résultats supposent que l'action de la leptine

induit des modifications d'activation d'AKT. Cette hypothèse est semblable et cohérente avec les mécanismes décrits pour les sécrétions adipocytaires.

L'ajout d'anticorps dirigés contre la leptine et l'adipsine dans les milieux conditionnés contenant les cellules de MM, a permis de sensibiliser à nouveau les cellules tumorales au melphalan et au bortezomib avec un effet synergique des deux anticorps, tout comme l'ajout d'un inhibiteur de STAT3 (130).

L'ensemble de ces résultats sur la leptine, l'adiponectine et l'adipsine sont cohérents avec les mécanismes observés dans les cellules tumorales après exposition au milieu conditionné d'adipocytes. Ceci suggère que ces adipokines, ensemble, pourraient être responsables du phénomène de résistance observé. Cependant, ces données peuvent être critiquées car les concentrations utilisées d'adipokines in vitro sont très élevées comparées à celles dosées dans le sérum humain ou le milieu de culture des cellules et quelques études n'ont pas réussi à démontrer ce lien (43).

#### 4.4.2. Interleukine-6

L'IL-6, a été largement décrite dans l'inflammation liée à l'obésité et suggérée comme étant responsable de la résistance aux traitements anticancéreux en cas d'obésité. Il a été confirmé que son expression était augmentée par les cellules tumorales cultivées en présence d'adipocytes par rapport à celles cultivées seules (134). De plus, l'exposition des cellules tumorales à l'IL-6 a reproduit le phénomène de résistance de ces cellules vis-à-vis des radiations ionisantes en présence d'adipocytes ainsi que les modifications d'expression de la protéine Chk1 (134). L'IL-6 pourrait donc être responsable d'une amélioration des capacités de réparation de l'ADN des cellules et donc de la résistance observée des cellules tumorales en présence d'adipocytes pour les radiations ionisantes. Cependant, d'autres études n'ont retrouvé aucune modification de sensibilité des cellules tumorales aux agents cytotoxiques après exposition à l'IL-6 (43).

#### 4.4.3. Hormones

Les hormones sécrétées par les adipocytes, telles que les estrogènes et la progestérone, ont été décrites comme responsable d'une plus grande prolifération et d'une plus grande agressivité tumorale (142). En ce qui concerne la résistance aux traitements, il a été démontré que les cellules de cancer du sein cultivées en présence de sécrétions adipocytaires étaient moins sensibles à certains agents cytotoxiques tels que le trastuzumab et le T-DM1 que celles cultivées seules (43). Cette résistance a été observée pour diverses lignées cellulaires, indépendamment de l'expression des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone. Ces résultats ne sont donc pas en faveur d'un rôle des hormones pour expliquer le mécanisme de cette résistance.

#### 4.4.4. Acides aminés

L'activité métabolique des adipocytes inclut la libération d'acides aminés dans le milieu de culture (143). Or, des agents cytotoxiques, comme la L-asparaginase, agissent par compétition avec l'asparagine, un acide aminé essentiel des cellules. On peut donc supposer que si les cellules tumorales reçoivent de l'asparagine des adipocytes, cela pourrait être la cause de leur résistance à cet agent en présence d'adipocytes. Aucune différence concernant les taux d'asparagine n'a été observée dans le plasma ou dans la moelle osseuse de patients obèses ou non obèses atteints de LAL (127). En revanche, les taux de glutamine augmentés ont été mis en évidence et le blocage de synthèse de la glutamine restaure la sensibilité des cellules de LAL à la L-asparaginase après exposition aux sécrétions adipocytaires (127). Des facteurs sécrétés par les adipocytes pourraient donc entrer en compétition avec le substrat de certains agents thérapeutiques et donc en diminuer l'efficacité.

#### 4.4.5. miARN

Il a été démontré à plusieurs reprises que les adipocytes pouvaient excréter des microARN (miARN) via la formation d'exosomes (144). Une hypothèse consiste donc à dire que les cellules tumorales pourraient capter ces miARN et qu'ils leur confèreraient des propriétés de résistance à certains agents cytotoxiques. Ce phénomène a été observé pour des cellules de cancer des ovaires pour un miARN particulier, le miARN21 ou miR21, particulièrement surexprimé dans les



adipocytes (135). Il a été mis en évidence que les cellules tumorales de cancer des ovaires étaient capables d'internaliser ces miR21 et que cela leur conférait une diminution de sensibilité au paclitaxel avec une diminution d'expression de gènes proapoptotiques. Il est également plus fortement exprimé dans les cellules de cancer des ovaires cultivées en contact avec les adipocytes que dans celles cultivées seules. De plus, il a été démontré que l'inhibition de synthèse et la suppression de ce miARN permettait de retrouver une bonne sensibilité des cellules de cancer des ovaires au paclitaxel ainsi qu'une expression normale des gènes proapoptotiques (135).

## CONCLUSION

De nombreuses résistances en relation avec le TA ont été observées pour divers types de cancers *in vitro* et *in vivo*, pour divers types de cancers et divers types d'adipocytes. Il semblerait que les mécanismes de cette résistance soient complexes et multifactoriels.

Une première question concerne le type de contact entre cellules tumorales et les adipocytes. Alors que certaines études montrent que le contact entre adipocytes et cellules tumorales est indispensable pour observer la résistance, d'autres montrent que l'exposition des cellules tumorales aux sécrétions adipocytaires suffisent. Une étude a également suggéré qu'il était nécessaire d'exposer d'abord les adipocytes aux cellules tumorales afin que les adipocytes induisent un stress oxydant dans les cellules tumorales qui les rendrait résistantes à la daunorubicine (132).

Au niveau du mécanisme de ce phénomène de résistance, il se traduit par une diminution d'apoptose et une augmentation de survie dans les cellules tumorales exposées aux agents cytotoxiques. Ce phénomène a été observé pour toutes les cellules tumorales et toutes les molécules anticancéreuses décrites dans ces études sauf pour le nilotinib sur les cellules de leucémies. En effet, la tendance d'augmentation du pourcentage de cellules tumorales viables en coculture directe avec les adipocytes comparé à celui des cellules cultivées seules étaient la même que pour les autres agents cytotoxiques mais elle n'a pas atteint la significativité statistique (126).

Afin d'identifier les facteurs responsables de la résistance, plusieurs ont été étudiés dans les sécrétions. La leptine, l'adiponectine, l'IL-6, les acides aminés et les microARN ont tous donné des résultats prometteurs pour un type de cancer et sur un agent thérapeutique précis. Cependant, concernant les thérapies ciblées, la leptine, l'adiponectine et l'IL-6 n'ont pas permis de rétablir la sensibilité des cellules de cancer du sein pour le trastuzumab (43).

Des actions interventionnelles ont été testées afin de rétablir la sensibilité des tumeurs pour les différents traitements comme la perte de poids et l'élaboration de nouvelles formes galéniques pour les médicaments utilisés. D'une part, la perte de poids des souris, soit par modifications de l'alimentation soit par prise d'un médicament anti-obésité, l'orlistat a permis de rétablir la

sensibilité des mélanomes à la dacarbazine (128). Pour montrer cela, plusieurs groupes de souris porteuses de tumeurs de mélanome ont été utilisés, ces souris recevaient soit une alimentation enrichie en graisse pendant plusieurs jours qui leur faisaient prendre du poids avant le début du traitement, soit une alimentation normale. La réponse au traitement par dacarbazine était significativement meilleure pour les souris recevant le régime alimentaire normal que pour les autres selon la croissance tumorale observée. Ensuite, le changement d'alimentation d'enrichie en graisse à normal et/ou l'administration d'orlistat a permis de rétablir la réponse à la dacarbazine chez ces souris.

D'autre part, une augmentation de sensibilité des cellules de cancer du sein à la gemcitabine a été observée suite à l'incorporation d'un dérivé de gemcitabine à l'intérieur de nanoparticules lipidique (129). Des lignées cellulaires de tumeurs mammaires et d'adipocytes 3T3-L1 ont été utilisées pour démontrer, *in vitro*, que les cellules tumorales étaient moins sensibles à la gemcitabine lorsqu'elles étaient en contact avec du milieu conditionné d'adipocytes que lorsqu'elles étaient dans du milieu control. Dans cette étude, ils ont également utilisé des souris rendues obèses par l'alimentation pour montrer que les souris obèses et porteuses de tumeurs mammaires répondaient moins bien au traitement par gemcitabine que les souris de poids normal. Cependant, ce phénomène de résistance n'était pas observé avec l'utilisation de gemcitabine encapsulée dans des nanoparticules *in vitro* et *in vivo*.

D'autres études seraient nécessaires afin de comprendre le ou les mécanisme(s) de résistance(s) des cancers en lien avec l'obésité. Notamment pour les thérapies ciblées dont le mécanisme paraît différent que pour les autres agents anticancéreux.

Notre travail expérimental a consisté en la mise en évidence de la résistance des cellules de cancer du sein pour divers ITK mais plus particulièrement pour le lapatinib lorsque ces cellules sont en contact avec du milieu conditionné d'adipocytes. Dans le premier article, plusieurs expériences nous ont permis de montrer cette résistance *in vitro* puis *in vivo* grâce à un modèle murin reproduisant le contact entre la tumeur et le TA. Les expériences suivantes visent à identifier le mécanisme et le ou les facteur(s) responsable(s) de cette résistance. Le deuxième article a eu pour but de décrire notre modèle murin auquel nous greffons du TA humain. Nous avons étudié sa stabilité dans le temps au niveau structural, histologique et cytologique.





## PARTIE EXPERIMENTALE

## **PARTIE I**

# **Adipocyte-conditioned medium induces resistance of breast cancer cells to lapatinib**

(GENESTE *et al.* manuscrit soumis dans Clinical Cancer Research)

## INTRODUCTION

Il a été précédemment observé que les thérapies ciblées pouvaient être moins efficaces dans le traitement des cancers en cas d'obésité (120,121). Ce phénomène de résistance a été reproduit de manière expérimentale par plusieurs équipes dans le but de décrire des mécanismes pouvant expliquer cette résistance aux thérapies ciblées. Nous allons rapidement citer les différents mécanismes de résistance décrits pour les thérapies ciblées dirigées contre HER2 dans le traitement du cancer du sein puis les mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux décrits en lien avec l'obésité.

D'une part, les mécanismes de résistance décrits pour les thérapies ciblées anti-HER2 dans le traitement des cancers sont multiples i) la présence d'une forme tronquée de HER2 au niveau extracellulaire appelée p95HER2 (145), ii) une altération du mécanisme d'ADCC (146), iii) un défaut dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (147), iv) une altération des contrôles de phosphorylation de la voie de signalisation intracellulaire PI3K/AKT (148), v) l'action d'autres RTK ou de protéines non récepteurs à activité tyrosine kinase qui représenterait une alternative à l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinases en cas de blocage de HER2 (149,150), et vi) l'efflux de drogue via les pompes d'efflux telles que P-gp (136).

Les trois mécanismes décrits le plus souvent concernant la protection des cellules tumorales par les sécrétions adipocytaires des divers agents thérapeutiques sont un défaut d'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, l'inhibition du blocage du cycle cellulaire et la diminution du phénomène d'apoptose. Ces trois étapes de la vie cellulaire normalement touchées par les agents anticancéreux.

Notre équipe travaille depuis plusieurs années à élucider ce phénomène de résistance aux traitements en lien avec l'obésité. Malgré quelques travaux sur les hémopathies malignes dont nous ne détaillerons pas les résultats ici, nous avons principalement travaillé sur le cancer du sein et les thérapies ciblées dirigées contre HER2. Le bénéfice apporté par les thérapies ciblées dans le traitement des tumeurs de sein surexprimant HER2 a été démontré avec l'anticorps monoclonal trastuzumab (151–154) en complément de la chimiothérapie conventionnelle ainsi qu'avec l'ITK lapatinib (155). En effet, il a été démontré que plusieurs lignées cellulaires de tumeur du sein



surexprimant HER2, dont BT-474 et SKBR3, présentaient une sensibilité réduite au trastuzumab et au T-DM1 lorsque ces cellules étaient exposées aux adipocytes ou à leur sécrétion que lorsqu'elles étaient cultivées seules et dans leur milieu de culture (43). Cependant, aucune donnée, à notre connaissance n'existe sur la sensibilité des cellules tumorales pour le lapatinib en cas de contact avec le TA.

A partir de ces données, nous avons proposé dans ce projet d'étudier la résistance des cellules de tumeurs mammaires au lapatinib en présence de sécrétions d'adipocytes pour ensuite essayer d'en identifier le mécanisme. Nous avons travaillé sur des lignées cellulaires d'adipocytes et de cellules tumorales afin de reproduire cet effet *in vitro* d'une part et *in vivo* chez la souris d'autre part. Concernant les lignées de cellules cancéreuses utilisées, il a été suggéré que les cellules de tumeurs du sein BT-474 pourraient développer une résistance au lapatinib via l'augmentation d'activité de ER (156,157). C'est pourquoi nous utiliserons, en plus des lignées BT-474 et SKBR3, d'autres lignées cellulaires n'exprimant pas ER afin de s'affranchir de cette éventualité. Nous avons utilisé les lignées de préadipocytes murins 3T3F442A que nous avons différenciés ensuite en adipocytes par l'ajout d'insuline. Nous avons principalement étudié ici l'éventualité du défaut dans l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose. En effet, des études ont démontré que la suppression de prolifération des cellules tumorales induit par le lapatinib était corrélée à un arrêt de cycle cellulaire en phase G0/G1 et à une induction d'apoptose (158,159). Nous avons utilisé également les lignées cellulaires BT-474 et SKBR-3 dans un souci d'homogénéité avec les précédents résultats de notre équipe et aussi au vue de la sensibilité de ces lignées pour le lapatinib.

**Title: Adipocyte-conditioned medium induces resistance of breast cancer cells to lapatinib**

Authors: A. Geneste<sup>1</sup>, MN. Duong<sup>2</sup>, L. Molina<sup>1</sup>, S. Beaumel<sup>1</sup>, A. Cleret<sup>1</sup>, K. Chettab<sup>1</sup>, E. Delay<sup>3</sup>, Lachat M<sup>4</sup>, L.P. Jordheim<sup>1</sup>, Eva-Laure Matera<sup>1</sup>, C. Dumontet<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM UMR 1052, CNRS 5286, 8 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

<sup>2</sup> Department of Oncology, Lausanne University Hospital Center (CHUV) and University of Lausanne, Epalinges, Switzerland

<sup>3</sup> Centre Léon Bérard, Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, 28 Promenade Léa et Napoléon Bullukian, 69008 Lyon, France

<sup>4</sup> Hospices Civils de Lyon, Banque de tissus et cellules, 5 place d'Arsonval, 69003 Lyon, France

<sup>5</sup> Hospices Civils de Lyon, Services d'Hématologie, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite, France

The authors declare no potential conflicts of interest.

**Acknowledgments :**

This work was funded in part by INCA grants INCa\_INSERM\_DGOS\_12563 and PLBIO 2013-106

## Abstract

**Purpose:** The existence of a cross-talk between peritumoral adipocytes and cancer cells has been increasingly investigated. Several studies have shown that these adipocytes protect tumor cells from the effect of anticancer agents. However, the mechanisms and the signaling pathways involved in this protection remain unclear.

**Experimental design:** We aimed to demonstrate a protective effect of adipocyte-conditioned medium on breast cancer cells exposed to tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as lapatinib and explored the underlying mechanisms. We firstly determined the impact of adipocyte-conditioned medium on lapatinib-induced cell cycle blockade. Then, we partly explored performed preliminary characterization of the adipocyte-secreted factors involved. We also elaborated and characterized a murine model reproducing the cross talk between adipose tissue and mammary tumors.

**Results:** Adipocyte-conditioned medium induced resistance of HER2 positive breast cancer cells to the cytotoxic effect of several TKI including lapatinib. Investigations of cell cycle and transcription of related genes revealed that the lapatinib-mediated blockade in G0/G1 phase was attenuated in the presence of conditioned medium. Additionally, in an *in vivo* mice model, the proximity of adipose tissue with the tumor decreased the antitumor activity of lapatinib. Pharmacological inhibition of lipolysis in adipocytes was found to reverse their protective effect on tumor cells exposed to lapatinib.

**Conclusions:** Our results demonstrate that proximity with adipose tissue results in increased resistance of tumor cells to TKI such as lapatinib. Exposure of adipocytes to anti lipolytic agents such as beta blockers reduced this protective effect *in vitro*.

## Introduction

Approximately 20% of human breast cancers are human epidermal growth factor receptor 2- (HER2) amplified, and overexpression correlates with aggressive tumor behavior and poor patient outcomes (1). HER2 (ErbB2, or HER2/neu) is a member of the HER tyrosine kinase receptor (TKR) family, which includes three other members: epidermal growth factor receptor (EGFR or HER1), HER3, and HER4. Homo- and hetero-dimerization of ligand-bound HER receptors results in activation of multiple pathways, including the p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathways, which regulate cell proliferation and apoptosis (2–4). HER2, the preferred heterodimerization partner of other HER receptors, does not have a known natural ligand and is activated by over-expression and homodimerization, or by ligand-mediated stimulation of another HER receptor through heterodimerization. Targeted therapies such as monoclonal antibodies or tyrosine kinase inhibitors (TKI) have provided an improvement in breast cancer treatment by targeting HER2 or its dimerization partners. The monoclonal antibody trastuzumab and the TKI lapatinib have both been approved by the FDA and the EMA in combination with chemotherapy (5,6), and both have proven efficacy in the clinical setting (7,8). However, resistances still occur in patients because of the complexity, robustness and redundancy of the HER biological network (9,10).

Obesity is described as a factor of cancer development but also a factor of a lower efficacy of cancer treatment (11–14) It has been observed in epidemiological studies that trastuzumab and lapatinib were less efficient in overweight and obese patients than in other patients in terms of free relapse survival and overall survival (10,15). Indeed, the overall survival of lean women treated with trastuzumab for breast cancer was 38% higher than for obese women with a 10-year follow-up. Moreover, several *in vitro* studies have demonstrated a decrease of efficacy of targeted therapies on breast tumor cells if they are in contact with adipocytes or conditioned medium (CM) from adipocytes (16–19). The main obesity-mediated mechanisms of cancers to chemotherapies described *in vitro* or in mice are the alteration of the intracellular signaling pathway PI3K/AKT/mTOR (16), the inhibition of the cell cycle blockade and the inhibition of

apoptosis(20–22). In a previous study, our team showed that adipocyte-secreted factors decreased the efficacy of trastuzumab on BT-474 and SKBR-3 breast cancer cell lines (16).

Several mechanisms of resistance have been described specifically for anti-HER2 targeted therapies. These include i) the expression of a truncated form of HER2 called p95HER2 unable to bind trastuzumab (23) ii) an alteration in ADCC mechanisms (24) iii) a defect in cell cycle arrest and/or apoptosis (25) iv) an alteration in phosphorylation control of the intracellular signaling pathway (26) v) the action of alternative tyrosine kinase protein activation in case of HER2 blockade (17,27) vi) drug efflux through efflux pumps such P-gp (28) and vii) an upregulation of estrogen receptors (ER) (29).

In this study, we proposed to continue the study of the role of adipose tissue in the resistance of breast cancer cells to small molecule targeted therapies such as the TKI lapatinib. Lapatinib is a small molecule that binds to the intracellular domain of the TKR and inhibits the activation of downstream signalization pathways. Lapatinib shares the mechanisms of resistance described for anti-HER2 targeted therapies except that it binds to the intracellular domain of HER2. Since the presence of p95HER2 should not modify its activity and as it does not act via an ADCC mechanism, we did not study these mechanisms as a potential mechanisms of resistance and focused on cell cycle arrest. Indeed, the cytotoxic effect of lapatinib has been described as modifying the activation of PTEN/AKT/mTor pathway and blocking the cell cycle in G1 phase (30). Several proteins are required for cell cycle progression, such as P27, AKT, cyclin D1 and E2F3. Phosphorylated AKT is involved in cell cycle progression by phosphorylating P27 that prevents the cell cycle blockade. P27, when not phosphorylated, inhibits the action of cyclins while E2F3 is implicated in cyclin D1 gene transcription.

After demonstrating reduced cell cycle blockade by lapatinib in the presence of adipocyte-conditioned medium, we reproduced the protective effect of tumor cells by adipocyte-secreted factors for lapatinib as it has been described for other drugs (16,20,31–33) and investigated the effect of adipocytes-conditioned medium on cell proliferation. In order to see if the protective effect of adipocyte-secreted factors is dependent on HER2 or ER, we explored the lapatinib-induced cytotoxic effect on different breast cancer cell lines in presence or not of adipocyte-conditioned medium. Then, we performed a screening of several TKI targeting different RTK to

investigate if the protection is specific for HER2. We also reproduced the model of resistance *in vivo* in a murine model. To understand the mechanism of such resistance, we performed different physical and chemical treatments on the adipocyte-conditioned medium in order to separate and identify the different molecules and agents involved. In parallel, we investigated the changes that occurs in breast tumor cells following the contact with adipocyte-conditioned medium and the exposure to lapatinib both at transcriptional and protein level. Finally, we tried to modulate the metabolism of adipocytes in order to modify the components of the adipocyte-conditioned medium and identify the factors involved in the observed resistance.

## **Materials and methods**

### *Cell culture and chemical compounds*

Human breast cancer cell lines BT-474, SKBR3, MDA-MB-453, MDA-MB-361, MDA-MB-231, MCF-7 and the fibroblast cell line NIH3T3 were all obtained from ATCC. The 3T3-F442A (named 3T3 cells here) murine preadipocyte cell line was kindly provided by Dr. Catherine Muller (Toulouse, France). The human multipotent adipose-derived stem cell (hMADS) were provided by Dr. Christian Dani, *UMR 6543 CNRS*, Nice, France and cultured as described previously (16).

The preadipocyte cell line 3T3, the fibroblast cell line NIH3T3 and the tumor cell lines MDA-MB-453, MDA-MB-361, MDA-MB-231, and MCF-7 were cultured in complete DMEM medium (Life technologies) (supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin), BT-474 and SKBR3 were maintained in complete RPMI medium with the same supplementation as DMEM. All cells were cultivated at 37 °C in presence of 5% CO<sub>2</sub>.

