

Université de Bourgogne

UFR Sciences Vie, Terre et Environnement / Inserm U866

Thèse

En vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de la Vie

par

Anne-Sophie PIERRE

Soutenue publiquement le 21 Décembre 2012

Le métabolisme des acides gras monoinsaturés et la
prolifération des cellules cancéreuses coliques :

Rôle de la Stéaroyl-CoA Désaturase-1 et Effets des
isomères conjugués de l'acide linoléique

Pr. Stéphane CHEVALIER (Université François-Rabelais -INSERM U1069, Tours)	Rapporteur
Dr. Véronique CHAJES (International Agency for Research on Cancer, Lyon)	Rapporteur
Pr. François GHIRINGHELLI (Université de Bourgogne- INSERM U866, Dijon)	Examineur
Pr. Jean-Michel CHARDIGNY (Unité de Nutrition Humaine-INRA, Clermont –Ferrand-Theix)	Président du Jury
Pr. Michel NARCE (Université de Bourgogne-INSERM U866, Dijon)	Directeur de thèse
Dr. Mickaël RIALLAND (Université de Bourgogne-INSERM U866, Dijon)	Co-encadrant de thèse

A mon Papa,

Remerciements

A l'heure où j'écris ces remerciements, ma thèse a été soutenue et c'est une nouvelle page qui se tourne.

Je tiens à remercier les différents membres de mon jury de thèse d'avoir porté un regard attentif et un œil critique sur ce travail, au Professeur Stéphan Chevalier et au Docteur Véronique Chajès de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mes travaux, aux Professeurs Jean-Michel Chardigny et François Ghiringhelli pour les conseils avisés dont ils m'ont fait part.

Je remercie le Professeur Michel Narce de m'avoir accueillie au sein de son équipe bien avant la thèse et de m'avoir fait confiance pour ces trois années décisives. La thèse n'est pas long fleuve tranquille, patience et persévérance est le meilleur moyen de rester à flot.

Merci au Docteur Mickaël Rialland, pour m'avoir inculqué le sens du travail et l'envie de se dépasser.

Merci à Mélaine, même si nous ne sommes pas les meilleures amies, ça a été un travail d'équipe et je te remercie de m'avoir montrée la voie !

Merci à toute l'équipe de recherche, tout particulièrement Joseph Gresti, « le soleil de Dijon ! », Sandrine Bellenger pour ses oreilles attentives, mais aussi à l'équipe pédagogique, l'enseignement a été pour moi le moment de prendre du recul et de transmettre un peu de ma passion.

Merci à Cécile pour son soutien dans des moments quelque peu difficiles. Un grand Merci à Célia et Aurélie pour leur bonne humeur ! Dans trois ans se sera à vous d'être l'encyclopédie du labo ! Célia, pas d'inquiétude tu seras la reine des « western » à ton tour ! Aurélie, toi aussi tu parleras à tes cellules (tubes, cytomètres et autres) et tu auras des résultats d'enfer !

La thèse est une course de fond et un sprint à la fois, moi qui ne suis pas très sportive je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel. A ma Maman et mon Papa pour tout leur amour. Où que tu sois Papa, j'espère que tu es fière de moi. Merci à mes Mamies et Papi.

Un grand Merci à tous ceux qui y sont passés avant moi, Mathieu, Nico, Romain (pas de jaloux c'est par ordre de soutenance !) et ceux qui étaient là pour « nous » soutenir, Sébastien, Evi, Jennifer (quand nous n'étions pas toujours au top ou quand nous parlions chinois chacun dans son domaine...). Enfin, merci à mon compagnon, je l'ai rencontré juste avant le bac, nous avons pris des chemins parallèles pas toujours tout tracés, chacun dans nos domaines... aujourd'hui nous voilà Docteurs... Merci d'avoir été là dans les moments difficiles.

Résumé

Le métabolisme de la cellule cancéreuse s'adapte aux besoins en macromolécules de cette cellule en prolifération et en réponse aux signaux du microenvironnement tumoral. Ainsi, la biosynthèse des acides gras monoinsaturés (AGMI), est augmentée dans les cellules cancéreuses coliques et associée à une augmentation de l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase (SCD), enzyme limitante de cette synthèse. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) comme les isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA), c9,t11-CLA et t10,c12-CLA possèdent à la fois un effet inhibiteur sur l'activité SCD et un effet anti-tumoral dont les mécanismes moléculaires restent à préciser. Dans ce contexte, les objectifs de ce travail furent d'évaluer le rôle de SCD-1 dans la survie de la cellule cancéreuse colique (CCC) et les mécanismes de régulation sous-jacents mais également d'apporter des éléments nouveaux sur les régulations à l'origine de l'effet anti-prolifératif des CLA.

Nous avons tout d'abord montré que l'extinction de l'expression de *SCD-1* conduit à l'apoptose des CCC dépendante de CHOP. En revanche l'extinction de *SCD-1* n'affecte en rien les cellules non cancéreuses.

Par ailleurs, nous avons étudié les effets sur la viabilité des CCC de deux isomères de l'acide linoléique le c9,t11-CLA et le t10,c12-CLA *in vitro*. Nos résultats montrent que seul le t10,c12-CLA induit une mort cellulaire par apoptose des CCC sans affecter la survie de cellules coliques non transformées. Il apparait aussi être le seul isomère à réduire la biosynthèse des AGMI dans les CCC. La mort induite par le t10,c12-CLA dans les CCC est dépendante de l'activation d'un stress du RE via la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Nos travaux apportent des éléments nouveaux dans la compréhension du rôle de SCD-1 dans la survie des cellules cancéreuses coliques et les mécanismes d'action du t10,c12-CLA. Notre étude soutient l'hypothèse de faire de la biosynthèse des AGMI une cible thérapeutique possible dans le traitement des cancers colorectaux.

Mots clés : Synthèse des acides gras monoinsaturés (AGMI), stéaroyl-CoA désaturase-1 (SCD-1), acide conjugué de l'acide linoléique (CLA), Stress du réticulum endoplasmique (RE), espèces réactives de l'oxygène (ROS), cellules cancéreuses coliques.

Abstract

Cancer cells adapt their metabolism in response to signals from the microenvironment and proliferation. Thus, MonoUnsaturated Fatty Acid (MUFA) synthesis is increased in colon cancer cells, and associated with increased Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) activity, the rate limiting enzyme of MUFA biosynthesis. Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA), as isomers of conjugated linoleic acid (CLA), exert inhibitor activity on SCD-1 and have anti-cancer properties, but their mechanisms are not yet clear. In this context, the aim of this work was first to evaluate the role of SCD-1 in the proliferation of colon cancer cells (CCC) and to define the underlying mechanisms. In a second time, we provide new information about regulation of the anti-proliferative effect of CLA.

In a first time we showed that extinction of *SCD-1* induces CCC apoptosis through CHOP expression. In contrast, the extinction of *SCD-1* has no effect on viability of non cancerous cells.

In addition, we studied effects of two isomers of CLA, c9,t11-CLA and t10,c12-CLA, on CCC viability *in vitro*. We showed that only t10,c12-CLA induces apoptotic CCC death without affecting survival of untransformed colon cells. t10,c12-CLA seems to be also the only to repress MUFA synthesis. It is also shown that cell death induced by t10,c12-CLA is ER stress dependent through reactive oxygen species generation.

This work provides new information about SCD-1 role in colon cancer cells survival and mechanism of t10,c12-CLA. This study supports the hypothesis to consider MUFA biosynthesis as a potential therapeutic target in colorectal cancer treatment.

Table des Matières

Table des Matières	1
Tables des figures et des tableaux	6
Abréviations	9
Introduction	12
1. Le cancer colorectal.....	13
1.1 Définition du cancer	13
1.2 Le cancer colorectal en quelques chiffres.....	13
1.3 Anatomicopathologie du cancer colorectal	14
1.4 Les facteurs de risque	15
1.5 La cancérogenèse colorectale.....	16
1.5.1 L'instabilité chromosomique.....	17
1.5.2 L'instabilité génétique.....	17
1.5.3 L'hyperméthylation de l'ADN.....	18
1.5.4 Le rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse colorectale	19
1.5.5 Principales voies de signalisation impliquées dans le cancer colorectal	20
1.5.5.1 La voie de signalisation Wnt ou voie APC/ β -caténine	20
1.5.5.2 La voie de TGF β	22
1.5.5.3 La voie de p53.....	23
1.5.5.4 La voie de l'EGF	24
1.5.5.5 La voie RAS/RAF/MAPK	24
1.5.5.6 La voie PI3K/Akt	26
2. La biosynthèse des acides gras insaturés	27
2.1 La synthèse des acides gras monoinsaturés.....	27
2.1.1 Les AGS, précurseurs des AGMI.....	27
2.1.2 La synthèse des AGMI	29
2.2 La synthèse des acides gras polyinsaturés.....	29
3. Altération du métabolisme des lipides et cancer	33
3.1 Les voies de signalisation, prolifération, et lipogenèse dans la cellule cancéreuse	33
3.1.1 Rôle de BRCA1.....	33
3.1.2 Rôle des voies des facteurs de croissance.....	33
3.2 Altération de la composition lipidique dans les cancers.....	35
3.3 Altération de l'expression des enzymes de la lipogenèse dans le cancer.....	37
4. La Stéaroyl-CoA Désaturase	39

4.1	Généralités.....	39
4.1.1	La stéaroyl-CoA désaturase: enzyme du métabolisme des AGMI.....	39
4.1.2	Isoformes de la Stéaroyl-CoA Désaturase	40
4.1.3	Structure de la Stéaroyl-CoA Désaturase.....	41
4.2	Régulation de la Stéaroyl-CoA Désaturase-1.....	42
4.2.1	Régulation transcriptionnelle de l'expression de SCD-1	42
4.2.1.1	Régulation de SCD-1 par SREBP	44
4.2.1.2	Régulation de SCD-1 par LXR	44
4.2.1.3	Régulation de SCD-1 par les PPARs.....	45
4.2.1.4	Régulation de SCD-1 par les récepteurs aux œstrogènes.....	46
4.2.1.5	Régulation de SCD-1 par les facteurs de croissance.....	46
4.2.1.6	Régulation de SCD-1 par les AGPI	46
4.2.2	Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de SCD-1	47
4.2.3	Régulation post-traductionnelle de SCD-1.....	47
4.2.4	Régulation allostérique de SCD-1.....	48
4.3	Régulation du métabolisme des lipides par SCD-1	49
4.4	Contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération par SCD-1	51
4.5	Potentiel thérapeutique de SCD-1 et des enzymes de la synthèse des AGS	53
4.5.1	Cas des enzymes de la synthèse des AGS : ACC et FAS	53
4.5.2	Une cible thérapeutique potentielle de certains cancers : SCD	55
5.	Modulation de la prolifération cellulaire par les AG	57
5.1	Effets des AGS et des AGMI en C16 et C18	57
5.2	Effets des AGPI et des acides conjugués de l'acide linoléique (CLA) sur la cancérogenèse.....	59
5.2.1	Structure des CLA.....	60
5.2.2	Origine des CLA	60
5.2.3	Potentiels thérapeutiques des CLA.....	61
5.2.3.1	Propriétés anti-cancérigènes des CLA.....	62
5.2.3.2	Autres propriétés thérapeutiques	63
5.2.3.3	Les CLA et la régulation de SCD	64
6.	Le stress du réticulum endoplasmique : origine et conséquences.....	65
6.1	La voie du stress du réticulum.....	65
6.1.1	Les perturbateurs de l'homéostasie du RE.....	66
6.1.2	La signalisation du stress du RE	66
6.1.2.1	La voie IRE1 : un épissage des ARNm d'XBP1 sélectif.....	67
6.1.2.2	La voie PERK : La modulation de la traduction	69
6.1.2.3	La voie ATF6	70
6.2	Conséquences du stress du RE : après la survie, la mort des cellules	70
6.2.1	CHOP, l'effecteur de la mort dans le stress du RE	72

6.2.2	<i>Mort cellulaire induite par IRE1 dans le stress du RE</i>	72
6.2.3	<i>Mort cellulaire induite par BCL2 dans le stress du RE</i>	73
6.2.4	<i>Les caspases : enzymes effectrices de la mort dépendante du stress du RE</i>	74
6.3	Origine du stress du réticulum : les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	75
6.3.1	<i>Production des espèces réactives de l'oxygène</i>	76
6.3.2	<i>Régulation de la machinerie anti-oxydante</i>	77
6.3.2.1	Les superoxydes dismutases.....	78
6.3.2.2	La catalase	78
6.3.2.3	La glutathion peroxydase	79
6.3.2.4	Rôle de XBP1.....	79
6.3.3	<i>Les ROS inducteurs du stress du RE</i>	80
	But de ce travail	82
	Résultats et discussion	84
1.	L'inhibition de SCD-1 induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses coliques : implication de CHOP	85
1.1	Résultats	85
1.1.1	<i>Inhibition de l'expression de SCD-1 et suppression de la synthèse de novo des AGMI</i>	85
1.1.2	<i>L'extinction de SCD-1 induit l'apoptose des cellules cancéreuses</i>	88
1.1.3	<i>Induction partielle du stress du réticulum endoplasmique par l'inhibition de l'expression de SCD-1</i>	91
1.1.4	<i>Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par l'extinction de SCD-1</i> ...	94
1.1.5	<i>Effets ciblés de l'extinction de SCD-1 aux cellules cancéreuses</i>	97
1.2	Discussion	98
2.	Effets des CLA sur la survie des cellules cancéreuses coliques: induction des ROS et activation du stress du réticulum endoplasmique	104
2.1	Résultats	104
2.1.1	<i>Incorporation des CLA dans les cellules cancéreuses</i>	104
2.1.2	<i>Induction sélective de la mort par le t10,c12-CLA</i>	105
2.1.3	<i>Le t10,c12-CLA induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses coliques</i>	108
2.1.4	<i>t10,c12-CLA inhibe la synthèse de novo des AGMI dans les cellules cancéreuses coliques</i>	109
2.1.5	<i>Induction du stress du réticulum endoplasmique par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques</i>	110
2.1.6	<i>Rôle de JNK dans la mort induite par le t10,c12-CLA</i>	113
2.1.7	<i>Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par le t10,c12-CLA</i>	115

2.1.8	<i>Les ROS induits par le t10,c12-CLA participent à l'induction de CHOP au cours du stress du réticulum endoplasmique</i>	118
2.2	Discussion	119
	Conclusion et Perspectives	124
	Matériels et Méthodes	129
1.	Culture cellulaire et traitements	130
1.1	Lignées cellulaires utilisées	130
1.2	Conditions de culture et traitements	131
1.2.1	<i>Entretien des lignées</i>	131
1.2.2	<i>Transfections par les ARN interférents</i>	131
1.2.3	<i>Transfection de plasmides</i>	132
1.2.4	<i>Traitement avec les inhibiteurs de SCD-1</i>	132
1.2.5	<i>Traitement par les acides gras</i>	132
1.2.5.1	Préparation des solutions d'AG	132
1.2.5.2	Vérification de la concentration des solutions d'AG	133
1.2.5.3	Préparation des cellules et traitement	134
1.2.6	<i>Traitement avec un inhibiteur des ROS : N-acétyl-L-cystéine et α-tocophérol</i>	134
1.2.7	<i>Traitement avec un inhibiteur de JNK : SP600125</i>	135
1.2.8	<i>Traitement avec la Thapsigargine : contrôle positif du stress du RE</i>	135
1.2.9	<i>Traitement avec l'étoposide : contrôle positif de l'apoptose</i>	135
2.	Mesure de la prolifération cellulaire et viabilité	135
2.1	Analyse de la prolifération cellulaire	135
2.2	Analyse de la viabilité	136
3.	Mort cellulaire et mort par apoptose	136
3.1	Evaluation de la mort cellulaire	136
3.2	Evaluation de la mort par apoptose	137
3.2.1	<i>Marquage Annexin V</i>	137
3.2.2	<i>Marquage au Hoechst</i>	137
3.2.3	<i>Marquage caspase-3</i>	137
4.	Extraction d'ARN et RT-PCR	138
4.1	Extraction des ARN totaux	138
4.2	Contrôle de l'intégrité des ARN	138
4.3	Transcription inverse	138
4.4	La PCR semi-quantitative	139
4.5	La PCR en temps réel	140

5. Western Blotting	141
5.1 Extraction des protéines	141
5.1.1 <i>Extraction des protéines totales</i>	142
5.1.2 <i>Extraction des protéines nucléaires</i>	142
5.2 Migration et transfert	143
5.3 Incubation des anticorps et révélation	143
6. Evaluation de l'activité SCD-1	144
7. Evaluation du niveau de ROS intracellulaires	145
8. Statistiques	145
Bibliographie	146
Publications et communications	185

Tables des figures et des tableaux

Figure 1 : Estimation de l'incidence (standardisée par l'âge) et de la mortalité pour le cancer colorectal dans le monde.	13
Figure 2 : La voie de signalisation Wnt, impliquant le couple APC/ β -caténine.	21
Figure 3 : La voie de TGF β et ses altérations dans les cancers colorectaux.....	23
Figure 4 : Implication des voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/Akt dans le cancer colorectal.	25
Figure 5 : Implication d'ACC et FAS dans la biosynthèse des acides gras saturés.....	28
Figure 6 : Biosynthèse des AGPI des séries n-6 et n-3 chez les mammifères.....	31
Figure 7 : Biosynthèse des AG à longue chaîne et très longue chaîne chez les mammifères..	32
Figure 8 : Expression de l'ARNm <i>SCD-1</i> dans huit tumeurs coliques humaines.....	38
Figure 9 : Insertion d'une double liaison par la SCD.	39
Figure 10 : Rôle de SCD1 dans la synthèse des lipides.	40
Figure 11 : Modèle de la topologie membranaire de SCD-1 chez la souris.	42
Figure 12: Diagramme du promoteur de SCD-1.....	43
Figure 13 : Inhibiteurs de la SCD-1.	49
Figure 14 : Régulation du métabolisme et des voies de signalisation par SCD-1 dans les cellules cancéreuses.	51
Figure 15 : Structure des acides gras conjugués de l'acide linoléique.	60
Figure 16 : Voies de signalisation du stress du réticulum endoplasmique.	68
Figure 17 : La mort cellulaire programmée ou apoptose induite par le stress du RE.....	71
Figure 18 : Voies de production de ROS dans la cellule.....	76
Figure 19 : Les espèces réactives de l'oxygène synthèse, inactivation et conséquences.....	77
Figure 20 : Inhibition de l'expression de <i>SCD-1</i> et de son activité par siRNA dans les cellules cancéreuses coliques.	86
Figure 21 : Inhibition de l'expression de <i>SCD-1</i> par les siRNA dans les cellules U2OS.	86
Figure 22 : Effet des inhibiteurs de SCD-1, CVT-11127 et MF-438, sur l'activité de désaturation SCD.....	87
Figure 23 : Induction d'apoptose des cellules cancéreuses coliques SW480 et HCT116 par l'extinction de l'expression de <i>SCD-1</i>	88
Figure 24 : Induction d'apoptose par l'extinction de l'expression de SCD-1 dans les cellules U2OS.....	89
Figure 25 : Induction de la mort cellulaire par les inhibiteurs de SCD-1, CVT-11127 et MF-438.	90
Figure 26 : Induction de l'expression des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique dans les lignées cellulaires U2OS et SW480 après traitement à la thapsigargine.	91
Figure 27 : Expression en ARNm <i>XBP1</i> après extinction de l'expression SCD-1 dans les cellules U2OS et SW480.....	92

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 28 : Expression de la forme phosphorylée de la protéine eIF2 α après perte de l'activité SCD-1 dans les cellules U2OS et SW480.....	92
Figure 29 : Expression de la protéine de GRP78 après extinction de l'expression SCD-1 dans les cellules U2OS et SW480.....	93
Figure 30 : Expression de CHOP après la perte d'activité SCD-1 dans les cellules cancéreuses coliques SW480 et HCT116 et les cellules U2OS.	94
Figure 31 : Rôle de CHOP dans la mortalité des cellules HCT116 déficientes en SCD-1.....	95
Figure 32 : Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par l'extinction de <i>SCD-1</i> dans les cellules U2OS.....	96
Figure 33 : Impact de l'inhibition de l'activité SCD-1 par les siRNA sur les fibroblastes de peau humains normaux (NHDF).....	97
Figure 34 : Induction de mort par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques. ...	106
Figure 35 : Les CLA n'induisent pas de mortalité des cellules épithéliales coliques non transformées, NCM460.....	107
Figure 36 : Induction d'apoptose par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.	108
Figure 37 : Le t10,c12-CLA réduit la synthèse des AGMI dans les cellules cancéreuses coliques.....	110
Figure 38 : Expression de GRP78 après traitement par les CLA dans les cellules cancéreuses coliques.....	111
Figure 39 : Induction de l'épissage alternatif d'XBP1 après traitement par les CLA dans les cellules cancéreuses coliques.	112
Figure 40 : Induction de la forme phosphorylée d'eIF2 α par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.	113
Figure 41 : Rôle de phospho-JNK1/2 dans la mort des cellules HCT116 induite par le t10,c12-CLA.....	114
Figure 42 : Induction de l'expression de CHOP dans les cellules cancéreuses coliques après traitement par le t10,c12-CLA.	115
Figure 43 : Le t10,c12-CLA n'induit pas d'apoptose ni l'expression de CHOP dans les cellules non cancéreuses coliques.	116
Figure 44 : Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.	117
Figure 45 : Le t10,c12-CLA induit le stress du RE via l'induction de ROS.....	119

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la régulation de la Stéaroyl-CoA Désaturase-1 [115]...	43
Tableau 2 : Estimation de la quantité en CLA présente dans divers aliments [252].	61
Tableau 3 : Enrichissement des cellules HCT116 en CLA 24 et 48h après traitement.	105
Tableau 4 : Lignées cellulaires utilisée.	130
Tableau 5 : Séquences des ARN interférents (siRNA).	131
Tableau 6 : Etape de la transcription inverse dans le thermocycleur.	139
Tableau 7 : Liste des amorces de PCR semi-quantitative.	140
Tableau 8 : Programme de PCR semi-quantitative.	140
Tableau 9 : Liste des amorces de PCR en temps réel.	141
Tableau 10 : Programme de PCR en temps réel.	141
Tableau 11 : Liste des anticorps employés pour l'immuno-blotting.	144

Abréviations

AA : Acide Arachidonique (20:4n-6)	C/EBP : <i>CAAT/Enhance Binding Polymerase II</i>
Aa : Acides aminés	CDK : <i>Cyclin Dependent Kinase</i>
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase	CHEK ₂ : <i>Checkpoint Kinase 2</i>
ACL : Adénosine triphosphate-Citrate Lyase	CHOP : <i>C/EBP Homologous protein (GADD153)</i>
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CIMP : <i>CpG Island Methylation Phenotype</i>
ADNc : ADN complémentaire	CIN : <i>Chromosome INstability</i>
AG : Acides Gras	CLA : <i>Conjugated Linoleic Acid</i>
AGMI : Acides Gras MonoInsaturés	CLA1 : c9,t11-CLA
AGPI : Acides Gras PolyInsaturés	CLA2 : t10,c12-CLA
AGPI-RE : Élément de Réponse aux AGPI	c-MYC : <i>c-myelocytomatosis oncogene</i>
AGS : Acides Gras Saturés	COX : <i>Cyclo-OXygénase</i>
AGS : Acides Gras Trans	c-PARP : <i>PARP Clivé</i>
ALA : Acide α -linoléique (18:3 n-3)	DAPK2 : <i>Death-Associated Protein Kinase 2</i>
AMPk : <i>AMP-activated protein Kinase</i>	DCC : <i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
AP-1/2 : <i>Activated Protein-1 /2</i>	DDIT4 : <i>DNA Damage-Inducible Transcript 4</i>
APAF1 : <i>Apoptosis Protease-Activating Factor1</i>	DGLA : <i>Acide Dihomo-γ-Linoléique (20:3n-6)</i>
APC : <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>	DHA : <i>Acide DocosaHexaénoïque (22:6 n-3)</i>
ARN : Acide RiboNucléique	DMEM : <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
ASK1 : <i>Apoptosis Signal-regulating Kinase1</i>	DMSO : <i>Diméthylsulfoxyde</i>
ATF : <i>Activating Transcription Factor</i>	DN : <i>Dominant Négatif</i>
ATP : Adénosine TriPhosphate	DNMT : <i>ADN méthyltransférases</i>
AURKA : <i>Aurora Kinase A</i>	DPA : <i>Acide DocosaPentaénoïque (22:5 n-3)</i>
BAX : <i>Bcl-2-associated X protein</i>	DR5 : <i>Death Receptor 5</i>
BCA : <i>acide bicinchoninique</i>	DTT : <i>Dithiothréitol</i>
Bcl-2 : <i>homologous antagonist/killer</i>	EC : <i>Ester de Cholestérol</i>
bFGF : <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>	ECL : <i>Enhanced ChemiLuminescent</i>
BH3 : <i>Bcl-2 homology domain 3</i>	EDTA : <i>Acide Ethylène Diamine</i>
BIM : <i>Bcl2-interacting mediator of cell death</i>	Tétraacétique
BIP/GRP78 : <i>Glucose-Regulated Protein 78</i>	EGF : <i>Epidermal Growth Factor</i>
BSA : <i>Sérum albumine bovine</i>	
BUB1 : <i>Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1</i>	
bZIP : <i>basic leucine zipper</i>	

LISTE DES ABREVIATIONS

EGFR : Récepteur à l'EGF (HER1 ou ErbB)

EGTA : Acide Ethylène Glycol

Tétraacétique

eIF2 : *Eukaryotic translation Initiation Factor 2*

ELC : Elongase à longue chaîne

ELVOL : *Elongation of Very Long Chain Fatty Acid*

EPA : Acide EicosaPentaénoïque (20:5 n-3)

ERAD : *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*

ERK : *Extracellular Regulated Kinase*

ERSE : Elément de réponse au stress du RE

FADS : *Fatty Acid Desaturase*

FAS : *Fatty Acid Synthase*

FITC : Fluorescéine IsoThioCyanate

FLIP : *FLice (caspase-8) Inhibitory Protein*

G₁ : phase G₁ du cycle cellulaire

G₂ : phase G₂ du cycle cellulaire

GADD153 : *Growth Arrest and DNA Damage 153 (CHOP)*

GADD34 : *Growth Arrest and DNA Damage 34*

GDP : Guanosine DiPhosphate

GLA : Acide γ-Linolénique (18:3 n-6)

GLUT4 : *GLUcose Transporter type 4*

GPX : Glutathion Peroxydase

GRP94 : *Glucose-Regulated Protein 94*

GSH : Glutathion

GSK3β : *Glycogen Synthase kinase 3β*

GTP : Guanosine TriPhosphate

HCC : Hépatocarcinomes Cellulaires

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HER : *Human Epidermal Growth Factor Receptor (ErbB)*

HNPCC : *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*

HSD : *honestly significant difference*

IGF : *Insulin like Growth Factor*

IRE : élément de réponse à l'insuline,

IRE1 : *Inositol-Requiring Kinase 1*

JNK : *c-Jun amino terminal kinase*

Keap1 : *Kelch-like Ech-associated protein1*

KO : *Knock-Out*

LA : Acide Linoléique (18:2 n-6)

LDL : *Low Density Lipoprotein*

LepRE : élément de réponse à la leptine.

