

**ASPECTS NUTRITIONNELS DES ACIDES GRAS POLYINSATURES n-3 Augmentation sélective de la sensibilité des tumeurs à la chimiothérapie par les acides gras polyinsaturés n-3**

**Selective increase in the sensitivity of tumours to chemotherapy with n-3 polyunsaturated fatty acids**

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 7, Numéro 1, 60-3, Janvier - Février 2000, Dossier : actes des Journées Chevreul "Corps gras, nutrition et santé, questions d'actualité" (Bordeaux, Pessac)

**Auteur(s)** : Philippe BOUGNOUX, Loïc de PONCHEVILLE, Emmanuelle GERMAIN, Sophie COGNAULT, Jérôme MONTHARU, Lucie AUBOURG, Pierre BONNET, Véronique CHAJES, CORAD, Hôpital Bretonneau, 37044 Tours Cedex, France.

**Author(s)** : Philippe BOUGNOUX, Loïc de PONCHEVILLE, Emmanuelle GERMAIN, Sophie COGNAULT, Jérôme MONTHARU, Lucie AUBOURG, Pierre BONNET, Véronique CHAJES

**Résumé** : L'alimentation intervient à différents niveaux dans le déroulement de la maladie cancéreuse : au niveau du risque [1] et au niveau de l'évolution en modifiant le risque de survenue des métastases. L'alimentation influence-t-elle aussi la réponse aux traitements anticancéreux ? À l'appui de cette hypothèse viennent deux observations indirectes réalisées dans le cancer du sein : nos données [2, 3] ainsi que les observations épidémiologiques provenant d'autres travaux [4] ont apporté des arguments supportant l'hypothèse que les lipides alimentaires peuvent influencer la réponse des tumeurs mammaires aux traitements. On sait que la composition des lipides membranaires n'est pas génétiquement déterminée, mais qu'elle dépend des acides gras disponibles aux tissus périphériques. Le type d'acides gras disponibles est influencé par les apports alimentaires. Comme les tumeurs incorporent dans leurs lipides les acides gras disponibles de façon similaire aux autres tissus [5], il est plausible que les habitudes alimentaires (apports alimentaires en acides gras polyinsaturés, vitamines anti ou pro-oxydantes) puissent influencer leur chimiosensibilité en apportant aux cellules tumorales des substrats de peroxydation.

**Summary** : Since long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) are good substrate for peroxydation, a biochemical correlate of cancer cell programmed death and since some cytotoxic agents such as anthracyclins are known to induce oxidative stress, we looked for the effect of PUFA on the response of the cancer disease to anthracyclins-based chemotherapy. We found that breast cancer patients with elevated DHA content in white adipose tissues taken as an indicator of post dietary intake had a better response rate to anthracyclins-containing neoadjuvant chemotherapy than patients with low DHA level, suggesting that chemosensitivity of the carcinoma was higher when DHA availability to the tumor tissue was greater. Such a hypothesis was examined using human breast carcinoma cell cultures. Long chain PUFA and especially docosahexaenoic acid (22:6n-3) increased the sensitivity of breast cancer cell lines to anthracyclins. Using the rat model of NMU-induced mammary tumors, we documented an increased efficacy of anthracyclins on mammary tumors without change in cardiac toxicity in the dietary group supplemented with fish oil, enriched in n-3PUFAs, or with purified DHA.

This shows that this fatty acid also sensitizes the tumor in vivo. A clinical trial investigating the potential of dietary DHA to increase the response rate of measurable metastatic tumors in breast cancer patients will be conducted shortly.

**Keywords :** n-3 PUFA, docosahexaenoic acid, mammary tumors, chemosensitivity, breast cancer, anthracyclins.

ARTICLE

### **La réponse des carcinomes mammaires à la chimiothérapie néo-adjuvante est associée à un taux élevé d'acides gras polyinsaturés n-3 dans le tissu adipeux**