To induce the differentiation of 3T3 cells, confluent cells were incubated in differentiation medium (DMEM supplemented with 10% FCS plus 50 nM insulin (Sigma, 259278)) for up to 14 days. During the two week incubation, pre-adipocytes differentiated into adipocytes (80-90% of

the cells are differentiated after 14 days) and accumulate lipid droplets in their cytoplasm. The CM from pre-adipocytes (3T3-CM) and adipocytes (#3T3-CM) was harvested, centrifuged at 300 g for 5 min and was directly used or stored at -20 °C before use. The control medium for these CM is complete DMEM (medium) for 3T3-CM and differentiation medium (#medium) for #3T3-CM.

Lapatinib was purchased from Sigma Aldrich while phenylephrine, clonidine, epinephrine, dobutamine, yohimbine, propranolol and atenolol and ibrutinib were purchased from BioScience. Acipimox and etomoxir were obtained from Adooq Bioscience and terbutaline, prazosin, salbutamol, afatinib and AZD4547 were purchased from Selleckchem.

#3T3 cells were incubated with salbutamol at 5 µM, terbutaline at 18 µM, isoprenaline at 0,1 µM, dobutamine at 29,6 µM, propranolol at 45 µM, atenolol at 45 µM, Insulin at 15 µM, acipimox at 100 µM and etomoxir at 20 µM.

#### *Protein denaturation, exosome isolation and lipid sequestration*

The #3T3-CM was heated at 96°C during 1 hour in order to denature the proteins.

Exosomes were isolated from the CM by differential centrifugation. In brief, the CM was centrifuged at 3,000 g for 30 min to remove cell debris then at 10,000 g for 60 min at 4°C to separate vesicles from exosomes. The exosomes and the soluble factors were separated by ultracentrifugation at 100,000 g for 90 min. We evaluated the purification using the Nanosight® device that detects and quantifies the exosomes with a laser at 405 nm.

#### *Cytotoxicity MTT assay*

BT-474, SKBR3 and MCF-7 cells were seeded in 96 wells plates at 20000, 8000, 3000, cells per well, respectively in 50 µL media. The 3T3-CM, #3T3-CM, human adipocytes (hMADs-CM) and fibroblasts (NIH3T3-CM) were added to the wells. The next day, drugs were added into the wells at a range of concentrations and cells were incubated for 72 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. MTT was then added in each well and incubated for additional 4 h. The supernatant was discarded and a solution composed of isopropanol/H<sub>2</sub>O/HCl (90/9/1, v/v/v) was added. The optical density was determined at 540 nm using Multiskan device.

### *Cell cycle analysis*

BT-474 cells seeded in 6 well plates at 420,000 cells per well in 1.5 mL were incubated with 1.5 mL of either #3T3-CM or #medium or either 3T3-CM or medium, reproducing the MTT assays conditions for the indicated times. Each condition was performed at least in triplicate, with or without lapatinib at the concentration of 1  $\mu$ M. The cells were harvested by trypsination and the supernatant was kept, in order to count the dead cells. After washing with PBS, the cells were incubated with PI solution (0.05  $\mu$ g/mL) in the dark at 4 °C for 30 minutes. Cell cycle was

### *Reverse transcription and quantitative PCR*

BT-474 cells were exposed to #3T3-CM or 3T3-CM for 24 hours prior to exposure to lapatinib. Cells were harvested, and RNA was extracted using kit RNeasy Mini Kit (Qiagene®). To determine the impact of pharmacological agents on #3T3 cells, these were exposed for 6 hours prior to RNA extraction using successively Qiazol® and formaldehyde.

Real-time qPCR was performed on LightCycler Nano (Roche), detecting SYBR Green I signal transmission. The expression of genes was normalized to the housekeeping gene ribosomal 28S. Relative expression was determined using the  $\Delta\Delta$ Ct method. The primers used for PCR were: AKT forward primer 5'-tctggcttcacggcagt-3', AKT reverse primer 5'-gatcgactcctgtctagg-3', cycline D1 forward primer 5'-tacaaccaggcagcggata-3', cycline D1 reverse primer 5'-agccaccagaattagacacc-3', P27 forward primer 5'-ccctagagggcaagtacgagt-3', P27 reverse primer 5'-agtagaactcgggcaagctg-3', E2F3 forward primer 5'-acgaagtccagatagtcacaaa-3', E2F3 reverse primer 5'-ataccatcgggtgactg-3', FABP4 forward primer 5'-ggatggaaagtgcaccacaa-3', FABP4 reverse primer 5'-tggaaagtcacgccttcata-3', LPL forward primer 5'-tttgtgaaatgcatgacaag-3', LPL reverse primer 5'-cagatgctttctctctgtttgt-3', HIF1 $\alpha$  forward primer 5'-catgatggctccttttca-3' and HIF1 $\alpha$  reverse primer 5'-gtcacctggtgctgcaata-3'.

### *Patient samples*

The body mass index (BMI) was calculated as follow: weight (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). Subcutaneous adipose tissue obtained by lipoaspirate was immediately transported to the registered Cell Therapy Unit (Hospices Civils de Lyon, ETI/16/M/001). Briefly, after centrifugation (1962g during 3 minutes), oil (upper phase) and tumescent phase (lower phase) have been removed.



Then, adipose tissue was digested with collagenase (0.1 U/ml, NB6 collagenase (GMP-grade, Serva Electrophoresis Roche, Indianapolis, USA) at 37°C for 45 min and under constant shaking. Digestion was stopped by adding Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM with glutamax, Gibco (Invitrogen, Carlsbad, USA) containing 10 % fetal calf serum (FCS, HyClone, Logan, USA). After centrifugation at 300g during 5 minutes, floating adipocytes were discarded and cells from the stromal-vascular fraction (SVF) were pelleted, rinsed with medium, and centrifuged (300 g for 5 min. at 20°C). Cells were counted using 0.4% trypan blue (hospital pharmacy preparation) and viability was evaluated. Adipocytes has been resuspended in DMEM for 24h and supernatants were extracted and frozen at -80°C before use. Patient provided written informed consent.

#### *In vivo studies*

All animal procedures were performed in accordance with the European Union directive 86/609/EEC. Experiments were performed under individual permit and in animal care facilities accredited by the French Ministry of Agriculture. The study was approved by the local animal ethics committee (Université Claude Bernard Lyon I, protocol number DR-2014-64). The study was conducted using severe combined immunodeficiency (SCID) mice, with five mice per group. Mice bearing xenografts of normal human adipose tissue were obtained by the subcutaneous injection of 1 mL of abdominal adipose tissue obtained from patients undergoing plastic surgery who had provided informed consent. After 1 week, BT-474 tumors were grafted subcutaneously in contact with the adipose xenograft. Treatments were initiated when the tumor volume was 150 mm<sup>3</sup>, with daily orally administration of lapatinib 135 mg/kg for two weeks. Tumor growth was directly measured using a caliper. The volume was calculated using the following formula  $V = \frac{4}{3} \times \pi \times R^3$  where R is the radius measured.

#### *Statistical analysis*

Means  $\pm$  SD or representative experiments are shown when experiments were repeated several times. Statistical significance was evaluated using paired Student's *t*-test on the means of at least three independent *in vitro* experiments. Unpaired Student's *t*-test was used for *in vivo* experiment. IC50 were calculated using Compusyn software. p-values below 0.05 (\*) or 0.01 (\*\*) were considered significant while "ns" stands for not significant.

## Results

### **Adipocyte-conditioned medium reduces the lapatinib-induced cell cycle blockade in tumor cells**

To assess the lapatinib-induced cell cycle blockade, we stained the SKBR3 cells with PI and performed flow-cytometry analyses for tumor cells in control medium or in #3T3-CM in the presence or absence of lapatinib. Figure 1A shows that the percentage of cells in G0/G1 phase was increased by 23.4% after exposure to lapatinib of SKBR3 cells cultivated in control medium. The increase was lower for cells incubated in #3T3-CM (13.2%). The percentage of cells in S phase decreased from 14.3% to 5.8% for the cells in control medium after lapatinib exposure whereas it decreased from 17.4% to 14.7% for the cells incubated in #3T3-CM. The proportions of cells in G2/M phase followed the trend with a lower lapatinib-induced decrease for the tumor cells exposed to #3T3-CM than in control medium.

The results in control medium are consistent with the classical effect of lapatinib but this effect was lower for the SKBR3 cells in #3T3-CM, suggesting that lapatinib is less effective under these conditions. Interestingly, #3T3-CM did not by itself increase the proportion of cells in S phase as described in other studies (20).

After extraction and purification of cellular RNA, we performed quantitative RT-PCR assays to evaluate the transcription of genes coding for P27, cyclin D1, AKT and E2F3 (Fig. 1B). We normalized the fold changes obtained from three experiments for each condition with lapatinib on the cells in the same condition without lapatinib in order to highlight the transcription changes induced by the drug. As expected, in control medium, the exposure to lapatinib increased the expression levels of P27 and decreased those of AKT, cyclin D1 and E2F3 in tumor cells. The CM from adipocytes did not influence the gene expressions by itself (data not shown). For the cells in presence of #3T3-CM, P27 gene expression levels did not vary after exposure to lapatinib and those of cyclin D1 and E2F3 were higher than in cells cultured in control medium. The levels of AKT mRNA remained approximately equal within all conditions but the levels of AKT

measured encompass the active and inactive forms of AKT and do not reflect the activation status of AKT.

### **Adipocyte-conditioned medium induces a resistance in breast tumor cells HER2+ to several tyrosine kinase inhibitors**

To evaluate and quantify the role of adipocytes in the sensitivity of tumor cells to lapatinib, we performed cytotoxicity MTT experiments and evaluated the drug-mediated cytotoxicity on several breast cancer cell lines with different levels of expression of HER2 in the presence of #3T3-CM or control media.

The sensitivity of each cell line for lapatinib was quantified by calculating the mitochondrial metabolic activity that we correlated with the percentage of viable cells after exposure to lapatinib at the same concentration of 1  $\mu\text{M}$  on each cell line (Fig. 2A). Lapatinib had a cytotoxic effect on all the HER2+ (BT-474, SKBR3, MDA-MB-453 and MDA-MB-361) cell lines but not on HER2- cells (MDA-MB-231 and MCF-7). However, this effect was significantly reduced when the HER2+ cells were cultivated in #3T3-CM. These results show that #3T3-CM can make the breast tumor cells resistant to lapatinib-induced cytotoxicity. Moreover, the protective effect was found both for BT-474 cells which are HER2+/ER+/PR+ and for SKBR3 cells, which are HER2+/ER-/PR-, suggesting that the effect is independent of estrogen and progesterone which might be present among the adipocyte-secreted factors.

The lapatinib is not specific for HER2 since it also binds to EGFR. In order to see if the #3T3-CM-induced resistance of tumor cells to lapatinib was specific of one or another TKR blockade, we tested it with other TKIs and we determined the half maximal inhibitory concentration (IC50) on these cells for each drug. Ibrutinib is a TKI directed against Bruton tyrosine kinase but also against HER2, EGFR and HER3 (34). Afatinib blocks HER2, EGFR and HER4 (35) and AZD4547 is an anti fibroblast growth factor receptor (FGFR) (36). We calculated the ratio of IC50 for the cells exposed to #3T3-CM to the IC50 of cells in control medium for each drug and for each experiment (Fig 2B). The results revealed that the IC50 values were increased approximately two- to seven-fold for lapatinib when the tumor cells were in contact of #3T3-CM

in comparison to control medium. For ibrutinib, the value was three and four times higher in #3T3-CM. The exposure to #3T3-CM increased the IC50 four times for afatinib on tumor cells. Finally, the IC50 for AZD4547 increased around five times for the BT-474 cells incubated in the #3T3-CM. Thus, the protection was observed for every TKI tested.

### **Exposure to adipocyte-derived factors is required during exposure to lapatinib to induce resistance**

In order to see if the #3T3-CM-induced resistance of tumor cells to lapatinib was due to a deep change in the tumor cell or if it was a direct effect of a soluble agent during the exposure to lapatinib, we changed the condition of #3T3-CM exposition (fig 3A). Instead of simply adding the lapatinib to the cells that we incubated in the #3T3-CM or the control medium 24 hours earlier, we removed and added a new medium before adding the lapatinib. It appears that the BT-474 cells exposed for 24 hours to #3T3-CM prior to lapatinib exposure then placed in control DMEM medium were as sensitive to lapatinib as the cells which had not been exposed to #3T3-CM. On the other hand, we observed a reduced sensitivity of lapatinib-induced cytotoxicity on the tumor cells when these were in first placed in control medium then secondarily exposed to the #3T3-CM. These results suggest that exposure to adipocyte-derived factors is required during exposure to lapatinib to induce resistance to this agent.

### **The protective effect is specific for adipocyte-conditioned medium**

To confirm that this effect could be observed with another adipocyte cell line we used the hMAD human adipocyte cell line. Using these cells, we also observed the resistance of tumor cells in presence of hMAD-CM (Fig 3B). Conversely, it did not appear in presence of a non-adipocyte fibroblast-CM, showing that the conditioned-medium from adipocytes specifically inhibit the activity of lapatinib on breast tumor cells (Fig 3C). However, #3T3-CM did not stimulate cell proliferation (supplementary Figure 1). We also incubated the tumor cells in fresh CM of human adipocytes obtained from three lean healthy patients (Fig 3D). There was a trend towards higher IC50 values in cells exposed to these fresh adipocyte conditioned supernatants although the

difference was only significant in patient ASC18011.

### **Proximity with adipose tissue protects HER2+ cancer cells from lapatinib *in vivo***

To verify whether adipose tissue can exert the same effect *in vivo*, we used a new and original adipose tissue xenograft in SCID mice, which we recently reported (16). Subcutaneous adipose tissue obtained from patients undergoing plastic surgery was injected subcutaneously into SCID mice to form a stable xenograft. BT-474 tumor fragments were secondarily grafted in contact with the adipose xenograft, to reproduce the contact between tumor and adipose tissue (fig. 4).

Our results showed that the lapatinib significantly reduced BT-474 tumor growth in mice (lapa group) in comparison to the untreated group (nt group) ( $p=0.005$ ). Indeed, the tumor volume was  $1700 \pm 112 \text{ mm}^3$  for the mice on nt group and around  $600 \pm 95 \text{ mm}^3$  for those on lapa group after 19 days, demonstrating the efficacy of lapatinib to reduce breast tumor growth. Conversely, lapatinib had no significant effect on tumor growth in mice with adipose tissue xenografts (adip lapa group vs adip group). However, the tumor growth seemed to be impaired when the tumor was in contact with adipose tissue, a phenomenon that we have also observed with other models (data not shown).

### **Soluble agent(s) issued from adipocyte lipolysis are likely to be responsible of the lower efficacy of lapatinib on breast tumor cells after exposure to adipocyte-conditioned medium.**

Due to its metabolism and endocrine functions, adipocytes produce a large variety of molecules including proteins and lipolytic products and release them as soluble molecules or contained in microparticles such as exosomes. In an attempt to identify what type of molecules were responsible for the resistance effect on tumor cells, we performed different physical and chemical treatments on #3T3-CM. We heated the #3T3-CM at  $95^\circ\text{C}$  in order to degrade the proteins including adipokines and we added lipid-free BSA to sequester the lipids. We also isolated the exosomes by differential centrifugation and ultracentrifugation. Results shown in Figure 5A suggest that the resistance of breast cancer cells to the effect of lapatinib are dependent on a thermolabile factor but not on free fatty acids. Indeed, we still observed the increase of IC<sub>50</sub> for lapatinib on breast tumor cells exposed to #3T3-CM compared to the same cells in control

medium, but this was no longer observed after #3T3-CM heating, suggesting that thermolabile factor(s) had been degraded. Conversely, when we attempted to sequester the lipids by adding BSA and filtered the #3T3-CM, the protective effect of CM was maintained. After the ultracentrifugation, we found that the #3T3-CM containing only the exosomes did not induce a resistance in the breast tumor cells for lapatinib-mediated cytotoxicity while the #3T3-CM containing the soluble factors induced such resistance in the cells (Fig 5B).

As the secretome of adipocytes is very complex, we also attempted to pharmacologically modulate the metabolism of adipocytes in order to modify the adipocyte secretome for factors released from metabolic reactions. At first, as the metabolism of adipocytes is highly dependent of adenosine AMP, ADP and ATP (37,38) we incubated the adipocytes with one or the other of these metabolites or with other molecule affecting lipolysis such as etomoxir that is a lipolysis inhibitor (Fig 6A). We observed that the #3T3-CM from adipocytes that we had exposed to agents such as ADP, AMP and adenosine maintained their ability to reduce the sensitivity of cancer cells to lapatinib. However, in the case of the CM from adipocytes exposed to etomoxir, we found a significantly higher reduction of viable tumor cells after exposure to lapatinib suggesting that the exposure to etomoxir could modify the production or release of soluble agent(s) responsible for the resistance phenotype provided by the CM.

As etomoxir modulates lipolysis by inhibiting the transport of fatty acyl chain from the cytosol into the mitochondria, we tried to verify our hypothesis that a soluble agent from lipolysis was responsible of the observed resistance by modulating the lipolysis via other ways. We stimulated or blocked the lipolysis via beta-adrenergic receptors. Indeed, the stimulation of a  $\beta$ -adrenergic receptor in adipocytes results in the increase of HIF1 $\alpha$  transcription factor (39) and leads to the activation of lipolysis. We also investigated whether the effect of another lipolysis inhibitor, acipimox, an anti-lipolytic nicotinic acid derivative and of insulin that is known to block lipolysis and to stimulate lipogenesis after food intake. As shown in Figure 6B, we found that the #3T3-CM from adipocytes that had been exposed to the antagonists of beta 1 and 2 adrenergic receptors propranolol and atenolol did not induce resistance of BT-474 cells to lapatinib. Similar observations were made with the lipolysis inhibitors insulin, acipimox and etomoxir. Conversely, the exposure of adipocytes to the pure or mixed beta 1 and beta 2 adrenergic receptor agonists salbutamol, terbutaline, isoprenaline and dobutamine produced a #3T3-CM that induced a

resistance of tumor cells to the lapatinib-mediated cytotoxicity at least as strong as #3T3-CM from adipocytes alone. To confirm that these agonists and antagonists were effectively modulating the receptors and altering lipolytic activities in adipocytes, we performed RT-PCR analysis of HIF1 $\alpha$  as well as LPL and FABP4, the latter being involved lipolysis (Fig 6C). The results revealed that we had an increase of HIF1 $\alpha$  gene expression from two to eight times in adipocytes exposed to the agonist compared to the unexposed adipocytes. LPL and FABP4 expression increased also, particularly in the adipocytes exposed to salbutamol. Conversely, the exposure to beta-blockers leads to a drop of the levels of mRNA for the three genes. These data are consistent with the hypothesis that adipose tissue induces a resistance in tumor cells to lapatinib via the release of lipolytic products in the microenvironment.

## DISCUSSION

Adipose tissue and breast tumors are in close contact and adipocytes actively participate in tumor progression through the secretion of various adipokines (40). Previous studies have shown that adipocyte-secreted factors could promote tumor cell resistance to various chemotherapeutic agents as well as antibodies. Such effect has been demonstrated for multiple myeloma cells in response to melphalan, bortezomib, dexamethasone and doxorubicin (20,31) and for breast cancer cells in response to trastuzumab, T-DM1 and gemcitabine (16,32). It has been found by Brady *et al.* that blocking mTOR could reverse lapatinib resistance of cancer cells (41). Moreover, another study demonstrated that the activation of mTOR could elude HER2 blockade (42). To our knowledge, no study has investigated the role of adipocyte-CM in breast cancer cell resistance to lapatinib or other TKIs.

Our results show that adipocyte-CM reduces the sensitivity of HER2+ breast tumor cells to the cytotoxic activity of lapatinib as well as other TKIs. These results have been confirmed on two different HER2+ cell lines and using conditioned medium from two different types of adipocytic cell lines. They are also in accordance with other studies using a CM from adipocytes

demonstrating an adipocyte-induced resistance of tumor cells towards therapeutic agents. In our results, the cells exposed to #3T3-CM did not proliferate differently from cells in control medium. This suggests that the protective effect is not attributable to a reduced growth rate of cells due to adipocyte-derived factors. For the first time we also show that proximity to adipose tissue *in vivo* reduces sensitivity to lapatinib of established tumors. This confirms the relevance of adipocyte-derived factors in the *in vivo* setting.

Our results show a reduced lapatinib-induced cell cycle blockade when incubating cells with adipose tissue. This was observed both by direct analysis of the cell cycle and the expression of genes coding for the proteins involved in cell cycle progression. This type of resistance has already been described in the literature for chemotherapeutic agents (20-22). Additional experiments could be performed to determine lapatinib-mediated reduction of expression of phosphorylated proteins in tumor cells such as HER2, EGFR, AKT, ERK1/2 in the presence of absence of adipocyte conditioned medium. Such results would highlight the role of downstream signaling pathways in the adipocyte secreted factor-mediated resistance of breast cancer cells to lapatinib.

Our results obtained using #3T3-CM fractionation and pharmacological modulation suggest that lipolysis pathway products are involved in the protective effect towards lapatinib. Modulation of lipolysis in differentiated adipocytes by etomoxir and acipimox, which act at two different levels of the metabolic reaction, seemed to reduce the #3T3-CM mediated resistance of breast tumor cells to lapatinib (43,44). We observed the same effect for the beta-adrenergic blockers known to inhibit lipolysis and an opposite effect with the beta-adrenergic receptor agonists. Additional metabolomic approaches are required to determine the soluble factor(s) involved in the resistance of tumor cells to lapatinib by measuring the metabolites in the #3T3-CM from adipocytes after exposure to the modulators of lipolysis. Such analyses have already been performed in supernatants from adipocytes (45).

Many other mechanisms described in the literature for the resistance of tumor cells on lapatinib have not reported in the literature (46), such as the mutation of HER2 tyrosine kinase domain (47). An alternative hypothesis is that lapatinib is sequestered or inactivated by adipocyte-derived soluble factor(s). Another mechanism of resistance could be an activation of compensatory



pathway such as the increase of activity of hepatocyte growth factor receptor (HGFR) or c-Met. The ligand of HGFR is the hepatocyte growth factor is secreted by adipocytes. Other adipocyte-secreted factors have been described to promote tumor cell resistance to TKI. Among them, the tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1), interleukin-6 (IL-6), the fibroblast growth factor (FGF) and the neuregulin-1 (NRG-1) (48–52). All these factors could play a role in the adipocyte-secreted factors-mediated resistance of cancer cells to lapatinib observed in this study and it would be useful to quantify them or to evaluate their activity. AXL is another transmembrane receptor close to HGFR and its upregulation has been found in breast tumor cells with acquired resistance to lapatinib (18).