LOX : Lipoxygénase

LT : Leucotriène

LXR : *Liver X Receptor*

LXR-RE : Elément de réponse au LXR

M : Mitose

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MLH : *MutL homolog*

MMR : *DNA mismatch repair*

MOPS : Acide γ-morpholinopropanesulfonique

MSH : *MutS homolog*

MSI : *MicroSatellite Instability*

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

NAC ou L-NAC : N-acétyl-L-cystéine

NADPH : Nicotinamide Adénine

Dinucléotide Phosphate

NF-1 : *Nuclear Factor 1*

NF-Y : *Nuclear Factor Y*

NF-κB : *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NHDF : fibroblastes de peau non

différenciés humains

NOXA : *neutrophil NADPH Oxidase factor*

NRF2 : *transcription Factor Nuclear Respiratory 2*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase

LISTE DES ABREVIATIONS

PC : Phosphatidylcholines	SDS : Sodium-Dodécyl-Sulfate
PCR : réaction en chaîne par polymérisation	siRNA : ARN interférent
PDGF : <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>	siRNA : petit ARN interférant
PDK2 : <i>3-phosphoinositide dependent kinase 2</i>	Skp2 : <i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
PERK : <i>double-stranded RNA-activated protein kinase like ER Kinase</i>	SOD : Super Oxyde Dismutase
PG : Prostaglandine	SP1 : <i>Specificity Protein 1</i>
PGC-1 α : <i>Peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1α</i>	SREBP : <i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein</i>
PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase	SV40 : <i>Simian Virus 40</i>
PKR : <i>interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase</i>	SVF : Sérum de Veau Foetal
PL : Phospholipides	TCF4 : <i>TransCription Factor 4</i>
PLK ₁ : <i>Polo-Like Kinase 1</i>	Tg : Thapsigargine
PMS1/2 : <i>Post Meiotic Segregation increased 1/2</i>	TG : Triglycérides
PMSF : Fluorure de phenylméthanesulfonyle	TGF : <i>Transforming Growth Factor</i>
PPAR : <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>	TGFR : Récepteur au TGF
PPRE : Elément de réponse aux PPAR	TLR : Récepteurs Toll Like
PTEN : <i>Phosphatase and TENsin homolog</i>	TNF : <i>Tumor Necrosis Factor</i>
PUMA : <i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>	TR : <i>Triodothyronine receptor</i>
PVDF : Fluorure de Polyvinylidène	TRAF2 : <i>Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2</i>
Rb : gène de la protéine du RétinoBlastome	TRAIL : <i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
RE : Réticulum endoplasmique	Trb3 : <i>Tribbles homolog 3</i>
RNase : Endoribonucléase	TRX : Thioredoxine
ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène	TXA ₂ : Thromboxane A ₂
RT : transcription inverse	UPR : <i>Unfold Protein Response</i>
RXR : Récepteurs X aux Rétinoïdes	USP2a : <i>Ubiquitin-Specific Protease 2a</i>
S : phase S du cycle cellulaire	VEGF : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
SCAP : <i>SREPB Cleavage-Activating Protein</i>	VLDL : <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
SCD : Stéaroyl-CoA Désaturase	VP16 : Etoposide
SD : Sérum Délipidé	XBP1 : <i>X-box Binding Protein1</i>
SDA : Acide Stéridonique (18:4 n-3)	XBP1s : XBP1 épissé

Introduction

1. Le cancer colorectal

1.1 Définition du cancer

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est un terme générique appliqué à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant des métastases.

1.2 Le cancer colorectal en quelques chiffres

Les études les plus récentes établissent qu'en 2008 le cancer colorectal est, dans le monde entier, le troisième cancer le plus diagnostiqué chez l'homme avec 663 000 cas, soit 10% des cancers, et le second chez la femme avec 570 000 cas, soit 9,4% des cancers. Près de 60% des cancers colorectaux touchent les personnes des pays développés. L'incidence est décuplée entre les pays industrialisés et les pays sous développés, en particulier, en Australie, en Nouvelle Zélande et en Europe de l'ouest comparée à l'Afrique (à l'exception de l'Afrique du Sud) ou à l'Asie Centrale et du Sud [1] (Figure 1).

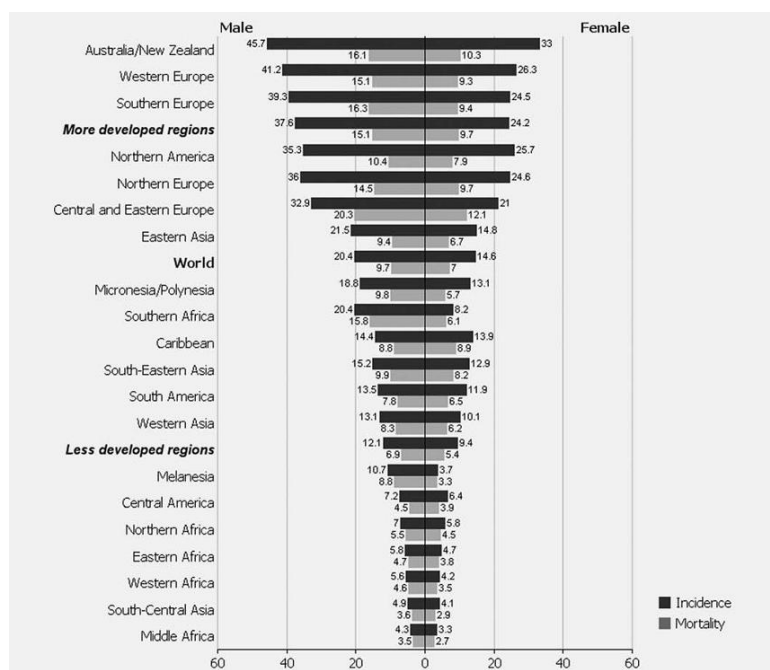


Figure 1 : Estimation de l'incidence (standardisée par l'âge) et de la mortalité pour le cancer colorectal dans le monde.

(par 100 000) D'après Ferlay et al.[1]

Le nombre de décès par cancer colorectal est estimé dans le monde à 608 000 par an, soit 8% des décès par cancer. On observe pour l'incidence comme pour la mortalité,

des niveaux plus faibles chez la femme que chez l'homme (Incidence homme/femme, 1,4:1).

1.3 Anatomo-pathologie du cancer colorectal

Le côlon se divise en quatre segments, le côlon droit ou ascendant, le côlon transverse, le côlon gauche ou descendant et le côlon sigmoïde qui rejoint le rectum par la jonction recto-sigmoïdienne. Le côlon mesure environ 1,50 m et le rectum 15 cm.

Les cancers colorectaux regroupent les cancers coliques et les cancers du rectum. Ils débutent généralement par un adénome, qui est une tumeur bénigne touchant une glande telle que les glandes endocrines, le foie, le pancréas, l'estomac, la prostate, les reins, les seins, la vésicule biliaire ou les testicules, ou certaines muqueuses telles que les muqueuses utérine, colique, rectale ou bronchique. L'analyse anatomo-pathologique au microscope d'un adénome révèle un aspect histologique de glande ou la présence de muco-sécrétions. La transformation d'un adénome en cancer forme un adénocarcinome. Plus de 95% des tumeurs coliques sont des adénocarcinomes. Les polypes, quant à eux sont des formations en relief qui font saillie sur la muqueuse intestinale.

La dysplasie est le terme utilisé pour décrire l'apparence histologique de cellules montrant un taux élevé de mitoses, une maturation incomplète et un ratio nucléocytoplasmique élevé. Cette prolifération est désorganisée mais non autonome. La dysplasie est le précurseur du néoplasme *in situ*. La néoplasie est la prolifération cellulaire autonome avec perte de régulation qui se poursuit même en l'absence de stimuli.

L'adénome ou tumeur épithéliale bénigne a une prévalence de 7% dans la tranche d'âge 45-49 ans, 15% entre 50 et 59 ans et de 20 à 30% entre 64 et 74 ans [2]. La filiation adénome-cancer ne fait plus de doute. Les adénomes ou polypes se transforment en adénocarcinome ou en cancer en une dizaine d'année. Un adénome naît par hyper-prolifération de l'épithélium intestinal, et croît pour évoluer en tumeur, et infiltre le chorion puis la musculature.

La transformation des adénomes a pu être constatée chez des patients refusant l'exérèse de leur adénome. La fréquence des tumeurs développées sur un adénome est estimée entre 60 et 80% [3]. Les facteurs qui influencent le plus cette transformation maligne sont la taille, la présence d'une composante villeuse et le degré de dysplasie [4].

1.4 Les facteurs de risque

Les cancers colorectaux apparaissent plus fréquents avec l'âge : on considère les sujets âgés de plus de 50 ans comme la population à risque moyen. La population à risque élevé sont les parents au premier degré de sujets atteints d'un cancer colorectal, les sujets ayant un antécédent personnel, ou familial, d'adénome colorectal, de cancer colorectal, et les personnes atteintes de rectocolites ulcéro-hémorragiques ou de la maladie de Crohn. Le risque est quant à lui très élevé dans les familles atteintes de cancers à transmission héréditaire [4].

Dans environ 5% des cas, le cancer colique survient dans un contexte de maladies héréditaires prédisposant au cancer colique, à transmission autosomique dominante et à pénétrance élevée. La polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch ou HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*) sont les deux maladies actuellement identifiées comme associées aux gènes de susceptibilité du cancer colorectal [5].

La variabilité de l'incidence du cancer colique dans le temps et l'espace suggère l'influence de facteurs environnementaux tels que l'alimentation, l'activité physique ou la consommation d'alcool et de tabac.

Notre alimentation a beaucoup évolué au cours de ces 60 dernières années. Les apports en protéines sont en général suffisants voire excédentaires. Les apports en glucides simples sont trop importants au détriment des glucides complexes et des fibres alimentaires. Les apports en lipides sont quant à eux trop importants et majoritairement riches en acides gras saturés. Aucun lien significatif entre la consommation de lipides saturés et le risque de cancer colorectal n'a été mis en évidence. Les lipides polyinsaturés auraient quant à eux un rôle protecteur vis-à-vis

du développement du cancer colorectal [6, 7]. La consommation de protéines apparaît liée à une augmentation du risque de cancer colorectal, en particulier une consommation excessive de viande rouge [4, 8]. La cuisson des viandes rouges induit la formation d'amines hétérocycles carcinogènes à partir des protéines [9, 10], celle des graisses -à haute température- produirait des promoteurs de la cancérogenèse tels que des hydrocarbures aromatiques polycycliques. La consommation de fruits et de légumes a quant à elle un effet protecteur, qui serait lié à leur teneur en vitamines, en antioxydants, en fibres alimentaires et à leur effet de lest diminuant la concentration des carcinogènes dans le bol fécal [11].

Il a été montré qu'un apport calorique élevé, une obésité, et la sédentarité sont associés à un risque augmenté d'adénome ou de cancérogenèse [12]. L'hyper-insulinémie serait également un promoteur dans la cancérogenèse [13].

La consommation d'alcool est associée à un risque relatif de 1,2 fois le risque de cancer colorectal dès 40g/jour. La bière est la boisson qui augmente le plus ce risque. L'alcool interviendrait sur l'étape précoce de promotion du cancer lors de la croissance de l'adénome. L'acétaldéhyde, métabolite de l'alcool, possède une activité cytotoxique prouvée [14, 15]. Le tabagisme est également associé à une augmentation du risque et de la mortalité par cancer colorectal au delà de 20 paquets/an ; ce risque disparaît après arrêt du tabac [15, 16].

1.5 La cancérogenèse colorectale

Le cancer colorectal représente un modèle de cancérogenèse multi-étapes caractérisé par l'apparition d'altérations génétiques successives, responsables de la transformation d'une cellule colique normale en cellule cancéreuse. Ces altérations touchent les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. L'analyse génétique des altérations somatiques et constitutionnelles a permis d'identifier trois mécanismes de cancérogenèse colique [4, 17-20] : l'instabilité chromosomique, l'instabilité génétique et l'hyperméthylation de l'ADN. L'inflammation a également un rôle important dans la cancérogenèse colorectale et de nombreuses voies de signalisation sont touchées.

1.5.1 L'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est l'altération la plus commune des cancers coliques et représente environ 85% des cas [21]. Il s'agit du phénotype CIN, *Chromosome INstability*. Cette instabilité chromosomique est caractérisée par la survenue de pertes alléliques sur le bras court des chromosomes 8 et 17, ainsi que sur le bras long des chromosomes 5, 18 et 22. Ces pertes alléliques sont associées à des mutations fréquentes des gènes suppresseurs de tumeur p53 (17p13) et le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli* ; 5q21), ainsi ils participent à l'inactivation biallélique de ces gènes. Sur les bras long du chromosome 18, l'identification de gènes suppresseurs de tumeur ciblés par les pertes alléliques n'est pas certaine, cependant plusieurs gènes sont des candidats potentiels, *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*), *SMAD2* et *SMAD4*. Les protéines SMAD2 et SMAD4 jouent un rôle clé dans la voie de signalisation du TGF β (*Transforming Growth Factor*). Sur les chromosomes 1q, 8p et 22q, aucun gène suppresseur de tumeur n'a pu être identifié à ce jour. Ces pertes alléliques sont souvent associées à un contenu anormal en ADN (aneuploïdie). Les mécanismes à l'origine de ces altérations sont peu connus à l'heure actuelle [17, 18].

La survenue de mutations « stop » dans le gène *APC* pourrait être à l'origine de ce phénotype. En effet, la protéine APC joue un rôle dans la ségrégation chromosomique par liaison avec la protéine BUB1 (*Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1*), en interaction avec les kinétochores des chromosomes, et le maintien de la polymérisation des microtubules [22, 23]. Cependant, l'inactivation du gène *APC* n'est pas suffisante pour provoquer seule ce phénotype, d'autres gènes sont impliqués, en particulier des gènes participants au contrôle du fuseau mitotique susceptibles de mutations. L'amplification du gène *AURKA* (Aurora Kinase A), sérine thréonine kinase associée au centrosome, est fréquente dans les cancers colorectaux et est aussi associée à ce phénotype [24].

1.5.2 L'instabilité génétique

Un deuxième mécanisme, caractérisé par une instabilité des séquences répétées de types microsatellites, résulte de l'inactivation du système de réparation de

mésappariements des bases (*DNA mismatch repair*, MMR). Les séquences microsatellites sont particulièrement sensibles aux erreurs de réplication, et donc la moindre mutation dans le système de réparation prédispose au développement d'une instabilité génétique. Le système MMR est composé de sept protéines différentes (MLH1, MLH3, MSH3, MSH6, PMS1 et PMS2) qui s'associent pour former des complexes hétérodimériques, pour reconnaître et réparer les erreurs dans l'ADN [25].

Dans les cancers sporadiques, ces défauts de réparation sont principalement liés à l'hyperméthylation du promoteur de hMLH1. Dans le cas du syndrome de Lynch ou HNPCC, l'altération du système MMR est due à des mutations inactivatrices des gènes hMSH2, hMLH1, hMSH6 et PMS2. Les tumeurs de ce groupe, dit phénotype MSI (*MicroSatellite Instability*), représentent 15% des cancers colorectaux [17]. Ces tumeurs sont diploïdes, et les mutations des gènes *p53* et *APC* sont significativement moins fréquentes que pour le phénotype CIN [26]. Ce déficit du système MMR entraîne une accumulation de mutations secondaires particulièrement délétères si ces séquences répétées se situent en région codante de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN. Ce type de mutation a été décrit pour le gène du récepteur de type II du TGF β ou le gène pro-apoptotique BAX (*Bcl-2-associated X protein*) [17].

1.5.3 L'hyperméthylation de l'ADN

Des anomalies de la méthylation de l'ADN ont été mises en évidence dans environ 15% des cancers colorectaux sporadiques, définissant un nouveau phénotype de cancer colorectal, bien souvent en association avec les phénotypes présentés précédemment [27]. Ces anomalies de la méthylation touchent les cytosines des îlots CpG des promoteurs, et entraînent leur inactivation transcriptionnelle. On parle de phénotype CIMP (*CpG Island Methylation Phenotype*). L'hyperméthylation du gène suppresseur de tumeur *p16^{INK4A}* est observée dans 26% des cas de cancer colorectal [28].

La méthylation de l'ADN est sous la dépendance des ADN méthyltransférases (DNMT) qui catalysent le transfert de groupements méthyles. Des taux élevés d'activité de DNMT-1 ont été mis en évidence dans les cellules cancéreuses coliques,

et il a été montré qu'une surexpression de DNMT-1 pouvait conduire à la transformation cellulaire [29, 30].

1.5.4 Le rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse colorectale

L'inflammation chronique prédispose souvent à la transformation maligne [31]. En effet, les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques des intestins présentent une incidence accrue de cancer colique [32]. L'inflammation chronique favorise la cancérogenèse en induisant la mutation de gènes, l'inhibition de l'apoptose, la stimulation de l'angiogenèse et la prolifération cellulaire [33]. Quelques protéines ont été identifiées comme clés dans le développement de tumeurs, les récepteurs Toll Like (TLR), le $\text{TNF}\alpha$ (*Tumor Necrosis Factor*), le $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) et la cyclo-oxygénase-2 (COX2) [34].

La surexpression de certains TLR a été rapportée dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'activation de ces récepteurs conduit à un signal intracellulaire induisant la production d'éléments pro-inflammatoires tels que COX2 [35]. Des souris déficientes en TLR4, auxquelles des cellules cancéreuses coliques ont été inoculées, présentent un taux de survie meilleur que les souris non déficientes [36], suggérant un rôle important de l'inflammation dans la cancérogenèse colique.

$\text{TNF}\alpha$ est une cytokine de la famille des TNF. Il conduit à une réponse inflammatoire via la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ou à une activation de la caspase-8, qui a un rôle dans l'apoptose [37]. Les effets contradictoires du $\text{TNF}\alpha$ vis-à-vis de la cancérogenèse colorectale dépendent de la quantité présente. Un taux très élevé en $\text{TNF}\alpha$ est nécessaire pour induire une réponse pro-apoptotique [38]. Toutefois, Popivanova *et al.* ont montré qu'un blocage de l'action du $\text{TNF}\alpha$ par KO (*Knock-Out*) de son récepteur chez la souris réduit la formation de tumeurs colorectales [39].

$\text{NF-}\kappa\text{B}$ joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire. Son activation a été associée à l'expression de différentes cytokines inflammatoires, aux facteurs anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, aux facteurs angiogéniques, et à

COX2 [40]. NF- κ B est un facteur de transcription dimérique cytoplasmique transloqué au noyau sous le signal des TLR.

Des expérimentations menées sur des souris déficientes en *APC* traitées avec des inhibiteurs de COX2 ou déficientes en COX2 présentent un faible taux de formation de polypes. COX2 convertit l'acide arachidonique (20:4n-6) en prostaglandine (PG) de la série PGG₂, précurseur d'au moins cinq autres molécules, PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , PGI₂ et le thromboxane A₂ (TXA₂). PGE₂, est un inducteur de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse après fixation sur son récepteur, qui confère à COX-2 son rôle dans la cancérogenèse [41, 42]. Les cyclo-oxygénases activent de nombreux facteurs angiogéniques, comme VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) via l'action de PGE₂.

1.5.5 Principales voies de signalisation impliquées dans le cancer colorectal

En plus des différentes altérations génétiques présentées précédemment, il existe différentes voies de signalisation affectées lors du cancer colorectal, notamment dues à des mutations délétères qui prédisposent au développement tumoral.

Parmi les voies impliquées, on retrouve la voie de signalisation Wnt (voie APC/ β -caténine), la voie de TGF β , la voie p53, la voie de l'EGF, la voie RAS/RAF/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et la voie PI3K (phosphatidyl-inositol 3'-kinase) [17-19].

1.5.5.1 La voie de signalisation Wnt ou voie APC/ β -caténine

Le gène suppresseur de tumeur *APC* est un acteur essentiel de cette voie de signalisation. Il est muté dans 60 à 80% des cas de cancer colorectal de phénotype CIN.

Le gène *APC* code une grosse protéine de 312 kDa de 2843 acides aminés. Un contrôle négatif du cycle cellulaire se fait au travers de l'action de la protéine APC en interaction avec la β -caténine (Figure 2).

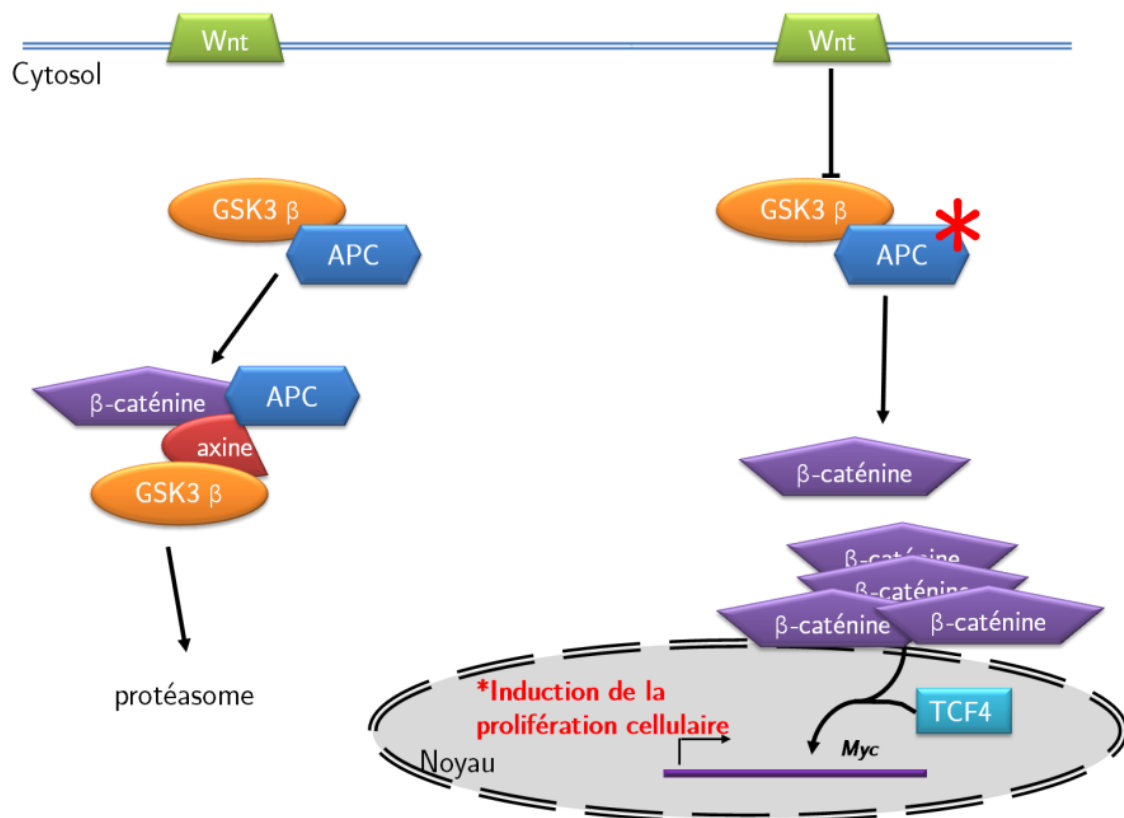


Figure 2 : La voie de signalisation Wnt, impliquant le couple APC/ β -caténine.