La pratique des chimiothérapies d'induction (néo-adjuvantes), comme premier traitement des cancers du sein de taille supérieure à 3 cm, a fourni l'opportunité d'examiner de façon simple la réponse de ces tumeurs (régression tumorale) à la chimiothérapie [6]. Nous avons confronté la composition en acide gras du tissu adipeux, prélevé avant le traitement, à la réponse de ces tumeurs à la chimiothérapie, dans une population de cancers du sein traités par ailleurs de façon conventionnelle. Le taux d'acide docosahexaénoïque (DHA) dans le tissu adipeux était plus élevé chez les patientes dont la tumeur était sensible à l'activité des chimiothérapies anticancéreuses que chez les patientes avec chimiorésistance [7]. Ainsi, la probabilité pour une tumeur mammaire de répondre à la chimiothérapie est 4,6 fois plus élevée lorsque le taux de DHA est au-dessus du taux médian dans le tissu adipeux. Le fait que l'acide gras ainsi individualisé soit le plus polyinsaturé (donc le plus peroxydable) des AGPI de la série n-3 suggère que la lipoperoxydation pourrait être un mécanisme moléculaire impliqué dans la réponse des cellules tumorales aux drogues cytotoxiques. De plus, il indique que les AGPI de la famille n-3 peuvent agir à différentes étapes dans l'histoire des cancers du sein, incluant les thérapeutiques.

### **Augmentation de l'activité antitumorale des anthracyclines par les AGPI en culture cellulaire**

Pour déterminer si les AGPI et leurs dérivés peroxydés étaient impliqués dans l'action des drogues cytotoxiques, nous avons mesuré dans une lignée établie à partir d'un cancer du sein (MDA-MB-231) la viabilité cellulaire et le taux de lipoperoxydes après action d'anthracyclines en présence de divers AGPI, d'anti-oxydants ou d'agents pro-oxydants. Les lipides membranaires ont été modifiés par la culture de ces cellules en présence d'acides gras polyinsaturés dans des conditions permettant leur incorporation sélective et leur métabolisme dans les membranes cellulaires [8]. Les conditions pro-oxydantes, destinées à inhiber les possibilités cellulaires de réduire les lipoperoxydes générés, ont été obtenues en utilisant le couple REDOX ascorbate-ménadione. Il a été observé [9] que le DHA augmentait l'activité cytotoxique de la doxorubicine, que les anti-oxydants supprimaient cet effet et que les pro-oxydants le renforçaient. La doxorubicine, à la concentration de  $10^{-7}$  mole, entraînait une toxicité cellulaire de 50 % ( $IC_{50}$ ). En présence de DHA et d'oxydants, la toxicité atteignait 90 %, et l' $IC_{50}$  passait à près de  $10^{-8}$  mole (*figure 1*).

Cet effet existait avec la doxorubicine, la mitomycine C, et aussi avec l'épirubicine. Il n'était pas retrouvé avec la mitoxantrone, une anthracènedione sélectionnée pour son faible potentiel à générer des lipoperoxydes. Enfin, la réponse cytotoxique à la doxorubicine était directement proportionnelle au taux de lipoperoxydes générés dans la cellule tumorale, lui-même fonction de la présence de DHA et d'oxydants [9].

L'action d'autres acides gras polyinsaturés a été examinée dans des conditions similaires. Comme cela est attendu de leur potentiel à former des lipoperoxydes, le degré d'activité des acides gras polyinsaturés, en termes de sensibilisation des cellules tumorales, est proportionnel au nombre de doubles liaisons [9].

Ainsi, en présence d'agents oxydants, parmi tous les AGPI, le DHA est l'acide gras le plus efficace pour sensibiliser les cellules MDA-MB-231 à l'action de la doxorubicine. Ces données indiquent que les AGPI n-3 et les pro-oxydants se comportent dans la cellule tumorale comme des effecteurs supplémentaires de l'action des drogues qui induisent un stress oxydant, et confèrent à ces drogues une activité additionnelle, indépendante de leur mécanisme d'action spécifique (inhibition de topoisomérases, intercalation, etc.). Elles suggèrent qu'il est possible de manipuler par les acides gras et les pro-oxydants la sensibilité intrinsèque des cellules tumorales à la chimiothérapie comportant des drogues induisant un stress oxydant.

### **Évaluation des effets d'une intervention nutritionnelle sur la chimiosensibilité de tumeurs mammaires chez le rat**

Il était nécessaire de déterminer si ces observations réalisées *in vitro* (sensibilisation de cellules de cancer du sein en culture à la doxorubicine par des acides gras polyinsaturés en présence d'oxydants) s'appliquent *in vivo*. En effet, les cellules tumorales ne sont pas des tumeurs. L'expérimentation animale suggère que le phénomène observé *in vitro* existe également *in vivo*. Il a été rapporté, à partir d'un modèle utilisant une lignée de cellules de cancer du sein (MDA-MB-231) greffées chez la souris athymique, que l'activité antitumorale de la mitomycine C, une drogue qui génère un stress oxydant, était augmentée par l'apport dans la ration d'huiles marines, riches en acides gras polyinsaturés de la série n-3 [10].