By using *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrated that peritumoral adipocytes are likely to be involved in the resistance of breast tumor cells to lapatinib-mediated cytotoxicity. The effects of adipose cells are mediated via secreted factors that appear to affect HER2 associated downstream signaling pathways. This phenomenon is due to thermolabile soluble factors and is reversed when adipocytes are exposed to inhibitors of lipolysis. Further studies are necessary to identify the precise mechanism of this resistance and to allow the development of sensitizing strategies to circumvent the adipose-mediated resistance to lapatinib in breast cancer.

## REFERENCES

1. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177–82.
2. Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;19(2):124–34.
3. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):505–16.
4. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):127–37.
5. Haute Autorité de Santé - TYVERB [Internet]. [cited 2017 Apr 20]. Available from: [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_684109/en/tyverb](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_684109/en/tyverb)
6. Haute Autorité de Santé - HERCEPTIN (trastuzumab), monoclonal antibody [Internet]. [cited 2017 Apr 20]. Available from: [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_2620144/fr/herceptin-trastuzumab-anticorps-monoclonal](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2620144/fr/herceptin-trastuzumab-anticorps-monoclonal)

7. Cetin B, Benekli M, Dane F, Boruban C, Gumus M, Oksuzoglu B, et al. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced-Stage Breast Cancer in Elderly Women: Review of the Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO) Experience. *Breast Care Basel Switz.* 2013 Mar;8(1):67–70.
8. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014 Nov 20;32(33):3744–52.
9. Ewertz M, Jensen M-B, Gunnarsdóttir KÁ, Højris I, Jakobsen EH, Nielsen D, et al. Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Jan 1;29(1):25–31.
10. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu M-F, Chamness GC, Wong H, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Jan 10;29(2):166–73.
11. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 2016 Aug 25;375(8):794–8.
12. Arnold M, Touillaud M, Dossus L, Freisling H, Bray F, Margaritis I, et al. Cancers in France in 2015 attributable to high body mass index. *Cancer Epidemiol.* 2018 Feb;52:15–9.
13. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003 Apr 24;348(17):1625–38.
14. Schmitz KH, Neuhouser ML, Agurs-Collins T, Zanetti KA, Cadmus-Bertram L, Dean LT, et al. Impact of obesity on cancer survivorship and the potential relevance of race and ethnicity. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Sep 18;105(18):1344–54.
15. Crozier JA, Moreno-Aspitia A, Ballman KV, Dueck AC, Pockaj BA, Perez EA. Effect of body mass index on tumor characteristics and disease-free survival in patients from the HER2-positive adjuvant trastuzumab trial N9831. *Cancer.* 2013 Jul 1;119(13):2447–54.
16. Duong MN, Cleret A, Matera E-L, Chettab K, Mathé D, Valsesia-Wittmann S, et al. Adipose cells promote resistance of breast cancer cells to trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Breast Cancer Res BCR.* 2015 Apr 24;17(1):57.
17. Formisano L, Nappi L, Rosa R, Marciano R, D’Amato C, D’Amato V, et al. Epidermal growth factor-receptor activation modulates Src-dependent resistance to lapatinib in breast cancer models. *Breast Cancer Res BCR.* 2014 May 5;16(3):R45.

18. Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69(17):6871–8.
19. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene.* 2008 Jun 26;27(28):3944–56.
20. Yu W, Cao D-D, Li Q-B, Mei H-L, Hu Y, Guo T. Adipocytes secreted leptin is a pro-tumor factor for survival of multiple myeloma under chemotherapy. *Oncotarget.* 2016 Dec 27;7(52):86075–86.
21. Behan JW, Yun JP, Proektor MP, Ehsanipour EA, Arutyunyan A, Moses AS, et al. Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7867–74.
22. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011 Oct 30;17(11):1498–503.
23. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Apr 18;99(8):628–38.
24. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Yonemori K, et al. FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2011 Jun;22(6):1302–7.
25. Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung M-C, Esteva FJ. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3981–6.
26. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell.* 2007 Oct;12(4):395–402.
27. Rexer BN, Ham A-JL, Rinehart C, Hill S, Granja-Ingram N de M, González-Angulo AM, et al. Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene.* 2011 Oct 6;30(40):4163–74.
28. Polli JW, Humphreys JE, Harmon KA, Castellino S, O'Mara MJ, Olson KL, et al. The role of efflux and uptake transporters in [N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine (GW572016, lapatinib) disposition and drug interactions. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2008 Apr;36(4):695–701.

29. Xia W, Bacus S, Hegde P, Husain I, Strum J, Liu L, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 May 16;103(20):7795–800.
30. Tang L, Wang Y, Strom A, Gustafsson J-Å, Guan X. Lapatinib induces p27(Kip1)-dependent G<sub>1</sub> arrest through both transcriptional and post-translational mechanisms. *Cell Cycle Georget Tex*. 2013 Aug 15;12(16):2665–74.
31. Liu Z, Xu J, He J, Liu H, Lin P, Wan X, et al. Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget*. 2015 Oct 27;6(33):34329.
32. De Angel RE, Blando JM, Hogan MG, Sandoval MA, Lansakara-P DSP, Dunlap SM, et al. Stearoyl gemcitabine nanoparticles overcome obesity-induced cancer cell resistance to gemcitabine in a mouse postmenopausal breast cancer model. *Cancer Biol Ther*. 2013 Apr;14(4):357–64.
33. Malvi P, Chaube B, Singh SV, Mohammad N, Pandey V, Vijayakumar MV, et al. Weight control interventions improve therapeutic efficacy of dacarbazine in melanoma by reversing obesity-induced drug resistance. *Cancer Metab*. 2016;4:21.
34. Grabinski N, Ewald F. Ibrutinib (Imbruvica™) potently inhibits ErbB receptor phosphorylation and cell viability of ErbB2-positive breast cancer cells. *Invest New Drugs*. 2014 Dec;32(6):1096–104.
35. Solca F, Dahl G, Zoephel A, Bader G, Sanderson M, Klein C, et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Nov;343(2):342–50.
36. Gavine PR, Mooney L, Kilgour E, Thomas AP, Al-Kadhimi K, Beck S, et al. AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res*. 2012 Apr 15;72(8):2045–56.
37. Johansson SM, Lindgren E, Yang J-N, Herling AW, Fredholm BB. Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue — Interactions with insulin. *Eur J Pharmacol*. 2008 Nov 12;597(1):92–101.
38. Kather H. Pathways of purine metabolism in human adipocytes. Further evidence against a role of adenosine as an endogenous regulator of human fat cell function. *J Biol Chem*. 1990 Jan 5;265(1):96–102.
39. Cheong HI, Asosingh K, Stephens OR, Queisser KA, Xu W, Willard B, et al. Hypoxia sensing through  $\beta$ -adrenergic receptors. *JCI Insight [Internet]*. 2017 Jan 4 [cited 2018 Mar 28];1(21). Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/90240>
40. Tan J, Buache E, Chenard M-P, Dali-Youcef N, Rio M-C. Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7–9):851–9.

41. Brady SW, Zhang J, Tsai M-H, Yu D. PI3K-independent mTOR activation promotes lapatinib resistance and IAP expression that can be effectively reversed by mTOR and Hsp90 inhibition. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(3):402–11.
42. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Colomer R, Brunet J, Menendez JA. Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb®) in human breast carcinoma cells. *Ann Oncol.* 2008 Jun 1;19(6):1097–109.
43. Wang-Fisher YL, Han J, Guo W. Acipimox stimulates leptin production from isolated rat adipocytes. *J Endocrinol.* 2002 Jan 8;174(2):267–72.
44. Schlaepfer IR, Rider L, Rodrigues LU, Gijon MA, Pac CT, Romero L, et al. Lipid Catabolism via CPT1 as a Therapeutic Target for Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014 Oct 1;13(10):2361–71.
45. Chen J-H, Enloe BM, Weybright P, Campbell N, Dorfman D, Fletcher CD, et al. Biochemical correlates of thiazolidinedione-induced adipocyte differentiation by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2002 Oct;48(4):602–10.
46. D'Amato V, Raimondo L, Formisano L, Giuliano M, De Placido S, Rosa R, et al. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015 Dec;41(10):877–83.
47. Trowe T, Boukouvala S, Calkins K, Cutler RE, Fong R, Funke R, et al. EXEL-7647 Inhibits Mutant Forms of ErbB2 Associated with Lapatinib Resistance and Neoplastic Transformation. *Clin Cancer Res.* 2008 Apr 15;14(8):2465–75.
48. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 2012 Jul 26;487(7408):505–9.
49. Gilbert LA, Hemann MT. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell.* 2010 Oct 29;143(3):355–66.
50. Gabrielsson BG, Johansson JM, Jennische E, Jernås M, Itoh Y, Peltonen M, et al. Depot-specific expression of fibroblast growth factors in human adipose tissue. *Obes Res.* 2002 Jul;10(7):608–16.
51. Bell LN, Cai L, Johnstone BH, Traktuev DO, March KL, Considine RV. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Feb;294(2):E336–344.
52. Madec S, Chiarugi M, Santini E, Rossi C, Miccoli P, Ferrannini E, et al. Pattern of expression of inflammatory markers in adipose tissue of untreated hypertensive patients. *J Hypertens.* 2010 Jul;28(7):1459–65.



## Figure legends

**Figure 1 Conditioned medium from adipocytes reduces the lapatinib-induced cell cycle blockade in tumor cells** A) Lapatinib-induced cell cycle blockade was investigated on SKBR-3 cell lines incubated in control medium (a) or in adipocyte-conditioned medium (#3T3-CM) (b). Cells were exposed for 24h to lapatinib before staining by propidium iodure and FACS analyses were performed to evaluate the percentage of cells in the different cell cycle phases. B) The expression of genes involved in the cell cycle progression was measured on tumor cells after exposure to lapatinib in presence (+) or not (-) of #3T3-CM. Cells were exposed for 12 hours to lapatinib before RNA extraction and mRNA measurement by SYBR Green device. Fold changes were normalized for the cells exposed to lapatinib on the cells in the same condition not exposed to lapatinib.

**Figure 2 Adipocyte-conditioned medium induces a tumor cell resistance to various tyrosine kinase inhibitors in Her2 positive cell lines** A) BT-474, SKBR3, MDA-MB-453, MDA-MB-361, MDA-MB-231 and MCF-7 tumor cell lines were incubated 24 hours in adipocyte-conditioned medium (#3T3-CM) or in control medium then we added 0,1  $\mu$ M of lapatinib and we measured the mitochondrial metabolic activity by MTT that we correlated with the percentage of viable cells. P values were calculated by comparing for each cell line the percentage of viable cells in presence of #3T3-CM to the percentage of viable cells in control medium after exposure to lapatinib. B) Under the same conditions of incubation than in A) BT-474 cells were exposed to different tyrosine kinase inhibitors lapatinib, ibrutinib, afatinib and AZD4547. The IC<sub>50</sub> for each therapeutic agent were measured and we calculated the ratio and evaluated the p values of the value in presence of #3T3-CM to the control media condition.

\*  $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

**Figure 3 Adipocyte-conditioned medium-induced resistance of tumor cells to lapatinib is reproducible and specific for various adipocytes cell lines and the constant presence of adipocyte-conditioned medium is necessary to observe the resistance** A) BT-474 cells were seeded on the day 1 in control medium or adipocyte-conditioned medium (#3T3-CM) and the medium were changed on day 2 prior exposure to lapatinib and evaluation of IC<sub>50</sub>. B) C) and D) BT-474 cells were incubated in #3T3CM, in human adipocytes-conditioned medium (#hmads), in non fibroblast-conditioned medium (NIH-3T3-CM), in preadipocytes (3T3F442A-CM) or in conditioned medium from fresh human adipocytes from three donors (ASC18032, ASC15011 and

ASC18019). We evaluated the IC50 of lapatinib in each condition. The ratio of IC50 for cells in control medium to the IC50 for cells in the various conditions.

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$

**Figure 4 Proximity of adipose tissue protects tumors from the lapatinib-induced cytotoxicity in vivo.** Tumor growth of BT-474 breast tumors in mice treated by 135 mg/kg of lapatinib daily were measured for four groups of five SCID mice. The animals of two groups were implanted with human adipose tissue (adip) one week prior to tumor xenografts. One group of five mice bearing BT-474 tumors were treated with lapatinib (lapa) while the five others were not treated (nt).

**Figure 5 Thermolabile soluble factor(s) are responsible for adipocyte-conditioned medium-induced resistance of breast cancer cells to lapatinib** A) adipocyte-conditioned medium (#3T3-CM) were heated at 95°C in order to denature the protein and delipidated BSA was added to the CM prior to exposure of tumor cells and to lapatinib. B) #3T3-CM were centrifuged to separate the microvesicles then ultracentrifuged to precipitate the exosomes and to obtain the soluble factors. P values were calculated by comparing the conditions to the control medium.

\*  $p < 0,05$

**Figure 6 Inhibition of lipolysis in adipocytes reverses adipocyte-conditioned medium-induced resistance of tumor cells to lapatinib** A) Adipocytes were exposed to different metabolism modulators. After 6 hours, the supernatants were harvested and add to BT-474 cells prior to exposure to lapatinib. BT-474 were also exposed to control medium or adipocyte-conditioned medium (#3T3-CM), The percentage of viable cells was estimated by correlation with the mitochondrial metabolism measured by MTT. B) adipocytes were exposed to lipolysis stimulators or inhibitors. The supernatants were harvested and used as in A) and IC50 were calculated for each conditions. C) mRNA were extracted from adipocytes after exposure to terbutaline, salbutamol, dobutamine, isoprenaline, atenolol and propranolol and the expressions of the genes involved in lipolysis stimulation were evaluated and normalized on the expression of the genes in adipocytes cultured without treatment.

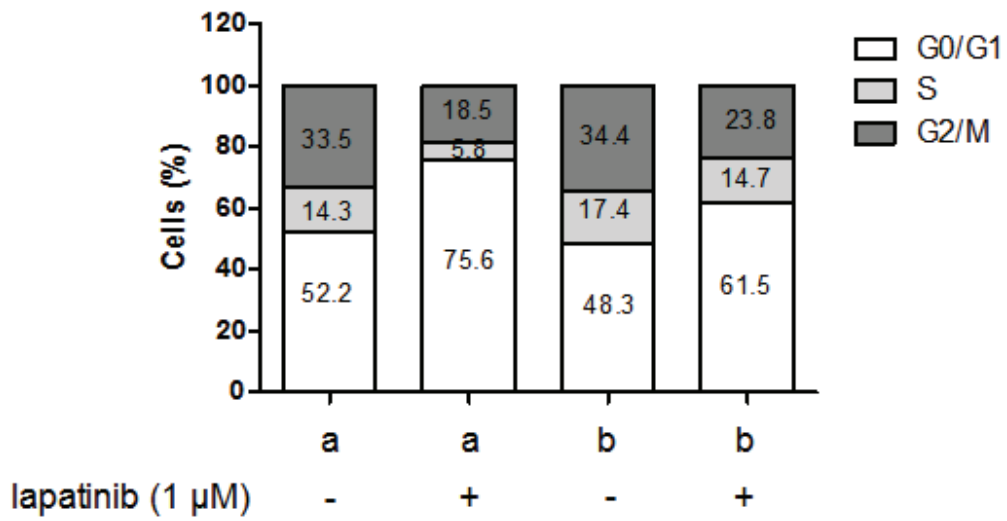
\*\*  $p < 0,01$





Figure 1

A)



B)

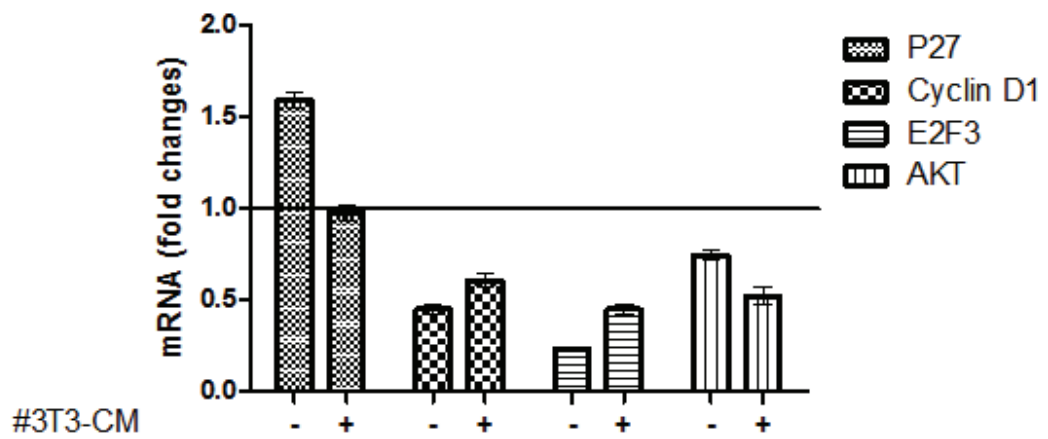


Figure 2

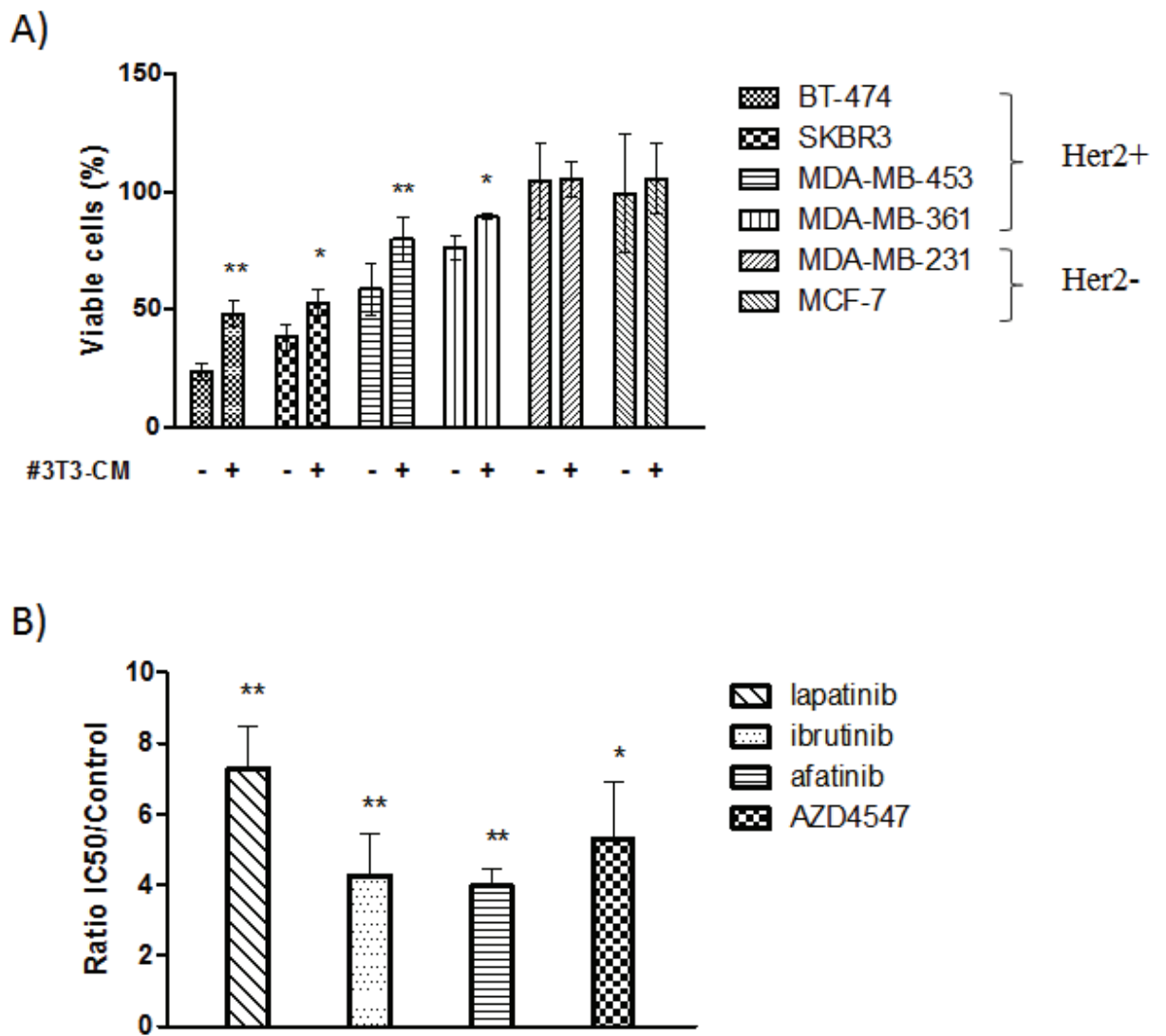
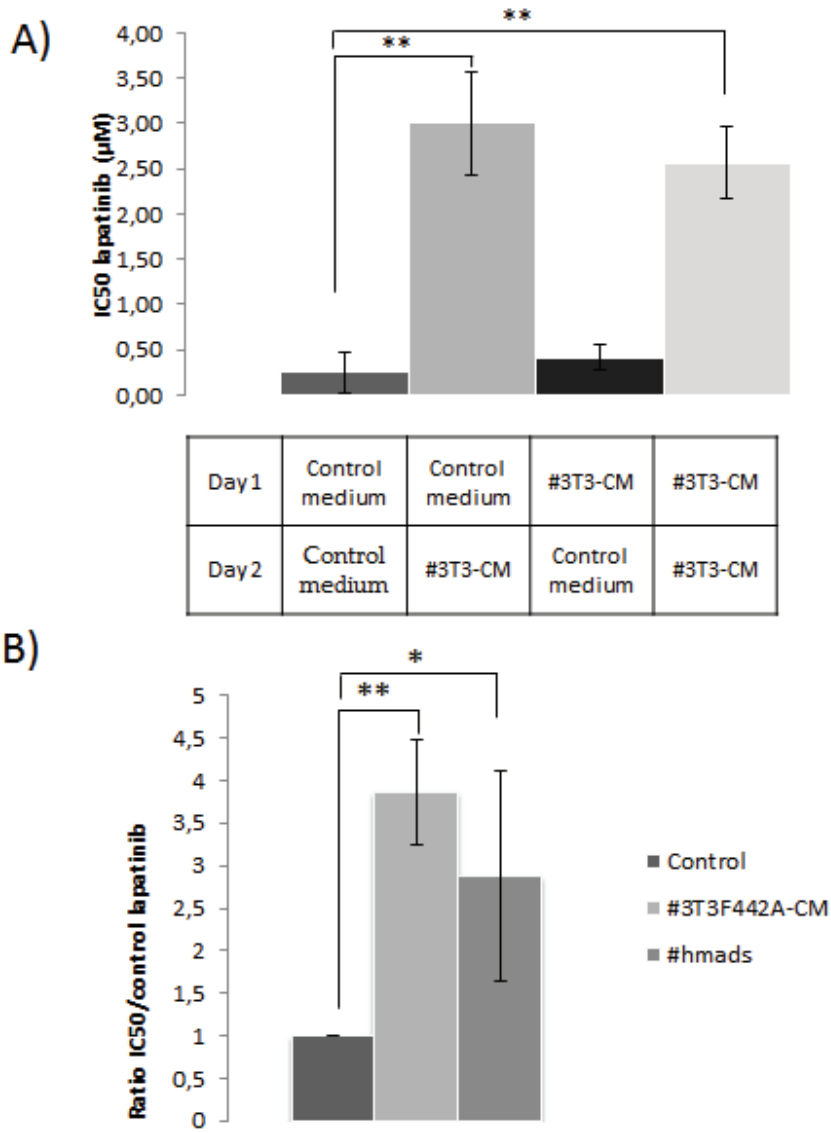