A gauche, hors de toute activation de cette voie, la protéine GSK3 β est phosphorylée, et forme un complexe avec la protéine APC puis retient la β -caténine avec d'autres partenaires comme l'axine. Lors d'une activation du proto-oncogène Wnt, à droite, cela entraîne une inhibition de la GSK3 β . Dans ce cas, la régulation négative par la protéine APC n'a plus lieu, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme, se lie avec TCF-4, puis le complexe est transloqué dans le noyau où il induit l'expression de gène impliqué dans la prolifération cellulaire. *en rouge indique qu'une mutation ou une déficience de la protéine APC, dans les cancers colorectaux, induit la formation d'un complexe β -caténine/TCF4 stable, et une sur-activation de la voie.

Après activation de la voie de signalisation par le récepteur Wnt, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme des cellules activées. Elle forme un complexe avec le facteur de transcription TCF4, ce qui conduit à sa translocation dans le noyau, où il favorise la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Lors d'une déficience en protéine APC, le complexe β -caténine/TCF4 reste constitutivement actif du fait de l'incapacité à phosphoryler la β -caténine pour sa dégradation. En présence de la protéine APC, la β -caténine quitte le complexe pour se lier à APC et induit sa dégradation par le protéasome. La régulation négative par la protéine APC

de la β -caténine implique d'autres partenaires comme l'axine et la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β).

L'activation constitutive du complexe β -caténine/TCF4 est retrouvée lors de mutations de la β -caténine empêchant sa dégradation par le protéasome. Ces mutations surviennent dans 50% des cas de cancer du côlon où aucune mutation du gène *APC* n'a été trouvée.

Un des gènes cibles du complexe est l'oncogène *c-MYC* qui est surexprimé dans les cancers colorectaux, et qui induit la prolifération des cellules épithéliales coliques.

Par ailleurs, la β -caténine se lie avec la E-cadhérine qui est une protéine de la famille des glycoprotéines transmembranaires nécessaire à l'adhésion entre les cellules. La protéine *APC* en déplaçant la β -caténine de son site de liaison à la E-cadhérine, empêche cette dernière de jouer son rôle de protéine d'adhérence et favorise ainsi la migration des cellules épithéliales coliques vers le sommet des villosités ainsi que leur desquamation dans la lumière intestinale [43].

1.5.5.2 La voie de TGF β

Les membres de la famille du TGF β sont des facteurs de croissance et de différenciation impliqués dans plusieurs processus biologiques, tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose, la synthèse de la matrice extracellulaire, la réponse immunitaire et l'angiogenèse.

TGF β 1 est un inhibiteur de la prolifération cellulaire épithéliale. La transduction du signal est permise, après activation des récepteurs à activité sérine thréonine kinase, TGF β RI et TGF β RII, par deux protéines SMAD2 et SMAD4, qui forment un hétérodimère transloqué au noyau, où il contribue à la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Figure 3). L'activation de la voie TGF β est associée à l'inhibition de cyclines, des kinases dépendantes des cyclines et à l'augmentation de l'expression d'inhibiteurs des cyclines.

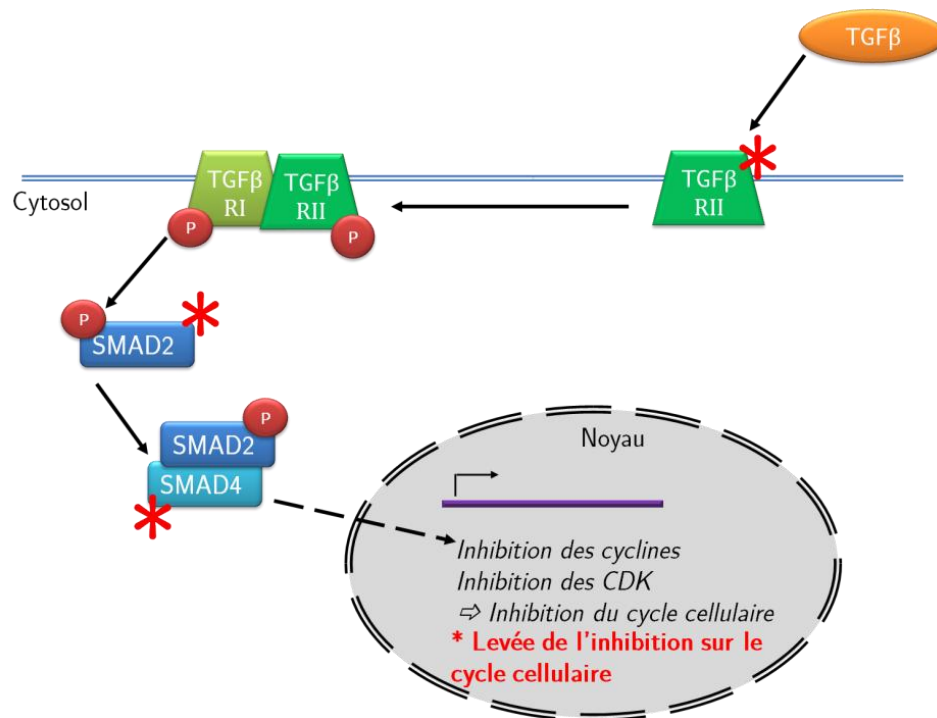


Figure 3 : La voie de TGFβ et ses altérations dans les cancers colorectaux.

La fixation de TGFβ sur son récepteur TGFβRII induit sa phosphorylation qui forme ensuite un hétérodimère avec TGFβRI induisant sa phosphorylation. Le complexe ainsi activé phosphoryle à son tour la protéine SMAD2, qui va former un hétérodimère avec SMAD4. L'ensemble est alors transloqué au noyau où il contribue à la transcription de gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire. Cette voie est impliquée dans les cancers colorectaux (* en rouge) à la suite de mutation du récepteur TGFβRII, ou par mutation inactivatrice des gènes *SMAD2* et *SMAD4*.

Cette voie de signalisation est impliquée dans 20 à 30% des cancers colorectaux de phénotype CIN par mutations inactivatrices des gènes *SMAD2* et *SMAD4*. Elle est aussi impliquée dans le phénotype MSI, où le gène du TGFβRII est inactivé de manière biallélique dans 60 à 80% des cas.[44-46]

1.5.5.3 La voie de p53

Le gène suppresseur de tumeur p53 est inactivé par des pertes alléliques et des mutations ponctuelles dans 60 à 80% des cas de cancer de type CIN.

Les altérations de p53 sont impliquées dans la séquence adénome-cancer et surviennent tardivement au cours de la carcinogenèse colorectale. La protéine p53 bloque le cycle cellulaire en phase G1/S, par induction de la transcription du gène inhibiteur du cycle cellulaire *CIP1/WAF1* lors de lésions de l'ADN. Elle peut

également induire l'apoptose en favorisant la transcription du gène pro-apoptotique *BAX*, si les lésions à l'ADN sont trop importantes pour être réparées. L'altération du gène de la protéine p53 serait donc au centre de la transformation maligne de la cellule colorectale autorisant la survenue d'altérations génétiques multiples. [47, 48]

1.5.5.4 La voie de l'EGF

Le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou EGFR (ou HER1, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 1*) est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, HER ou ErbB. Il existe plusieurs ligands possibles au domaine extracellulaire du récepteur, qui sont principalement l'EGF et le TGF α , mais également l'amphiréguline, l'épiréguline, la β -celluline et les neurégulines. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne l'homo- ou hétéro- dimérisation de l'EGFR avec d'autres récepteurs de la famille ErbB comme HER2. Le domaine tyrosine kinase active par phosphorylation différentes voies de signalisation, la voie RAS/RAF/MAPK et la voie PI3K/Akt (Figure 4).

Plusieurs altérations génétiques peuvent expliquer une activation de la voie de signalisation de l'EGF. Une amplification du récepteur est retrouvée dans 10 à 15% des cas de cancer colorectal, ainsi qu'une activation constitutive des voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/Akt. [17, 49-52]

1.5.5.5 La voie RAS/RAF/MAPK

Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases. Elles jouent un rôle important dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau, régulant l'angiogenèse, la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire (Figure 4).

Les protéines RAS jouent un rôle d'interrupteur au sein des voies de signalisation et oscillent entre un état actif lorsqu'elles sont liées au GTP (Guanosine TriPhosphate), et un état inactif lorsqu'elles sont liées au GDP (Guanosine DiPhosphate).

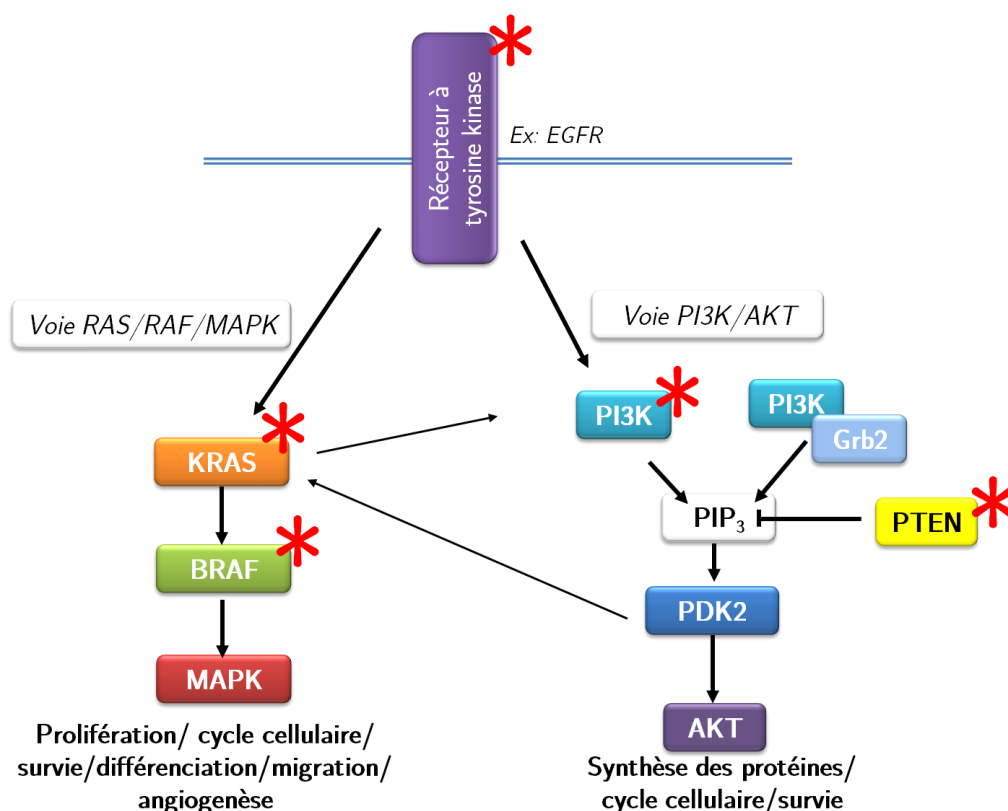


Figure 4 : Implication des voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/Akt dans le cancer colorectal.

Les * rouges représentent les différentes altérations de ces voies de signalisation dans le cancer colorectal. Il s'agit de mutation conduisant à la sur-activation des voies.

Le gène *KRAS* est fréquemment activé dans les cancers colorectaux. Cette activation résulte d'une mutation faux-sens, qui lui confère un pouvoir oncogénique. La prévalence des mutations de l'oncogène *KRAS* dans les cancers colorectaux est voisine de 40%. Une autre protéine, appartenant à la cascade RAS, a été mise en évidence dans 10 à 15% des cancers colorectaux, il s'agit d'une protéine sérine thréonine kinase codée par le gène *BRAF*. L'activation des protéines RAS et BRAF entraîne l'activation des MAPK ou ERK (*Extracellularly Regulated Kinase*).

La voie de transduction du signal passant par RAS apparaît activée dans 50% des cas de cancer colorectal quelque soit le phénotype. [17]

1.5.5.6 La voie *PI3K/Akt*

La voie *PI3K/Akt* joue un rôle important dans certaines fonctions cellulaires, telles que la régulation de la glycogénèse, la migration, la survie et la prolifération des cellules.

Cette voie peut être activée de trois façons différentes, par phosphorylation du domaine tyrosine kinase suite à la liaison du ligand de l'EGFR, par phosphorylation assurée par la PDK2 (*3-phosphoinositide dependent kinase 2*), qui active également Akt, et par la protéine Grb2, capable aussi d'activer la voie RAS (Figure 4).

Des mutations du gène *PI3KCA* codant pour la sous unité catalytique de la *PI3K* sont observées dans 12 à 15% des cas de cancer colorectal et sont associées à une augmentation de l'activité de la voie *PI3K/Akt*. Des altérations somatiques (mutation, pertes alléliques ou hyperméthylation du promoteur) inactivatrices de *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*), acteur de cette voie de signalisation, conduisant à une perte d'expression de la protéine, ont été observées dans 15 à 30% des tumeurs colorectales. La prévalence des mutations de *PTEN* est de l'ordre de 18% dans les cas de cancers de type MSI. Au total, la cascade de signalisation est impliquée dans plus de 70% des cancers colorectaux. [17]

2. La biosynthèse des acides gras insaturés

Les acides gras (AG) font partie de la grande famille des lipides et constituent l'élément de base pour la synthèse de lipides plus complexes tels que les phospholipides, les triglycérides ou les esters de cholestérol. Ils interviennent comme éléments de structure des membranes biologiques, comme pourvoyeurs d'énergie mais également dans la signalisation cellulaire et la modulation de l'expression de nombreux gènes. Le taux d'AG dans l'organisme est régulé par les apports alimentaires, leur synthèse *de novo* et leur catabolisme par β -oxydation.

Les AG sont des chaînes carbonées plus ou moins longues, avec des degrés d'insaturation (ou double liaison) différents. On parle d'acides gras saturés (AGS) lorsqu'ils n'ont pas d'insaturation, d'acides gras monoinsaturés (AGMI) lorsqu'ils présentent une unique insaturation, et d'acides gras polyinsaturés (AGPI) lorsqu'ils présentent plusieurs insaturations.

La synthèse des AGMI débute à partir d'AGS, en particulier l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0). Ces AG peuvent être apportés par l'alimentation ou sont issus de la synthèse *de novo*. En revanche, tous les AGPI ne sont pas synthétisables par notre organisme. En effet, les deux précurseurs des voies de biosynthèse des AGPI, l'acide linoléique (LA, 18:2 n-6) et l'acide α -linolénique (ALA, 18:3 n-3), doivent être apportés par l'alimentation, on parle d'AG indispensables.

2.1 La synthèse des acides gras monoinsaturés

2.1.1 Les AGS, précurseurs des AGMI

Les AGS sont la base pour la synthèse des AGMI. La synthèse *de novo* des AG a lieu principalement dans les tissus lipogéniques comme le foie, le tissu adipeux et les glandes mammaires.

La synthèse des AGS se fait à partir de l'acétyl-CoA provenant de l'oxydation mitochondriale du pyruvate et de la dégradation oxydative des acides aminés cétogènes. Elle nécessite de l'énergie, apportée par l'ATP (Adénosine TriPhosphate)

et du pouvoir réducteur du NADPH, H^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate).

La première réaction de synthèse des AGS est la synthèse du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA (Figure 5). Cette réaction est catalysée par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC). Il existe deux isoformes d'ACC, ACC1 et ACC2, qui diffèrent de 146 acides aminés à l'extrémité $-\text{NH}_2$ terminale. Ces deux isoformes présentent une très forte homologie de séquence et ont une activité enzymatique similaire [53].

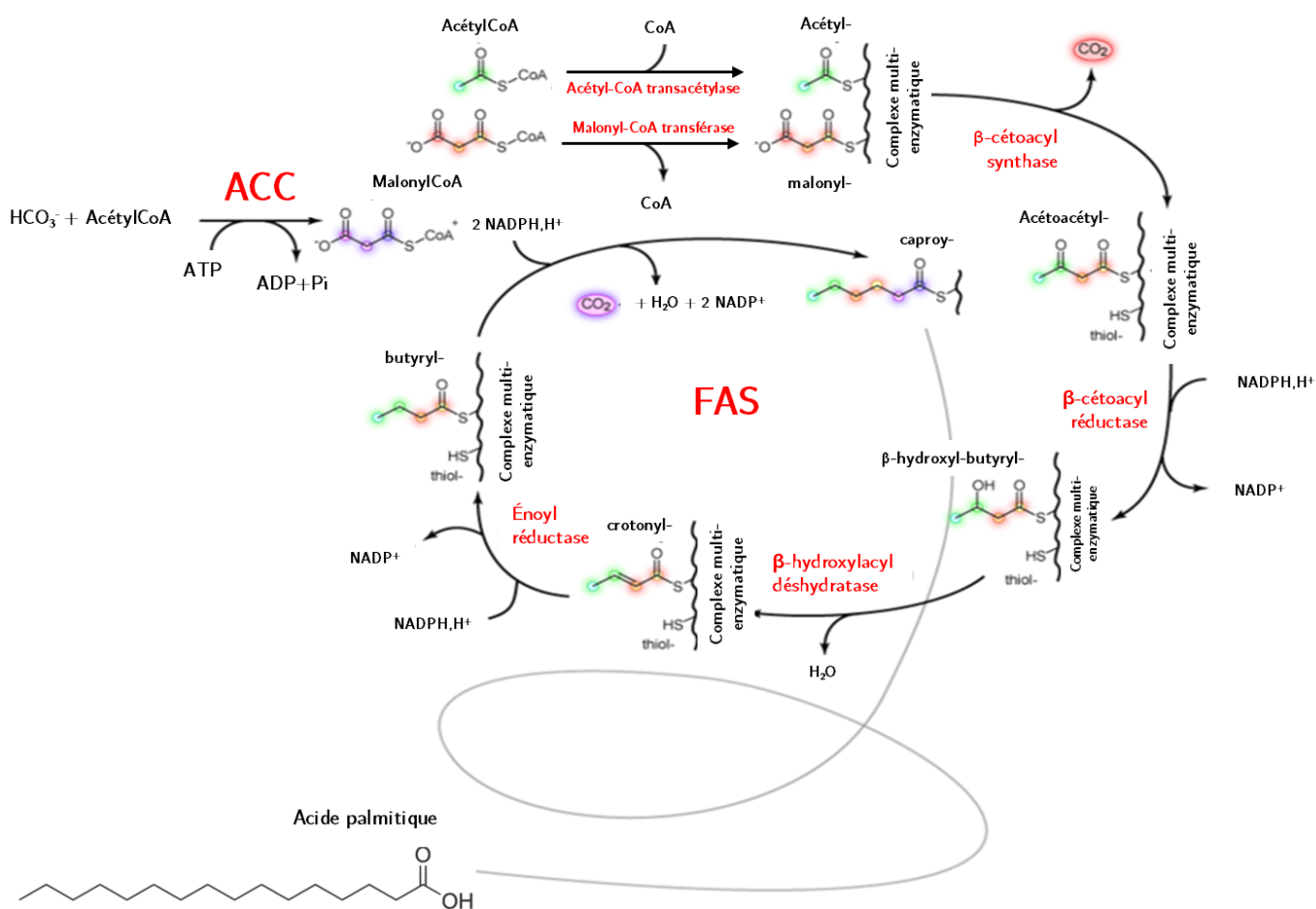


Figure 5 : Implication d'ACC et FAS dans la biosynthèse des acides gras saturés. La synthèse des acides gras saturés (AGS) débute par la synthèse de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA, catalysée par l'Acétyl Co-A Carboxylase (ACC) en présence de biotine. Ensuite, le malonyl-CoA est greffé à un acétyl-CoA par la β -cétosynthase, une des sept activités enzymatiques de la *Fatty Acid Synthase* (FAS). Puis s'en suit une réduction par la β -cétosynthase, une déshydratation par la β -hydroxylacyl déshydratase, une nouvelle réduction par l'énol-réductase, puis un nouveau cycle recommence avec la nouvelle condensation d'une molécule de malonyl-CoA.

Le malonyl-CoA est ensuite pris en charge par l'acide gras synthase ou FAS (*Fatty Acid Synthase*) pour allonger la chaîne de l'AG (Figure 5). FAS est constituée de sept sous unités catalytiques dont les activités sont les suivantes : acétyl/malonyl-CoA transférase, β -cétoacyl synthase, β -cétoacyl réductase, β -hydroxylacyl déshydratase, énoyl réductase, thioestérase et transporteur d'acyl (*acyl carrier protein*) [54]. L'élongation de la chaîne se fait par un enchainement de réactions conduites par FAS, et peut varier entre 2 et 7 cycles réactionnels afin d'obtenir tous les AGS, des AG à chaîne très courte (4:0), à chaîne intermédiaire (16:0). L'AG majoritairement formé par cette chaîne de réaction est l'acide palmitique (16:0) à la suite de sept cycles.

Les AG ainsi synthétisés peuvent subir d'autres insaturations et/ou élongations qui seront assurées au niveau du réticulum endoplasmique (RE).

2.1.2 La synthèse des AGMI

Les AGMI sont issus de la désaturation des AGS. Cette réaction est catalysée majoritairement par la $\Delta 9$ -désaturase, ou Stéaroyl-CoA Désaturase (SCD), enzyme du réticulum endoplasmique. Elle introduit une double liaison en position $\Delta 9$ à partir du groupement carboxyle terminal des AG. Les substrats préférentiels de SCD sont l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) pour former l'acide palmitoléique (16:1 n-7) et l'acide oléique (18:1 n-9) respectivement. L'activité de SCD est dépendante de la présence de différents cofacteurs NADPH, H^+ et de deux autres protéines acceptrices d'électrons le cytochrome b_5 et la cytochrome b_5 réductase (Figure 9, *Introduction §4.1.1*).

Il existe une autre désaturase responsable de la synthèse d'AGMI, la $\Delta 6$ -désaturase (ou FADS2, *Fatty Acid Desaturase 2*) qui introduit une double liaison entre les carbones 6 et 7 de l'acide palmitique pour donner l'acide sapiénique (16:1 n-10)[55].

2.2 La synthèse des acides gras polyinsaturés

Les AGPI sont impliqués dans de nombreuses fonctions de l'organisme. Ils possèdent de 2 à 6 doubles liaisons et sont classés en deux familles principales, la famille en n-6

ou $\omega 6$, dérivée de LA (18:2 n-6) et la famille en n-3 ou $\omega 3$, dérivée de l'ALA (18:3 n-3).

Si les mammifères ont la capacité de synthétiser *de novo* les AGMI, la synthèse des AGPI nécessite des précurseurs apportés par l'alimentation. Les précurseurs de la synthèse des AGPI sont alors qualifiés d'indispensables. Par ailleurs, les AGPI n-3 et n-6 sont aussi qualifiés d'essentiels, car en absence d'apport ou de biosynthèse, des symptômes de carences réversibles apparaissent. En effet, ils jouent non seulement un rôle structural en tant que composants indispensables des phospholipides membranaires, mais également un rôle fonctionnel, car ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (Figure 6) et sont des régulateurs de l'expression génique.

L'organe principal de la biosynthèse des AGPI est le foie [56], même si celle-ci peut s'effectuer au sein d'autres organes tels que le cerveau, les reins ou les intestins [57-59]. Les deux familles d'AGPI, n-3 et n-6, empruntent la même voie de biosynthèse, qui est une succession de réactions de désaturation, d'élongation et de rétroconversion peroxysomale selon les AGPI formés [60] (Figure 6).

Chez les mammifères, deux types de désaturation sont effectués dans la voie de biosynthèse des AGPI, la $\Delta 6$ et la $\Delta 5$ - désaturation. La $\Delta 6$ -désaturation est réalisée par la $\Delta 6$ -désaturase (FADS2), qui introduit une double liaison entre les carbones 6 et 7 de LA et ALA. La $\Delta 5$ -désaturation est réalisée par la $\Delta 5$ -désaturase (FADS1), qui introduit une double liaison entre les carbones 5 et 6 de l'acide dihomog- γ -linolénique (DGLA, 20:3n-6) et du 20:4 n-3.

Pour former des AG à très longue chaîne (jusqu'à 24 carbones) possédant 5 ou 6 doubles liaisons, les AGPI à 20 carbones, tels que l'acide arachidonique (AA, 20:4 n-6) et l'acide éicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3), les AGPI subissent successivement deux élongations et sont ensuite β -oxydées par le peroxysome pour former l'acide docosapentaénoïque (22:5 n-6) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3).