Pour savoir si les acides gras polyinsaturés et les oxydants apportés par voie orale modifiaient la chimiosensibilité des tumeurs *in vivo*, nous avons utilisé le système de tumeurs mammaires autochtones induites chez le rat par le N-méthyl nitroso-urée (NMU). En effet, ce système expérimental apparaît comme l'un des meilleurs pour modéliser le cancer du sein : le NMU induit des altérations génétiques aléatoires, et les tumeurs mammaires qui apparaissent possèdent une architecture tumorale complète avec un stroma, une vascularisation et une infiltration de la tumeur par les cellules de l'hôte. Enfin, les animaux conservent un système immunitaire intact. De plus, parmi les rongeurs, cet animal est plus adapté que la souris aux études d'intervention nutritionnelles. Les acides gras polyinsaturés ont été apportés dans la ration sous la forme de 15 % d'huile de sardine, qui comporte 30 % d'AGPI, pour moitié EPA et pour moitié DHA. Le couple REDOX oxydants (naphtoquinone-déhydroascorbate) a été apporté dans l'eau de boisson. Dans le groupe anti-oxydants, l'alpha-tocophérol a été apporté par voie orale. L'épirubicine a été choisie à la place de la doxorubicine, car cette drogue est utilisée en clinique humaine, en Europe, en raison de sa toxicité cardiaque moindre que celle de la doxorubicine. Elle a été administrée en i.p. une fois par semaine dès que la première tumeur atteignait 1,5 cm de diamètre. Trois groupes de 12 rats ont été individualisés pour déterminer l'effet des conditions oxydantes. Dans le groupe de rats recevant PUFA + anti-oxydants, la croissance des tumeurs a été peu affectée par l'épirubicine. Au contraire, elle a été totalement inhibée dans le groupe recevant les PUFA et des pro-oxydants [11] (*figure 2*).

Cette expérience a été répétée deux fois avec des résultats similaires en utilisant deux huiles marines différentes, puis a été réalisée avec du DHA purifié [12, 13]. Ainsi, l'apport alimentaire de DHA a

sensibilisé les tumeurs mammaires à l'action de l'épirubicine. Cet effet a été augmenté par l'apport par voie orale d'ascorbate oxydé par la ménadione (groupe pro-oxydants). L'alpha-tocophérol (groupe anti-oxydants) a supprimé cet effet, les tumeurs continuant leur croissance. En conclusion, une tumeur spontanément peu chimiosensible peut répondre à l'épirubicine dans des conditions d'oxydo-réduction appropriées, sous réserve d'un apport alimentaire en acides gras polyinsaturés.

### **Absence de majoration de la toxicité cardiaque des anthracyclines**

La toxicité la plus redoutée des anthracyclines est l'atteinte cardiaque. Le mécanisme impliqué est mal compris. On évoque le rôle des espèces oxygénées réactives dans la toxicité cardiaque de ces drogues. Il est donc important ici d'évaluer la fonction cardiaque avec précision pour s'assurer qu'on n'augmente pas au niveau du cœur les conséquences du stress oxydant comme on le fait au niveau de la tumeur. Pour ce faire, nous avons évalué la fonction cardiaque dans les trois groupes de rats précédemment décrits, par mesure de la pression télédiastolique dans le ventricule gauche après cathétérisme rétrograde par l'artère carotide droite (*figure 3*). Aucune différence de toxicité cardiaque n'a été mise en évidence entre les groupes de rats au cours de deux expériences successives, indépendantes, utilisant deux types différents d'huiles marines [11, 14], puis l'apport de DHA purifié [15].

En conclusion, il est possible chez le rat de manipuler la sensibilité intrinsèque de tumeurs mammaires à l'épirubicine par les acides gras polyinsaturés et les pro-oxydants alimentaires sans augmenter la toxicité cardiaque de l'épirubicine.

### **Perspectives : intervention nutritionnelle dans le cancer du sein**

Les sources alimentaires sont les huiles marines, riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série n-3. Ces huiles comportent en général 30 % d'AGPI n-3, essentiellement les acides éicosapentaénoïques (EPA) et le DHA. La biologie de ces AGPI diffère, et les données expérimentales suggèrent que le DHA pourrait être le plus efficace. La seule source de DHA purifiée (sans EPA) disponible est le DHASCO (Martek Biosciences Co, Columbia, MD, États-Unis). Il s'agit d'un composé d'origine végétale [16], purifié à partir de micro-algues, ces organismes unicellulaires qui sont la source originale de DHA pour les poissons.