Figure 3



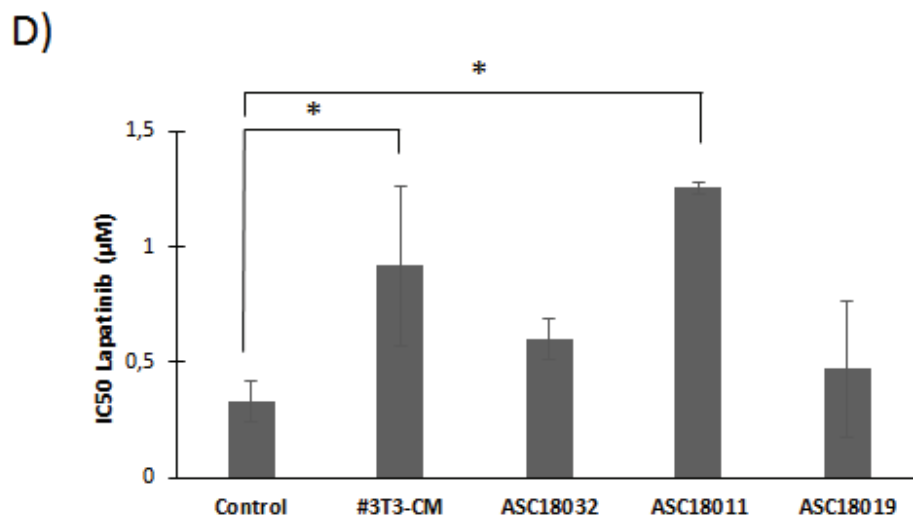
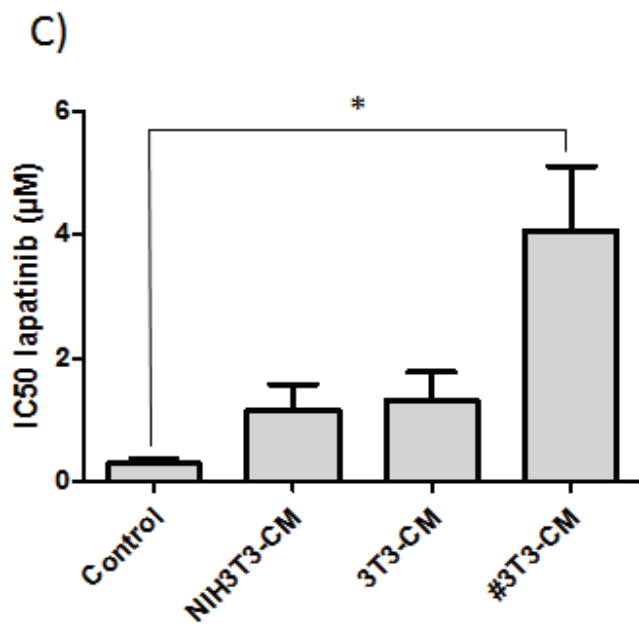


Figure 4

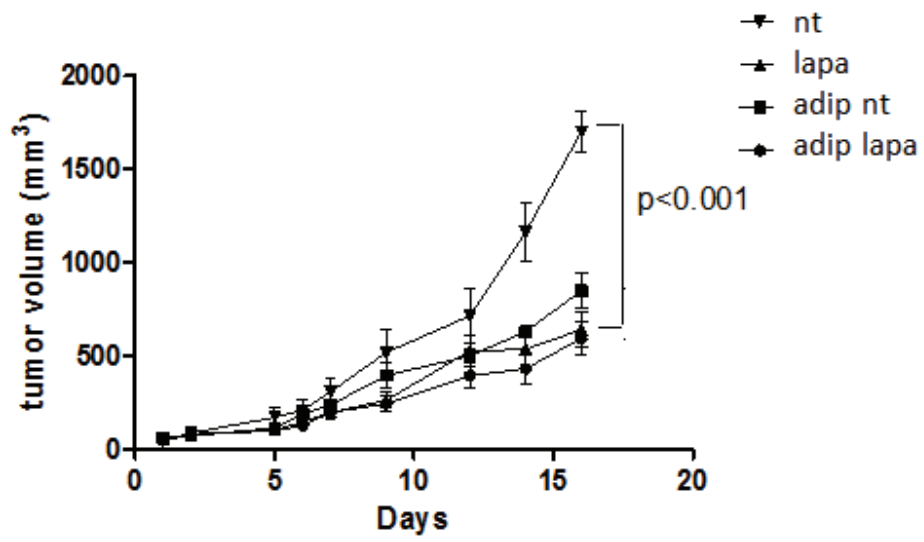
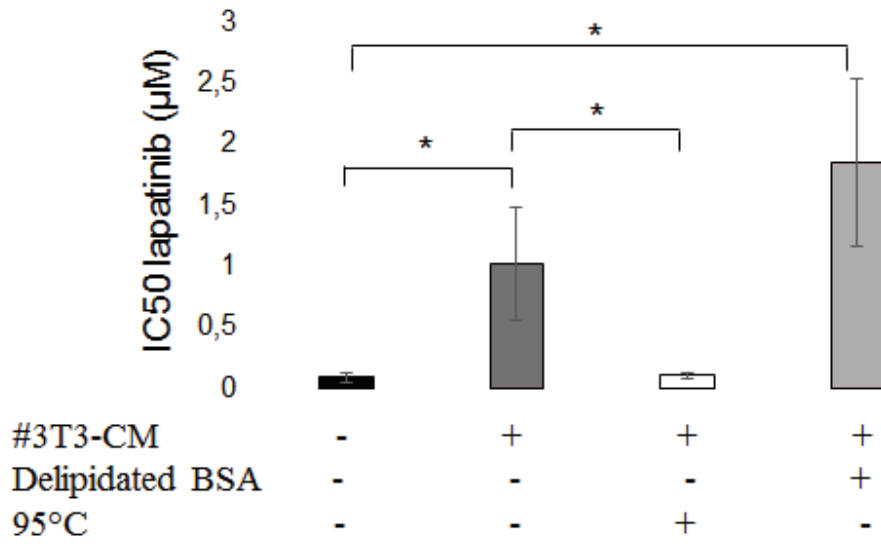


Figure 5

A)



B)

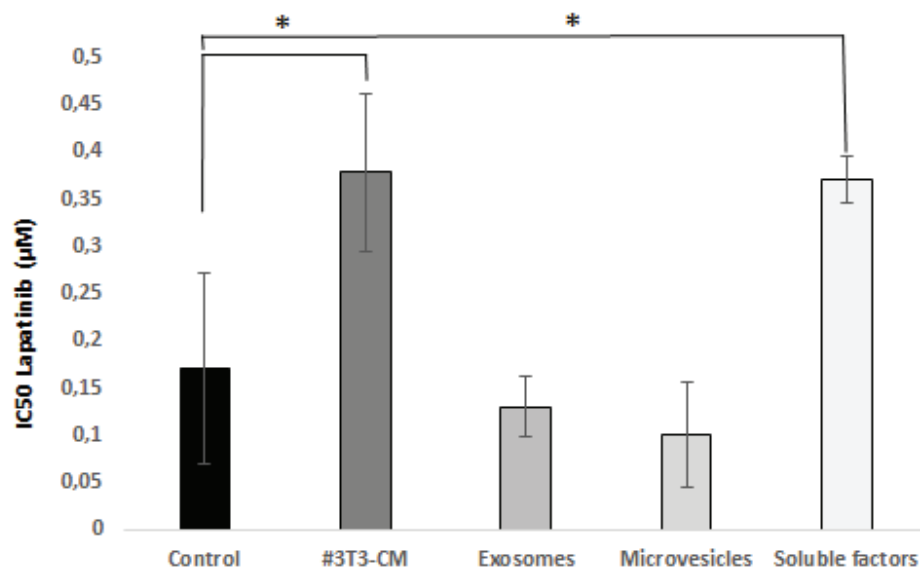
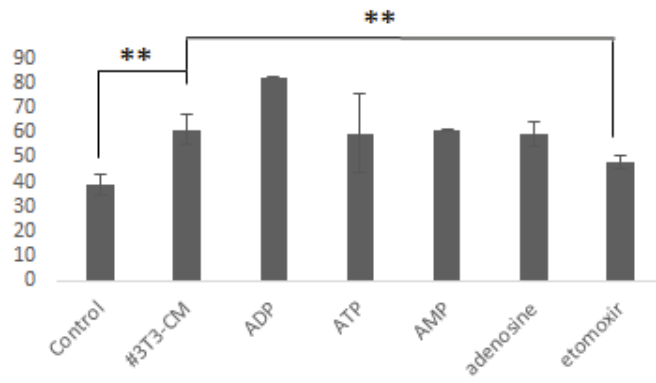
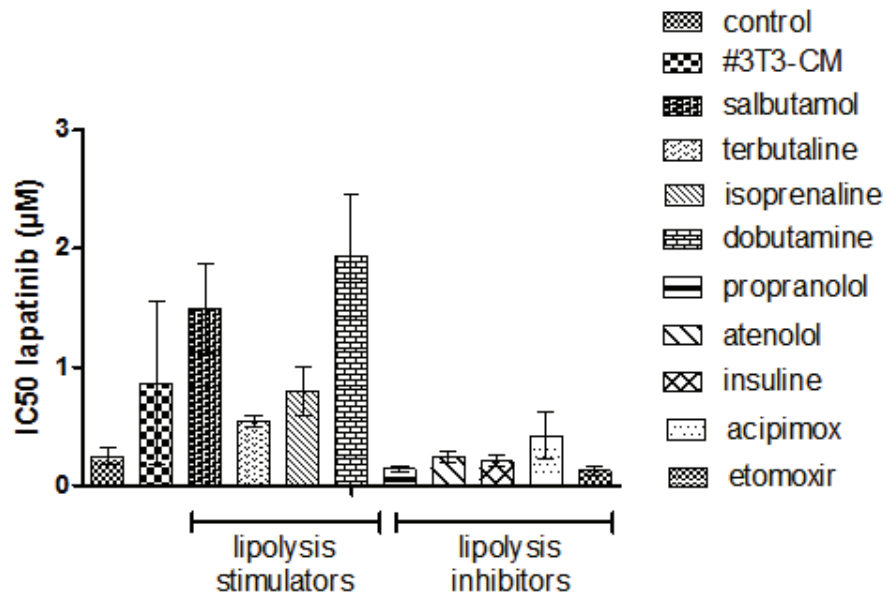


Figure 6

A)

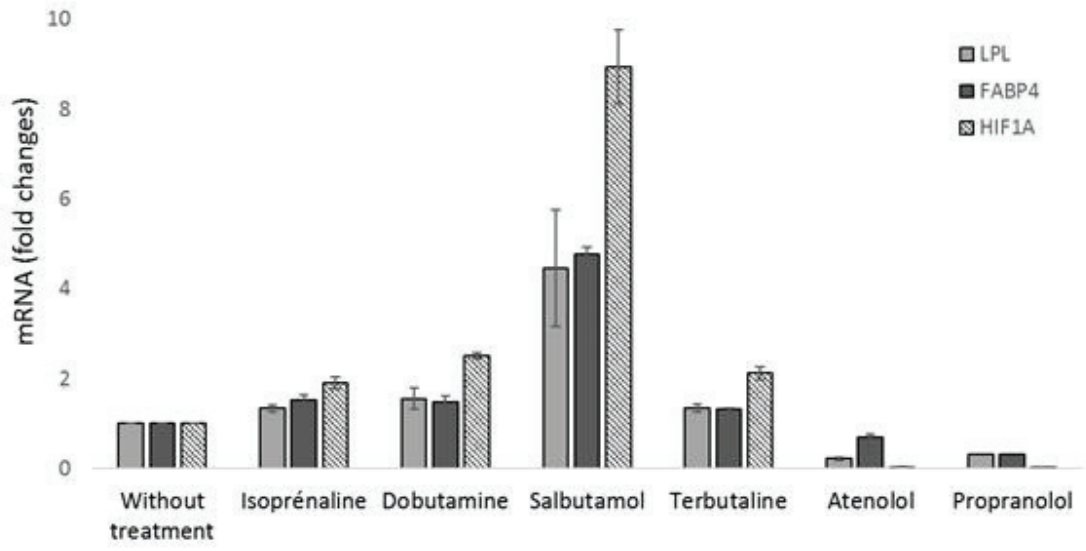


B)



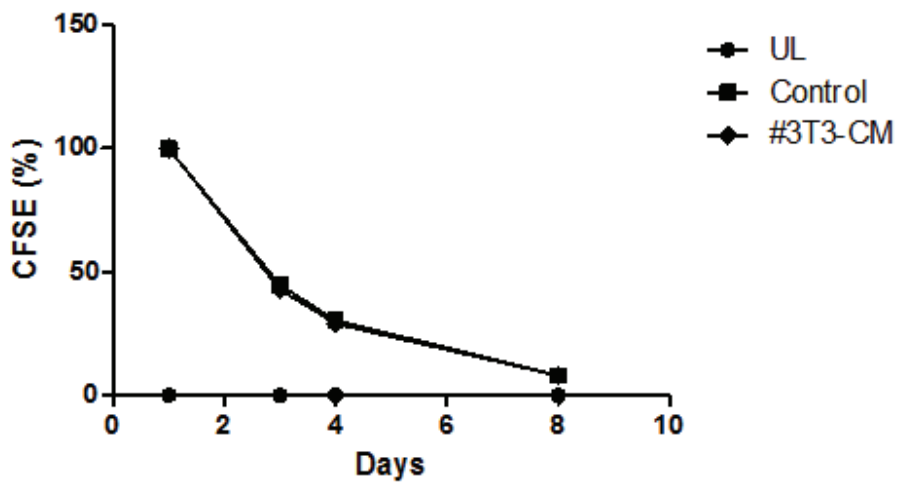


C)



**Supplementary data**

**Supplementary Figure 1: adipocyte-conditioned medium does not stimulate cell proliferation** BT-474 cells were stained or not (NL) with CFSE and incubated in control medium or in adipocyte-conditioned medium. The intensity of fluorescence released by the stained tumor cells was followed by flow cytometry for 8 days. We correlated the intensity of fluorescence with a percentage of cells labelled with CFSE. The negative control was the same tumor cells unlabelled with CFSE (UL).



## CONCLUSION

Pour conclure, nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature concernant les résistances aux traitements induites par les sécrétions adipocytaires et amènent un élément de plus à ce thème de recherche. D'autres expériences sont nécessaires afin de comprendre précisément le mécanisme de résistance de ces cellules tumorales et développer des stratégies thérapeutiques appropriées. Comprendre le mécanisme de ce type de résistance est crucial afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer, de ralentir et de limiter la mortalité des cancers dans le contexte de l'obésité. En effet, cela permettrait de réduire l'utilisation de chimiothérapies très agressives pour les patients, limitant de nombreux effets indésirables et le risque de rechutes ou résistances dans la prise en charge des patients au profit d'une prise en charge personnalisée. Ce principe de prise en charge personnalisée se baserait sur le type tumoral bien sûr mais également sur des caractéristiques biologiques et moléculaires précises qui permettrait l'utilisation de thérapies ciblées dirigées contre ces caractéristiques, de manière spécifique. L'évaluation de l'efficacité de ces thérapies ciblées en présence de sécrétions adipocytaires permettrait d'adapter et d'ajuster la prise en charge des patients en fonction de leur statut pondéral.

## **PARTIE II**

### **Xenotransplantation of human adipose tissue in SCID mice: a model of proximity between adipose tissue and tumors**

(GENESTE *et al.* Manuscrit en préparation)

## INTRODUCTION

Dans le premier article, nous avons utilisé un modèle murin qui a déjà été décrit précédemment par notre équipe mais qui n'a encore jamais été caractérisé comme système reproduisant le contexte d'hyperadiposité dans l'efficacité des traitements anticancéreux, nous allons donc le décrire et le caractériser dans cet article. La souris est très souvent utilisée comme modèle *in vivo* dans la recherche en oncologie du fait de sa facilité d'élevage, son faible coût et sa petite taille. De nombreux modèles ont donc été développés, toujours après l'expertise et l'accord d'un comité d'éthique. Ces souris peuvent subir des modifications génétiques et/ou des greffes leur conférant des propriétés utiles pour les études scientifiques de maladies humaines. En effet, après une phase d'études *in vitro*, les résultats obtenus doivent être vérifiés dans un organisme vivant avant d'être testés chez l'homme afin d'en évaluer l'efficacité et l'innocuité.

Au cours des nombreuses recherches sur l'obésité, dans le but d'endiguer ce fléau mondial, des modèles murins ont été créés tels que des souris pour lesquelles le gène de la leptine a été désactivé, empêchant la production de leptine, hormone de la satiété déficiente chez les personnes en surpoids et obèses (95). Il est possible également d'éteindre d'autres gènes impliqués dans la régulation de la lipolyse, comme celui codant pour HSL ou pour la périlipine, qui ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de la lipolyse. Concernant les modèles d'obésité, il est également possible de faire prendre du poids à certaines souches de souris en leur donnant une alimentation très spécifique enrichie en matières grasses. Cette technique reste plus compliquée car un animal va être capable de réguler sa prise alimentaire en fonction de leur apport nutritionnel, il est donc difficile de leur faire ingérer suffisamment de cette nourriture pour obtenir une prise de poids significative. Les conditions d'élevage de ces souris spécifiques sont plus complexes et leur coût plus élevé.

La proximité du Centre Léon Bérard et du service de chirurgie réparatrice mammaire nous a permis de nous fournir aisément en TA de patientes subissant une reconstruction mammaire après l'ablation chirurgicale de toute ou partie du sein contenant des tumeurs malignes. Nous avons donc injecté 1 millilitre de ce tissu en sous-cutané chez des souris SCID, qui sont des souris

mutées qui ne présentent pas de système immunitaire et qui ne pourront pas rejeter le tissu greffé. Nous avons ainsi réalisé des PDX de tissu adipeux humain normal chez ces souris. Nous avons désigné la xénogreffe obtenue sous le terme de « lipome » en raison de sa stabilité et de sa consistance rappelant celle des lipomes observés chez l'homme.

Nous avons tout d'abord suivi l'évolution de cette greffe qui s'entoure d'une fine capsule fibreuse. Le suivi de ces lipomes s'est fait à plusieurs niveaux. D'une part, nous avons observé les changements histologiques en effectuant des coupes tissulaires et en observant les marquages classiques hématoxyline/eosine et trichrome/ mais également immunohistologiques. En effet, les coupes ont été marquées avec des anticorps anti-PPARgamma et anti-pérlipine, protéines impliquées dans la différenciation cellulaire et la régulation de la lipolyse. Nous avons également réalisé des analyses cytologiques en séparant la fraction stromale des lipomes et en marquant les cellules avec des anticorps anti-CD73 et anti-CD90 spécifiques des préadipocytes (160) dans le but de mettre en évidence une éventuelle capacité d'auto-renouvellement cellulaire. Une des capacités spécifiques du TA étant la lipolyse, nous avons évalué cette fonction en quantifiant par RT-PCR l'expression de certains gènes impliqués dans la lipolyse tels que FABP4 et LPL (161). Le TA a également un rôle de sécrétion d'adipokines spécifiques leptines et adiponectines (93,162) mais aussi d'interleukines telles l'IL-6 et l'IL-8 (101,163).

Afin d'évaluer au mieux l'évolution du TA implanté, nous avons suivi deux protocoles différents. Le premier a consisté en l'implantation de TA provenant du même donneur dans 6 souris, ce qui nous a fourni 3 lipomes pour chaque analyse à plusieurs temps après l'implantation soit, 10, 15, 30, 90 et 180 jours. Ce protocole a été réalisé dans le but d'évaluer la reproductibilité technique de nos analyses. La deuxième phase de cette étude nous a permis d'évaluer la reproductibilité biologique de notre modèle, en implantant du TA provenant de trois donneurs différents à trois temps différents dans 3 souris nous permettant de récupérer un lipome à chaque temps pour chaque analyse. Pour terminer, étant donné que notre but est d'utiliser ce modèle pour tester l'efficacité des agents anticancéreux sur des tumeurs, nous avons réalisé une troisième phase de test pour évaluer la pousse tumorale chez ces souris. Pour ce faire, nous avons implanté du TA chez 3 souris puis des morceaux de tumeurs 15 jours après. Les tumeurs ont été implantées de telle sorte qu'elles poussent en contact avec le lipome. Nous avons ensuite mesuré la croissance tumorale à l'aide d'un pied à coulisse et une formule mathématique nous donne une

approximation du volume tumoral. Les mêmes tumeurs ont également été implantées chez 3 souris non porteuses de lipomes du même âge afin de comparer la croissance tumorale entre les deux groupes de souris. Cette phase a été réalisée sur quatre types de tumeurs mammaires, le BT-474, les SKBR-3, les MDA-MB436 et les MDA-MB231.

**Title: Xenotransplantation of human adipose tissue in SCID mice: a model of proximity between adipose tissue and tumors**

Authors: A. Geneste<sup>1</sup>, MN. Duong<sup>2</sup>, L. Molina, S. Beaumel<sup>1</sup>, A. Cleret<sup>1</sup>, E. Delay<sup>3</sup>, P. Valet<sup>5</sup>, C. Dumontet<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM UMR 1052, CNRS 5286, 8 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

<sup>2</sup>Department of Oncology, Lausanne University Hospital Center (CHUV) and University of Lausanne, Epalinges, Switzerland

<sup>3</sup> Centre Léon Bérard, Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, 28 Promenade Léa et Napoléon Bullukian, 69008 Lyon, France

<sup>4</sup> Hospices Civils de Lyon, Services d'Hématologie, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite, France

<sup>5</sup> Université de Toulouse, UPS, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Equipe n°3, UMR INSERM 1048, IFR31, Toulouse, France



## Abstract

Scientific background: The link between obesity and cancer has been largely demonstrated. Mice models are often used as *in vivo* models to study the obesity and its complication as well as the impact on tumor growth. However, the direct proximity of adipose tissue and tumor has never been characterized for such studies.