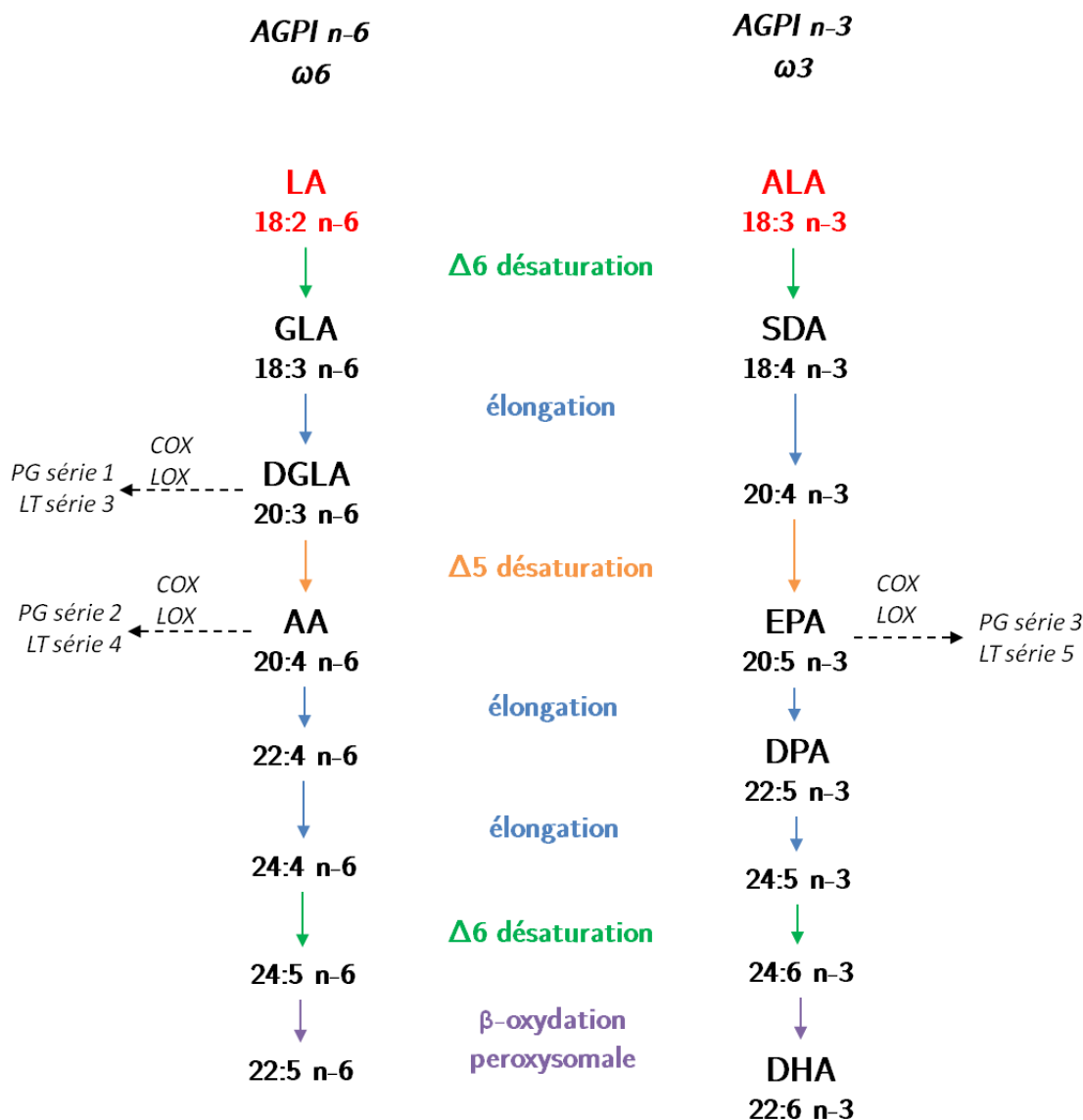


Figure 6 : Biosynthèse des AGPI des séries n-6 et n-3 chez les mammifères.

En rouge, les deux AG précurseurs de la synthèse des AGPI, l'acide linoléique (LA) et l'acide α -linoléique (ALA). La famille des n-6 est composée de LA, de l'acide γ -linoléique (GLA), de l'acide dihomog γ -linoléique (DGLA) et de l'acide arachidonique (AA). Ces deux derniers donnent naissance aux prostaglandines (PG) des séries 1 et 2, et aux leucotriènes (LT) des séries 3 et 4 majoritairement pro-inflammatoires et pro-agrégants, par l'intermédiaire des cyclooxygénases (COX) et des lipoxygénases (LOX). La famille des n-3 est composée de l'ALA, de l'acide stéridonique (SDA), de l'acide eicosapentaénoïque (EPA), de l'acide docosapentaénoïque (DPA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA). L'EPA, par l'intermédiaire des COX et LOX, produit des écosanoïdes PG et LT dans l'ensemble anti-inflammatoire, d'où l'importance des AGPI dans l'organisme.

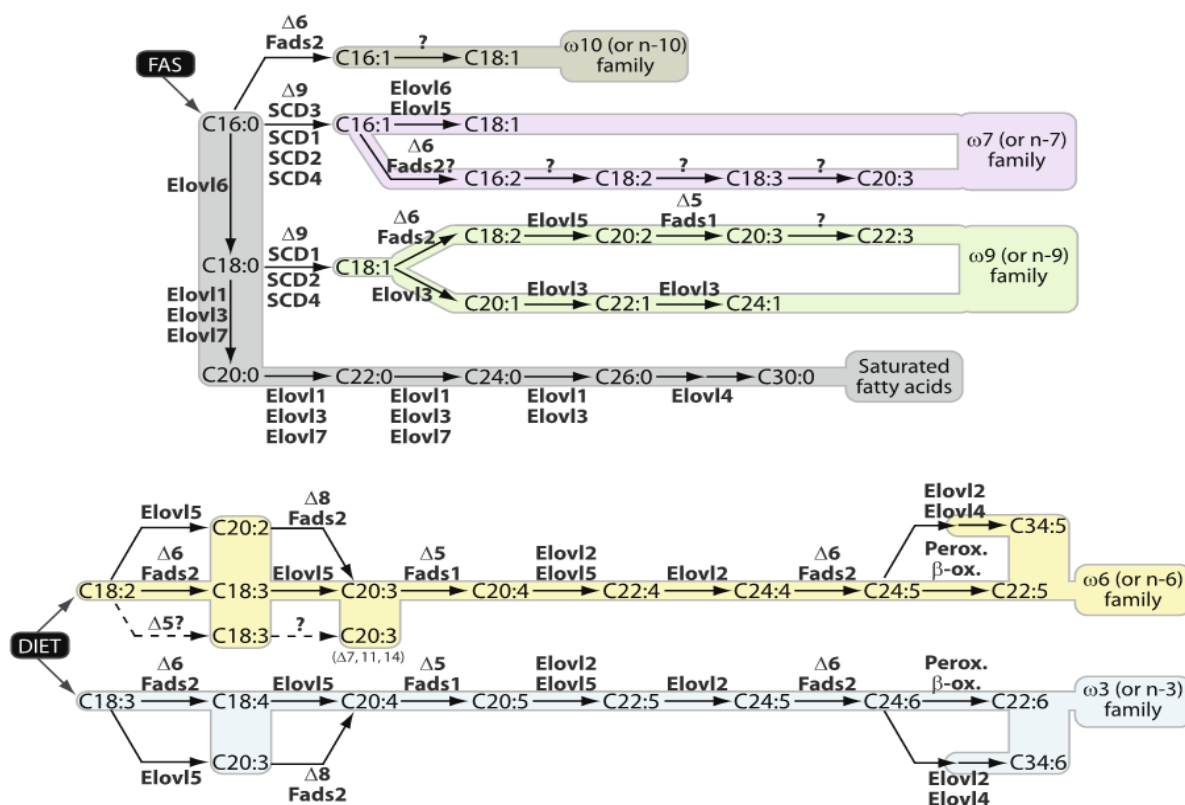


Figure 7 : Biosynthèse des AG à longue chaîne et très longue chaîne chez la souris.

L'acide palmitique (16:0) issu de la FAS (*Fatty Acid Synthase*) est à l'origine des AG à longue chaîne et à très longue chaîne de la famille des n-10, n-7 et n-9. Les familles n-3 et n-6 ne sont synthétisés qu'à partir de l'apport alimentaire (DIET) des précurseurs 18:2 n-6 et 18:3 n-3. Les différentes enzymes nécessaires à la synthèse des différents AG de ces voies de biosynthèse sont les désaturases (SCD et FADS) et les élongases (ELOVL). D'après Guillou *et al.* [55].

L'élongation des AG, consiste en l'ajout de deux carbones apportés par un malonyl-CoA via les élongases (ELOVL, *ELongation Of Very Long chain fatty acid*) [55], présentes au niveau du RE (Figure 7). Chez les mammifères, sept ELOVL ont été identifiées, dont les ELOVL 1, 3, 6 et 7 utilisant préférentiellement les AGS et les AGMI comme substrat et les ELOVL 2, 4, et 5 étant sélectives des AGPI [55]. Les gènes *ELOV1*, 5 et 6 sont exprimés de manière ubiquitaire, alors que *ELOVL 2*, 3, 4 et 7 ont une expression tissu spécifique.

3. Altération du métabolisme des lipides et cancer

Au cours de la cancérogenèse de nombreuses voies de signalisation sont altérées, favorisant ainsi la prolifération cellulaire, et modifiant le métabolisme cellulaire dont la lipogenèse. Cette induction de la lipogenèse apparaît essentielle à la prolifération de la cellule cancéreuse. Il a été mis en évidence que ces altérations s'accompagnaient de modifications de la composition en lipides des tumeurs et du niveau d'expression des enzymes de la synthèse des AG.

3.1 Les voies de signalisation, prolifération, et lipogenèse dans la cellule cancéreuse

3.1.1 Rôle de *BRCA1*

La coordination entre le métabolisme et le cycle cellulaire est un point important pour la prolifération cellulaire. Au cours du cycle cellulaire, il existe différents mécanismes de synchronisation du métabolisme avec la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, notamment la protéine BRCA1. Mutée dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein et de l'ovaire, elle est responsable d'un maintien de l'expression d'ACC active/non phosphorylée, d'une augmentation de la synthèse *de novo* des AG et d'une prolifération cellulaire accrue [61-63]. En effet, le gène *BRCA1*, connu pour être un gène suppresseur de tumeur, code la protéine BRCA1, qui interagit avec la forme phosphorylée/inactive d'ACC et prévient sa déphosphorylation. Ainsi BRCA1 régule la lipogenèse, en limitant la synthèse *de novo* des AG. Le complexe BRCA1/ACC régulé par les CDK au cours du cycle cellulaire permet de moduler la lipogenèse en fonction du cycle. Les mutations de *BRCA1* altèrent la formation du complexe BRCA1/ACC, ce qui rend ACC sujette à la déphosphorylation, donc au maintien de son activité [61-63].

3.1.2 Rôle des voies des facteurs de croissance

Par ailleurs, une augmentation de la teneur en facteurs de croissance (e.g. EGF) dans l'environnement de la cellule tumorale peut être à l'origine de la surexpression des enzymes de la lipogenèse dans les cellules cancéreuses [64]. Des altérations des voies

de signalisation de ces facteurs de croissance telles que la voie des MAPK, la voie PI3K/Akt et la voie de l'AMPk (*AMP-activated kinase*) en sont également responsables [64-68]. En effet, dans les cancers hormono-sensibles, tels que le cancer du sein, de l'endomètre, des ovaires et de la prostate, on observe une suractivation des voies PI3K/Akt et MAPK ainsi qu'une forte expression des enzymes de la lipogenèse telles que FAS [69].

La surexpression hépatique de la voie PI3K/Akt chez la souris induit une forte augmentation du taux de tumeurs spontanées, et de la lipogenèse [70, 71]. L'augmentation de la lipogenèse est concomitante avec l'expression de certains facteurs de transcription des enzymes de la lipogenèse, PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) [71], LXR β (*Liver X Receptor*), de SREBP1 et de SREBP2 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) [70]. Les tumeurs hépatiques spontanées développées chez les souris transgéniques *Pi3kca*, porteuses de la mutation N1068fs*4, qui surexpriment de manière constitutive la PI3K dans le foie, présentent un enrichissement en acide palmitique (16:0) et en acide oléique (18:1 n-9). L'acide oléique est connu pour réguler l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN, inhibiteur de la voie PI3K/Akt, via l'induction de micro-ARN, miR-21 dans les hépatocytes [72].

Akt, au cœur de cette voie de signalisation, est impliquée dans de nombreux mécanismes. Akt exerce notamment un contrôle sur le cycle cellulaire avec les cyclines et les CDK, via l'inactivation de la protéine Rb par phosphorylation. La protéine Rb régule négativement l'activité des facteurs de transcription de la famille des E2F impliqués dans la transcription d'un grand nombre de gènes associés à la prolifération cellulaire et dans le contrôle du passage de la phase G₁ à S du cycle cellulaire [73]. L'inactivation de Rb par Akt permet à E2F1 d'induire l'expression des enzymes lipogéniques et contribue à la prolifération cellulaire dans les médulloblastomes de souris [74]. Akt est également nécessaire à la traduction de Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*), une protéine impliquée dans la dégradation de p27 et de p21, ainsi elle permet l'activation des cyclines et la progression des cellules cancéreuses en G₂ et en mitose dans le cycle cellulaire [75]. De plus, il a été montré dans les hépatocarcinomes, qu'Akt était impliquée dans la régulation de la stabilité

de FAS, enzyme de la synthèse *de novo* des AG, et de SREBP, facteur de transcription des enzymes de la lipogenèse via une induction de l'expression de USP2a (*Ubiquitin-Specific Protease 2a*) augmentant leur stabilité. Akt régule négativement la GSK3 β , nécessaire à la formation du complexe de dégradation de SREBP avec CDC4 [70]. Ceci induit un maintien de l'expression de FAS et de SREBP en inhibant leur dégradation par le protéasome dans les cellules cancéreuses. Akt active aussi la voie mTOR, qui induit la lipogenèse via l'induction de l'expression de SREBP dans les mélanomes [76], et la prolifération cellulaire dans le cancer de la prostate *in vitro* et *in vivo*, par induction de l'expression des récepteurs aux androgènes, augmentation de la lipogenèse et production de ROS promoteurs de tumeurs [77]. Cet axe de signalisation, PI3K/Akt/mTOR apparait altéré dans un grand nombre de cancers dont le cancer colorectal et le cancer de la prostate.

Lors du cancer de la prostate, la voie LKB1-AMPk fait un lien entre la prolifération cellulaire et le métabolisme énergétique [78]. En effet, l'AMPk est le senseur énergétique de la cellule, sous forme active/phosphorylée, elle est suppresseur de tumeur par inhibition de la voie mTOR conduisant à un arrêt du cycle cellulaire [78]. Il apparait que l'AMPk soit fortement réprimée dans les hépatocarcinomes, suggérant une levée du contrôle de l'axe PI3K/Akt/mTOR favorisant ainsi prolifération cellulaire et lipogenèse.

Il existe donc une relation entre la lipogenèse et la prolifération des cellules cancéreuses même si tous les mécanismes ne sont pas clairement élucidés.

3.2 Altération de la composition lipidique dans les cancers

Dans des conditions physiologiques, l'apport majeur d'AG est d'origine alimentaire tandis que la synthèse *de novo* reste faible dans l'ensemble des organes à l'exception du foie et du tissu adipeux qui régulent l'homéostasie lipidique. De ce fait, les enzymes de la lipogenèse sont faiblement exprimées dans la plupart des tissus, à l'exception des organes lipogéniques à l'état adulte et au cours de l'embryogenèse qui répondent à des signaux physiologiques. La synthèse *de novo* des AG est très active au cours de l'embryogenèse. A l'âge adulte, elle est restreinte aux périodes de lactation et au cours du cycle utérin [79].

Au cours de la carcinogenèse, il apparaît que 95% des AG proviennent de la synthèse *de novo* dans les cellules cancéreuses, en dépit d'un apport abondant en AG extracellulaires [80-85]. De plus, la synthèse *de novo* des AG privilégie la synthèse des AGS et des AGMI au détriment des AGPI [86]. Cette modification est observée dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal, avec une accumulation des acides palmitique et oléique [80, 87-91].

Dans la cellule cancéreuse, les AGS et les AGMI, issus de la synthèse *de novo*, entrent dans la composition de lipides plus complexes tels que les phospholipides, les triacylglycérols et les esters de cholestérol, pour répondre aux besoins liés à sa prolifération. Une augmentation de la teneur en phospholipides a été rapportée dans les lésions néoplasiques colorectales chez l'homme [92] et les tumeurs mammaires chez la souris [93]. Une surexpression de la choline kinase, première enzyme de la synthèse des phosphatidylcholines (PC) est observée dans plusieurs cancers [79]. Il a été montré que les fibroblastes transformés par l'oncogène *ras* présentent un enrichissement en acides phosphatidiques, en diacylglycérols et en céramides [94]. Hilvo *et al.* ont montré, sur 257 échantillons de cancer du sein, un enrichissement des tumeurs en PC, en phosphatidyléthanolamines, en phosphatidylinositols, en sphingomyélines et en céramides [95]. La teneur en triacylglycérols reste quant à elle inchangée par rapport au tissu sain. Ces auteurs ont montré qu'un enrichissement en PC(32:0)=PC(16:0/16:0), PC(32:1) et en PC(32:2) était associé à un mauvais pronostic de survie des patients. De plus, ils ont montrés qu'ACC, SCD-1 et SREBP1 étaient très fortement exprimées dans ces échantillons ce qui suggère un lien entre la synthèse des AGS et des AGMI, et le profil des phospholipides retrouvés dans les échantillons de cancers mammaires [95]. Oraldi *et al.*, ont montré une diminution générale de la teneur en AGPI des phospholipides des tumeurs coliques comparées à la muqueuse saine, avec un appauvrissement significatif en acide linoléique (18:2) et en acide arachidonique (20:4), principaux AGPI des phospholipides membranaires [96]. A l'inverse, ils observent une augmentation significative de la teneur en AGS et en AGMI dans les tumeurs coliques [96].

3.3 Altération de l'expression des enzymes de la lipogenèse dans le cancer

La composition lipidique des tumeurs, avec un enrichissement en 16:0, 18:0, 16:1 et 18:1, suggère une augmentation de l'expression des différentes enzymes de la lipogenèse, en particulier d'ACC, FAS et SCD-1, afin de pourvoir les lipides complexes en AG. En effet, on observe une augmentation de l'expression d'ACC, FAS et SCD dans un grand nombre de cancers [64, 97-99].

La surexpression d'ACC a été mise en évidence tant au niveau de l'ARNm que de la protéine dans de nombreuses lésions pré-néoplasiques et dans les carcinomes avancés chez l'homme [97].

A partir de 1994, FAS a été identifiée comme un marqueur du cancer du sein chez la femme [99]. La surexpression de FAS a été rapportée dans un grand nombre de lésions pré-néoplasiques et de cancers épithéliaux du sein, de la prostate, du côlon, de l'ovaire, de l'œsophage, de l'estomac, du poumon, de la langue, de la bouche, et de la thyroïde [79, 100].

Dernièrement il a été montré que SCD-1 était fortement exprimée dans différents cancers chez l'homme et dans des modèles animaux, dans des tumeurs chimioinduites ou chez la souris susceptibles de développer un cancer, notamment du sein, de la prostate, des poumons, des ovaires et du foie [86, 101-107]. La transformation de fibroblastes par l'oncogène SV40 (*Simian Virus 40*) induit une augmentation de l'expression de *SCD-1* comparée aux cellules normales [108]. Ceci suggère une relation positive entre l'expression de SCD-1 et la progression cancéreuse. Nous avons étudié l'expression de l'ARNm *SCD-1* dans des échantillons de tissus péri-tumoraux et tumoraux issus de la chirurgie de huit patients atteints d'un cancer colique. On observe pour sept d'entre eux une augmentation de son expression, analysée par RT-qPCR, par rapport au tissu péri-tumoral variable en fonction des patients (Figure 8).

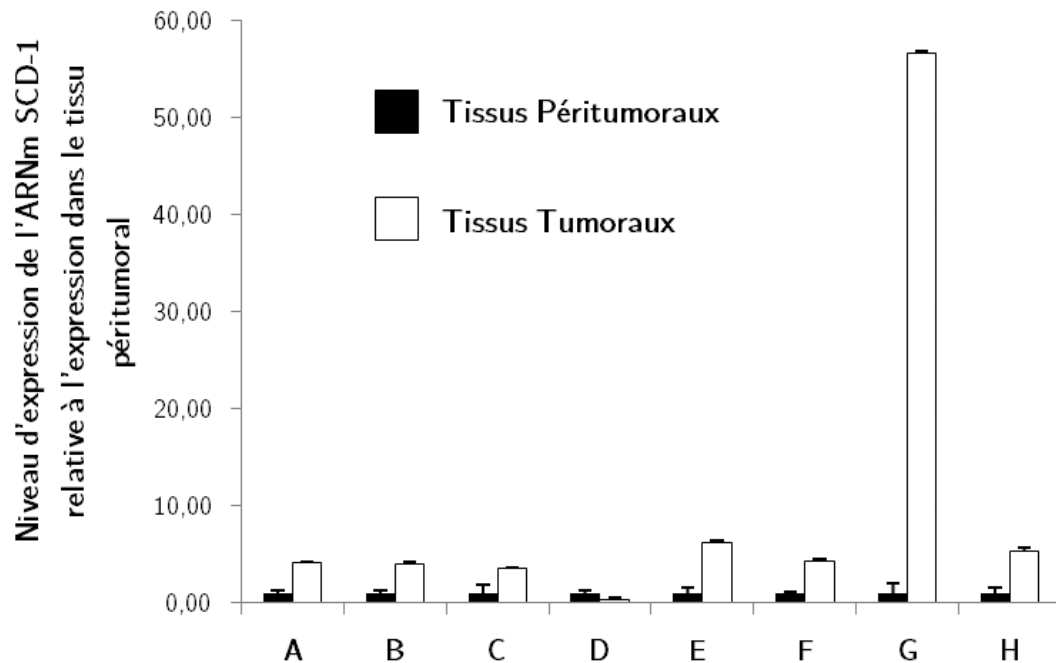


Figure 8 : Expression de l'ARNm *SCD-1* dans huit tumeurs coliques humaines. Expression évaluée par RT-qPCR, relative à l'expression dans le tissu péri-tumoral.

La lipogenèse est donc un élément clé dans la prolifération cellulaire cancéreuse. L'analyse de la composition lipidique des tumeurs révèle un enrichissement en AG et tout particulièrement en AGMI. Cette composition en acide gras est corrélée au niveau d'expression des enzymes de la biosynthèse des AGMI, ACC, FAS et SCD-1.

4. La Stéaroyl-CoA Désaturase

4.1 Généralités

4.1.1 La stéaroyl-CoA désaturase: enzyme du métabolisme des AGMI

SCD est l'enzyme limitante de la biosynthèse des AGMI. Elle catalyse l'insertion d'une double liaison en position *cis* entre les carbones 9 et 10 des acides gras saturés. Elle nécessite la présence du NADPH, du cytochrome b₅, de la cytochrome b₅ réductase, et d'une molécule de dioxygène (Figure 9). Les substrats préférentiels de SCD sont l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0), qui sont convertis en acide palmitoléique (16:1 n-7) et en acide oléique (18:1 n-9) respectivement [109, 110]. Elle assure aussi la désaturation des AGS du 12:0 au 18:0 [109]. Les AGMI ainsi produits sont intégrés dans les lipides complexes, les phospholipides (PL), les triglycérides (TG), les diacylglycérols, et les esters de cholestérol (EC) (Figure 10). La majorité des PL possède un AGS greffé sur le carbone 1 et un AG insaturé sur le carbone 2. L'AGS greffé en position C1 est souvent un acide palmitique (16:0) ou stéarique (18:0). L'AG insaturé en position C2 est souvent un AG à longue chaîne avec une ou plusieurs insaturations, tels que l'acide oléique (18:1), le LA (18:2 n-6), l'AA (20:4 n-6) et le DHA (22:6 n-3). SCD apparait importante dans la régulation de la synthèse des PL, des TG et des EC. En effet, une déficience en activité SCD dans des cellules cancéreuses pulmonaires induit des altérations de la synthèse de ces lipides et des modifications de la composition en AG des PL, TG et EC [111-113].

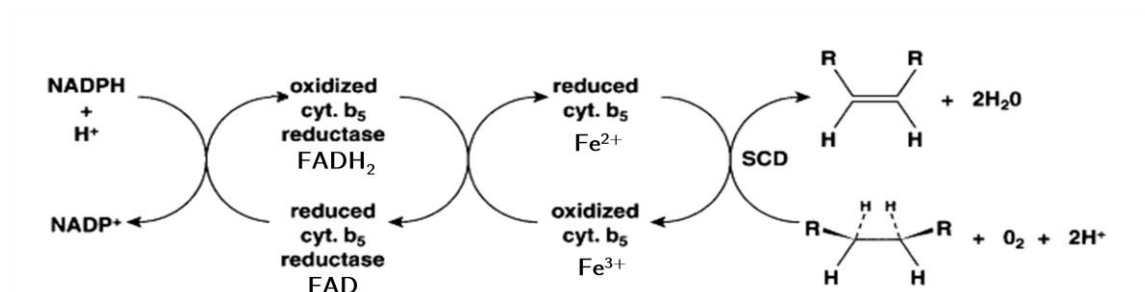


Figure 9 : Insertion d'une double liaison par la SCD.

SCD catalyse l'insertion d'une double liaison en position *cis* entre les carbones 9 et 10, qui implique différents cofacteurs, le NADPH, la cytochrome b₅ réductase et le cytochrome b₅ nécessaire pour le transport des électrons. La réaction de désaturation est une réaction

oxydative qui nécessite une molécule de dioxygène et deux électrons, bien que le dioxygène ne soit pas incorporé dans l'AG mais forme une molécule d'eau. D'après Ntambi [114].