Les conditions paraissent réunies pour transposer au cancer du sein métastaté le concept présenté. Les données précliniques présentées indiquent que l'activité des drogues cytotoxiques qui génèrent un stress oxydant (comme l'épirubicine et le cyclophosphamide, deux composants du « FEC », la chimiothérapie de référence du cancer du sein métastatique) peut être augmentée par les acides gras polyinsaturés qui fournissent à la cellule des substrats de peroxydation, et par le couple REDOX ascorbate-quinone qui inhibe les possibilités cellulaires de réduire les peroxydes formés. Les données précliniques indiquent aussi que ces composants peuvent être apportés par voie orale. On pense donc pouvoir ainsi augmenter la sensibilité des localisations tumorales à la chimiothérapie FEC-75.

L'objectif principal est de déterminer le taux de réponse objective chez les patientes ayant un cancer du sein métastatique traité par FEC-75 en première ligne, recevant une supplémentation orale d'acides gras polyinsaturés et des agents oxydants. L'objectif secondaire est de déterminer le profil de toxicité de l'association et de disposer de données sur la distribution des acides gras polyinsaturés

et la formation de lipoperoxydes dans les lipides sériques et membranaires au cours du traitement. Dans le cadre d'un essai ouvert de phase II avec bénéfice individuel direct, on prévoit d'inclure 25 patientes au maximum.

Si les résultats indiquent que les apports nutritionnels de DHA et d'oxydants rendent le cancer du sein métastatique plus sensible aux chimiothérapies existantes, cette étude permettra une planification optimale d'un essai de phase III. Ce type d'approche, visant à augmenter la sensibilité intrinsèque de tumeurs, est susceptible de retombées rapides dans les stratégies thérapeutiques en cancérologie.

## CONCLUSION

Les AGPI à longue chaîne paraissent susceptibles d'augmenter la toxicité de certaines drogues anticancéreuses vis-à-vis des tissus tumoraux et non vis-à-vis de tissus non tumoraux. Ils se comportent comme des substrats de lipoperoxydation, intermédiaires métaboliques potentiellement utiles, en augmentant l'action de certains agents anticancéreux qui induisent un stress oxydant. La sélectivité de cet effet semble être causée par la perte de l'efficacité de plusieurs mécanismes de défense anti-oxydants au cours de la transformation maligne. La reconnaissance et l'utilisation de différences entre tissus normaux et transformés a toujours mené à des avancées en cancérologie, et il est logique d'attendre des propriétés métaboliques des lipides des applications thérapeutiques nouvelles [17].

## Remerciements

Nous remercions C. Couet, qui a apporté les compétences de nutrition humaine et J. Goré celles de physiologie cellulaire. G. Durand a fourni les huiles utilisées chez le rat, et Martek Inc. a fourni le DHA purifié. Les travaux cliniques ont été possibles grâce à O. Le Floch, J. Lansac, G. Body. F. Fetissof, T. Lefrancq et M.C. Grangeponne ont réalisé les études anatomo-pathologiques. Les supports financiers proviennent en partie de l'INSERM (CRE # 930301), de l'Agence régionale d'hospitalisation de la région Centre (V. Chajès) et des comités départementaux de la Ligue nationale contre le cancer (comités du Cher, de la Charente, du Loir-et-Cher et de l'Indre-et-Loire), ainsi que d'un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC 97). Enfin, nous souhaitons associer à l'ensemble de ces travaux notre collègue Claude Lhuillery.

## REFERENCES

1. BOUGNOUX P, CORPET D, GERBER M (1996). Acides gras alimentaires et cancérogenèse. In : RIBOLI E, DECLOITRE F, COLLET-RIBBING C, eds. *Alimentation et cancer, évaluation des données scientifiques*. Paris : Lavoisier Tec & Doc : 281-302.
2. BOUGNOUX P, LHUILLERY C (1995). Acides gras polyinsaturés et cancérogenèse mammaire. In : *Nutrition et cancer*. CERIN Symposium (ISBN-2-9500982), Paris : 119-32.