Description of the project: In the present project, we aim to describe and characterize a mouse model bearing human adipose tissue and human tumors in direct contact. We used two protocols in order to evaluate the stability of the implanted adipose tissue and the relevance, feasibility and repeatability of our analysis both technically and biologically. We used several approaches to analyze our model at immuno-histological, cytological, protein and genetic levels on the explanted adipose tissue as well as its secretome. We also evaluated the tumor growth of tumors in contact with adipose tissue for three breast tumor types.

Results: Analyzes showed that the adipose is stable in mice after transplantation regarding the immune-histology with the structure of adipocytes. The quantity of adipocytes precursor was steady in each lipoma until 90 days after implantation. The lipolysis function was efficient even after 90 days of implantation as we saw on the expression of genes involved in the lipolysis and on the adipokine dosage. The different breast tumor types had a similar growth in presence or not of the adipose tissue during at least 15 days.

Conclusion: Our model seems to be relevant and exploitable to study the impact of adipose tissue on tumors growth and sensitivity to treatment.

## INTRODUCTION

While obesity rates are rising worldwide, population data link obesity to the increased incidence of several common cancers (1). Obesity also portends worse cancer-specific outcomes after diagnosis in several tumor types including those of the breast, esophagus, colon, prostate, and others (2,3). Furthermore, a higher risk of relapse after treatment has been described in overweight patients compared to lean patients. For breast cancer, several studies shown such resistance in clinical, *in vivo* and *in vitro* studies. For example, treatment with the monoclonal antibody trastuzumab was less efficient in obese patients than in lean patients regarding the 10 years survival (4). In cell culture, adipocytes protected breast tumor cells from the radiotherapy death-induced (5) as well as conditioned media from adipocytes that protected the breast tumor cells from the trastuzumab, t-DM1 (6) and gemcitabine-induced cytotoxicity (7) compared to the breast tumor cells cultured in control media and exposed to the same quantity of therapeutic agents. The precise mechanisms underlying this obesity and adipose tissue–resistance to treatment in cancers link are not yet well understood, making it imperative that animal models sharing characteristics of human cancer in a context of obesity be developed in order to understand and counteract this resistance. The existing and characterized animal models of obesity are obtained by genetically, surgical or chemical modification. The overweight can also be induced by high fat or adapted diet (8).

Adipose tissue is an energy storage and a secretory tissue. It participates in the energetic metabolism by accumulating lipids in the cytoplasm of the adipocytes and by releasing it if necessary by the lipolysis processes. Adipocytes produce and secrete several proteins specifically as adiponectin and leptin or not as interleukins and chemokines.

We developed a new model of immunodeficient mice bearing both adipose tissue and tumors in close contact in order to reproduce the direct contact of human adipose tissue and tumors. The subcutaneous xenograft of human adipose tissue in mice lead to an anatomic entity that we called lipoma. To characterize these lipomas, we observed it at several levels. Indeed, we checked the histological changes before the implantation and on the explants at different times; we made the classical coloration to evaluate the quality of the tissue and the rates of fibrosis, vascularization and necrosis. We also labelled by IHC sections with antibodies to determine the cell composition

and the cell infiltration from mice in the lipoma. In parallel, the tissue renewal and the cell infiltration were studied in flow cytometry by labelling the stromal vascular fraction with several cell type specific antibodies and by the evaluation of the expression of several adipocyte-specific gene. The conservation of the adipose tissue metabolism in the explants was verified by measuring the release of specific adipokines and fatty acids from the lipomas explanted and the expression of adipokines-coding genes. Finally, we used our model to reproduce the tumor growth in direct contact with adipose tissue by implanting a tumor near the lipoma.

## MATERIALS AND METHODS

### *Isolation of human adipose-derived stem cells*

Adipose tissues were provided by Dr Emmanuel Delay (Centre Léon Bérard, Lyon, France). They were obtained by liposuction from abdominal fat of patients undergoing plastic surgery. Written patient consent was obtained, and the Lyon research ethics committee approved this protocol. Adipose tissue samples (5 to 10 g) were rapidly digested with collagenase at 5 mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 37°C with agitation for 30 minutes. Digestion was stopped by addition of complete DMEM/F-12 medium. After centrifugation at  $300 \times g$  for 7 minutes, cells corresponding to the stromal vascular fraction were verified by flow cytometry to be CD14<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> and HLA-ABC<sup>+</sup> (human leukocyte antigen).

### *Flow cytometry*

Cells were labeled with corresponding antibodies for 15 minutes at room temperature and analyzed with a BD LSR II flow cytometer using BD FACSDiva software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). The antibodies used are a human anti CD-73-APC from BD ref 56847 and a human anti-CD90-vioblu from Miltenyi Biotec.

### *In vivo studies*

All animal procedures were performed in accordance with European Union directive 86/609/EEC. Experiments were performed under individual permit and in animal care facilities accredited by the French Ministry of Agriculture. The local animal ethics committee (Université Claude Bernard Lyon I, protocol number BH-2012-40) approved the study. It was conducted using severe combined immunodeficiency (SCID) mice, with four used per group. Each mouse was given a subcutaneous injection of 1 ml of abdominal adipose tissue obtained from patients undergoing plastic surgery to form a lipoma. After 1 week, BT-474 tumors were grafted subcutaneously in contact with the lipoma. Tumor growth was directly measured using a caliper, based on the difference of consistencies between the lipoma and the tumor.

### *Statistical analysis*

All experiments were performed at least three times. Mean  $\pm$  SD values of representative experiments are shown. Statistical significance was evaluated using paired Student's t-tests on the means of at least three independent *in vitro* experiments. Unpaired Student's t-tests were used for *in vivo* experiments. P-values  $<0.05$  were deemed significant.

### *Reverse transcription and quantitative PCR*

RNA was extracted using the QIAzol® Lysis Reagent from Qiagen by extraction successively with qiazol, chloroform, isopropanol and ethanol. cDNA were generated from the RNA using reagents from Invitrogen including random primers, M-MLV reverse transcriptase enzyme, DTT and dNTP. Quantitative real time RT-PCR (qPCR) was performed with primers (QIAGEN) using SYBR Green method and the LightCycler®

(Roche) with a 40 cycles program. Primers used for qPCR are listed in table 1.

### *Immunohistological analysis*

The samples were given to the anatomopathologist platform of the Centre Leon Berard, Lyon.

### *Adipokine dosages*

Adipose tissues and lipomas were incubated for 4 hours in DMEM without SVF, the supernatant were harvested, centrifuged and the following proteins were dosed by luminex technology in the team of Philippe Valet at the Institute of metabolic and cardiovascular diseases, Toulouse. They measured the concentrations of CCL2/MCP1, CXCL8/IL8, IL1b, IL6, TNFa, leptin, Adiponectin, HGF, Serein/PAI1, Resistin and IL-2.

## RESULTS

### **Adipose tissue specific functions are maintained in the lipomas explanted**

Adipose tissue is a secretory organ and the released cytokines are involved in the functionality and metabolism of the tissue. Both interleukins (IL) IL-6 and IL-8 are produced and secreted by the adipocytes (9,10). The levels of these interleukins secreted and measured in the lipomas-conditioned medium had a similar evolution, an increase of the level in the conditioned medium compared to the concentration before the transplantation on the first day then we observed a normalization and a progressive decrease on the concentration (Figure 1). We measured the rates in the nM range, which is consistent with previous data in the literature. We observed the same tendencies with the rates of the serine protease inhibitor serpin E1 also called Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) usually secreted by adipose tissue (11). Leptin and adiponectin are adipose tissue specific adipokines (12) and the expression of their coding genes stayed almost equal in each explanted lipomas. The production and secretion of adiponectin by the lipomas decreased during the mice hosting but were still detectable at the end of the experiment (day 180). The levels of MCP-1 stayed high until 90 days then dropped and were poorly detectable at day 180.

In parallel, we investigated the gene expression of Both ADRP and PPARG that is known to be expressed in differentiated adipocytes. We found that they were expressed in the xenograft explanted at different times (Figure 2). The transcription of the genes coding for FABP4 and LPL was also maintained in the xenografts explanted, showing that the adipose tissue xenotransplanted keeps the ability of lipolysis. In the same manner, the inflammation marker HIF1a expressed in adipocytes following the activation of lipolysis was expressed at the same rate in the different explants.

These results show that the explanted transplants of adipose tissue kept the adipose tissue-specific secretory ability for at least three months.

### **Histological and cell changes in the explants**

Adipose tissue before the implantation is a tissue obtained by lipoaspiration and can be structurally different from the explanted tissue. However, we observed on our histological and immunohistochemical analyses of the samples the signs of a healthy adipose tissue. As shown on the figure 3, after 15 days of implantation, the HE staining revealed the presence of cells that seems to be polynuclear neutrophils signing an inflammation then disappears in the next samples. We also observed the presence of necrosis area in the explants at days 180. In the different explanted lipomas, we observed endothelial cells CD31 stained in the different tissue signing a murine vascularization in the transplanted adipose tissue. Trichrome staining showed a progressive increase in fibrosis at the edge of the transplants forming a fibrous capsule around the adipose tissue. By labelling the cell of the SVF with antibodies anti-CD73 and anti-CD90, we quantified the precursor of adipocytes. The percentage of this cell population was stable in explanted xenografts (Figure 4).

### **The proximity of adipose tissue does not modify the tumor growth**

We choose to implant subcutaneously small piece of tumors near the lipoma 2 to 3 weeks after the xenotransplantation of the adipose tissue. This delay should ensure to be on the minimal inflammation process and on a good adipose tissue function by the lipoma. We evaluated the tumor growth for several breast cancer types in contact or not with the adipose tissue transplanted earlier. For BT-474, we observed a similar tumor growth until 12 days after the first measure in the mice bearing the adipose tissue-tumor and those bearing only the tumor (Figure 5). We saw the same tendency for the MDA-MB436 tumors until the end of the study, 42 days and the MDA-MB231 tumors until 26 days. The explantation of the adipose tissue and the tumors allowed us to evaluate the proximity of both tissues. They all had a common edge witnessing the interaction.

## DISCUSSION

Xenotransplantation of human adipose tissue in mice has already been performed to correct inborn errors of metabolism (13) but never to evaluate the influence on tumor growth and resistance to treatments. We already used this model to study the efficacy of targeted therapies on breast tumor in a previous study successfully and we wanted to determine the relevance, advantages and disadvantages of such a model. The adipose tissue evolution after subcutaneous transplantation in mice appeared quite stable with a self-renewal, a murine vascularization, a secretory and an adipose-specific lipolysis activity maintained.

This model several advantages to study the impact of adipose tissue on tumors. First, we can use immunodeficient mice and study human or any other types of tumors. Then, these mice do not need any preferential care or diets as the models used in other studies (7,14–16). Finally, as the adipose tissue and the tumor grafted subcutaneously, it is practical to follow the tumor growth and the evolution of the tissue. We can also easily explanted the tissue without killing the animals. However, one disadvantage is to make the tumor growth measure difficult because of the close contact with the adipose tissue and the eventually fusion of both tumor and adipose tissue. That is the reason to use BT-474 tumors in this study, their consistency is not similar of the consistency of adipose tissue comparatively to SKBR3 tumors for example.

The inflammation observed in the lipoma at day 15 is a phenomenon already described (17) and allow us to transplant the tumors preferentially after this time. A follow up day-by-day of the lipomas could inform us on the exact delay to respect between the implantations. The necrosis area at later times inform us on the necessity to reduce our tumor growth studies to few weeks. Regarding the tumor growth, literature data would predict a faster tumor growth in contact with adipose tissue. We observed a tendency to the opposite on our models with a slower tumor growth after few weeks for the tumor in contact of adipose tissue as for the tumor alone. That is another reason to limit our studies in the time.

The analysis of precursors of adipocytes was not complete, as we wanted. Indeed, to identify clearly this cell population in the SVF of adipose tissue, we labeled the cells with antibodies directed against CD14, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC and HLA-DR as described in the literature (18). Unfortunately, we did not obtain enough of SVF fraction and we had to choose



a cell population with only two labeling for CD90 and CD73. The percentage of cells in this population appeared stable during three months and we saw an increased percentage at day 180. As we would limit our studies to few weeks, these results would not affect it. In the same manner, we wanted to stain the tissue with antibodies anti-perilipin and anti-PPAR $\gamma$  but it seemed that the samples stayed too long in the formaldehyde buffer. Further analyses would be necessary to correctly describe this model.

## REFERENCES

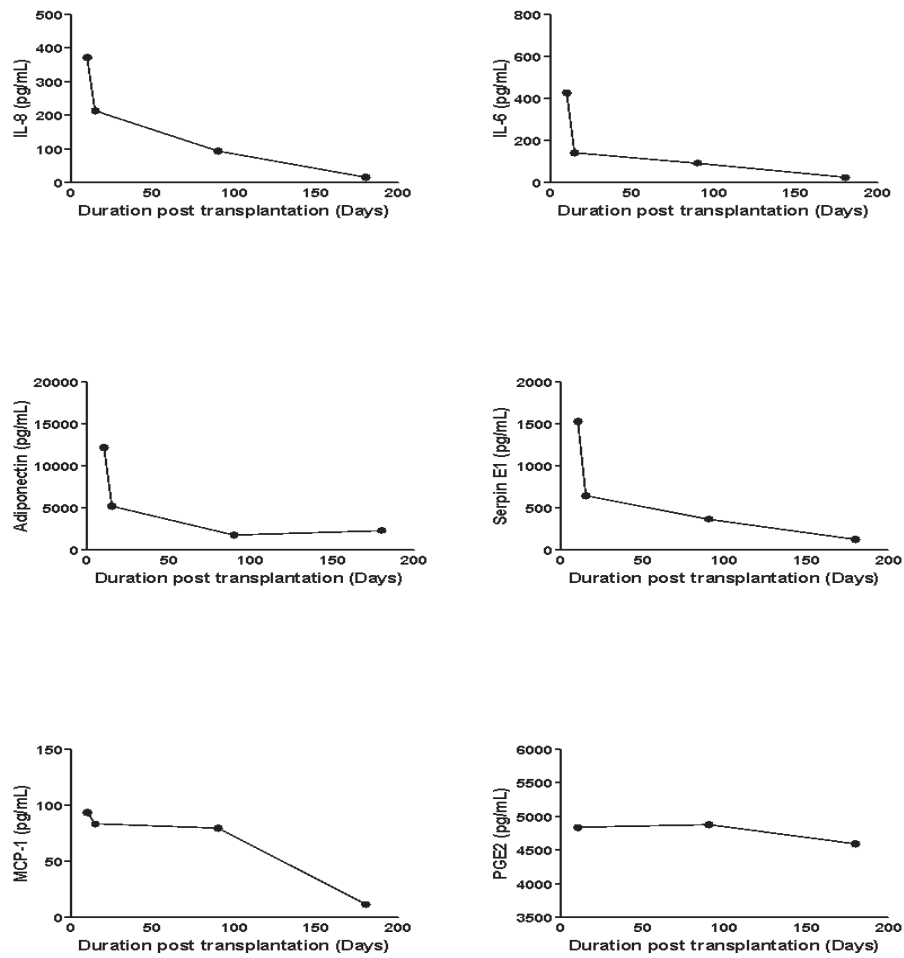
1. WHO | Obesity and overweight [Internet]. WHO. [cité 20 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Schmitz KH, Neuhauser ML, Agurs-Collins T, Zanetti KA, Cadmus-Bertram L, Dean LT, et al. Impact of obesity on cancer survivorship and the potential relevance of race and ethnicity. *J Natl Cancer Inst.* 18 sept 2013;105(18):1344-54.
3. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 24 avr 2003;348(17):1625-38.
4. Ewertz M, Jensen M-B, Gunnarsdóttir KÁ, Højris I, Jakobsen EH, Nielsen D, et al. Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 janv 2011;29(1):25-31.
5. Bochet L, Meulle A, Imbert S, Salles B, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 juill 2011;411(1):102-6.

6. Duong MN, Cleret A, Matera E-L, Chettab K, Mathé D, Valsesia-Wittmann S, et al. Adipose cells promote resistance of breast cancer cells to trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Breast Cancer Res BCR*. 24 avr 2015;17(1):57.
7. De Angel RE, Blando JM, Hogan MG, Sandoval MA, Lansakara-P DSP, Dunlap SM, et al. Stearoyl gemcitabine nanoparticles overcome obesity-induced cancer cell resistance to gemcitabine in a mouse postmenopausal breast cancer model. *Cancer Biol Ther*. avr 2013;14(4):357-64.
8. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. *Curr Protoc Pharmacol Editor Board SJ Enna Ed--Chief Al*. sept 2012;CHAPTER:Unit5.61.
9. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. déc 1997;82(12):4196-200.
10. Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. mars 2001;86(3):1267-73.
11. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 10 nov 1995;270(45):26746-9.
12. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. févr 2011;11(2):85-97.
13. Ablamunits V, Klebanov S, Giese SY, Herold KC. Functional human to mouse adipose tissue xenotransplantation. *J Endocrinol*. janv 2012;212(1):41-7.
14. Behan JW, Yun JP, Proektor MP, Ehsanipour EA, Arutyunyan A, Moses AS, et al. Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res*. 1 oct 2009;69(19):7867-74.
15. Ehsanipour EA, Sheng X, Behan JW, Wang X, Butturini A, Avramis VI, et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res*. 15 mai 2013;73(10):2998-3006.

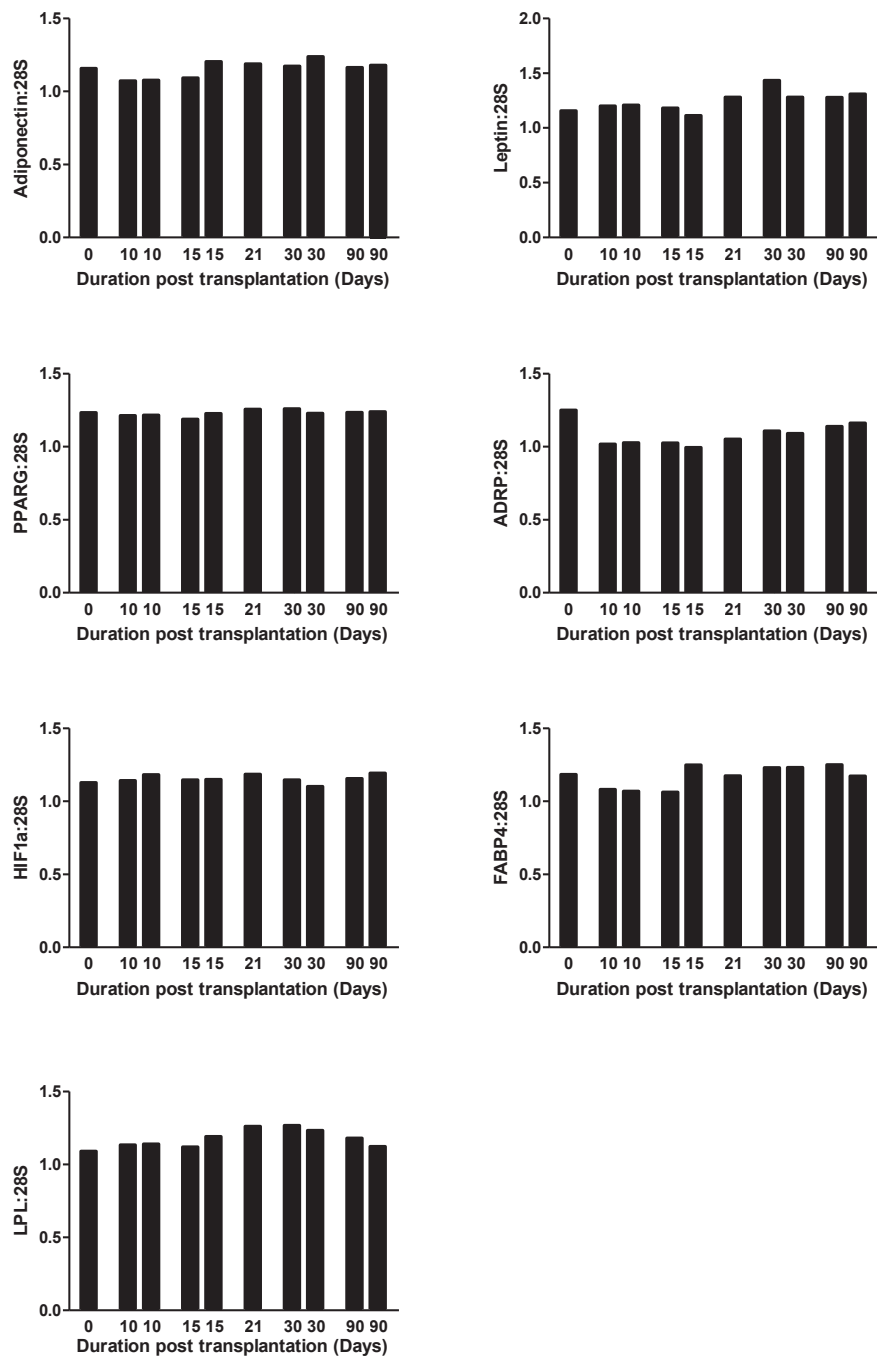
16. Malvi P, Chaube B, Singh SV, Mohammad N, Pandey V, Vijayakumar MV, et al. Weight control interventions improve therapeutic efficacy of dacarbazine in melanoma by reversing obesity-induced drug resistance. *Cancer Metab.* 2016;4:21.
17. JCI - Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice [Internet]. [cité 4 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/7901>
18. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells.* 26 juill 2014;6(3):256-65.