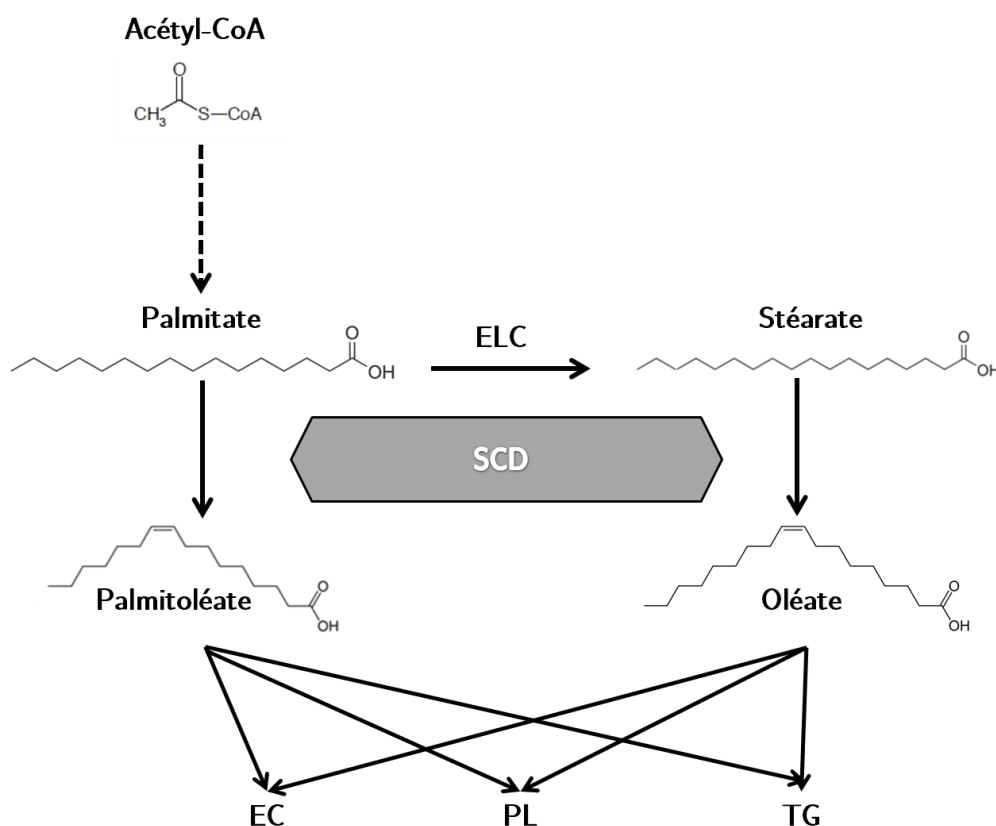


Figure 10 : Rôle de SCD1 dans la synthèse des lipides.

EC : ester de cholestérol, TG : triglycéride, PL : phospholipides, SCD : Stéaroyl-CoA Désaturase, ELC : élongase à longue chaîne. D'après Ntambi et Miyazaki, [115].

4.1.2 Isoformes de la Stéaroyl-CoA Désaturase

Les gènes *SCD* ont été clonés dans différentes espèces, dont la levure *C. elegans*, la drosophile, le mouton, le hamster, le rat, la souris et l'homme [116-123].

Chez la souris, quatre isoformes ont été mise en évidence, SCD-1, SCD-2, SCD-3 et SCD-4. Ces différentes isoformes partagent entre 85 et 88% d'homologie de séquence en acide aminés. Chez la souris, les gènes *SCD* sont localisés sur le chromosome 19 et codent des transcrits d'environ 4,9 kb. Dans des conditions normales de régime, l'ARNm *SCD-1*, est fortement exprimé dans le tissu adipeux blanc, le foie, les glandes de meibomius, les glandes de Harder et la glande prépucciale. Son expression est fortement induite dans le foie et le cœur en réponse à un régime riche en glucides. SCD-2 est exprimée principalement dans le cerveau, et au cours du développement.

Tout comme SCD-1, l'expression de l'ARNm *SCD-2* est faible dans les reins, la rate, le cœur et les poumons, mais elle peut être induite par un régime hyperglucidique. Les isoformes SCD-3 et SCD-4 semblent exclusivement être exprimées dans la peau et le cœur, respectivement [124]. Les différentes isoformes de SCD ne possèdent pas la même capacité à désaturer l'acide palmitique et stéarique. En effet, ces deux AG sont les substrats de SCD-1, SCD-2 et SCD-4, tandis que SCD-3 utilise préférentiellement l'acide palmitique [125].

Chez le rat, seules deux isoformes ont été caractérisées, SCD-1 et SCD-2. Elles possèdent une répartition tissulaire similaire et une homologie de séquence similaire à celles de la souris.

Chez l'homme, deux isoformes de SCD sont retrouvées, SCD-1 et SCD-5. SCD-1 est exprimée de manière ubiquitaire à des niveaux variables selon les tissus, et l'expression de SCD-5 est quant à elle réduite au cerveau et au pancréas à l'âge adulte, et exclusivement au cerveau chez le fœtus. SCD-1 est fortement exprimée dans le foie. Le gène *SCD-1* est situé sur le chromosome 10 et s'étend sur 24 kb comprenant 6 exons. Il donne lieu à la synthèse de deux transcrits de 3,4 et 2,8 kb qui résultent de deux signaux de polyadénylation différents. La fonction de la polyadénylation est peu connue, mais elle pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la stabilité ou de la traduction [110]. Le chromosome 17 porte un pseudogène *SCD-1*, qui est transcriptionnellement inactif. Le gène codant SCD-5, *ACOD4*, se situe sur le chromosome 4 et s'étend sur 169 kb. SCD-5, comme SCD-1 peut jouer un rôle dans la prolifération cellulaire [126].

4.1.3 Structure de la Stéaroyl-CoA Désaturase

La Stéaroyl-CoA Désaturase-1, SCD-1, est une protéine de 37kDa, ancrée dans la membrane du RE. Elle est constituée de quatre domaines transmembranaires avec les extrémités -NH₂ et -COOH terminales orientées vers le cytosol (Figure 11).

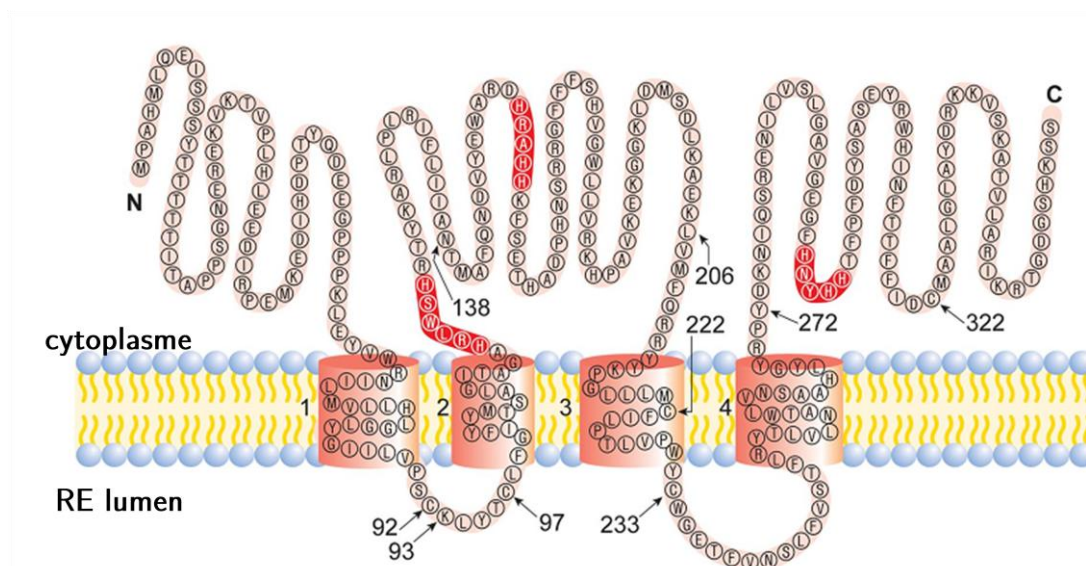


Figure 11 : Modèle de la topologie membranaire de SCD-1 chez la souris.

Les résidus en rouge représentent les régions histidine conservées, essentielles au site catalytique. N et C représente les extrémités –NH₂ et –COOH terminales. RE : réticulum endoplasmique. D'après Man *et al.* [127].

La boucle cytoplasmique, et l'extrémité -COOH terminale, contiennent huit résidus histidine, formant des boîtes His, capable de lier le fer dans le centre catalytique de la désaturase. Les deux boucles dans la lumière du RE sont relativement plus petites comparées à la boucle cytoplasmique [124].

4.2 Régulation de la Stéaroyl-CoA Désaturase-1

4.2.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression de *SCD-1*

De nombreux facteurs, environnementaux dont alimentaires et hormonaux régulent l'expression de SCD-1 (Tableau 1) [115]. Les régimes hyperglucidiques, l'insuline, le glucose et le fructose, le cholestérol, le froid, la lumière, quelques xénobiotiques tels que les proliférateurs de peroxysomes (les fibrates e.g. le clofibrate et le gemfibrozil), et les agonistes de LXR (22(R)-hydroxycholestérol et l'acide 9*cis* rétinolique) sont des inducteurs de l'expression de *SCD-1* au niveau hépatique. A l'inverse, les AGPI de la famille des n-3 et n-6, les acides gras conjugués de l'acide linoléique (CLA, *Conjugated Linoleic Acid*), le TNF α , les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, inhibent son expression hépatique.

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la régulation de la Stéaroyl-CoA Désaturase-1 [115].

Facteurs Alimentaires	Facteurs Hormonaux	Autres Facteurs
▲ Glucose	▲ Insuline	▲ Peroxysome
▲ Fructose A	▲ Hormones de croissance	▲ Température
▲ Vitamine A	▲ Œstrogènes	▲ Fer
▲ Cholestérol	▲ Androgènes	▲ Agoniste de LXR
▲ Vitamine D	▼ Leptine	▲ TGF- β
▼ AGPI	▼ Glucagon	▲ Lumière
▲▼ Alcool	▼ Hormones thyroïdiennes	▲ β -amyloïde
▲▼ Acide conjugué linoléique	▲▼ Déhydroépiandostérone	▼ Thiazolidinédiones
		▼ Cadmium
		▼ TNF- α

La régulation de *SCD-1* est diverse et son expression affecte un grand nombre de fonction physiologique, dont la sensibilité à l'insuline, les niveaux métaboliques, l'adiposité, l'athérosclérose et le cancer.

Le promoteur *SCD-1* a été caractérisé dans de nombreuses espèces dont la souris, l'homme, le poulet, l'oie et les bovins [128]. De nombreux facteurs de transcription se lient au promoteur *SCD-1* suggérant une régulation fine de son expression. Ces facteurs de transcription incluent SREBP-1c, LXR, les PPAR mais aussi C/EBP- α (*CCAAT-Enhance Binding Polymerase II*), NF-1, NF-Y (*Nuclear Factor 1/Y*), AP-1 (*Activated Protein-1*), SP1 (*Specificity Protein 1*), TR (*Triiodothyronine receptor*) et PGC1- α [128].

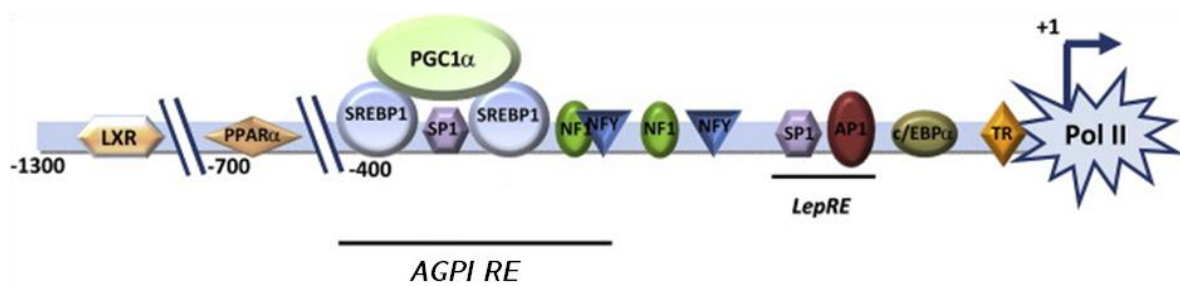


Figure 12: Diagramme du promoteur de SCD-1.

Ce diagramme représente les différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation de *SCD-1* conservés entre les espèces (homme, souris ou poulet). LXR : *Liver X Receptor*, PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 α* , NF-1/Y : *Nuclear Factor 1/Y*, AP-1 : *Activated Protein-1*, C/EBP : *CAAT/Enhance Binding Polymerase II*, AGPI RE : élément de réponse aux AGPI, TR : *Triiodothyronine receptor*, LepRE : élément de réponse à la leptine. D'après Mauvoisin *et al.* [128].

4.2.1.1 Régulation de SCD-1 par SREBP

L'expression de *SCD-1* est induite par le facteur nucléaire SREBP-1 via son élément de réponse SRE sur le promoteur. Il existe deux isoformes de SREBP-1, SREBP-1a et -1c, qui résultent d'épissages alternatifs différents du même gène. Ces deux isoformes sont impliquées dans la régulation des gènes de la biosynthèse des AG. SREBP-2 semble quant à lui impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Les facteurs de transcription SREBPs sont synthétisés sous forme immature de 125 kDa associée à la membrane du RE. Pour être actif, le précurseur de SREBP doit être libéré de la membrane du RE. Cette activation a lieu par clivage protéolytique qui se déroule en deux temps et fait intervenir trois protéines. SCAP (*SREBP Cleavage-Activating Protein*) lie l'extrémité -COOH terminale de SREBP, elle a pour rôles l'escorte de SREBP du RE à l'appareil du Golgi et de senseur aux stérols. Au niveau de l'appareil du Golgi, les protéases site 1 et site 2, clivent la protéine SREBP en deux sites, formant ainsi un facteur de transcription actif de 65 kDa avec une topologie hélice-boucle-hélice. Le facteur SREBP mature est par la suite transloqué au noyau, où il prend sa fonction de facteur de transcription [124]. SREBP-1c, activateur transcriptionnelle d'*ACC*, *FAS* et *SCD-1*, est induit par de nombreux facteurs dont l'insuline, le glucose et le fructose [129]. Il a été montré que les tumeurs humaines de la prostate présentent un taux élevé de SREBP-1 [77, 130]. En effet SREBP-1 est impliqué dans la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses, notamment de la prostate, et est associé à l'agressivité de la tumeur [77].

4.2.1.2 Régulation de SCD-1 par LXR

LXR régule l'expression de *SCD-1* par fixation sur son élément de réponse au niveau du promoteur *SCD-1*, le LXL-RE [131]. Il existe deux isoformes, LXR α et LXR β . Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones, et forment des hétérodimères avec les récepteurs X aux rétinoïdes (RXR), et lie des ligands spécifiques comme les oxystérols. La liaison du ligand sur ces facteurs de transcription induit la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol, mais aussi dans le métabolisme lipidique, en particulier *SCD-1*. Un agoniste synthétique de LXR, le TO-901317, induit une augmentation de l'expression de *SCD-1* chez la souris au niveau du foie et dans les cellules aortiques

humaines [131, 132]. Les agonistes de LXR synthétiques, TO-901317 et GW3965, et naturels, 22(R)-hydroxycholestérol et 24(S)-hydroxycholestérol, outre leur rôle dans la régulation de *SCD-1*, inhibent pourtant la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses humaines dont les cellules de prostate, du sein, du côlon, du poumon, des os, de la peau, du foie, des ovaires et les leucémies [133]. En effet, ils semblent induire un arrêt du cycle cellulaire en G1 par inhibition de l'expression de Skp2 et des cyclines A2 et D1 et par augmentation de l'expression de p27^{Kip1} dans les cellules cancéreuses de la prostate et du sein [133].

4.2.1.3 Régulation de SCD-1 par les PPARs

Les PPARs sont une autre classe de facteurs de transcription qui interagit avec le récepteur nucléaire RXR. Il existe trois isoformes de PPARs. PPAR α est exprimé dans le foie, les reins, le cœur, les muscles, et le tissu adipeux, où il est responsable de l'induction des gènes de la lipolyse. PPAR β/δ est ubiquitairement exprimé et régule l'expression des gènes impliqués dans la β -oxydation. Et enfin PPAR γ est impliqué dans la différenciation adipocytaire et régule les gènes impliqués dans le stockage des lipides. Les antidiabétiques de la famille des thiazolidinédiones (Tableau 1), la rosiglitazone, la troglitazone et la pioglitazone, sont des ligands synthétiques de PPAR γ . Mais seule la troglitazone régule négativement l'expression de *SCD-1* au niveau du messager et de la protéine [124]. PPAR α et PPAR γ , sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire [134]. L'activation de PPAR γ par les thiazolidinédiones inhibe la prolifération, la différenciation des cellules cancéreuses gastriques, prostatiques et pancréatiques, induit l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires et inhibe l'expression de la cycline D1 impliquée dans la progression dans le cycle cellulaire [134]. Les agonistes de PPAR α exercent des effets protecteurs vis-à-vis de la promotion du cancer de la peau [134]. A l'inverse PPAR δ induit la prolifération cellulaire et la progression de certains types de cancers. PPAR δ pourrait être impliqué dans le cancer colorectal. En effet, il a été identifié comme une cible en aval de la voie APC suppresseur de tumeur, et a été retrouvé surexprimé dans beaucoup de cancers colorectaux [134].

4.2.1.4 Régulation de SCD-1 par les récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes font aussi partis des récepteurs nucléaires aux hormones. Il en existe deux isoformes, α et β . La liaison du ligand sur son récepteur conduit à la formation d'homo- ou hétérodimères ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$ ou $\alpha\beta$). Ils régulent ainsi un grand nombre de gènes, dont ceux impliqués dans le métabolisme des lipides. En effet, chez la souris KO pour le récepteur aux œstrogènes, ou chez la ratte ovariéctomisée où le 17 β -estradiol est absent, on retrouve une augmentation de l'expression des enzymes de la lipogenèse telles que SCD-1, liées à une augmentation de l'adiposité et à l'insulino-résistance [124].

4.2.1.5 Régulation de SCD-1 par les facteurs de croissance

SCD-1 est aussi sous contrôle positif des facteurs de croissance. En effet, par activation de la voie PI3K, PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), EGF, et FGF augmentent l'expression des enzymes lipogéniques dont SCD-1 via SREBP-1c et C/EBP α/δ [135-137]. TGF β stimule aussi l'expression de SCD-1 via une voie de signalisation dépendante de SMAD [138].

4.2.1.6 Régulation de SCD-1 par les AGPI

Les AGPI ont aussi un rôle dans la régulation de l'expression génique de SCD-1. En 1978, Jeffcoat et James ont montré une diminution de 60% l'activité hépatique de SCD-1 chez le rat nourri avec un régime contenant 60% d'acide linoléique (18:2 n-6) [139]. D'autres AGPI, comme l'AA (20:4 n-6), et l'EPA (20:5 n-3), induisent sur des hépatocytes de souris isolés ou chez l'animal une diminution en ARNm SCD-1 [140, 141]. D'une manière générale, les AGPI à longue chaîne 18:2 n-6, 18:3 n-3, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 22:6 n-3, répriment l'expression de SCD-1, de même que le *trans*10, *cis*12-CLA [114, 142].

Les études ciblant le mécanisme de régulation des gènes par les AGPI se basaient sur l'existence d'un élément de réponse putatif aux AGPI (AGPI-RE) en position *cis* sur le promoteur du gène. Le(s) facteur(s) de transcription putatif(s) liant les AGPI, ciblerai(en)t l'AGPI-RE sur le promoteur et régulerai(en)t la transcription de SCD-1.

En 1997, un AGPI-RE a été mis en évidence sur les promoteurs des gènes de *SCD* chez l'homme [143].

Des gènes comme *FAS* sont réprimés par des proliférateurs du peroxysome (liant les PPAR), et les AGPI. De cette constatation naît la spéculation que les PPRE, éléments de réponse aux PPAR, seraient aussi les AGPI-RE. Cette théorie a été réfutée à la suite d'études *in vivo* où les AGPI et les proliférateurs de peroxisomes ont montrés des effets opposés sur l'expression de *SCD-1* dans le foie. Par la suite, un PPRE a été identifié sur le promoteur de *SCD-1* dans une zone distincte de l'AGPI-RE [141].

Aujourd'hui, l'AGPI-RE situé sur le promoteur *SCD-1*, n'est pas un élément de réponse propre aux AGPI, mais il est formé d'un SRE, qui lie SREBP, et d'une boîte CCAAT liant le facteur nucléaire NF-Y[114, 144, 145] (Figure 12).

4.2.2 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de *SCD-1*

Il existe une séquence de motifs AUUUA dans la région 3' non codante du transcrit, qui serait une séquence de déstabilisation du transcrit en réponse à certains facteurs. Une séquence similaire sur l'ARNm *GLUT4* (*GLU*cose *T*ransporter *t*ype 4) a été mise en évidence, et induit sa dégradation en réponse à un traitement au TNF α [146].

L'AA (20:4 n-6) est connu pour réduire de 3 fois la demi-vie du messager de *SCD-1* dans les cellules 3T3-L1 adipocytaires [147]. Cette diminution est indépendante des produits du métabolisme de l'AA que sont les éicosanoïdes, car des inhibiteurs des cyclooxygénases, des lipoxygénases et des époxygénases, ne modifient pas la réponse des cellules à l'AA. En contraste, l'acide oléique et l'acide stéarique n'affectent pas la stabilité du transcrit.

4.2.3 Régulation post-traductionnelle de *SCD-1*

Un régime hyperglucidique induit de très forte augmentation de l'expression de *SCD-1*. Un retour à un régime normal, conduit à une baisse rapide du niveau d'expression de la protéine *SCD-1* et de son activité, sans affecter le niveau

d'expression du cytochrome b_5 , de la NADPH-cytochrome b_5 réductase [148, 149]. Ceci suggère une forte régulation post-traductionnelle du niveau de protéines présentes dans la cellule.

La demi-vie de la protéine SCD-1 est de 3 à 4h. La régulation de sa demi-vie est à la fois dépendante et indépendante du protéasome. Une séquence de quelques acides aminés à l'extrémité $-NH_2$ terminale a été mise en évidence comme étant responsable de la stabilité de la protéine. En effet, il apparaît que la suppression de cette séquence conduit à la stabilisation de l'enzyme. De plus, lorsque cette extrémité $-NH_2$ est orientée vers la lumière du RE, au lieu d'être dans le cytosol (Figure 11), la dégradation de la protéine n'a plus lieu. Il apparaît donc que l'extrémité $-NH_2$ terminale soit le signal pour une dégradation rapide de la protéine. Cette séquence implique le système ubiquitine-protéasome dans la dégradation de SCD-1 [150, 151]. Cette extrémité $-NH_2$ terminale présente des résidus lysine qui sont des éléments de reconnaissance du système d'ubiquitylation avant dégradation par le protéasome [152]. La machinerie ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*) est un ensemble de protéines présent dans la lumière du RE, à la membrane du RE et dans le cytosol, qui permet la translocation des protéines du RE et les protéines malformées en cours de maturation dans le RE vers le système ubiquitine/protéasome qui se situe dans le cytosol [153]. La synthèse du cholestérol et des AGMI régulent cette voie de dégradation des protéines. En dehors du protéasome, il existe une endopeptidase microsomale de type plasminogène, qui dégrade sélectivement SCD-1 [154]. On ne connaît pas à ce jour, le contexte cellulaire qui conditionne la dégradation de SCD-1 par l'une ou l'autre de ces voies.

4.2.4 Régulation allostérique de SCD-1

Afin de supprimer l'activité de SCD-1, de nombreuses approches ont été développées dont les inhibiteurs de l'activité de SCD-1. Ils régulent l'activité de SCD-1 de manière allostérique. L'utilisation des inhibiteurs de SCD-1 ont permis de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques d'abord vis-à-vis de l'obésité, puis des maladies cardiovasculaires et du cancer. Parmi ces inhibiteurs nous pouvons citer les dérivés de la famille des azines (pyridazine, pyrazine, piperidine), d'acide tétrazoléacétique,

des ptéridinones, des pyrazolyls [155]. Dans ce travail nous avons utilisé deux inhibiteurs de SCD-1, le CVT-11127 et le MF-438 [156, 157]. Le CVT-11127 (N-(2-(6-(3,4-dichlorobenzylamino)-2-(4-methoxyphenyl)-3-oxopyrido[2,3-b]pyrazin-4(3H)-yl)ethyl) acetamide) est un dérivé des pyrazines et le MF-438 est un dérivé hétérocyclique des pyridazines (Figure 13).

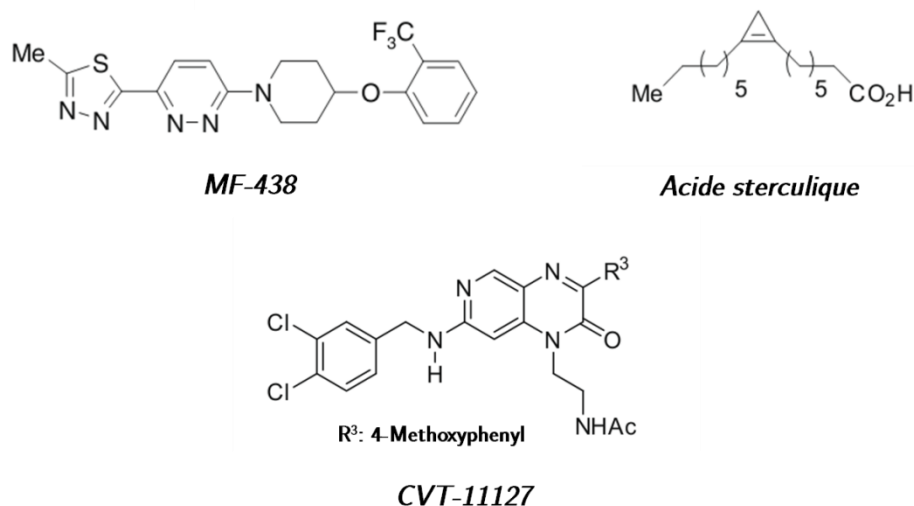


Figure 13 : Inhibiteurs de la SCD-1.