3. BOUGNOUX P, KOSCIELNY S, CHAJÈS V, DESCAMPS P, COUET C, CALAIS C (1994). Alpha-linolenic acid content of adipose tissue : a host determinant of the risk of early metastasis in breast cancer patients. *Br J Cancer*, 70 : 330-4.
4. HOLM LE, NORDEVANG E, HJALMAR ML, LIDBRINK E, CALLMER E, NILSSON B (1993). Treatment failure and dietary habits in women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85 : 32-6.
5. CHAJES V, LANSON M, FETISSOF F, LHUILLERY C, BOUGNOUX P (1995). Membrane fatty acids of breast carcinoma : contribution of host fatty acids and tumor properties. *Int J Cancer*, 63 : 169-75.
6. CALAIS G, BERGER C, DESCAMPS P, CHAPET S, REYNAUD-BOUGNOUX A, BODY G, BOUGNOUX P, LANSAC J, LE FLOCH O (1994). Conservative treatment feasibility with induction chemotherapy, surgery, and radiotherapy for patients with breast carcinoma larger than 3 cm. *Cancer*, 74 : 1283-8.
7. BOUGNOUX P, GERMAIN E, CHAJÈS V, HUBERT B, LHUILLERY C, BODY G, CALAIS G (1999). Cytotoxic drug efficacy and docosahexaenoic acid level in adipose tissue of patients with locally advanced breast carcinoma. *Br J Cancer*, 79 : 1765-9.
8. GORÉ J, BESSON P, HOINARD C, BOUGNOUX P (1994). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity in relation to membrane fatty acid composition and cell proliferation. *Am J Physiol*, 266 : C110-20.
9. GERMAIN E, CHAJES V, COGNAULT S, LHUILLERY C, BOUGNOUX P (1998). Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231 : relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer*, 75 : 578-83.
10. SHAO Y, PARDINI L, PARDINI RS (1995). Dietary menhaden oil enhances mitomycin C antitumor activity toward human mammary carcinoma MX-1. *Lipids*, 30 : 1035-45.
11. GERMAIN E, BONNET P, LAVANDIER F, LHUILLERY C, BOUGNOUX P (1998). Increased efficacy of epirubicin on NMU-induced mammary tumor in rats by dietary n-3 PUFA and oxidants without change in cardiac toxicity. *Proc Am Ass Cancer Res*, 39 : Abstr. 2125.
12. MABILLE DE PONCHEVILLE L, GERMAIN E, MONTHARU J, CHAJES V, BOUGNOUX P (2000). Increased sensitivity of NMU-induced mammary tumor to anthracyclins by dietary DHA in rats. *Proc Am Ass Cancer Res*, 41 : Abstr. 1270.
13. PONCHEVILLE (DE) L (1999). *Augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires aux anthracyclines par l'acide docosahexaénoïque en intervention nutritionnelle chez le rat*. Mémoire de DEA, Muséum national d'histoire naturelle, Paris.
14. BOUGNOUX P, GERMAIN E, LAVANDIER F, CHAJÈS V, LHUILLERY C, BONNET P (1998). Sensitization of NMU-induced mammary tumors to epirubicin by dietary n-3 PUFA and oxidants without increase in cardiac toxicity in rats. *Symposium on new drugs in cancer therapy*, NCI-EORTC, Amsterdam, June 16-19.
15. AUBOURG L (1999). *Effet des acides gras polyinsaturés n-3 et des oxydants sur la toxicité cardiaque de l'épirubicine : étude expérimentale chez le rat*. Mémoire de DEA, Biomembranes, Université de Tours.

16. BOSWELL K, KOSKELO EK, CARL L, GLAZA S, HENSEN DJ, WILLIAM KD, KYLE DJ (1996). Preclinical evaluation of single-cell oils that are highly enriched with arachidonic and docosahexaenoic acid. *Food Chem Toxicol*, 34 : 585-93.
17. BOUGNOUX P (1999). n-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2 : 121-6.