Gene	Forward primer	Reverse primer
PPAR $\gamma$	5'-GAGCCCAAGTTTGAGTTTGC-3'	5'-CAGGGCTTCTAGCAGTTGT-3'
adiponectin	5'-CCTGGTGAGAAGGGTGAGAA-3'	5'-GTAAAGCGAATGGGCATGTT-3'
ADRP	5'-TGAGATGGCAAGAGAACGGTGTG-3'	5'-GGCATTGGCAACAATCTGAGT-3'
leptin	5'-CACACGCAGTCAGTCTCCTC-3'	5'-AGGTTCTTCAGGTCGTTGG-3'
LPL	5'-CGCCGACCAAAGAAGAGATT-3'	5'-GCCACGGACTCTGCTACTCC-3'
HIF1 $\alpha$	5'-GAACGTGCGAAAAGAAAAGTCTCG-3'	5'-CCTTATCAAGATGCGAACTCACA-3'

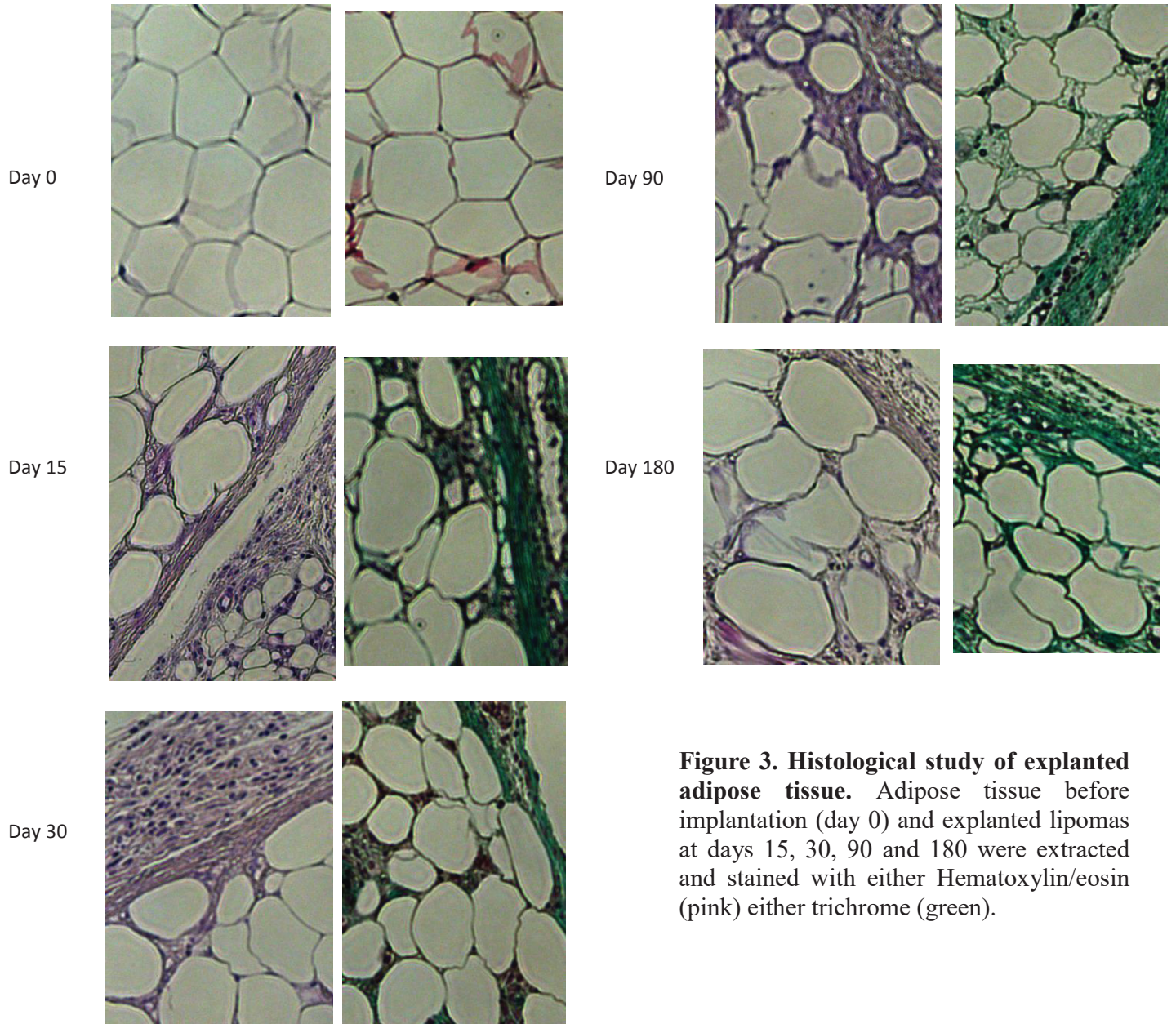
**Table 1. Primer sequences used for real-time qPCR.** ADRP, Adipose Differentiation-Related Protein; FABP4, FA Binding Protein 4; HIF1 $\alpha$ , Hypoxia Inducible Factor 1- $\alpha$



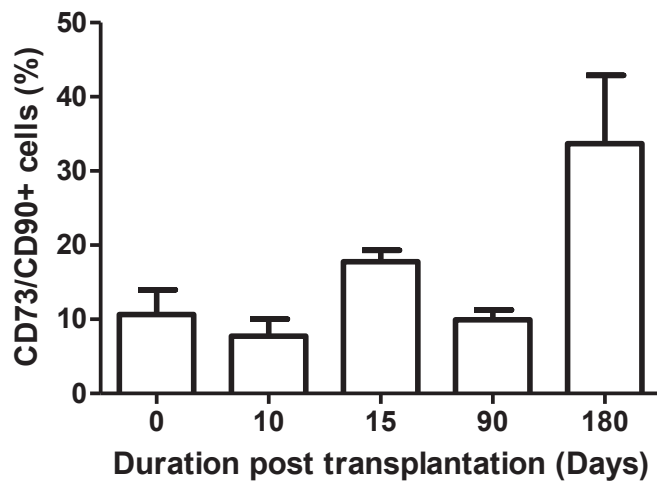
**Figure 1. Adipokine secretions by the explanted xenografts at 10, 15, 90 and 180 days after implantation.** The lipomas were incubated 6 hours then the interleukins 8 and 6, adiponectin, serpin E1, MCP-1 and PGE-2 levels were measured in the medium.



**Figure 2.** Analysis of gene expression in the adipose tissue before transplantation (day 0) and on explanted xenografts at 10, 15, 21, 30 or 90 days. Total RNA isolated from tissue was analyzed by qPCR. The paired bars represent parallel analysis done on biological replicates (separate xenografts) at each of the time points. Gene expression, shown on the y -axis, was calculated as the delta-delta Ct.

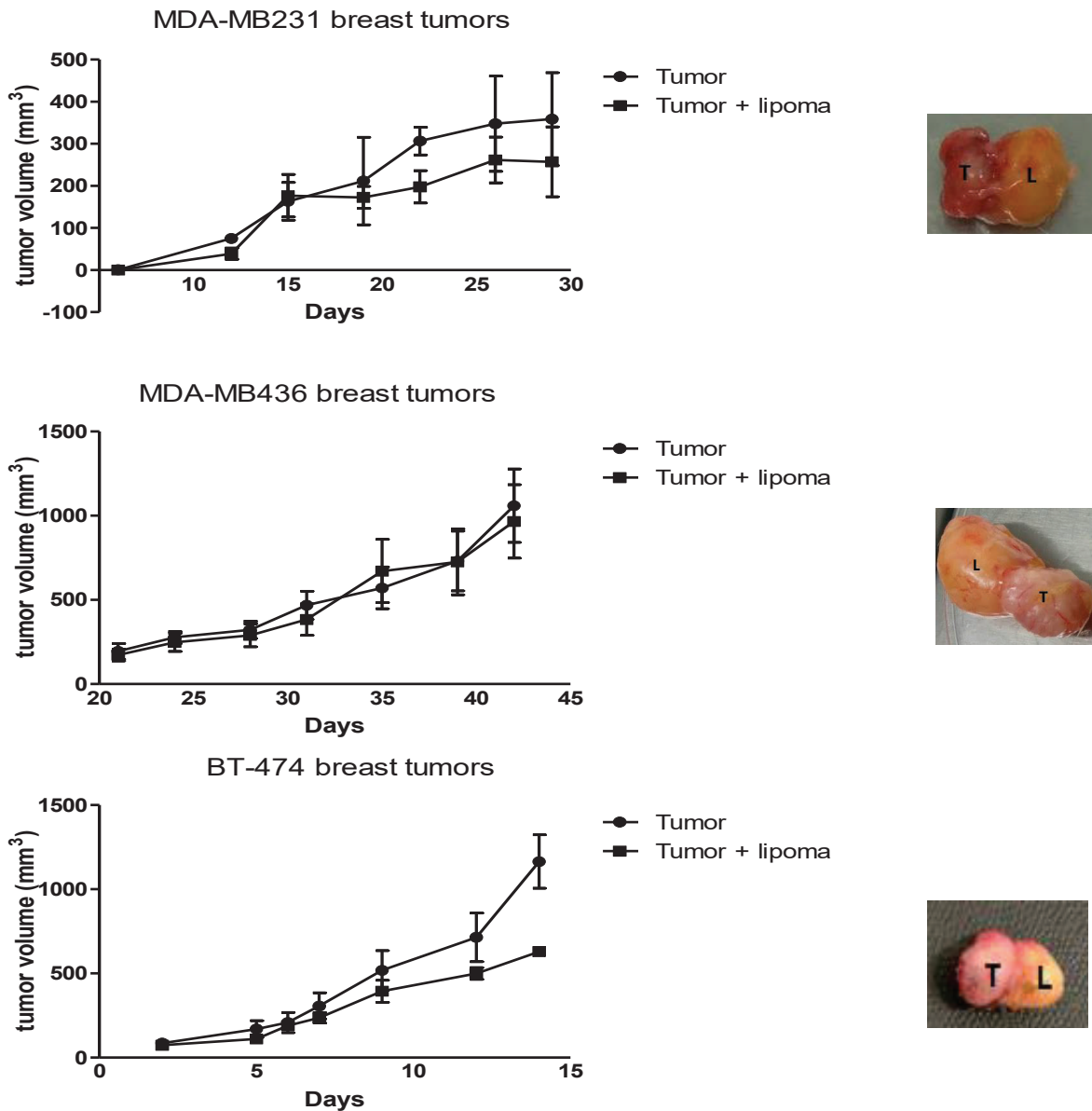


**Figure 3. Histological study of explanted adipose tissue.** Adipose tissue before implantation (day 0) and explanted lipomas at days 15, 30, 90 and 180 were extracted and stained with either Hematoxylin/eosin (pink) either trichrome (green).



**Figure 4. Adipocyte precursors in adipose tissue.** Tissue before transplantation (Day 0) and at days 10, 15, 90 and 180 were digested, the stromal vascular fraction was isolated and labeled with fluorescent antibodies directed against CD73 and CD90. The flow cytometry analysis permitted to quantify the cells both CD73 and CD90 positives.





**Figure 5 Tumor growth of breast tumors in mice bearing or not a lipoma.** Tumor growth of MDA-MB231, MDA-MB436 and BT-474 were measured for two groups of three SCID mice each. The animals of one group were subcutaneously transplanted with human adipose tissue to form a lipoma two weeks prior to tumor xenografts (Tumor + lipoma) while the three others had only the tumor xenografts (Tumor). For each experiments, we explanted the attached tumor (T) and lipoma (L) to observe the junction.



## CONCLUSION

Pour conclure, nous pouvons dire que nous disposons d'un modèle stable et reproductible de contexte d'hyperadiposité qui pourrait s'inclure dans le panel de modèles murins d'obésité existants. De notre côté, il nous permet de valider nos expériences *in vitro* et il permettra peut-être également d'évaluer des données cliniques.





## DISCUSSION GENERALE

Une quantité croissante de publications suggèrent que le tissu adipeux juxta-tumoral induit une résistance des cellules tumorales à différents types de traitements anticancéreux. De plus, plusieurs équipes ont démontré que l'incubation de cellules tumorales, *in vitro*, avec des milieux conditionnés provenant d'adipocytes ont un effet de résistance des cellules tumorales pour divers agents de chimiothérapie tels que la doxorubicine, la dexaméthasone, le melphalan ou de thérapies ciblées avec le bortezomib, le trastuzumab ou le T-DM1(43,128–130,132). Des résistances ont également été identifiées concernant des cellules tumorales pour divers agents thérapeutiques en cas de mise en contact directe ou indirecte avec des adipocytes (43,126,127,130,132,133,164). Bien que des résistances aient été observées pour le lapatinib comme décrit dans la revue de D'Amato *et al.* (46), aucune étude n'a encore été publiée, à notre connaissance, sur le lien entre cette résistance et la proximité du TA. Le lapatinib fait partie des thérapies ciblées utilisées dans le traitement des tumeurs mammaires surexprimant HER2. Nous nous sommes donc intéressés, d'une part aux mécanismes de résistance décrits pour les thérapies ciblées, dirigés contre HER2 (46,164). D'autre part, nous avons recherché les différents mécanismes de résistances induites par l'obésité, le TA, les adipocytes ou encore les facteurs sécrétés d'adipocytes afin d'orienter notre axe de recherche.

Nous avons choisi de travailler sur des milieux conditionnés d'adipocytes et donc sur le rôle des facteurs sécrétés par les adipocytes dans la résistance des cellules de cancer du sein au lapatinib. Plusieurs adipokines sécrétées par les adipocytes ont été impliquées dans la résistance des tumeurs aux thérapies anticancéreuses donnant des résultats parfois contradictoires. C'est le cas de la leptine qui a été décrite comme responsable de résistance dans plusieurs études mais dans d'autres elle n'a présenté aucun effet sur la sensibilité des cellules tumorales aux traitements anticancéreux (43,130,133). De plus, la complexité du sécrétome du TA et ses variations selon le type de TA, l'origine humaine ou animale et la localisation nous ont fait chercher du côté de la cellule tumorale (91,165). En effet, nous pensons qu'en identifiant le ou les mécanisme(s) accompagnant la résistance au niveau de la cellule tumorale, cela nous mettra sur une piste pour comprendre quel genre de facteur sécrété par les adipocytes pourrait activer ce processus et comment le bloquer afin de rétablir la sensibilité des cellules tumorales au lapatinib. Nous avons

également tenté de modifier le métabolisme des adipocytes par différentes molécules avant de récupérer leur milieu et de le mettre en contact avec les cellules tumorales.

Dans cette étude, nous avons utilisé des lignées cellulaires de préadipocytes murins dont nous avons induit la différenciation en adipocytes grâce à l'exposition de ces cellules à l'insuline pendant quinze jours. Les cellules tumorales utilisées sont toutes issues de lignées humaines de cancer du sein, elles expriment des taux différents de récepteurs PR, ER et de HER2. Nous avons récupéré les milieux de culture, appelés milieu conditionnés (CM) des préadipocytes et des adipocytes mais également de fibroblastes afin de les ajouter à celui des cellules tumorales, appelé milieu contrôle. Ainsi, les cellules tumorales sont cultivées en présence de sécrétions d'adipocytes sans qu'il n'y ait d'échanges entre les deux types cellulaires. Des essais ont été réalisés avec une lignée de préadipocytes humains qui ont donné les mêmes résultats qu'avec la lignée murine. Nous avons gardé la lignée cellulaire 3T3F442A pour des raisons de facilité de culture, ces cellules sont effectivement plus robustes et elles demandent moins de facteurs de croissance pour leur différenciation.

Nous avons pu reproduire, dans ces conditions, la résistance au lapatinib induite par les sécrétions d'adipocytes sur des cellules de cancer du sein. En effet, nous avons observé que le pourcentage de cellules viables était plus important pour les cellules tumorales incubées dans le milieu conditionné que pour celles incubées dans le milieu contrôle sans pour autant stimuler la prolifération des cellules tumorales. Ces résultats sont en accord avec les études citées précédemment. Nous aimerions étendre ces résultats à d'autres types cellulaires, notamment des modèles d'hémopathies malignes telles que la leucémie aigue myéloblastique et de myélome multiple. Nous avons réalisé quelques études préliminaires avec des lignées cellulaires Granta et d'une lignée adipocytaire isolée de moelle osseuse humaine, nommée iMSC qui nous a été fournie par une équipe de Norvège. Nous avons obtenu quelques résultats prometteurs dans le cadre de traitement à la doxorubicine de ces cellules tumorales.

Nous avons choisi d'utiliser le milieu conditionné comme modèle d'étude et non les coincubations directes ou indirectes, décrites dans le chapitre 4.2.2, pour plusieurs raisons. Il s'agit d'une facilité technique car les surnageants sont prélevés depuis la culture des cellules, centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires et ils peuvent être congelés à -80 °C en vue d'une

prochaine expérience. Il s'agit également d'une simplification d'analyse car effectuer des tests de cytotoxicité à partir de coculture peut se révéler compliqué du fait d'une multiplication des facteurs éventuellement responsables de la modification de sensibilité des cellules tumorales au lapatinib. En effet, de nombreuses études ont décrit un effet de régulation croisée au cours de laquelle les cellules tumorales modifiaient le métabolisme des adipocytes et vice versa. Il en est de même pour l'interprétation des données car les adipocytes et les cellules de cancer du sein sont deux types cellulaires adhérents rendant plus difficile la récupération des cellules nécessaire à certaines analyses. Enfin, le fait de s'affranchir d'éventuels échanges entre les cellules permet d'avoir une vision plus simplifiée du mécanisme de résistance avec moins de paramètres à prendre en compte. Cependant, les résultats devront être vérifiés en cas de contact direct entre les deux types cellulaires afin de se rapprocher au maximum des conditions *in vivo* et de pouvoir extrapoler nos résultats à une application clinique.

Le fait d'exposer plusieurs lignées de cancer du sein au lapatinib nous a permis de constater que ce phénomène de protection des cellules tumorales par les adipocytes n'était pas dépendant de ER comme l'avaient suggéré plusieurs études (46,142,157). Cependant, la différence d'expression de ce récepteur entre les cellules BT-474 et SKBR3 pourrait expliquer leur différence de sensibilité au lapatinib. De plus, les données d'expression des divers récepteurs membranaire nous proviennent des données commerciales des lignées cellulaires, il serait nécessaire de vérifier la stabilité des taux d'expression de ces protéines au cours de nos analyses. L'estimation de la sensibilité des cellules au lapatinib en prenant la même concentration pour toutes les lignées comme réalisée ici pourrait cacher des informations. Un calcul de la concentration nécessaire pour inhiber 50% de croissance cellulaire (IC50) pour chaque lignée cellulaire permettrait de mettre en évidence une réelle différence de survie entre les conditions même si les courbes de survies obtenues initialement n'en montraient pas. Afin de s'assurer que l'augmentation de survie observée lors de nos tests de MTT soit bien attribuable à une diminution de la mortalité des cellules tumorales, nous avons également marqué les cellules tumorales à l'annexine et à l'iodure de propidium. L'analyse de ces cellules en cytométrie en flux nous aurait permis de quantifier le taux de cellules apoptotiques après l'exposition au lapatinib en fonction de la présence de sécrétions adipocytaires ou non. Cependant, nos résultats sont peu interprétables du fait d'une forte mortalité comme montre souvent ce genre d'analyse sur cellules adhérentes du



fait de l'étape de prélèvement cellulaire très fragilisante pour les cellules. Nous avons donc suivi la croissance et l'expression des caspases avant et après le traitement au lapatinib des cellules SKBR3 et BT474 grâce à l'Incucyte®. L'expression des caspases étant augmenté en cas d'apoptose, cela devrait nous donner plus d'information sur l'apoptose induite par le lapatinib dans les cellules tumorales en présence ou non de milieu conditionné d'adipocytes. Les lignées cellulaires BT-474 et SKBR-3 expriment également EGFR mais nous ne nous en préoccupons pas ici car il a été démontré que le lapatinib exerce son action sur ces deux lignées cellulaires principalement via HER2 et que le blocage d'EGFR dans les cellules tumorales n'induisait pas de différence de sensibilité au lapatinib (166).

Nous avons ensuite effectué une étude élargie de la sensibilité des cellules BT-474 pour plusieurs ITK ciblant différents RTK afin de savoir si le phénomène de protection des cellules tumorales par les sécrétions adipocytaires était spécifique de HER2. En parallèle du lapatinib, nous avons donc exposé les cellules tumorales à trois ITK différents, l'ibrutinib qui se fixe sur EGFR, HER2 et HER3 (167), l'afatinib qui se lie de manière irréversible à EGFR, HER2 et HER4 et l'AZD4547 qui se lie spécifiquement à FGFR (33,168). Selon l'estimation de l'IC50 nous avons constaté que les quatre TKI avaient une efficacité significativement réduite sur les cellules tumorales en présence de CM d'adipocytes. L'effet de protection des cellules tumorales par les sécrétions d'adipocytes contre les ITK n'est donc pas spécifique du lapatinib ou de HER2 ou encore d'EGFR, il est également retrouvé pour FGFR et HER4 et ce, même en cas de ciblage multiples par la même molécule. Il est connu qu'en cas d'inhibition d'un RTK, d'autres RTK peuvent être suractivées afin de compenser cette inhibition (157). Cependant, le fait que la résistance survienne également des ITK qui ciblent plusieurs RTK remet en cause cette hypothèse dans notre étude. Ces résultats nous orientent plus vers une modification d'expression d'un acteur important d'une des voies de signalisation intracellulaire comme la suractivation d'AKT.

Nous avons choisi d'approfondir l'hypothèse de l'inhibition de blocage du cycle cellulaire induite par le lapatinib comme mécanisme de la résistance provoquée par les sécrétions adipocytaires. Ce phénomène est décrit dans la littérature comme un mécanisme de résistance pour les thérapies ciblées (37,147). Nos résultats sont bien en faveur de l'inhibition de blocage du cycle cellulaire induit par le lapatinib au niveau cellulaire et moléculaire. Des expériences de Western Blot ont été réalisées sur les cellules BT-474 et SKBR-3 afin de compléter ces résultats au niveau

protéique. Le but était de mettre en évidence, dans un premier temps, l'inhibition des voies de signalisations sous-jacentes à l'inactivation de HER2 et EGFR suite à l'exposition des cellules au lapatinib telle que réalisé dans les études décrivant le mécanisme d'action du lapatinib (35,37,169–172). Ceci comprend la recherche des protéines ERBB2, EGFR, AKT, ERK1/2 phosphorylées ainsi que leurs formes totale en s'attendant à obtenir une diminution d'expression des formes phosphorylées pour ces protéines après exposition au lapatinib. Dans un deuxième temps, nous voulions explorer l'expression de ces protéines dans les cellules tumorales en présence ou non de CM d'adipocytes et après exposition au lapatinib, afin de rechercher une diminution de l'inhibition d'expression qui refléterait la résistance comme décrit dans certains articles (142,149). Malheureusement, des difficultés techniques pour révéler les protéines phosphorylées ne nous ont pas permis de conclure sur ces expériences pour le moment. De nouveaux Western Blot seront réalisés à l'avenir en s'assurant de l'ajout des inhibiteurs de phosphatases dans le tampon de lyse et de la fonctionnalité des anticorps utilisés. Nous tenterons également l'immunoprécipitation pour mettre en évidence HER2 et sa forme phosphorylée.