Certains AG insaturés sont des inhibiteurs naturels de SCD-1. L'acide sterculique isolé des graines de *Stercula Foetida*, les thio-AG, analogues des AG, synthétiques, avec un atome de soufre à la place de la fonction méthyle terminale tels que l'acide 9-thiostéarique [158], sont les premiers inhibiteurs naturels à être mise en évidence (Figure 13).

Certains CLA ont un effet inhibiteur de l'activité de SCD-1, par liaison sur le site actif, en particulier le *trans*10,^{cis} 12 –CLA [155, 159, 160], dont nous avons étudié les effets sur la survie des cellules cancéreuses coliques.

4.3 Régulation du métabolisme des lipides par SCD-1

L'expression endogène de SCD-1 et la synthèse des AGMI sont largement reconnus comme étant essentiels aux fonctions physiologiques de la cellule eucaryote. En effet, il a été montré que les souris *Asébia*, porteuse d'une mutation naturelle de SCD-1, présentent en particulier une diminution de la lipogenèse, de la synthèse des TG et

des EC, une augmentation de l'oxydation des AG qui s'accompagne d'une réduction de la masse grasse et de la sensibilité à l'insuline [161, 162].

En temps normal, un régime hyperglucidique chez la souris ou le rat induit une forte augmentation de l'expression hépatique de *SCD-1* via l'activation de SREBP-1c induite par l'insuline. De cette activation résulte une augmentation de la synthèse des AGMI et des TG hépatiques (Figure 14). Chez la souris *SCD-1*^{-/-} sous régime hyperglucidique et hypolipidique, le processus de maturation de SREBP-1c est altéré. Cela conduit à une absence de l'induction de la lipogenèse, et à une accumulation du cholestérol, qui ne peut plus être estérifié. Ces modifications ont des conséquences sur la composition et la clairance des lipoprotéines LDL et VLDL (respectivement *Low Density Lipoprotein* et *Very Low Density Lipoprotein*). [124, 163, 164] La souris *SCD-1*^{-/-} présente également une augmentation du niveau de la β -oxydation via une augmentation de l'expression des différentes enzymes impliquées dans la β -oxydation, comme l'acyl-CoA oxydase, la déshydrogénase des acyl-CoA à longue chaîne et la carnitine palmitoyl-transférase I [165].

D'une manière générale, le mécanisme moléculaire reliant la déficience en *SCD-1* à une augmentation de la β -oxydation et à une abolition de la lipogenèse reste très peu compris. Cependant, l'activation de l'AMPk semble être impliquée dans le foie et le muscle [166, 167]. L'activation de l'AMPk par phosphorylation, inactive ACC. Il en résulte une diminution du taux de malonyl-CoA. Ce dernier entre dans la synthèse *de novo* des AG et est un inhibiteur allostérique de la carnitine palmitoyltransférase-1, impliquée dans le transport des AG au travers de la membrane mitochondriale en vue de son oxydation [167]. Une inhibition de *SCD-1* ou déficience chronique par KO dans des cellules cancéreuses pulmonaires et mammaires sont connues pour activer l'AMPk et inactiver ACC conduisant à une baisse de la lipogenèse [111]. (Figure 14).

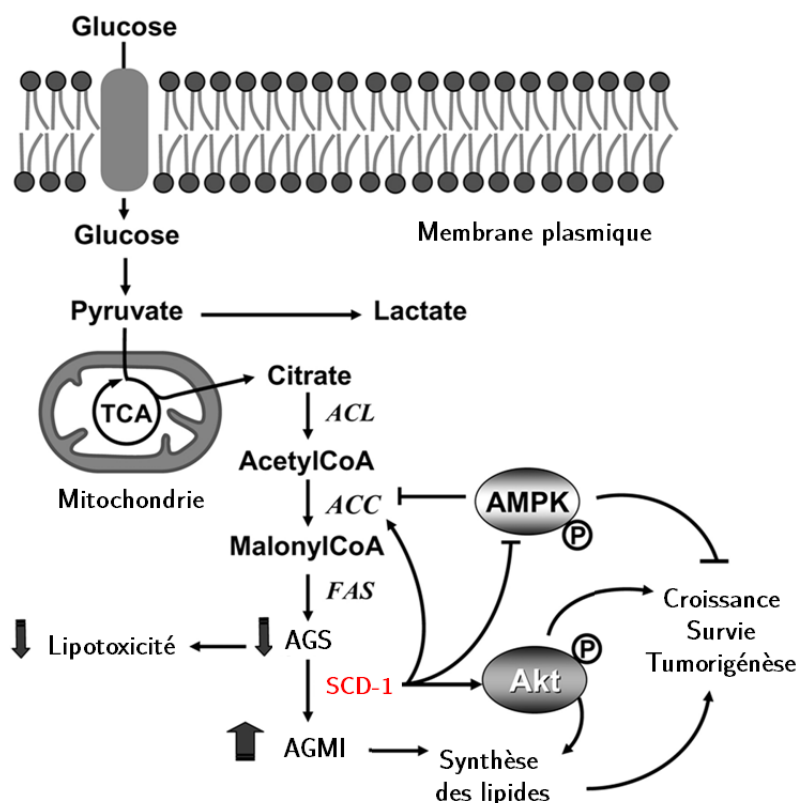


Figure 14 : Régulation du métabolisme et des voies de signalisation par SCD-1 dans les cellules cancéreuses.

ACL : adénosine triphosphate-citrate lyase, AMPk : *AMP-activated protein kinase*. D'après Igal [86].

4.4 Contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération par SCD-1

La synthèse de lipides tels que les AGS, les macromolécules de la membrane que sont les PL et le cholestérol, est régulée parallèlement au cycle cellulaire [168-170]. L'implication de SCD-1 dans la mitogenèse a été proposée après la mise en évidence que des facteurs de croissance activateurs du cycle cellulaire, tels que PDGF, EGF, et l'insuline, induisent l'expression de *SCD-1* dans les cellules cancéreuses pulmonaires humaines, et les fibroblastes de peaux humains et murins [135, 136]. La régulation positive de l'expression de *SCD-1* par PDGF induit une augmentation de la synthèse des AGS et des AGMI, des PL et du cholestérol. Cette induction semble dépendante de l'activation de la voie PI3K, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire [136].

Des études récentes montrent que SCD-1 n'est pas seulement une cible de la machinerie de régulation du cycle cellulaire mais participant également à la régulation moléculaire de la cellule en division. En effet, dans la cellule cancéreuse, l'activité SCD-1 contrôle le passage de la cellule de la phase G₁ à la phase S [102, 171]. Le blocage du cycle cellulaire par des inhibiteurs de SCD-1 peut être outrepassé par un apport exogène en AGMI. Ceci met en évidence l'importance des AGMI dans la progression du cycle cellulaire [171]. Bien que les mécanismes moléculaires par lesquels SCD-1 est impliquées dans la progression dans le cycle cellulaire ne soient pas bien connus, cette régulation passerait par une altération du niveau de la cycline D1 et la *Cyclin Dependent Kinase* CDK6 [171], deux protéines impliquées dans la progression du cycle entre la phase G₁ et S [172]. De plus, la perte d'activité de SCD-1 induit une l'inhibition de l'activité de la β -caténine via la levée de l'inhibition d'Akt sur GSK3 β [102]. La β -caténine est impliquée dans la régulation positive de gènes de la prolifération cellulaire, tel que *c-myc*.

L'excès d'AG libres, en particulier saturés, induit une lipotoxicité sur les cellules β -pancréatiques, les cardiomyocytes, ainsi que sur un grand nombre de cellules et tissus cancéreux [173-182], alors que les AGMI ne semblent avoir aucun effet [174]. Un marqueur de la cellule cancéreuse est la production constitutive d'AGS. Pour palier aux effets délétères liés à cette accumulation, l'excès d'AGS doit être particulièrement bien géré par la cellule cancéreuse. Une surexpression de SCD-1 protégerait les cellules endothéliales artérielles de cette lipotoxicité [132]. Aussi, on peut supposer que la présence, dans ces cellules cancéreuses, d'une SCD-1 très active qui serait cruciale pour transformer les AGS toxiques en AGMI biologiquement neutres. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'ablation de l'expression et/ou de l'activité de SCD-1, conduit à la mort par apoptose de ces cellules [111, 112, 171], et que la surexpression de SCD-1 bloque la mort par apoptose induite par l'acide palmitique [175, 182]. Les mécanismes moléculaires du stress induits par un excès d'AGS évoluant vers la mort par apoptose suite à un déficit en SCD-1 sont encore mal connus. Une modification du ratio AGMI/AGS, induit des perturbations dans le processus de synthèse des PL, et un remodelage de leur composition avec un enrichissement en AGS au détriment des AGMI. Il en est de même pour la synthèse

des TG. Il a par ailleurs été rapporté que, lors d'une inhibition de l'expression de *SCD-1*, une diminution de la teneur en AGMI en faveur des AGS au sein des PL induisait une activation du stress du réticulum [183].

L'activité *SCD-1* apparait fortement impliquée dans la réponse de la cellule à certains stimuli des voies de signalisation mitogéniques et de survie. Dans les cellules cancéreuses du poumon et de la prostate, *SCD-1* est un modulateur clé de la voie *PI3K/Akt* impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique, la croissance et la réplication cellulaire [102, 113]. Par ailleurs, l'abolition de *SCD-1* conduit à la déphosphorylation et à l'activation de *GSK3 β* , un élément de la cascade de signalisation de *Akt*, qui inhibe la prolifération cellulaire en favorisant la dégradation de la cycline D1 [184]. Ces résultats suggèrent une influence déterminante de *SCD-1* sur la voie de signalisation mitogénique *Akt*, modulateur de la lipogenèse. Comme décrit précédemment, *SCD-1* module la composition des PL membranaires et module ainsi la composition des radeaux lipidiques, siège de l'activation de nombreuses voies de signalisation, et contribue ainsi à une suractivation des voies mitogéniques associées à *EGFR* et à l'*Insulin like Growth Factor* (*IGF*), comme observé dans de nombreux cancers [185].

4.5 Potentiel thérapeutique de *SCD-1* et des enzymes de la synthèse des AGS

Les altérations du métabolisme lipidique, en particulier de la synthèse des AGMI dans les cellules cancéreuses et le rôle de *SCD-1* dans la cellule, font de *SCD-1* et des enzymes de la synthèse des AGS des cibles de choix dans le traitement de certains cancers.

4.5.1 Cas des enzymes de la synthèse des AGS : *ACC* et *FAS*

Les enzymes de la synthèse des AGS, *ACC* et *FAS*, ont beaucoup été étudiées comme cibles potentielles lors des traitements de certains cancers. En effet, l'extinction de l'expression d'*ACC* à l'aide d'ARN interférent (*siRNA*) induit un retard de croissance et la mort par apoptose des cellules cancéreuses de prostate, sans induire d'effet cytotoxique sur les cellules non malignes [186]. De la même manière, il

a été montré qu'ACC était indispensable à la survie des cellules cancéreuses du sein et de la prostate [187, 188]. L'extinction de l'expression d'ACC conduit à une diminution de la synthèse d'acide palmitique, qui est associée à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [187]. L'inhibition de l'activité d'ACC conduit à la mort par apoptose et à l'autophagie des cellules cancéreuses de la prostate [188].

L'inhibition de l'activité de FAS par des inhibiteurs pharmacologiques et l'inhibition de l'expression de FAS par des siRNA ont montré des effets anti-tumoraux significatifs sur des lignées de cellules cancéreuses et sur des modèles de xénogreffe de cancer du sein, de la prostate, et de l'ovaire [189-195]. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet anti-tumoral de l'abolition de FAS dans les cellules cancéreuses, dont la baisse de la synthèse des phospholipides, la perturbation de localisation des récepteurs à la membrane, l'inhibition du cycle cellulaire, l'accumulation toxique de malonyl-CoA (précurseur des AG) [196], l'apoptose et l'inhibition des protéines anti-apoptotiques [197]. En effet, il a été montré que la modulation de l'expression de FAS induit une sensibilisation des cellules aux ligands des récepteurs de mort tels que TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) [198]. Bandyopadhyay *et al.* ont montré que l'extinction de FAS par siRNA dans les cellules cancéreuses du sein, induisait une augmentation de l'expression d'éléments pro-apoptotiques tels que BNIP3, impliqué aussi dans la nécrose et l'autophagie, TRAIL, et DAPK2 (*Death-Associated Protein Kinase 2*) via une augmentation de la teneur en céramides [199, 200]. L'abolition de l'activité de FAS s'accompagne d'une augmentation de l'activité caspase-8, impliquée dans la mort induite par les récepteurs de mort [198, 201], induisant l'expression de DDIT4 (*DNA Damage-Inducible Transcript 4*), un inhibiteur de la voie mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) [201]. La voie mTOR contrôle la synthèse des protéines via eIF4E ; son inhibition par DDIT4 induit une diminution de l'expression de FLIP (*FLice (caspase-8) Inhibitory Protein*), protéine inhibitrice de la caspase 8. L'abolition de l'activité de FAS régule également de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire notamment *p27* et *Rb* (gène de la protéine du RétinoBlastome) [202]. Le KO FAS induit une augmentation de l'expression des

inhibiteurs de cycline, p21^{Cip1}, p16^{INK4}, p15^{INK4} et des régulateurs du cycle cellulaire en G₂/M, CHEK₂ (*Chekpoin t Kinase 2*), WEE₁, PLK₁ (*Polo-Like Kinase 1*) [202]. L'extinction de l'expression de FAS par siRNA induit une diminution de l'expression de Skp2, une composante de l'ubiquitine ligase E3. Skp2 a pour rôle de cibler p27^{Kip1} pour induire sa dégradation par le protéasome. La diminution de l'expression de Skp2 induit une augmentation du niveau de p27, permettant l'inhibition du cycle cellulaire en G₁/S via une inhibition des kinases dépendantes des cyclines [203]. Dans les cancers mammaires et ovariens, l'inhibition de FAS induit une réduction de l'expression de HER2, un récepteur des facteurs de croissance épidermiques humains fortement exprimé dans certains de ces cancers, réduisant ainsi la prolifération cellulaire [192, 204]. Par ailleurs, une perturbation de la synthèse des AG dans les cellules cancéreuses, conduit à des altérations de la synthèse de lipides complexes tels que les phospholipides [79], qui se trouvent alors enrichis en AGS et AGMI. La synthèse des phospholipides est une étape importante pour la fabrication de nouvelles membranes, dont la composition apparaît essentielle pour la signalisation cellulaire, et semble jouer un rôle contre la formation des ROS [205].

4.5.2 Une cible thérapeutique potentielle de certains cancers : SCD

SCD-1 en tant qu'enzyme limitante de la synthèse des AGMI et impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la survie, est une cible intéressante dans le traitement de certains cancers. En effet, il a été montré que la suppression de l'activité SCD-1 par des approches génétiques ou pharmacologiques, conduit à un ralentissement de la prolifération des cellules cancéreuses ou transformées et une diminution de leur survie [111-113, 171, 206, 207]. La diminution de l'expression stable de *SCD-1* dans les cellules cancéreuses pulmonaires induit un défaut de progression tumorale lors de xénogreffe chez la souris [113]. Elle conduit à un blocage du cycle cellulaire en G₁/S et à la mort des cellules cancéreuses pulmonaires par apoptose [171]. Dans les cellules cancéreuses mammaires et coliques, cette mort est dépendante de la caspase-3 [86, 113, 171, 206]. Les cellules cancéreuses pulmonaires déficientes en SCD-1 présentent une réduction d'environ 40% du ratio Akt active (phosphorylée)/Akt totale. La voie Akt régule différents aspects du développement de la cellule cancéreuse tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose et le

métabolisme. Une diminution de l'activation de cette voie lors de la déficience en SCD-1 conduit à une diminution de la phosphorylation de GSK3 β notamment impliquée dans la voie Wnt. Il en résulte une diminution de la prolifération, de l'invasion tissulaire, de la lipogenèse et une augmentation de l'apoptose [113]. De plus, une abolition de SCD-1 sensibilise les cellules cancéreuses aux effets pro-apoptotiques de l'acide palmitique [112, 113].

5. Modulation de la prolifération cellulaire par les AG

5.1 Effets des AGS et des AGMI en C16 et C18

Nous aborderons dans ce chapitre les effets de ces AG lors d'un apport exogène sur les cellules saines et cancéreuses.

Un apport d'acides gras libres sur un grand nombre de cellules non adipeuses telles que les cellules β , les cardiomyocytes et les hépatocytes, est connu pour induire de la toxicité et de la mort cellulaire [179, 208-215]. Bien que les AGMI tels que l'acide oléique et l'acide linoléique soient mieux tolérés, les AGS tels que l'acide palmitique, induisent des altérations cellulaires importantes qui conduisent à la mort cellulaire.

Les effets cytotoxiques de l'acide palmitique dans les cardiomyocytes sont liés à une altération de la mitochondrie et de la synthèse des cardiolipines (glycérol bisphosphatidyle), constituants de la membrane interne de la mitochondrie. Ces altérations conduisent à la libération du cytochrome c et à l'activation de l'apoptose [210, 213]. Au niveau hépatique, l'acide palmitique semble induire la production de ROS issus de perturbations de la mitochondrie [214]. Il stimule également la synthèse de $\text{TNF}\alpha$ [209], et induit l'apoptose au travers de l'activation de JNK [211] et du stress du RE [215]. L'acide palmitique est aussi capable de moduler les signaux intracellulaires dans les cellules préadipocytaires 3T3-L1 de souris et dans des cultures primaires de préadipocytes de rat [216], où il active le stress du RE et module la voie Akt.

L'acide stéarique est impliqué dans la régulation de la prolifération de la cellule cancéreuse. En effet, l'acide stéarique inhibe la croissance tumorale mammaire et hépatique chez le rat [217]. La modulation de la prolifération des cellules cancéreuses leucémiques humaines par l'acide stéarique semble s'effectuer via une inhibition de la fixation de l'oncoprotéine c-MYC à l'ADN [218]. Par ailleurs, le premier intermédiaire de la peroxydation de l'acide stéarique, l'acide 9-hydroxystéarique induit un arrêt du cycle des cellules cancéreuses coliques HT29 en G_0/G_1 dépendant de la surexpression de p21 [219].

L'acide oléique quant à lui protège des effets pro-apoptotiques de l'acide palmitique dans les cellules musculaires squelettiques, les cellules β , les cardiomyocytes ou encore les cellules cancéreuses mammaires [180, 208, 220, 221]. Les effets de l'acide oléique ont beaucoup été étudiés dans le cadre de l'athérosclérose. Il favorise la prolifération cellulaire des cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires [222-227], notamment par l'induction des voies PKC (*activating Protein Kinase C*) et PI3K/Akt [225, 227]. L'acide oléique promeut la prolifération induite par IGF-1 au travers de la libération d'acide phosphatidique par la phospholipase D [222]. Dans les cellules d'hépatocarcinome, l'acide oléique induit la prolifération par activation de la phospholipase D, de la voie mTOR [228] et par inhibition de PTEN, inhibiteur de la voie PI3K/Akt [229]. La voie PI3K est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires induite par l'acide oléique [180]. Dans le cancer du sein, l'acide oléique joue un rôle important sur la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules [180, 230-233].

Quelques études ont montré des effets opposés de l'acide oléique sur la survie des cellules cancéreuses ou immortalisées. L'huile d'olive riche en acide oléique induit l'apoptose et la différenciation des cellules colorectales prénéoplasiques par inhibition de COX2 suivie d'une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 [234]. L'effet semble moins important lorsque les cellules sont traitées uniquement avec l'acide oléique. Dans les cellules cancéreuses mammaires surexprimant l'oncogène HER-2, l'acide oléique réprime l'expression de cet oncogène et favorise l'inhibition de la prolifération de ces cellules [235]. Enfin, sur les lymphocytes T immortalisés, l'acide oléique induit une inhibition de la prolifération cellulaire et favorise l'apoptose de ces cellules par activation des caspases et la production de $\text{TNF}\alpha$ [236].

Les AG, substrats et produits de SCD-1, jouent un rôle important dans la prolifération et la survie des cellules et plus particulièrement des cellules cancéreuses. Les acides palmitique, stéarique, palmitoléique et oléique sont également impliqués dans la régulation de l'expression de SCD-1. En effet l'acide oléique régule l'expression de l'ARNm de SCD-1 dans les hépatocytes de rat [140], mais n'a pas été mis en évidence dans les adipocytes murins (3T3-L1) ou les cellules

d'hépatocarcinome humain [144, 147]. Les AGS substrats de SCD-1 sont quant à eux inducteurs de l'expression de *SCD-1* [237].

5.2 Effets des AGPI et des acides conjugués de l'acide linoléique (CLA) sur la cancérogenèse

Les AGPI sont aujourd'hui très étudiés pour leur potentiel thérapeutique ou préventif d'un grand nombre de maladies. Les premiers effets bénéfiques des AGPI ont été décrits au niveau des maladies coronariennes par la prévention de la thrombose et de l'athérosclérose associée à un effet anti-arythmique, anti-agrégant et hypotriglycéridémiant.

Les AGPI, du fait de leur richesse en insaturation sont sensibles à l'oxydation et forment des sous produits aux propriétés négatives, tels que le malondialdéhyde ou le 4-hydroxy-2-nonenal dans des pathologies de type cancer ou diabète [7]. Mais les AGPI présentent toutefois des effets bénéfiques importants non négligeables.

Les AGPI n-3 ont la capacité de réprimer la transformation néoplasique, l'angiogenèse et la croissance tumorale. En effet, ils présentent un effet direct inhibiteur de croissance *in vitro* sur les cellules cancéreuses coliques, et *in vivo* chez la souris, le rat et des xénogreffes de tumeurs humaines [238-241]. Par exemple, l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3), réduisent la taille et le nombre de tumeurs colorectales chez les rongeurs. Il a été également démontré que l'EPA réduisait de manière significative le nombre et la taille des polypes chez des patients atteints de polypose adénomateuse familiale [242].

Les AGPI de la famille en n-6, sont quant à eux décrits comme étant pro-inflammatoires et promoteurs de tumeurs, notamment l'acide linoléique (18:2 n-6) [243]. L'acide arachidonique (20:4 n-6) a des effets divergents vis-à-vis de la cancérogenèse. En effet, il est connu pour promouvoir la prolifération et l'angiogenèse du cancer du sein [244], mais il réduit la viabilité des cellules cancéreuses, notamment par l'induction de ROS [218, 245-247].

En 1990, des isomères de l'acide linoléique, en particulier le *cis*-9, *trans*-11 acide linoléique (c9,t11-CLA) et le *trans*-10, *cis*-12 acide linoléique (t10,c12-CLA) connus

aussi sous le nom de CLA1 et CLA2 respectivement, ont été mis en évidence comme des AG au potentiel anti carcinogène [248].

5.2.1 Structure des CLA

Les CLA sont des diènes conjugués isomères géométriques et ou positionnels de l'acide linoléique (18:2 n-6 $\Delta^9cis, 12cis$) (Figure 15).

Ils possèdent deux doubles liaisons consécutives, d'où le terme de diènes conjugués. Une vingtaine d'isomères ont été mis en évidence, et seuls deux sont principalement étudiés, le 18:2 n-7 $\Delta^9cis, 11trans$ (c9,t11-CLA) aussi connu sous le nom d'acide ruménique, et le 18:2 n-6 $\Delta^{10trans, 12cis}$ (t10,c12-CLA).

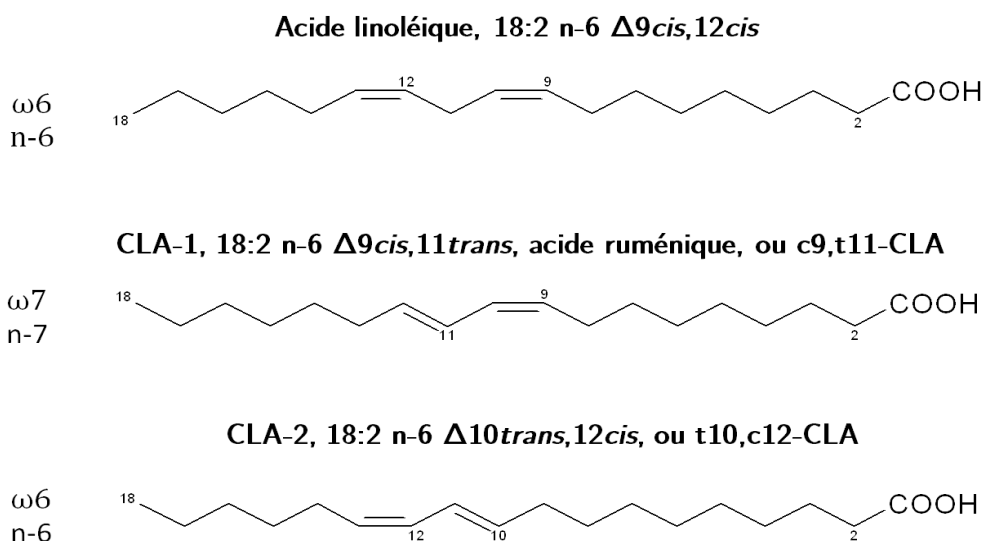


Figure 15 : Structure des acides gras conjugués de l'acide linoléique.