#### Illustrations

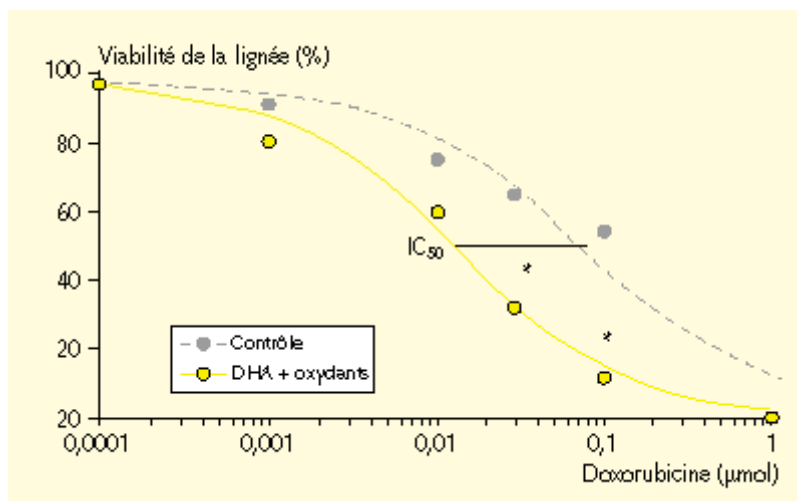


Figure 1. Courbe dose/effet de la doxorubicine sur la viabilité de la lignée MDA-MB-231. L'apport d'acides gras polyinsaturés (DHA, 10 µg/ml) et d'agents oxydants (ascorbate-naphtoquinone) au milieu de culture pendant 5 jours a sensibilisé les cellules tumorales ( $IC_{50}$  à  $10^{-7}$  mole : contrôle ; près de  $10^{-8}$  mole : DHA + oxydants) à l'action de la doxorubicine [9].

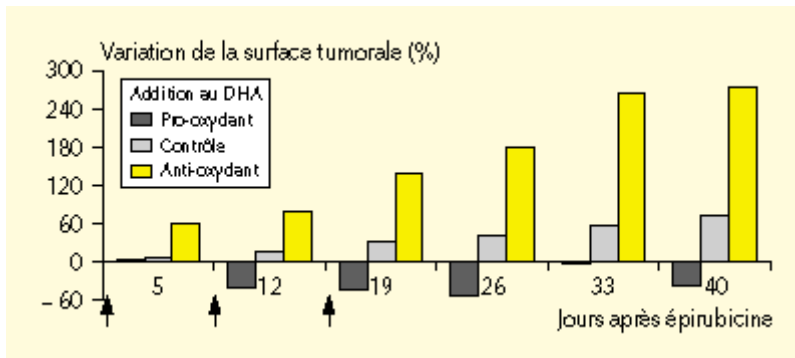


Figure 2. Action de l'épirubicine sur la croissance de la tumeur mammaire cible en fonction de l'apport d'agents oxydants ou anti-oxydants chez des rats recevant un régime enrichi en acides gras polyinsaturés n-3. Trente-six rats Sprague-Dawley ont reçu une injection de NMU en sous-cutané à l'âge de 48 jours et un régime riche en acides gras polyinsaturés n-3. Les tumeurs ont commencé à apparaître entre 6 et 8 semaines plus tard. Les flèches correspondent aux injections d'épirubicine.

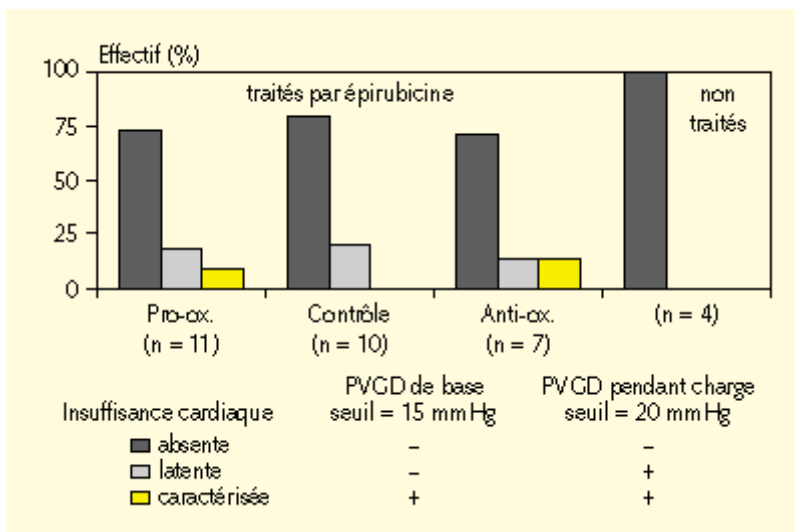


Figure 3. Toxicité cardiaque de l'épirubicine en fonction de l'apport d'agents oxydants ou anti-oxydants chez des rats recevant un régime enrichi en acides gras polyinsaturés n-3. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la figure 2. La pression ventriculaire gauche diastolique (PVGD) a été mesurée dans des conditions basales et après surcharge volémique par injection dans la veine jugulaire de 12 ml de sérum salé (pendant charge). L'insuffisance cardiaque a été définie dans les différentes situations en fonction du seuil indiqué.