Nous pourrions regarder d'autres voies comme la voie JAK/STAT qui a déjà été décrit dans la résistance des cellules tumorales à divers agents de chimiothérapie dans un environnement adipeux (130). Une critique que nous pouvons faire sur ces résultats tout comme sur tous ceux qui décrivent une modification d'activation de voie intracellulaire en parallèle d'une résistance c'est que nous ne pouvons pas vraiment savoir s'il s'agit de la cause de la résistance ou de sa conséquence. Afin d'élucider ce point, il serait intéressant de doser la quantité de lapatinib dans les cellules tumorales en présence ou non de CM d'adipocytes. Si la même quantité est présente dans toutes les cellules, indépendamment de leurs conditions de culture, la possibilité d'un mécanisme de résistance intracellulaire serait renforcée. A l'inverse, si la quantité de lapatinib est inférieure dans les cellules tumorales en présence de CM que dans celle en l'absence de CM, la possibilité d'une dégradation du lapatinib, de sa rétention à l'extérieur de la cellule ou encore l'efflux par des pompes comme la P-gp serait à envisager.

D'autres voies de compensation ont été décrites dans la littérature comme la voie utilisant mTor. En effet, Brady *et al.* ont démontré que bloquer mTor pouvait resensibiliser les cellules rendues résistantes pour le lapatinib (173). De plus, il a été démontré que l'activation de mTor pouvait lever l'inhibition de HER2 (174). Ces données pourraient orienter notre projet car nous avons

déjà réalisé des tests de cytotoxicité avec un inhibiteur de mTor, l'everolimus sur des cellules BT-474 en présence ou non de CM d'adipocytes. Les résultats ont montré que les cellules tumorales étaient sensibles à cette molécule et que cette sensibilité des cellules tumorales pour l'everolimus était identique en présence ou non de CM d'adipocytes. Au vue de ces résultats et des données bibliographiques, il pourrait être intéressant d'évaluer l'efficacité du lapatinib sur les cellules tumorales en présence ou non de CM d'adipocytes et en combinaison avec l'everolimus. Il se pourrait que les cellules tumorales retrouvent leur sensibilité au lapatinib dans ces conditions, même en présence de CM d'adipocytes. Concernant les tyrosines kinases de la famille src qui agiraient comme une voie alternative en cas de blocage d'HER2, elles sont capables d'interagir avec les autres membres de la famille ERBB afin de les activer, de la même manière que HER2 (149,150). Il serait donc intéressant de tester le saracatinib qui est un inhibiteur de src, dans nos modèles expérimentaux *in vitro*, afin de voir si la résistance peut être inversée de cette manière. Nous essayons également actuellement de reproduire ces résultats à partir de milieux conditionné de TA humain présentant des IMC différents.

Avant d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme, nous avons souhaité reproduire un modèle *in vivo* de cette résistance. Nous avons utilisé un modèle mis au point dans notre équipe dans le cadre d'un précédent projet qui vise à modéliser l'influence paracrine du tissu adipeux juxta-tumoral (43). Nos résultats laissent entrevoir le fait que le lapatinib perd son efficacité antitumorale lorsque la tumeur est en contact avec du TA même si les volumes tumoraux sont trop petits pour le dire. Ce modèle murin présente plusieurs avantages. Tout d'abord, il peut être réalisé à partir de souris immunodéprimées qui supportent les xénogreffes. Ceci permet d'utiliser du TA et des cellules tumorales d'origines humaines et donc de reproduire le contexte de proximité entre TA et tumeurs comme chez l'homme. Dans ce modèles il n'est pas nécessaire de faire appel à un régime alimentaire particulier pour rendre les souris obèses comme dans d'autres études (126–129). Enfin, le devenir du TA est mieux contrôlé ainsi que ses interactions avec la tumeur que dans le cas de co-injection de cellules tumorales et de cellules adipocytaires (130). En revanche, il présente le désavantage de rendre les mesures tumorales difficiles raison de sa proximité avec le tissu adipeux. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser les lignées BT-474 et non les SKBR-3 qui forment des tumeurs plus molles et qui se rapprochent de la consistance du lipome. Nous avons effectué un travail de caractérisation des lipomes afin d'évaluer les

modifications histologiques, cellulaires, protéiques et d'expressions géniques à divers temps au sein des lipomes afin de mieux maîtriser et de valider ce modèle. En effet, l'implantation de TA humain dans des souris SCID a déjà été étudiée en vue de restaurer un déficit métabolique, de réactiver la sécrétion de certaines hormones comme la leptine chez des patients obèses ou encore afin d'estimer la stabilité de ce genre de greffe utilisée pour la chirurgie mammaire réparatrice (175–177). Cependant, nous n'avons rien retrouvé dans la littérature parlant d'étudier la sensibilité des traitements des tumeurs dans un contexte d'hyperadiposité. Les premiers tests effectués plusieurs années auparavant ont donné d'emblée de très bons résultats avec une bonne stabilité des xénogreffes du point de vue de la taille et de l'absence de nécrose. Nous avons retrouvé une très bonne reproductibilité dans nos tests de caractérisation de ce modèle et une bonne reproductibilité biologique sur les différentes analyses en dehors des taux d'adipokines qui peuvent être variables selon le donneur. L'inflammation observée après 15 jours d'implantation avec une infiltration de polynucléaires neutrophiles dans la membrane du lipome est un processus qui a déjà été décrit (176) et elle nous suggère d'implanter nos tumeurs un peu plus de 15 jours après l'implantation de TA. Cependant, des études plus précises et quotidiennes des lipomes pourrait nous donner le délai précis à respecter entre les deux implantations afin d'optimiser la prise tumorale et de limiter l'impact de l'inflammation sur la croissance tumorale. Les zones de nécroses observées vers le centre des lipomes sur les temps plus avancés nous font penser qu'il est préférable de limiter nos études sur ces modèles à quelques semaines. Concernant la croissance tumorale, les données reliant obésité et cancers nous auraient poussé à penser que les tumeurs pousseraient beaucoup plus vite en présence de TA. Cependant, pour chaque modèle tumoral étudié, il s'est révélé que la tumeur avait plutôt tendance à pousser moins rapidement en présence du lipome que les tumeurs seules. Ce phénomène s'est reproduit pour les quatre lignées cellulaires testées à partir d'un certain temps, nous obligeant à limiter nos études dans le temps. Les analyses de sécrétions d'adipokines ainsi que celles de RT-PCR nous montrent que les lipomes conservent leurs caractéristiques de TA et que nos tumeurs évoluent donc bien dans un contexte d'hyperadiposité. Cependant, le TA présente des fonctions de sécrétions et de métabolisme différentes selon sa répartition dans le corps humain. Le TA que nous implantons chez les souris est d'origine abdominal et ne reflète pas exactement le comportement du TA mammaire. Ceci ne remet pas en question notre hypothèse car, selon nos études *in vitro*, ce serait les sécrétions du TA qui favoriseraient la résistance tumorale aux ITKs et pas la proximité. Le fait

que nous observions une vascularisation du lipome en immunohistologie, nous pouvons en déduire que les lipomes secrètent et libèrent dans la circulation sanguine un certain nombre d'adipokines et que nous sommes dans un contexte d'obésité. Cela signifierait aussi que nous pourrions implanter les lipomes et les tumeurs à distance l'un de l'autre, ce qui faciliterait nos mesures. Nous avons tenté de doser les triglycérides sanguins de nos modèles grâce à un kit de lecteur de triglycéridémie/cholestérolémie mais les résultats n'étaient pas très fiables, peut-être du fait du manque de sensibilité de l'appareil. Des analyses plus approfondies pourraient être réalisées sur ces modèles tel que le dosage du glycérol sanguin.

Nous avons également voulu quantifier les cellules préadipocytaires en marquant les cellules de la fraction stromale avec des anticorps anti-CD73 et anti-CD90 tel que décrit dans l'article de Baer. Nous avons alors observé, tout d'abord une diminution du nombre de ces préadipocytes et puis une augmentation au temps 180 jours (160). Étant donné les résultats des autres analyses, nos études de proximité entre le TA et la tumeur n'iront pas si loin dans le temps mais il serait quand même intéressant de comprendre cette augmentation. Nous avons également essayé de quantifier le taux de PPAR gamma, principalement exprimé dans les adipocytes avant la différenciation, sur des coupes de lipomes aux différents temps grâce à la technique d'immunohistochimie. De la même manière, nous avons marqué nos coupes tissulaires avec un anticorps anti-pérlipine, la pérlipine étant une protéine exprimée à la surface des gouttelettes lipidiques des adipocytes différenciés. Malheureusement, le marquage des pérlipines, bien que les essais préalables sur adipocytes 3T3-F442A étaient concluants, n'a donné aucun marquage positif sur les coupes tissulaires. En parallèle, le marquage des PPAR gamma fut difficile à interpréter et à quantifier du fait de la taille des noyaux des adipocytes et de leur forme très écrasée par rapport au cytoplasme mais ils apparaissaient du même ordre de grandeur pour toutes les coupes de lipomes. Cela n'explique pas l'augmentation des cellules double positives CD73/CD90. En plus des anticorps anti-CD73 et anti-CD90, nous avons mis en place un panel de huit anticorps anti-CD14, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC et HLA-DR afin d'identifier la population de précurseurs mésenchymateux de la fraction stromale tel que décrit dans la littérature (160). Ces marquages nous auraient permis d'isoler chaque population cellulaire de notre fraction stromale. Du fait de la très faible quantité de cellules récupérées après extraction des lipomes, ces résultats ne sont malheureusement pas exploitables et nous avons décidé de ne

conserver que les cellules CD73/CD90 positives. Il serait intéressant de refaire cette étude avec plusieurs lipomes à analyser pour chaque temps.

Même si ce modèle restera pour nous une bonne référence pour reproduire le contexte d'obésité dans le traitement du cancer, certaines critiques et interrogations surviennent dans ce genre de modèle animal. Parmi elles l'absence du microenvironnement immunitaire des tumeurs implantées dans ces souris immunodéprimées ou encore le fait que les tumeurs ne soient pas spontanées. Cela limite l'extrapolation à l'homme. Il serait intéressant d'implanter des tumeurs dont les cellules seraient marquées de manière à pouvoir les suivre par des techniques d'imageries afin de vérifier qu'elles ne migrent pas dans le lipome, ce qui expliquerait une moindre croissance tumorale et qui serait en accord avec une étude décrivant la migration des cellules tumorales au sein du TA dans le cas de cancer de la prostate afin de former une « niche tumorale » (178).

Afin d'étendre notre modèle animal, nous avons testé des allogreffes de TA chez les souris. Nous avons récupéré du TA abdominal et périgonadique murin de souris obèse pour l'implanter chez des souris SCID. Malheureusement, les souris transplantées n'ont pas survécue probablement du fait de la toxicité du TA telle qu'elle a déjà été décrite (179).

Nous avons envisagé d'autres approches pour comprendre le mécanisme de la résistance induite par les sécrétions adipocytaires comme le projet de métabolomique en cours, en collaboration avec une équipe de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Lyon dont les premiers résultats ont montré une différence dans le pool de métabolites provenant des préadipocytes et des adipocytes. Ceci nous a orienté vers des tests de modulations métabolique des adipocytes et plus particulièrement de la lipolyse comme il s'agit de leur principal rôle dans l'organisme. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre, l'AMP cyclique est au cœur de la réalisation de cette réaction, nous avons donc commencé par ajouter de l'AMP mais également de l'ATP, de l'ADP et de l'adénosine, ces molécules ayant déjà été décrites dans d'autres études étudiant la résistance tumorale à différentes thérapeutiques (180). De la même manière, le celecoxib, un inhibiteur de la COX inhibe la synthèse de PGE2 à partir d'acides gras et elle serait responsable de diverse réactions aux agents anticancéreux (181–183). Nous avons également, dans un premier temps, ajouté un inhibiteur de lipolyse qui agit au niveau de la FABP4, l'etomoxir. Au vu de nos résultats,

où seul le milieu conditionné des adipocytes ayant été en contact avec l'etomoxir a induit une diminution de la résistance des cellules tumorales au lapatinib par rapport au milieu conditionné des adipocytes seuls. Ceci a été confirmé par une augmentation du glycérol dans ces milieux conditionnés observé sur les derniers résultats de métabolomique. Nous avons donc approfondi les tests sur les modulateurs de lipolyse. Nous avons alors trouvé que lorsque nous incubions les adipocytes au préalable avec les inhibiteurs de lipolyse, que ce soit par blocage des récepteurs bêta-adrénergiques ou à un autre niveau (acipimox), la résistance observée avec les milieux conditionnés d'adipocytes, cette résistance disparaissait et inversement pour les activateurs de lipolyse. L'hypothèse d'un rôle des facteurs sécrétés de la lipolyse serait donc cohérente. De plus, les acides gras ont déjà été incriminé dans les résistance aux traitements dans le cancer (184) mais très peu d'études ont été menées, à notre connaissance, sur le glycérol.

Par ailleurs, nous avons également incubé des modulateurs des récepteurs alpha-adrénergiques sachant qu'ils ne sont pas des modulateurs spécifiques de la lipolyse mais également de la glycogénolyse. Nos résultats sont alors troublants car nous observons une disparition de la résistance pour les bloqueurs mais aussi pour les stimulateurs de ces récepteurs. Nous avons cherché à confirmer la stimulation des récepteurs bêta adrénergiques par l'expression du gène codant pour HIF1a pour les activateurs de ces récepteurs mais nous devrions trouver d'autres moyens de contrôle d'activation de la lipolyse afin d'évaluer le degrés d'implication des produits de la lipolyse dans cette inhibition de résistance. En effet, nous avons dosé le glycérol de chaque milieu conditionné étant donné qu'il s'agit d'une méthode de référence pour l'évaluation de l'activité lipolytique mais notre méthode manquant de sensibilité et de reproductibilité, les résultats n'ont pas pu être exploités (185). Les résultats à venir de métabolomique devrait nous éclairer un peu plus sur ces fonctions adipocytaires mais nous pourrions également essayer plusieurs combinaison d'inhibiteurs et activateurs de lipolyse afin d'obtenir la meilleure réponse possible. En parallèle, l'exploration des métabolites sécrétés par les cellules tumorales après la mise en contact avec les sécrétions adipocytaires, comparé à ceux sécrétés par les cellules dans leur milieu de culture classique pourrait nous fournir des informations importantes sur le fonctionnement de la cellule tumorale après exposition aux sécrétions adipocytaires. En effet, une modification dans les voies métaboliques après exposition à des sécrétions adipocytaires, a déjà permis d'expliquer la résistance à des agents anticancéreux (128,130). Nous sommes également

en train de mettre au point une méthode de dosage en métabolomique sur des extraits cellulaires afin d'analyser, non seulement les facteurs sécrétés mais également les facteurs contenus dans les cellules. La métabolomique nous permettra de doser les métabolites sécrétés par les cellules mais pas les AG, c'est pourquoi nous avons établi une autre collaboration avec une équipe de l'hôpital Edouard Herriot qui est spécialisée dans le dosage et l'analyse des acides gras. Ces analyses nous permettraient d'établir une corrélation entre la présence de certains éléments produits et libérés par les adipocytes et la réponse au traitement des cellules tumorales. Les mêmes études métabolomiques et lipidomiques sur les cellules tumorales et leurs milieux de culture avant et après l'exposition au milieu conditionné d'adipocytes et aux modulateurs de lipolyse nous permettra également d'établir une corrélation entre le métabolisme tumoral et la réponse au traitement. Pour l'instant, nous réalisons ces études sur les cellules BT474 et les adipocytes 3T3-F442A mais nous envisageons d'étendre les recherches à, au moins un autre modèle tumoral, SKBR3 et adipocytaire HMADS.

Concernant d'éventuelles méthodes visant à restaurer la sensibilité des cellules tumorales au lapatinib, plusieurs approches thérapeutiques sont envisageables. En ce qui concerne les résistances aux traitements dans le cadre de la cancérologie, les études *in vitro* utilisent souvent des cellules rendues résistantes pour un agent thérapeutique donné afin d'évaluer la restauration de sensibilité des cellules pour cet agent (156,157,173). Cependant, dans notre étude, les cellules tumorales ne semblent pas présenter de modifications irréversibles après l'exposition aux sécrétions adipocytaires les rendant résistantes aux ITK car lorsqu'on arrête l'exposition des cellules tumorales aux CM d'adipocytes, ces cellules retrouvent leur sensibilité au lapatinib. Il s'agirait donc plutôt de diminuer ou d'augmenter l'action d'un élément cellulaire touché par les sécrétions adipocytaires au moment de l'exposition des cellules tumorales au lapatinib. Par exemple, le blocage des pompes d'efflux empêcherait la sortie du lapatinib des cellules, l'ajout d'un inhibiteur de src éviterait la compensation de l'inhibition de HER2 par src ou encore, l'ajout d'un inhibiteur d'AKT restaurerait l'action du lapatinib sur la prolifération cellulaire. Il pourrait également être pertinent d'ajouter un inhibiteur de lipolyse ou un bêtabloquant directement sur les adipocytes.

Pour le modèle animal, nous avons mené une expérience sur notre modèle murin comme précédemment mais en rajoutant des groupes traités à l'etomoxir et/ou au lapatinib en présence



ou non de TA. Malheureusement, les résultats n'ont pas été concluants, nous n'avons observé aucune différence entre les groupes traités à l'etomoxir ou non. Cependant, nous envisageons de réaliser prochainement une expérience avec des souris, toujours porteuses de lipomes et de tumeurs ou de tumeurs seules et de les traiter avec du lapatinib et/ou avec un bêtabloquant comme le propranolol. Nous espérons trouver une restauration de l'efficacité du lapatinib pour les groupes de souris porteuses de tumeurs et de lipomes avec ce traitement.

En clinique, l'évaluation des traitements en cancérologie est délicate en raison de l'association de nombreuses molécules anticancéreuses et la mise en place d'études évaluant l'efficacité des thérapies ciblées en fonction du statut pondéral des patients paraîtrait intéressante. Le ciblage spécifique de plusieurs cibles thérapeutiques pourrait donner de bons résultats en clinique et il faudrait prendre en compte, entre autre, le rôle du TA dans la réponse des tumeurs aux différentes thérapies ciblées. Eventuellement, l'inhibition de la lipolyse chez ces patients pourrait être envisagée ou le captage spécifique du ou des produit(s) de la lipolyse impliqué(s) dans la résistance. Nous sommes actuellement en train d'établir des collaborations afin de récupérer des données de patients atteints de cancer et sous bêtabloquants afin de corréler la réponse au traitement avec la prise de bêtabloquants et éventuellement leur IMC. Nous espérons trouver des données montrant une corrélation positive entre la prise de bêtabloquant et une meilleure réponse aux thérapies anticancéreuses. L'idéal serait de pouvoir comparer des patients ayant un même IMC, recevant le même traitement anticancéreux mais d'obtenir un groupe sous traitement par bêtabloquants et l'autre non. Cela appuierait nos recherches même s'il nous faudrait une cohorte très étendue pour espérer avoir une puissance statistique suffisante, surtout si nous voulons écarter le biais d'autres traitements contre l'hypertension artérielle, troubles cardiaques ou diabètes.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO | Obesity and overweight [Internet]. WHO. [cité 20 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Global BMI Mortality Collaboration null, Di Angelantonio E, Bhupathiraju S, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet Lond Engl*. 20 2016;388(10046):776-86.
3. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 25 août 2016;375(8):794-8.
4. Vainio H, Kaaks R, Bianchini F. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. août 2002;11 Suppl 2:S94-100.
5. Arnold M, Touillaud M, Dossus L, Freisling H, Bray F, Margaritis I, et al. Cancers in France in 2015 attributable to high body mass index. *Cancer Epidemiol*. févr 2018;52:15-9.
6. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 24 avr 2003;348(17):1625-38.
7. Schmitz KH, Neuhauser ML, Agurs-Collins T, Zanetti KA, Cadmus-Bertram L, Dean LT, et al. Impact of obesity on cancer survivorship and the potential relevance of race and ethnicity. *J Natl Cancer Inst*. 18 sept 2013;105(18):1344-54.
8. Worldwide cancer statistics [Internet]. Cancer Research UK. 2015 [cité 19 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>
9. SEER Cancer Statistics Review 1975-2007 - Previous Version - SEER Cancer Statistics [Internet]. [cité 19 avr 2017]. Disponible sur: [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2007/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2007/)
10. Breast cancer statistics | World Cancer Research Fund International [Internet]. [cité 20 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>
11. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 1 déc 2009;1(2):1-4.
12. Hall AG, Tilby MJ. Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev*. sept 1992;6(3):163-73.

13. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. mai 2006;17 Suppl 5:v7-12.
14. Parker WB. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev*. juill 2009;109(7):2880-93.
15. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. oct 2010;9(10):790-803.
16. Howell A, Dowsett M. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: Aromatase inhibitors versus antioestrogens. *Breast Cancer Res*. 2004;6(6):269-74.
17. Brawer MK. Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *Rev Urol*. 2006;8(Suppl 2):S35-47.
18. Munagala R, Aqil F, Gupta RC. Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian J Pharmacol*. mai 2011;43(3):236-45.
19. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*. mars 2011;11(3):239-53.
20. IARC Publications - Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs [Internet]. [cité 17 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb4/>
21. ald\_30\_gm\_ksein\_vd.pdf [Internet]. [cité 2 mai 2018]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-02/ald\\_30\\_gm\\_ksein\\_vd.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-02/ald_30_gm_ksein_vd.pdf)
22. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 25 mai 2010;7(5):e1000279.
23. Parise CA, Caggiano V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *J Cancer Epidemiol*. 2014;2014:469251.
24. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 4 oct 2007;26(45):6469-87.
25. Facbio.com - Activité Tyrosine Kinase [Internet]. [cité 20 avr 2017]. Disponible sur: [http://www.facbio.com/content/index.php?option=com\\_content&task=view&id=69&Itemid=86&limit=1&limitstart=2](http://www.facbio.com/content/index.php?option=com_content&task=view&id=69&Itemid=86&limit=1&limitstart=2)
26. Haugsten EM, Wiedlocha A, Olsnes S, Wesche J. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol Cancer Res MCR*. nov 2010;8(11):1439-52.

27. Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol.* janv 1996;148(1):225-32.
28. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* juin 2007;18(6):977-84.
29. Harbeck N, Beckmann MW, Rody A, Schneeweiss A, Müller V, Fehm T, et al. HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer. *Breast Care Basel Switz.* mars 2013;8(1):49-55.
30. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res BCR.* 5 mars 2014;16(2):209.
31. Jeong W, Doroshow JH, Kummar S. US FDA Approved Oral Kinase Inhibitors for the Treatment of Malignancies. *Curr Probl Cancer.* 2013;37(3):110-44.
32. Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 juill 2010;28(20):3366-79.
33. Solca F, Dahl G, Zoephel A, Bader G, Sanderson M, Klein C, et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther.* nov 2012;343(2):342-50.
34. Gunzer K, Joly F, Ferrero J-M, Gligorov J, de Mont-Serrat H, Uttenreuther-Fischer M, et al. A phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, added to letrozole in patients with estrogen receptor-positive hormone-refractory metastatic breast cancer progressing on letrozole. *SpringerPlus [Internet].* 19 janv 2016 [cité 3 mai 2018];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4718910/>
35. Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu L-H, Ma H, Rusnak DW, et al. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene.* 12 sept 2002;21(41):6255-63.
36. O'Neill F, Madden SF, Aherne ST, Clynes M, Crown J, Doolan P, et al. Gene expression changes as markers of early lapatinib response in a panel of breast cancer cell lines. *Mol Cancer.* 18 juin 2012;11:41.
37. Tang L, Wang Y, Strom A, Gustafsson J-Å, Guan X. Lapatinib induces p27(Kip1)-dependent G<sub>1</sub> arrest through both transcriptional and post-translational mechanisms. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 août 2013;12(16):2665-74.
38. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer.* oct 2013;13(10):714-26.

39. Bell DW, Gore I, Okimoto RA, Godin-Heymann N, Sordella R, Mulloy R, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet.* déc 2005;37(12):1315-6.
40. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 24 févr 2005;352(8):786-92.
41. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* mars 2005;2(3):e73.
42. Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene.* 20 oct 2003;22(47):7340-58.
43. Duong MN, Cleret A, Matera E-L, Chettab K, Mathé D, Valsesia-Wittmann S, et al. Adipose cells promote resistance of breast cancer cells to trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Breast Cancer Res BCR.* 24 avr 2015;17(1):57.
44. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene.* 26 juin 2008;27(28):3944-56.
45. Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature.* 25 janv 2007;445(7126):437-41.
46. D'Amato V, Raimondo L, Formisano L, Giuliano M, De Placido S, Rosa R, et al. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev.* déc 2015;41(10):877-83.
47. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 23 mars 2011;3(75):75ra26.
48. Uramoto H, Shimokawa H, Hanagiri T, Kuwano M, Ono M. Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst Neth.* sept 2011;73(3):361-5.
49. McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2013;12(3):217-28.
50. Danen EHJ. Integrins: regulators of tissue function and cancer progression. *Curr Pharm Des.* 2005;11(7):881-91.

51. Lesniak D, Xu Y, Deschenes J, Lai R, Thoms J, Murray D, et al. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res.* 15 nov 2009;69(22):8620-8.
52. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 26 juill 2012;487(7408):505-9.
53. Gilbert LA, Hemann MT. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell.* 29 oct 2010;143(3):355-66.
54. Cinti S. Adipose tissues and obesity. *Ital J Anat Embryol Arch Ital Anat Ed Embriologia.* juin 1999;104(2):37-51.
55. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol.* mai 2014;170(5):R159-171.
56. Giordano A, Frontini A, Cinti S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(6):405-24.
57. Cinti S. The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech.* sept 2012;5(5):588-94.
58. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J Nutr.* 12 janv 2000;130(12):3122S-3126S.
59. Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. Adipocyte Differentiation. In: *Adipose Tissue Biology* [Internet]. Springer, New York, NY; 2012 [cité 3 mai 2018]. p. 17-38. Disponible sur: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-0965-6\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-0965-6_2)
60. Fukuda N, Ontko JA. Interactions between fatty acid synthesis, oxidation, and esterification in the production of triglyceride-rich lipoproteins by the liver. *J Lipid Res.* août 1984;25(8):831-42.
61. Mayes PA, Topping DL. Regulation of hepatic lipogenesis by plasma free fatty acids: simultaneous studies on lipoprotein secretion, cholesterol synthesis, ketogenesis and gluconeogenesis. *Biochem J.* avr 1974;140(1):111-4.
62. Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, et al. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res.* nov 1999;40(11):2059-66.
63. Reynisdottir S, Langin D, Carlström K, Holm C, Rössner S, Arner P. Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. *Clin Sci Lond Engl* 1979. oct 1995;89(4):421-9.

64. Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem.* 15 févr 2002;277(7):4806-15.
65. Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, et al. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 janv 2000;97(2):787-92.
66. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim K-H, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* 5 nov 2004;279(45):47066-75.
67. Zimmermann R, Haemmerle G, Wagner EM, Strauss JG, Kratky D, Zechner R. Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res.* nov 2003;44(11):2089-99.
68. Soni KG, Lehner R, Metalnikov P, O'Donnell P, Semache M, Gao W, et al. Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J Biol Chem.* 24 sept 2004;279(39):40683-9.
69. Dolinsky VW, Gilham D, Hatch GM, Agellon LB, Lehner R, Vance DE. Regulation of triacylglycerol hydrolase expression by dietary fatty acids and peroxisomal proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta.* 30 nov 2003;1635(1):20-8.
70. Wei E, Gao W, Lehner R. Attenuation of adipocyte triacylglycerol hydrolase activity decreases basal fatty acid efflux. *J Biol Chem.* 16 mars 2007;282(11):8027-35.
71. Baulande S, Lasnier F, Lucas M, Pairault J. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem.* 7 sept 2001;276(36):33336-44.
72. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem.* 19 nov 2004;279(47):48968-75.
73. Tornqvist H, Belfrage P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem.* 10 févr 1976;251(3):813-9.
74. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem.* 15 juin 1991;266(17):11341-6.
75. Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RGW. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 30 janv 2004;279(5):3787-92.

76. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Moos MC, Londos C, Kimmel AR. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 déc 1993;90(24):12035-9.
77. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavriloova O, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 mai 2001;98(11):6494-9.
78. Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*. 8 déc 2000;275(49):38486-93.
79. Miyoshi H, Souza SC, Zhang H-H, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 9 juin 2006;281(23):15837-44.
80. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res*. mai 1999;40(5):967-72.
81. Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*. mai 2004;53(5):1261-70.
82. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 5 nov 2004;279(45):46835-42.
83. Duan Y min, Yuan Z fang, Yao J, Zhang T ting, Chen C, Guo X hui. [Expression of aquaporin 7 in perirenal adipose tissue of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 18 févr 2011;43(1):117-22.
84. Syu LJ, Saltiel AR. Lipotransin: a novel docking protein for hormone-sensitive lipase. *Mol Cell*. juill 1999;4(1):109-15.
85. Gao JG, Simon M. Molecular screening for GS2 lipase regulators: inhibition of keratinocyte retinylester hydrolysis by TIP47. *J Invest Dermatol*. sept 2006;126(9):2087-95.
86. Arner P, Hellström L, Wahrenberg H, Brönnegård M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J Clin Invest*. nov 1990;86(5):1595-600.
87. Perea A, Clemente F, Martinell J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. Physiological effect of glucagon in human isolated adipocytes. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab*. août 1995;27(8):372-5.



88. Lafontan M, Berlan M, Carpenne C. Fat cell adrenoceptors: inter- and intraspecific differences and hormone regulation. *Int J Obes*. 1985;9 Suppl 1:117-27.
89. Walther TC, Farese RV. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*. juin 2009;1791(6):459-66.
90. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. juin 2004;89(6):2548-56.
91. Alvarez-Llamas G, Szalowska E, Vries MP de, Weening D, Landman K, Hoek A, et al. Characterization of the Human Visceral Adipose Tissue Secretome. *Mol Cell Proteomics*. 4 janv 2007;6(4):589-600.
92. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 22 oct 1998;395(6704):763-70.
93. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. nov 2002;26(11):1407-33.
94. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 10 nov 1995;270(45):26746-9.
95. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1 déc 1994;372(6505):425-32.
96. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*. 16 févr 1996;271(5251):994-6.
97. Bates SH, Kulkarni RN, Seifert M, Myers MG. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab*. mars 2005;1(3):169-78.
98. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AWK, Wang Y, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 20 févr 2003;421(6925):856-9.
99. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. mai 1995;95(5):2409-15.
100. Ventre J, Doebber T, Wu M, MacNaul K, Stevens K, Pasparakis M, et al. Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes*. sept 1997;46(9):1526-31.

101. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res.* juill 2001;9(7):414-7.
102. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* 1 août 1992;52(15):4113-6.
103. Bélanger C, Luu-The V, Dupont P, Tchernof A. Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* déc 2002;34(11-12):737-45.
104. Meseguer A, Puche C, Cabero A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* déc 2002;34(11-12):731-6.
105. Lee H-K, Lee JK, Cho B. The role of androgen in the adipose tissue of males. *World J Mens Health.* août 2013;31(2):136-40.
106. OMS | Surpoids et obésité: définitions [Internet]. WHO. [cité 15 avr 2017]. Disponible sur: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood\\_what/fr/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_what/fr/)
107. Singh RK, Kumar P, Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *C R Biol.* févr 2017;340(2):87-108.
108. Rydén M. On the origin of human adipocytes and the contribution of bone marrow-derived cells. *Adipocyte.* sept 2016;5(3):312-7.
109. Farnier C, Krief S, Blache M, Diot-Dupuy F, Mory G, Ferre P, et al. Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes.* oct 2003;27(10):1178-86.
110. Boucher J, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigné C, Buléon M, Carpéné C, et al. Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* déc 2005;37(12):761-7.
111. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* déc 2003;112(12):1796-808.
112. King CR, Spiotto MT, Kapp DS. Obesity and risk of biochemical failure for patients receiving salvage radiotherapy after prostatectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15 mars 2009;73(4):1017-22.

113. Strom SS, Kamat AM, Gruschkus SK, Gu Y, Wen S, Cheung MR, et al. Influence of obesity on biochemical and clinical failure after external-beam radiotherapy for localized prostate cancer. *Cancer*. 1 août 2006;107(3):631-9.
114. Geinitz H, Thamm R, Mueller T, Jess K, Zimmermann FB, Molls M, et al. Impact of body mass index on outcomes after conformal radiotherapy in patients with prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 sept 2011;81(1):16-22.
115. Zilli T, Nguyen TV, Bahary J-P, Chagnon M, Dufresne A, Taussky D. Prognostic impact of abdominal adiposity, waist circumference and body mass index in patients with intermediate-risk prostate cancer treated with radiotherapy. *Int J Obes* 2005. nov 2011;35(11):1421-6.
116. Shridhar R, Hayman T, Hoffe SE, Weber J, Almhanna K, Chuong M, et al. Body mass index and survival in esophageal adenocarcinoma treated with chemoradiotherapy followed by esophagectomy. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. juill 2012;16(7):1296-302.
117. Lerro CC, McGlynn KA, Cook MB. A systematic review and meta-analysis of the relationship between body size and testicular cancer. *Br J Cancer*. 26 oct 2010;103(9):1467-74.
118. Jiralerspong S, Kim ES, Dong W, Feng L, Hortobagyi GN, Giordano SH. Obesity, diabetes, and survival outcomes in a large cohort of early-stage breast cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. oct 2013;24(10):2506-14.
119. Parekh N, Chandran U, Bandera EV. Obesity in cancer survival. *Annu Rev Nutr*. 21 août 2012;32:311-42.
120. Ewertz M, Jensen M-B, Gunnarsdóttir KÁ, Højris I, Jakobsen EH, Nielsen D, et al. Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 janv 2011;29(1):25-31.
121. Crozier JA, Moreno-Aspitia A, Ballman KV, Dueck AC, Pockaj BA, Perez EA. Effect of body mass index on tumor characteristics and disease-free survival in patients from the HER2-positive adjuvant trastuzumab trial N9831. *Cancer*. 1 juill 2013;119(13):2447-54.
122. Simkens LHJ, Koopman M, Mol L, Veldhuis GJ, Ten Bokkel Huinink D, Muller EW, et al. Influence of body mass index on outcome in advanced colorectal cancer patients receiving chemotherapy with or without targeted therapy. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. nov 2011;47(17):2560-7.
123. Guiu B, Petit JM, Bonnetain F, Ladoire S, Guiu S, Cercueil J-P, et al. Visceral fat area is an independent predictive biomarker of outcome after first-line bevacizumab-based treatment in metastatic colorectal cancer. *Gut*. mars 2010;59(3):341-7.

124. Patel GS, Ullah S, Beeke C, Hakendorf P, Padbury R, Price TJ, et al. Association of BMI with overall survival in patients with mCRC who received chemotherapy versus EGFR and VEGF-targeted therapies. *Cancer Med.* oct 2015;4(10):1461-71.
125. Griggs JJ, Sabel MS. Obesity and cancer treatment: weighing the evidence. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 sept 2008;26(25):4060-2.
126. Behan JW, Yun JP, Proektor MP, Ehsanipour EA, Arutyunyan A, Moses AS, et al. Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res.* 1 oct 2009;69(19):7867-74.
127. Ehsanipour EA, Sheng X, Behan JW, Wang X, Butturini A, Avramis VI, et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res.* 15 mai 2013;73(10):2998-3006.
128. Malvi P, Chaube B, Singh SV, Mohammad N, Pandey V, Vijayakumar MV, et al. Weight control interventions improve therapeutic efficacy of dacarbazine in melanoma by reversing obesity-induced drug resistance. *Cancer Metab.* 2016;4:21.
129. De Angel RE, Blando JM, Hogan MG, Sandoval MA, Lansakara-P DSP, Dunlap SM, et al. Stearoyl gemcitabine nanoparticles overcome obesity-induced cancer cell resistance to gemcitabine in a mouse postmenopausal breast cancer model. *Cancer Biol Ther.* avr 2013;14(4):357-64.
130. Liu Z, Xu J, He J, Liu H, Lin P, Wan X, et al. Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget.* 27 oct 2015;6(33):34329.
131. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 30 oct 2011;17(11):1498-503.
132. Sheng X, Tucci J, Parmentier J-H, Ji L, Behan JW, Heisterkamp N, et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to daunorubicin via oxidative stress response. *Oncotarget.* 8 nov 2016;7(45):73147-59.
133. Yu W, Cao D-D, Li Q-B, Mei H-L, Hu Y, Guo T. Adipocytes secreted leptin is a pro-tumor factor for survival of multiple myeloma under chemotherapy. *Oncotarget.* 27 déc 2016;7(52):86075-86.
134. Bochet L, Meulle A, Imbert S, Salles B, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 juill 2011;411(1):102-6.
135. Au Yeung CL, Co N-N, Tsuruga T, Yeung T-L, Kwan S-Y, Leung CS, et al. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun.* 29 mars 2016;7:11150.

136. Polli JW, Humphreys JE, Harmon KA, Castellino S, O'Mara MJ, Olson KL, et al. The role of efflux and uptake transporters in [N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine (GW572016, lapatinib) disposition and drug interactions. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* avr 2008;36(4):695-701.
137. Behan JW, Avramis VI, Yun JP, Louie SG, Mittelman SD. Diet-induced obesity alters vincristine pharmacokinetics in blood and tissues of mice. *Pharmacol Res.* mai 2010;61(5):385-90.
138. Sheng X, Tucci J, Behan J, Mittelman SD. Abstract 172: Adipocytes decrease daunorubicin concentration in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* 1 oct 2014;74(19 Supplement):172-172.
139. Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest.* 15 déc 1999;104(12):1645-53.
140. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 6 août 1999;98(3):295-303.
141. Bartucci M, Svensson S, Ricci-Vitiani L, Dattilo R, Biffoni M, Signore M, et al. Obesity hormone leptin induces growth and interferes with the cytotoxic effects of 5-fluorouracil in colorectal tumor stem cells. *Endocr Relat Cancer.* sept 2010;17(3):823-33.
142. Wang Y-C, Morrison G, Gillihan R, Guo J, Ward RM, Fu X, et al. Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers--role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Res BCR.* 2011;13(6):R121.
143. Frayn KN, Khan K, Coppack SW, Elia M. Amino acid metabolism in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Clin Sci Lond Engl* 1979. mai 1991;80(5):471-4.
144. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* août 2009;21(4):575-81.
145. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 18 avr 2007;99(8):628-38.
146. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Yonemori K, et al. FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* juin 2011;22(6):1302-7.
147. Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung M-C, Esteva FJ. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 1 juin 2004;64(11):3981-6.

148. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. oct 2007;12(4):395-402.
149. Formisano L, Nappi L, Rosa R, Marciano R, D'Amato C, D'Amato V, et al. Epidermal growth factor-receptor activation modulates Src-dependent resistance to lapatinib in breast cancer models. *Breast Cancer Res BCR*. 5 mai 2014;16(3):R45.
150. Rexer BN, Ham A-JL, Rinehart C, Hill S, Granja-Ingram N de M, González-Angulo AM, et al. Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene*. 6 oct 2011;30(40):4163-74.
151. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 9 janv 1987;235(4785):177-82.
152. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 févr 2002;20(3):719-26.
153. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. sept 1999;17(9):2639-48.
154. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 20 oct 2005;353(16):1673-84.
155. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 28 déc 2006;355(26):2733-43.
156. Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res*. 1 sept 2009;69(17):6871-8.
157. Xia W, Bacus S, Hegde P, Husain I, Strum J, Liu L, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 16 mai 2006;103(20):7795-800.
158. Kim JW, Kim H-P, Im S-A, Kang S, Hur HS, Yoon Y-K, et al. The growth inhibitory effect of lapatinib, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase, in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett*. 18 déc 2008;272(2):296-306.

159. Diaz R, Nguewa PA, Parrondo R, Perez-Stable C, Manrique I, Redrado M, et al. Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC Cancer*. 11 mai 2010;10:188.
160. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells*. 26 juill 2014;6(3):256-65.
161. Serr J, Suh Y, Lee K. Regulation of adipose triglyceride lipase by fasting and refeeding in avian species. *Poult Sci*. 1 déc 2009;88(12):2585-91.
162. Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res*. 2005;54(2):133-40.
163. Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. mars 2001;86(3):1267-73.
164. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 1 avr 2011;71(7):2455-65.
165. Secretome analysis of rat adipose tissues shows location-specific roles for each depot type [Internet]. [cité 28 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911001011>
166. Zhang D, Pal A, Bornmann WG, Yamasaki F, Esteva FJ, Hortobagyi GN, et al. Activity of lapatinib is independent of EGFR expression level in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. juill 2008;7(7):1846-50.
167. Grabinski N, Ewald F. Ibrutinib (Imbruvica™) potently inhibits ErbB receptor phosphorylation and cell viability of ErbB2-positive breast cancer cells. *Invest New Drugs*. déc 2014;32(6):1096-104.
168. Gavine PR, Mooney L, Kilgour E, Thomas AP, Al-Kadhimi K, Beck S, et al. AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res*. 15 avr 2012;72(8):2045-56.
169. Benter IF, Sarkhou F, Al-Khaldi AT, Chandrasekhar B, Attur S, Dhaunsi GS, et al. The dual targeting of EGFR and ErbB2 with the inhibitor Lapatinib corrects high glucose-induced apoptosis and vascular dysfunction by opposing multiple diabetes-induced signaling changes. *J Drug Target*. 2015;23(6):506-18.
170. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. déc 2001;1(2):85-94.

171. Wainberg ZA, Anghel A, Desai AJ, Ayala R, Luo T, Safran B, et al. Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mars 2010;16(5):1509-19.
172. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res.* 1 févr 2006;66(3):1630-9.
173. Brady SW, Zhang J, Tsai M-H, Yu D. PI3K-independent mTOR activation promotes lapatinib resistance and IAP expression that can be effectively reversed by mTOR and Hsp90 inhibition. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(3):402-11.
174. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Colomer R, Brunet J, Menendez JA. Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb®) in human breast carcinoma cells. *Ann Oncol.* 1 juin 2008;19(6):1097-109.
175. Ablamunits V, Klebanov S, Giese SY, Herold KC. Functional human to mouse adipose tissue xenotransplantation. *J Endocrinol.* janv 2012;212(1):41-7.
176. JCI - Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice [Internet]. [cité 4 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/7901>
177. Zhu W, Nelson CM. Adipose and mammary epithelial tissue engineering. *Biomatter* [Internet]. 1 juill 2013 [cité 4 mai 2018];3(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749276/>
178. Laurent V, Guérard A, Mazerolles C, Le Gonidec S, Toulet A, Nieto L, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat Commun* [Internet]. 12 janv 2016 [cité 20 avr 2017];7. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4729927/>
179. La Merrill M, Emond C, Kim MJ, Antignac J-P, Le Bizec B, Clément K, et al. Toxicological Function of Adipose Tissue: Focus on Persistent Organic Pollutants. *Environ Health Perspect.* févr 2013;121(2):162-9.
180. Whiteside TL. Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert Rev Anticancer Ther.* 3 juin 2017;17(6):527-35.
181. Olesch C, Sha W, Angioni C, Sha LK, Açaçaf E, Patrignani P, et al. MPGES-1-derived PGE2 suppresses CD80 expression on tumor-associated phagocytes to inhibit anti-tumor immune responses in breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 30 avr 2015 [cité 4 mai 2018];6(12). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3581>
182. Majumder M, Xin X, Liu L, Girish GV, Lala PK. Prostaglandin E2 receptor EP4 as the common target on cancer cells and macrophages to abolish angiogenesis,



- lymphangiogenesis, metastasis, and stem-like cell functions. *Cancer Sci.* sept 2014;105(9):1142-51.
183. Ben-Batalla I, Cubas-Cordova M, Udonta F, Wroblewski M, Waizenegger JS, Janning M, et al. Cyclooxygenase-2 blockade can improve efficacy of VEGF-targeting drugs. *Oncotarget* [Internet]. 20 mars 2015 [cité 4 mai 2018];6(8). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3437>
184. Puig T, Aguilar H, Cufi S, Oliveras G, Turrado C, Ortega-Gutiérrez S, et al. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Res* [Internet]. déc 2011 [cité 4 mai 2018];13(6). Disponible sur: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3077>
185. Anti-obesity effect of sulfated glucosamine by AMPK signal pathway in 3T3-L1 adipocytes - ScienceDirect [Internet]. [cité 4 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691509002853>