En haut, la structure de l'acide linoléique (18:2 n-6 $\Delta^9cis, 12cis$), au milieu l'acide conjugué de l'acide linoléique-1 (CLA-1) aussi connu sous le nom d'acide ruménique du lieu de synthèse naturelle, et en bas, la structure du CLA-2.

5.2.2 Origine des CLA

La biosynthèse des CLA est issue de la biohydrogénation de l'acide linoléique en majorité et de l'acide α -linolénique (18:3 n-3) en très faible quantité, par la flore microbienne dans le tractus digestif des ruminants, bovins et ovins [249]. De cette biohydrogénation résulte la synthèse du c9,t11-CLA, qui peut être directement absorbé, ou métabolisé par les microorganismes du rumen. Certaines bactéries du rumen, comme *Propionibacter* seraient à l'origine de la synthèse du t10,c12-CLA.

Environ 90% des CLA synthétisés chez les ruminants sont du c9,t10-CLA. Le t10,c12-CLA est le deuxième isomères majoritairement produit dans le rumen, bien qu'il représente moins de 10% de la production totale des CLA. De ce fait on retrouve ces CLA dans les produits laitiers, ainsi que dans la viande ovine et bovine. Cependant la teneur en CLA de ces aliments est variable selon la saison, l'alimentation des animaux ainsi que leur état physiologique (âge) [249, 250].

Les CLA sont aussi le produit de réactions chimiques de synthèse à partir de l'acide linoléique sous condition alcaline ou lors d'hydrogénations industrielles [249, 251]. Lors de ces processus, la production en c9,t11-CLA et t10,c12-CLA est quasiment équimolaire. Dans ces préparations apparaissent d'autres isomères, en faible quantité, avec des doubles liaisons sur les carbones 8,10 ou 11,13. Les CLA issus de synthèse chimique entrent dans la composition de compléments alimentaires.

Tableau 2 : Estimation de la quantité en CLA présente dans divers aliments [252].

Produits laitiers	mg/g de lipide	Viande/Poisson	mg/g de lipide
Lait entier	5,5	Bœuf	4,3
Lait concentré	7,0	Veau	2,7
Beurre	4,7	Agneau	5,8
Crème glacée	3,6	Porc	0,6
Yaourt allégé	4,4	Poulet	0,9
Yaourt entier	4,8	Dinde	2,6
Cheddar	4,1	Saumon	0,3
Huiles Végétales	mg/g de lipide	Jaune d'œuf	0,6
Huile de tournesol	0,4		
Huile de carthame	0,7		
Huiles d'olives	0,0	<i>Exprimée en mg de CLA/g de lipide</i>	

5.2.3 Potentiels thérapeutiques des CLA

C'est en 1987, qu'à été identifié pour la première fois le potentiel anti-cancérigène des CLA à la suite de la découverte d'un agent, produit par isomérisation alcaline de l'acide linoléique dans le bœuf grillé, inhibant l'initiation du cancer épidermique chez la souris [253]. A la suite de cette découverte, la plupart des études sur les CLA est associée à leurs propriétés anti-cancérigènes. Puis les effets bénéfiques des CLA sur le diabète, l'athérosclérose, le métabolisme des lipides, la réponse immunitaire, le

métabolisme de la vitamine A [254], ont été démontrés dans de nombreux modèles expérimentaux.

5.2.3.1 Propriétés anti-cancérigènes des CLA

Les CLA ont des effets anti-cancérigènes à différents stades de développement des cancers, dont l'initiation, la progression et le développement de métastases [255-257]. Il a été montré que les CLA retardaient ou réduisaient l'installation de tumeurs chimio-induites chez le rat et la souris, notamment des cancers de la peau, des glandes mammaires et de l'estomac [20, 253, 258-261].

Quelques études chez l'Homme, ont montré que chez la femme ménopausée, le risque de développer un cancer du sein était inversement corrélé à la consommation de CLA [262]. Une étude sur 360 femmes françaises, a montré que l'incidence et le nombre des tumeurs étaient plus faible pour le groupe nourri avec un régime enrichie en CLA par rapport au régime contrôle [263].

Les effets des CLA varient avec la spécificité des isomères, avec le type de cancer, le stade et sa localisation. Les effets des CLA sur les cellules cancéreuses sont liés à l'inhibition de croissance et de prolifération [260, 264, 265], à l'induction de l'apoptose [266-268], et à la réduction de l'angiogenèse [256].

Les CLA semblent intervenir au niveau de plusieurs voies de signalisation et avoir de multiples effets. En effet, les CLA induisent l'apoptose par régulation positive de ses voies de signalisation [269], par modulation de l'homéostasie de la mitochondrie [270] ou via un stress oxydatif passant par la Protéine Kinase C et la NADPH oxydase [271]. La prolifération des cellules endothéliales est réduite par les CLA via la modulation de bFGF [272]. Les CLA régulent aussi les PPAR [273, 274], notamment via l'augmentation de rétinol, qui influence l'expression génique des *PPARs* [254]. Ils activent la transcription de facteurs impliqués dans le contrôle de la régulation de la croissance cellulaire [275], de la différenciation et de l'apoptose [276]. Les CLA modulent le métabolisme de l'AA et réduisent la production de prostaglandine E2 et de cytokines [277-279]. Les CLA répriment l'expression de récepteurs aux œstrogènes au niveau du messenger et de la protéine, et diminuent leur l'activité de protéines

nucléaires [280], ainsi ils régulent la prolifération cellulaire. Les CLA inhibent aussi la voie de signalisation du récepteur à l'IGF-I, impliqué dans le développement du cancer de la vessie [281, 282].

Bien que le t10,c12-CLA et le c9,t11-CLA aient d'abord été mis en évidence comme inhibiteur de la carcinogenèse induite chimiquement dans des modèles de rongeur [260, 283], des études récentes montrent qu'un régime contenant 0,5% à 1% de t10,c12-CLA pourrait promouvoir le développement tumoral dans des modèles de tumeurs mammaires spontanées (souris transgénique Erb2 ou PyMT) et sur la croissance allométrique de la glande mammaire [284, 285].

5.2.3.2 Autres propriétés thérapeutiques

Les CLA sont également connus pour avoir d'autres effets vis-à-vis d'un grand nombre de pathologies dont le diabète, l'athérosclérose et l'obésité.

Les CLA ont des propriétés anti-diabétiques chez le rat où ils augmentent la sensibilité à l'insuline [286]. Chez l'homme, la supplémentation par un mélange de CLA est associée à une amélioration de la glycémie à jeun chez le patient diabétique [287]. A l'inverse, les CLA augmentent la résistance à l'insuline chez la souris [288].

Une supplémentation en CLA est connue pour exercer un grand nombre de réponse sur les profils lipidiques. Il en résulte des effets bénéfiques sur l'athérogenèse chez le lapin et le hamster [289, 290].

Ils augmentent également la réponse immunitaire et protègent des effets du catabolisme [291, 292].

Les CLA sont connus du grand public, du fait de leurs propriétés amincissantes mises en évidence chez la souris, le rat, le hamster, le chien et l'homme [249]. Les résultats chez l'homme restent toutefois très controversés [252]. La perte de masse grasse chez la souris s'accompagne d'altérations majeures au niveau de l'organisme, avec une hépatomégalie, une insulino-résistance et l'apoptose des adipocytes [252]. Le t10,c12-CLA serait responsable d'une augmentation de la résistance à l'insuline, de la glycémie à jeun, de dyslipidémie [293, 294].

5.2.3.3 Les CLA et la régulation de SCD

Les CLA modulent la composition des membranes cellulaires par réduction de la proportion en AGMI, en réduisant l'index de $\Delta 9$ désaturation, soit les ratios 16:1/16:0 et 18:1/18:0 [295]. Une diminution de l'index est le reflet d'une diminution de l'activité SCD. Il a été montré que des mélanges de CLA, c9,t11 et t10,c12, inhibent l'expression du messenger de SCD au niveau hépatique chez la souris, tout comme dans les pré-adipocytes [295, 296]. Un traitement par le t10,c12-CLA des pré-adipocytes 3T3-L1 prévient la formation de gouttelettes lipidiques [296]. Nous avons montré que le t10,c12-CLA induisait une diminution de la synthèse des AGMI dans les cellules cancéreuses coliques par inhibition de l'expression de SCD-1 ou de son activité (Figure 37 page 110).

Le mécanisme d'action du t10,c12-CLA sur l'expression de SCD passe par une diminution de la stabilité du messenger et/ou de l'expression de SCD. [114]. Par ailleurs, le t10,c12-CLA peut exercer un effet direct sur la protéine et inhiber son activité [160, 297, 298].

6. Le stress du réticulum endoplasmique : origine et conséquences

6.1 La voie du stress du réticulum

Le RE est une organelle subcellulaire impliquée dans la synthèse de protéines sécrétoires ou membranaires et la synthèse de lipides comme les AGMI, les PL et les TG. Au niveau du RE se trouve un grand nombre de protéines chaperonnes, de lectines (les protéines de repliement) et d'enzymes de glycosylation nécessaires pour assurer la maturation des protéines. Le RE est doté d'un mécanisme de contrôle de la qualité des protéines produites et du maintien de son homéostasie. Ainsi une protéine anormale ou un dysfonctionnement déclenche la réponse UPR (*Unfold Protein Response*), afin de conduire la protéine anormale vers le protéasome ou de rétablir l'homéostasie du RE [299].

Le microenvironnement tumoral peut induire des perturbations des fonctions du RE. En particulier, l'hypoxie ou le manque de nutriments activent différentes voies de signalisation en provenance du RE à la suite de l'accumulation de protéines mal formées. La réponse UPR est un phénomène adaptatif de la cellule afin de limiter l'entrée de nouvelles de protéines dans le RE le temps d'un retour à l'homéostasie du RE. La capacité des cellules à activer ce stress leur permet de s'adapter et survivre ou d'entrer en apoptose. Il a été montré que l'hypoxie ou un appauvrissement en glucose, est à l'origine de la résistance à des chimiothérapies via une adaptation de cellules par le stress du RE [300]. De plus, certains agents anti-cancéreux conduisent à la création de signaux de survie via la réponse UPR dans les cellules cancéreuses [301]. Ainsi le stress du RE apparaît comme un mécanisme de défense pour la cellule cancéreuse, via l'induction de signaux de survie.

Cependant, sous des conditions de stress prolongées, le stress du RE est à l'origine de l'induction de mort cellulaire. De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant une activation forte et prolongée du stress du RE permettraient d'induire de la mort des cellules cancéreuses [302].

6.1.1 Les perturbateurs de l'homéostasie du RE

De nombreuses conditions physiologiques et pathologiques peuvent être à l'origine du stress du réticulum. Un appauvrissement en nutriments tel qu'une déplétion en glucose, les infections virales, les perturbations de la synthèse des lipides, du statut oxydatif, et de l'homéostasie calcique sont autant de paramètres qui peuvent perturber la synthèse et la maturation des protéines au niveau du RE [299, 303-306].

Le RE possède un environnement unique, où se côtoient des polypeptides naissants et des polypeptides en cours de maturation. Cette forte concentration en protéines plus ou moins matures est propice à l'agrégation des protéines. Les protéines chaperonnes telles que BIP/GRP78 et GRP94 (*Glucose-Regulated Protein*) préviennent la formation d'agrégats. Des quantités importantes de calcium et d'énergie sont nécessaires à la bonne maturation de ces protéines. Les protéines qui entrent dans la lumière du RE sont l'objet d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles dont les N-glycosylations, les hydroxylations, les γ -carboxylations, l'addition de glycosyl-phosphatidyl-inositol et les acylations. Tous ces processus sont extrêmement sensibles aux altérations de l'environnement du RE.

L'accumulation de protéines mal maturées induit la réponse UPR. Cela déclenche le blocage général de la synthèse des protéines afin d'éliminer des protéines de la lumière du RE mal formées. Puis elle conduit à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la dégradation des protéines (machinerie ERAD) et des protéines chaperonnes afin de permettre le retour de l'homéostasie du RE. Si le stress est maintenu, alors il y a induction de la mort par apoptose.

6.1.2 La signalisation du stress du RE

Les acteurs moléculaires de la voie du stress du RE ont bien été décrits au cours de ces dix dernières années. Il est maintenant bien établi, que trois transducteurs transmembranaires localisés au niveau de RE initient une réponse adaptative lors du stress du RE. Ces trois transducteurs sont, la protéine kinase IRE1 (*Inositol-Requiring Kinase 1*) [307, 308], la protéine kinase PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase like ER Kinase*)[309] et le facteur de transcription ATF6

(*Activating Transcription Factor 6*) [308, 310]. Ces trois transducteurs sont exprimés de manière constitutive, mais ils sont soumis à des régulations par maturation post-traductionnelle (clivage, phosphorylation). (Figure 16)

6.1.2.1 La voie IRE1 : un épissage des ARNm d'XBP1 sélectif

Cette voie fut la première à être décrite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. IRE1 est une protéine sérine/thréonine kinase transmembranaire du RE avec une fonction endoribonucléase (RNase) à site spécifique. Lorsque les cellules ne sont pas stressées, la protéine IRE est maintenue sous forme monomérique inactive par la protéine chaperonne BIP/GRP78. Sous des conditions de stress, IRE1 est libérée. Ainsi, IRE1 forme un homodimère, et par transphosphorylation induit son activité RNase [299, 303].

Chez les mammifères deux isoformes d'IRE1 ont été mises en évidence, IRE1 α et IRE1 β [311, 312]. IRE1 α est exprimée dans la plupart des cellules et tissus, mais à un niveau plus élevé dans le pancréas et le placenta. L'expression IRE1 β est prédominante dans l'épithélium intestinal. Les activités RNases des deux isoformes sont similaires.

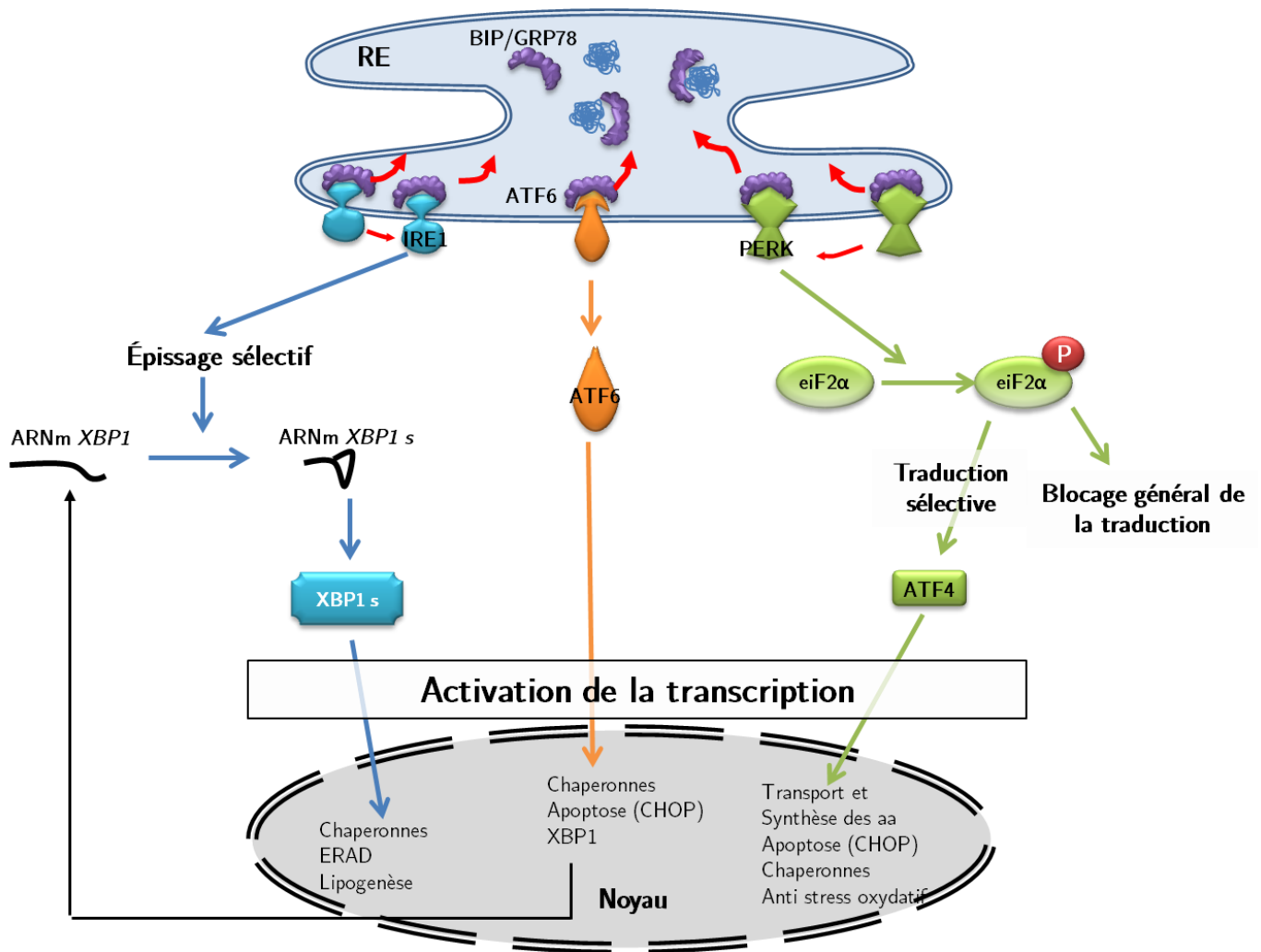


Figure 16 : Voies de signalisation du stress du réticulum endoplasmique.

Les trois senseurs (IRE1, PERK et ATF6) agissent en concert pour réguler les voies du stress du réticulum. La protéine chaperonne BIP/GRP78 est le principal régulateur négatif de ces trois voies de signalisation. En conditions normales, la protéine BIP/GRP78 est liée au domaine intra-réticulum d'IRE1, de PERK pour prévenir de leur dimérisation, ainsi qu'à ATF6. Lors d'un stress, BIP/GRP78 est libéré, de IRE1 ce qui permet la dimérisation de ce dernier, activant son domaine kinase et son activité de RNase ainsi IRE1 initie l'épissage du messenger de *XBP1*, facteur de transcription qui cible la transcription des gènes impliqués dans la dégradation des protéines par la machinerie ERAD. De la même manière, BIP/GRP78 libère ATF6, ce qui induit son transport vers l'appareil du Golgi, où ATF6 est clivé pour donner un facteur de transcription actif, qui dans le noyau active la transcription de gènes des acteurs du stress du RE. Enfin, BIP/GRP78 se sépare de la protéine transmembranaire PERK, qui se dimérise, s'autophosphoryle et active eIF2 par phosphorylation sur la sérine 51. Ceci conduit à une diminution générale de la traduction avec une traduction sélective du messenger d'ATF4, facteur de transcription qui régule l'expression de gènes anti-oxydatif, et de gènes à la fonction pro-apoptotique comme CHOP. Aa : acides aminés, XBP1s : XBP1 épissé

Lors du stress du RE, l'activité RNase de IRE1, clive le messenger de *XBP1* (*X-box binding protein 1*) pour éliminer un intron de 26 nucléotides, ce qui crée un déplacement du cadre de lecture lors de la traduction et cette forme d'*XBP1s* contient un nouveau domaine de fixation à l'ADN en position C terminale. Ce facteur de transcription *XBP1s* joue un rôle important dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles de la voie du stress du RE, comme les gènes de la machinerie de dégradation des protéines du RE, comme EDEM, HDR1 [299, 303, 313]. *XBP1* est un facteur de transcription à domaine bZIP (*basic leucine zipper*) capable de lier élément de réponse au stress du RE, dit ERSE (CCAAT-(N₉)CCACG)[314].

6.1.2.2 La voie PERK : La modulation de la traduction

Au cours du stress du RE, on observe un arrêt général de la traduction des protéines médié par la voie PERK. Un stress du réticulum, conduit à la dissociation de BIP/GRP78 de la protéine sérine/thréonine kinase transmembranaire PERK. Cette libération conduit à la dimérisation de PERK et sa phosphorylation. PERK ainsi activée phosphoryle le facteur de traduction eIF2 α (*Eukaryotic translation Initiation Factor 2*) sur la sérine 51 chez l'homme (Ser 51 chez la levure et Ser 52 équivalente chez la souris). La phosphorylation d'eIF2 α inhibe l'échange de GTP sur le facteur eIF2B le rendant ainsi inactif pour initier la traduction. Cependant, cela permet la traduction de messagers tels qu'ATF4 sous la dépendance de p-eIF2 α . ATF4 régule ainsi positivement l'expression des gènes impliqués dans la synthèse et le transport des acides aminés, les gènes de la réponse anti-oxydante et certains gènes impliqués dans l'apoptose tels que *CHOP* (*C/EBP Homologous protein* appelée aussi *GADD153*, *Growth Arrest and DNA Damage 153*). [299, 303, 309]

Ces dernières années, des relations étroites entre le stress oxydatif et le stress du RE ont été mises en évidence. Quelques études suggèrent que NRF2 (*transcription Factor Nuclear Respiratory 2*) serait un substrat de l'activité kinase de PERK. NRF2 et NRF1 sont des facteurs de transcription qui interviennent dans la régulation de l'expression des enzymes anti-oxydantes en réponse au stress oxydatif. NRF2 est présent dans tout le cytoplasme sous forme quiescente, lié à la protéine

Keap1 (*Kelch-like Ech-associated protein1*, protéine associée aux microtubules). Lors du stress du RE, PERK phosphoryle NRF2 pour le libérer de Keap1 et induire sa translocation au noyau. Les cellules *Nrf2*^{-/-} semblent être très sensibles à l'apoptose induite par le stress du RE. Ceci suggère que NRF2 est un effecteur de survie de la voie PERK [315]. Pour appuyer cette hypothèse, les cellules *PERK*^{-/-} accumulent les ROS à la suite d'un stress du RE [316].

6.1.2.3 La voie ATF6

ATF6 est un facteur de transcription de la famille des bZIP. Il se lie à l'élément de réponse au stress du réticulum, présent sur les gènes de la machinerie UPR (*BiP*, *Grp94*, *calréticuline*). Il existe deux isoformes d'ATF6, ATF6 α et ATF6 β . Elles sont synthétisées dans tous les types cellulaires, sous forme de protéines membranaires localisées au niveau du RE. Hors conditions de stress, la protéine ATF6 est liée à BIP/GRP78. En réponse au stress, ATF6 est libérée de sa protéine chaperonne, et migre vers l'appareil de Golgi, où deux protéases (site 1 et site 2) la clivent successivement. Le facteur de transcription ainsi activé, induit l'expression de gènes cibles tels que les gènes des protéines chaperonnes, *XBP1* [308, 309], *CHOP* et des protéines de la machinerie ERAD telles que *SEL1* [313]. La voie ATF6 induit aussi l'expression de la protéine P58^{IPK} [protéine inhibitrice de la PKR (*interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase*)]. La surexpression de P58^{IPK} induit une inhibition d'eIF2 α et de ces cibles en aval. L'expression de la P58^{IPK} au cours de la réponse UPR permet de protéger la cellule du stress du RE [317].

6.2 Conséquences du stress du RE : après la survie, la mort des cellules

Lorsque le stress du RE ne permet pas de rétablir l'homéostasie de RE, la mort des cellules est activée. La principale voie de mort décrite est la mort par apoptose, dépendante ou indépendante de la mitochondrie (Figure 17). Mais d'autres voies telles que l'autophagie sont aujourd'hui décrites comme étant induites par le stress du RE [318].

Lors du stress du RE, différents signaux pro-apoptotiques sont générés. L'expression de CHOP, induite lors du stress du RE est un activateur de l'apoptose. L'efflux de calcium du RE par BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/Killer*)/BAX, l'activation du complexe ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase1*)/JNK (*c-Jun amino terminal Kinase*) et le clivage de la procaspase-12 chez la souris sont d'autres activateurs de l'apoptose [303].

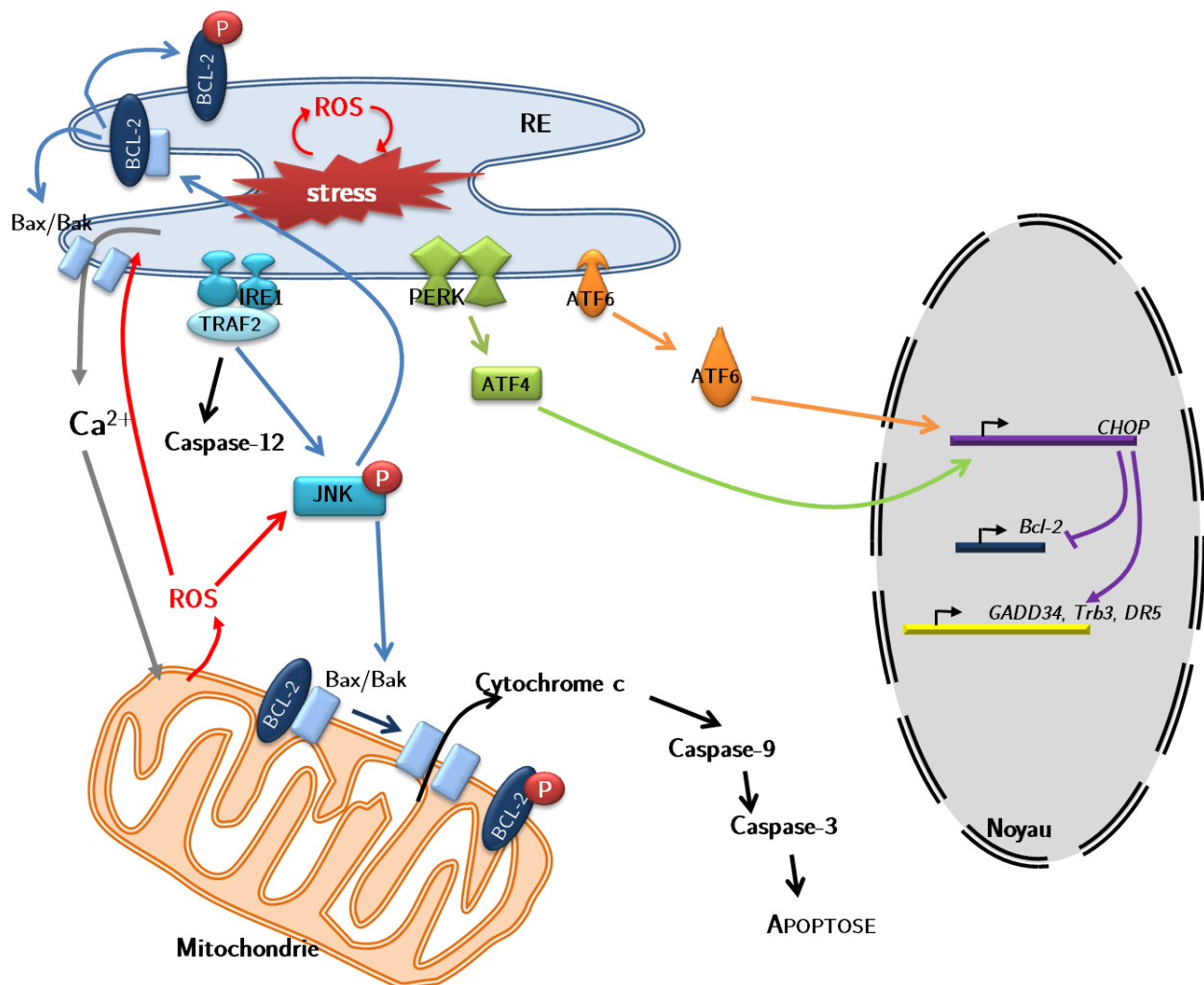


Figure 17 : La mort cellulaire programmée ou apoptose induite par le stress du RE.

Le stress du RE, par ses différentes voies conduit de manière redondante à l'activation des caspases impliquées dans l'apoptose dépendante et indépendante de la mitochondrie. IRE-1 activée recrute TRAF2, induit d'une part l'activation de la caspase 12 qui initie la cascade des caspases, mais aussi l'activation par phosphorylation de JNK. JNK phosphorylée, induit la libération des protéines proapoptotiques BAK et BAX de leur inhibiteur BCL-2 au niveau du RE et de la mitochondrie, ce qui favorise l'efflux du calcium du RE. L'action conjointe du calcium, de BAX et de BAK active l'induction de l'apoptose depuis la mitochondrie. L'activation des voies PERK et ATF6, conduisent à l'expression du facteur de transcription

CHOP qui induit l'apoptose en modifiant le profil d'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être une cause et une conséquence du stress du RE. D'après Szegezdi *et al.*, et Malhotra et Kaufman [299, 303]

6.2.1 CHOP, l'effecteur de la mort dans le stress du RE

CHOP ou GADD153 est un facteur de transcription de la famille bZIP, qui est induit sous l'effet des voies ATF6 et PERK. Il a été montré que des cellules *CHOP*^{-/-} étaient protégées de la mort par apoptose induite par le stress du RE [319]. CHOP induit l'expression de différents gènes impliqués dans la mort cellulaire tels que *GADD34*, *Trb3* (*Tribbles homolog 3*), *DR5* (*Death Receptor 5*). *GADD34* code une sous unité de la protéine phosphatase 2C responsable de la déphosphorylation d'eIF2 α . Ceci relance la synthèse protéique inhibée par p-eIF2 α induite par la voie PERK. Le maintien de la synthèse protéique sans retour à l'homéostasie du RE induit de manière chronique la réponse UPR. Ainsi la quantité de protéines à maturer dans la lumière du RE tend à augmenter et initie la mort cellulaire [320]. L'expression du gène *DR5* est un gène induit par l'augmentation de l'expression de CHOP [321, 322]. Le gène *DR5* code un récepteur de mort situé à la membrane, DR5, qui lors de la fixation de son ligand, TRAIL, il est responsable de l'activation de la voie extrinsèque de mort par apoptose [321]. Certaines études montrent aussi que l'induction de l'expression de *DR5* par CHOP lors du stress du RE est à l'origine de l'activation de cette voie indépendamment de la fixation du ligand [323]. *Trb3* code une protéine à activité kinase supposée. Un KO pour *Trb3* induit une résistance des cellules HepG2 à l'apoptose induite par le stress du RE [324].

CHOP a aussi été impliqué dans la régulation négative de *BCL-2*, codant pour une protéine anti-apoptotique, et dans la déplétion en glutathion, ce qui favorise la production de ROS et l'activation de l'apoptose [325].

6.2.2 Mort cellulaire induite par IRE1 dans le stress du RE

Nous avons décrit précédemment que la voie IRE1 induite par le stress du RE conduit à l'épissage de l'ARNm de *XBP1*. L'induction de la voie IRE1 est aussi à l'origine de l'activation de cascade de kinases MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*).

Le domaine cytoplasmique d'IRE1 interagit avec une protéine adaptatrice, TRAF2 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2*). L'activation de JNK se fait par interaction d'ASK1, une MAPK et le complexe IRE1/TRAF2 [326]. L'activation de JNK et l'apoptose induite par le stress du RE sont réduites dans les cellules *IRE1^{-/-}* et *ASK1^{-/-}*.

Le complexe IRE1/TRAF2 conduit aussi à l'apoptose, par activation de la caspase-12 chez la souris [327] et par activation d'ATF3 [328].

TRAF2 couplé au récepteur de mort activé induit la phosphorylation et l'activation de JNK [329]. Diverses études suggèrent que l'activation d'IRE1 par le stress du RE initie la voie extrinsèque de mort par apoptose par interaction avec TNFR1, TRAF2 et ASK1. Il apparaît que l'activation par le stress du RE de JNK est altérée dans les cellules *TNFR1^{-/-}* [330, 331]. L'expression de TNF α apparaît induite par IRE1, ce qui exerce une boucle d'amplification de l'activation de JNK.

Les ROS peuvent activer ASK1 par sa dissociation du complexe avec la thioredoxine (TRX), après oxydation de la TRX et conduit à l'activation de JNK et à la mort cellulaire [332]. TNF α est connu pour induire un stress du RE de manière ROS dépendantes [333].

Ainsi le stress oxydatif et le stress du RE induisent la mort cellulaire par les mêmes voies : IRE1/TRAF2/ASK1. Ces résultats indiquent une relation étroite entre les récepteurs de mort, le stress oxydatif et le stress du RE.

6.2.3 Mort cellulaire induite par BCL2 dans le stress du RE

Les protéines de la famille de BCL2 sont impliquées dans l'apoptose induite par le stress du RE. Les membres proapoptotiques de cette famille sont alors recrutés à la membrane du RE et activent la caspase-12 chez la souris, vraisemblablement la caspase-4 chez l'homme. La protéine BIM (*BCL2-Interacting Mediator of cell death*), cible de CHOP, est transloquée à la membrane du RE et active la caspase-12. Il a été montré qu'un KO pour cette protéine, induisait une résistance à la mort induite par le stress du RE. De la même manière, la surexpression des membres antiapoptotiques

de la famille de BCL2 (BCL-xL, inhibiteur de la translocation de BIM) induit la résistance au stress du RE [334].

Les protéines BAX et BAK à domaine BH3 (*Bcl-2 Homology Domain 3*), sont présentes à la surface du RE et de la mitochondrie. Elles sont maintenues inactives par la protéine BCL-2. Au cours du stress, BAX et BAK sont libérés de BCL-2 et s'oligomérisent pour permettre l'efflux de calcium du RE vers le cytosol. L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique conduit à l'activation de caspases dépendantes et indépendantes de la mitochondrie [335, 336]. En effet, l'augmentation de la concentration calcique participe à l'activation de la caspase-12 chez la souris (indépendante de la mitochondrie), et elle participe aussi à la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Cette dépolarisation libère le cytochrome c de la membrane, qui à son tour active le complexe APAF1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor1*)/procaspase-9 et forment l'apoptosome. (Figure 17)

La régulation des protéines de la famille BCL2 est peu connue, toutefois CHOP est connu pour induire BIM et réprimer l'expression de *BCL-2*, levant l'inhibition sur les protéines apoptotiques tels que BAX et BAK. Par ailleurs, la protéine JNK activée par le complexe IRE1/TRAF2/ASK1 est connue pour réguler BCL-2 par phosphorylation, levant ainsi la séquestration et l'inhibition des protéines BH3 pro-apoptotiques [337] (Figure 17). L'induction et le contrôle post-traductionnel des protéines BH3 ont un rôle important dans l'activation de l'apoptose. D'autres membres de la famille de protéines BH3, PUMA (*p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*) et NOXA (*Neutrophil NADPH Oxidase factor*) sont également induits lors du stress du RE via p53 [338].

6.2.4 Les caspases : enzymes effectrices de la mort dépendante du stress du RE

Les caspases sont bien connues pour être les grands acteurs de l'apoptose. L'implication des caspases-2, 3, 4, 7, 9 et 12 a été rapportée dans la mort cellulaire à la suite d'un stress du RE [339-342]. Lors du stress du RE, on observe une augmentation de l'expression de la calpain (*calcium-activated neutral protease*), qui promeut l'activation de la caspase-12 [343]. De plus, les protéines BAX et BAK,

lorsqu'elles sont colocalisées à la membrane du RE, exercent une fonction apoptotique au travers de l'activation de la caspase-12 [340, 341]. La caspase-12 active la caspase-9 qui active à son tour la caspase-3. L'implication réelle de la caspase-12 dans les stress du RE chez l'homme reste encore une interrogation, car il existe de nombreuses mutations inactivatrices dans le gène humain de la caspase-12 [344]. En revanche, il est possible que la caspase-4 soit impliquée chez l'homme [342].

6.3 Origine du stress du réticulum : les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Des expositions répétées des systèmes biologiques à des stress oxydatifs altèrent le statut redox cellulaire et engendrent des modifications oxydatives des protéines, des lipides, et des acides nucléiques. Ces altérations prédisposent au développement de désordres physiologiques, comme c'est le cas au cours du vieillissement [345].

Le stress du RE et le stress oxydatif sont particulièrement liés. En effet, chacun d'entre eux peuvent induire la libération de calcium du RE via l'induction de la production de ROS. Une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et intra-mitochondriale induit la production de ROS par la chaîne mitochondriale. Ces ROS sensibilisent également la libération de calcium du RE. Sans protection antioxydante suffisante, cette boucle de régulation menace la survie cellulaire (Figure 18) [303].

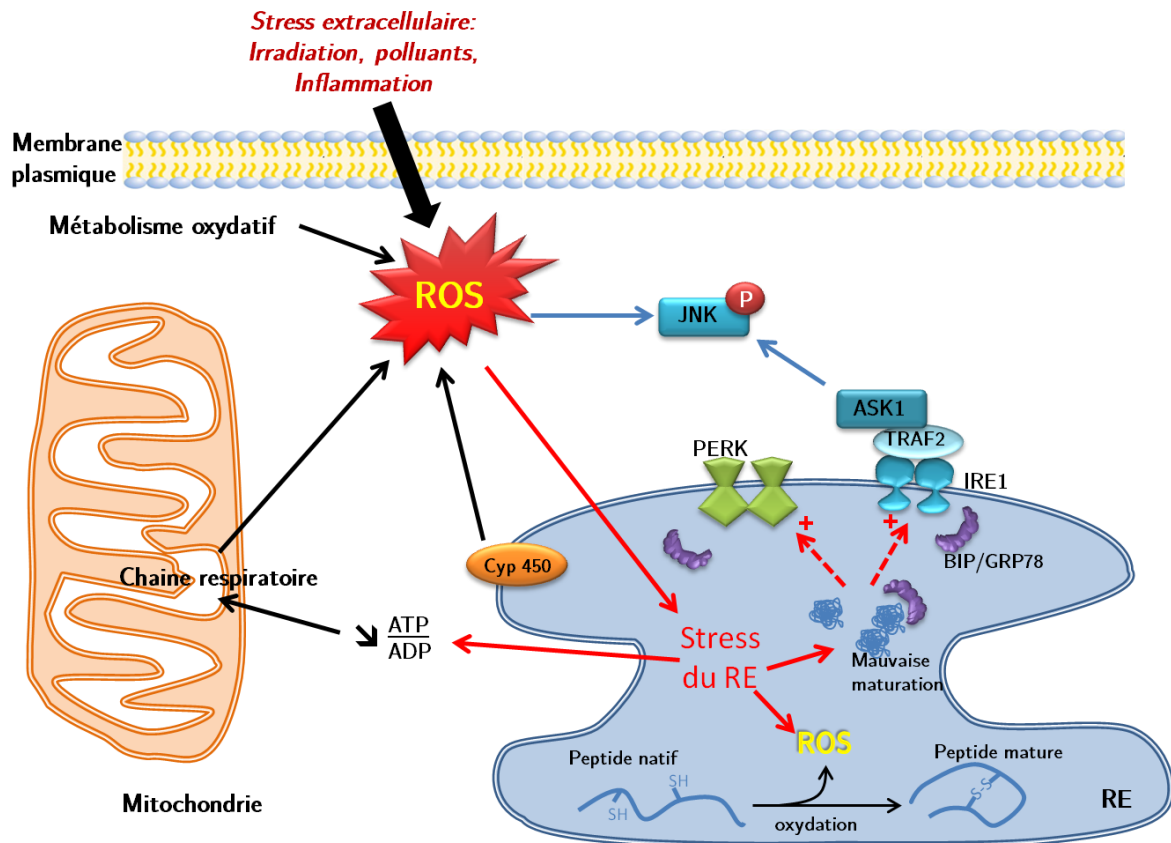


Figure 18 : Voies de production de ROS dans la cellule.

Les ROS peuvent être générés à la suite d'exposition à de multiples stress comme l'irradiation, les polluants de l'air, des produits de la chaîne respiratoire et du métabolisme oxydatif ou des cytochrome P450 (CYP450). Les altérations du statut redox ou la génération de ROS directe ou indirecte affecte l'homéostasie du RE et la maturation des protéines. Le stress oxydatif peut induire une accumulation de JNK sous sa forme active, phosphorylé. Cette accumulation est complétée par la voie IRE1 du stress du RE, qui active la protéine JNK. Au sein du réticulum, la maturation des protéines notamment l'ajout des ponts disulfures dépend du statut redox du RE, et produit des ROS. D'après Malhotra et Kaufman, [303].

6.3.1 Production des espèces réactives de l'oxygène

Une exposition à des agents toxiques tels que l'irradiation, les xénobiotiques, les polluants et les médicaments (*i.e.* anthracyclines), peuvent être à l'origine de la production de ROS. Les ROS sont produits dans tous les compartiments cellulaires. A ce niveau, les ROS sont des sous produits issus de réactions enzymatiques par exemple issus de la chaîne respiratoire, de l'activité des enzymes de la famille des cytochromes P450, des glucose oxydases, des amino-acide oxydases, de la NADPH/NAD oxydase, ou des NO synthases (Figure 18). Ainsi, la chaîne respiratoire mitochondriale du transport des électrons produit des anions superoxydes

($O_2^{\cdot-}$) [346] dont la quantité dépend de son activité et de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), qui les convertit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 est capable de traverser la membrane mitochondriale pour rejoindre le cytoplasme. En présence de fer III (ferrique), le peroxyde d'hydrogène forme un radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) très réactif. L'anion superoxyde produit aussi d'autres métabolites toxiques comme les peroxynitriles ($ONOO^{\cdot-}$), les acides hypochloreux ($HOCl$), et l'oxygène singulet (1O_2) (Figure 19).

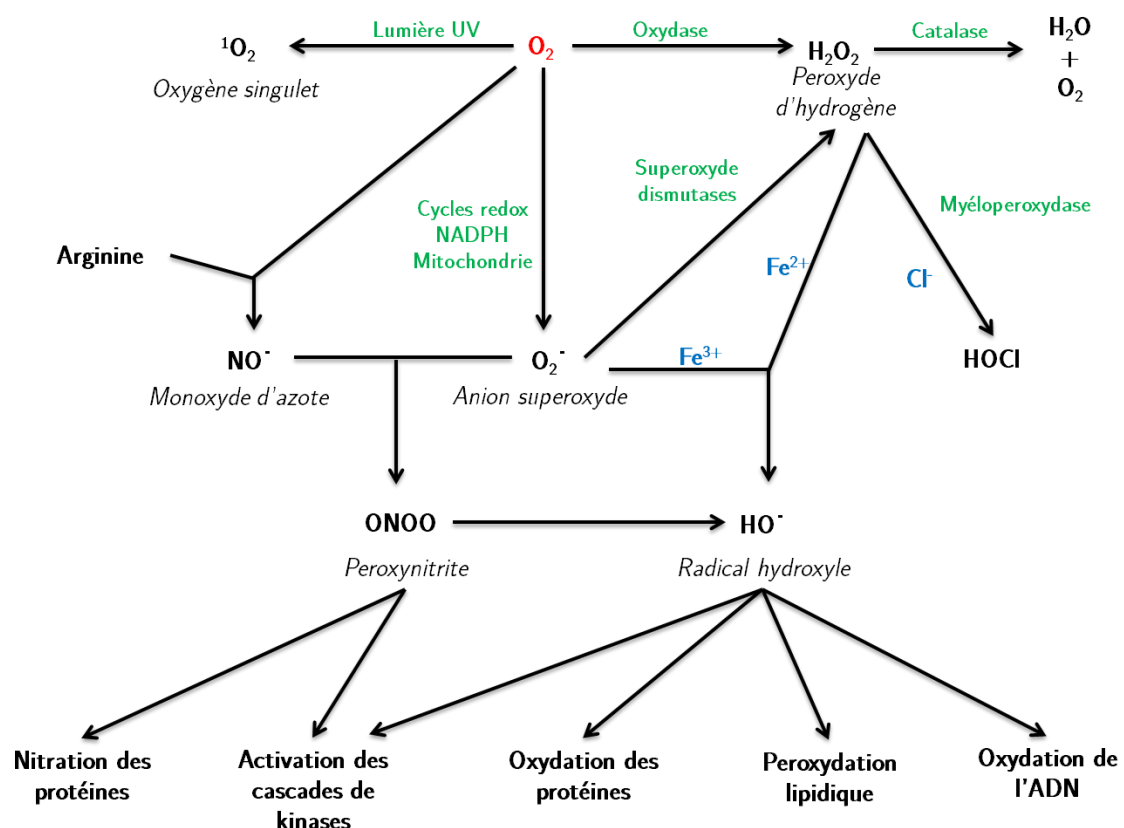


Figure 19 : Les espèces réactives de l'oxygène synthèse, inactivation et conséquences

6.3.2 Régulation de la machinerie anti-oxydante

En conditions physiologiques, l'accumulation de ROS est prévenue par des mécanismes enzymatiques de défense antioxydante et non enzymatiques qui piègent les ROS ou préviennent leur formation. Les mécanismes enzymatiques sont, la SOD, la glutathion peroxydase (GPX), la catalase, et la thioredoxine réductase. Les vitamines, en particulier les vitamines C (ascorbate), E (tocophérol), les dérivés des caroténoïdes et le glutathion font parties des défenses non enzymatiques. Ils agissent

en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine devient alors un radical, puis sera détruite ou régénérée par un autre système. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les phytates [347].

6.3.2.1 Les superoxydes dismutases

La SOD est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. C'est pour cela qu'elle représente une part importante du système de défense contre les radicaux libres.

La SOD existe sous différentes isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique. En effet, on distingue les SOD à manganèse (Mn SOD, codée par le gène *SOD2*) protégeant les mitochondries, les formes à cuivre-zinc (Cu/Zn SOD, codée par le gène *SOD1*) dans le cytosol, et celle du milieu extracellulaire (EC-SOD, codée par le gène *SOD3*) ancrée à la matrice extracellulaire ou circulante sous forme de tétramère [348].

La régulation des gènes *SOD* est importante dans la balance des concentrations en ROS. Le promoteur de *SOD1* est riche en région GC, ainsi qu'en boîte TATA et en boîte CCAAT. Le promoteur de *SOD2* ne présente pas ces deux boîtes, mais il est composé de nombreux motifs riches en GC, de motifs de fixation des protéines SP1 et de séquences consensus pour les protéines AP-2 (*Activating Protein 2*) dans la région proximale du promoteur. Deux boîtes CCAAT ont été identifiées au niveau du promoteur du gène *SOD3*. Les différents facteurs de transcription qui régulent l'expression des *SOD* sont NF- κ B, AP-1, AP-2, SP-1 et C/EBP [349]

6.3.2.2 La catalase

La catalase est responsable de l'élimination de l' H_2O_2 , par une transformation en H_2O et en O_2 . L'affinité de la catalase est importante pour les peroxydes d'hydrogène seulement lorsque leur concentration est accrue. La catalase est formée de quatre sous unités protéiques contenant chacune un noyau hémique avec un atome de Fe^{3+} lié au site actif.

L'expression du gène de la catalase est principalement régulé par le facteur de transcription C/EBP- β , membre de la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP, et ou par le facteur nucléaire NF-Y [350].

6.3.2.3 La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase ou GPx est formée de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium. La GPx prend en charge le peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes d'origine lipidique. Son substrat est le glutathion (GSH). La quantité de glutathion dans la cellule étant limité, il est recyclé en permanence par la glutathion réductase grâce au NADPH comme donneur d'électrons.

L'expression de la GPx est régulée par le C/EBP- ε et NF-Y.[351]

6.3.2.4 Rôle de XBP1

Comme décrit précédemment, le facteur de transcription XBP1 de la famille des bZIP est induit lors du stress du RE. Il permet de réguler l'expression de protéines chaperonnes et la lipogenèse dans le but de protéger les cellules du stress du RE. Dernièrement de nouveaux gènes cibles de XBP1 ont été mis en évidence, en particulier des gènes impliqués dans l'homéostasie rédox et la réponse au stress oxydatif [352].

Liu *et al.* ont montré qu'une déficience en XBP1 augmentait la sensibilité au stress oxydatif et la production de ROS. Cette sensibilité s'accompagne d'une diminution de l'expression de certaines enzymes anti-oxydantes tels que la catalase, la SOD1 et la thioredoxine 1 [353]. A l'inverse, la surexpression de XBP1 dans les gliomes semble avoir un effet protecteur vis-à-vis de l'arsenic ou de thérapies pro-oxydantes telles que la radiothérapie [354]. L'arsenic est connu comme un agent pro-oxydant, il induit la baisse d'expression des enzymes antioxydantes et de NRF2, facteur de transcription régulant l'expression de ces enzymes [355]. Ceci induit une augmentation de la production des ROS et active le stress du RE dans les cellules β -pancréatiques, les neutrophiles humains, et différentes cellules de myélome [356-359].

La régulation de ces gènes par XBP1 ne semble pas directe. Il apparaît que des mutations des boîtes CCAAT affectent fortement la capacité de XBP1 à induire l'expression de la catalase, par ailleurs une surexpression de XBP1 augmente la liaison du facteur de transcription NF-Y au promoteur de la catalase. Ces résultats suggèrent une régulation des gènes des enzymes antioxydantes par XBP1 au travers de la fixation de NF-Y sur leur promoteur. Il semble que ce soit la forme non épissée de *XBP1* qui régule positivement l'expression de la catalase et non la forme issue de l'épissage du messenger par IRE1.

6.3.3 Les ROS inducteurs du stress du RE

Les ROS ont été décrits comme des inducteurs du stress du RE en ciblant directement les différentes voies de signalisation du stress du RE, dont l'activation de JNK par activation du complexe TRAF2-ASK1 [332], l'activation transcriptionnelle de *CHOP* et l'activation des caspases.

Dans le RE, les changements luminaux du statut rédox sont détectés par les protéines chaperonnes, suite à la formation d'agrégats et plus directement par les protéines transmembranaires impliquées dans la signalisation comme ATF6. En effet, les ponts disulfures d'ATF6 sont réduits en cas de stress oxydatif dans le RE, formant des monomères d'ATF6 migrant vers l'appareil du Golgi et d'où ils agissent comme facteur de transcription [360].

La libération des stocks de calcium du RE sont importantes dans le stress du RE et dans l'induction de la mort par le stress du RE. Les canaux calciques sont sensibles au statut rédox, notamment par la modulation de l'oxydoréduction de résidus thiol de ces canaux, provoquant leur ouverture.

La protéine disulfure isomérase (PDI) est une des principales protéines chaperonnes du RE. Elle facilite le repliement et la formation de pont disulfure, et est régulée au niveau post-traductionnel par des modifications oxydatives (nitrosylation et glutathionylation), mais aussi par l'oxydase du RE (ERO1, ER oxydoreductine). ERO1 régénère la PDI de sa forme réduite à sa forme oxydée (active). L'activité d'ERO1 est régulée par la modulation d'un résidu cystéine situé en dehors du site

catalytique qui inhibe son activité lors que le lumen du RE est sous condition oxydante. Un déséquilibre du potentiel redox dans le RE est la cause la plus fréquente du stress du RE qui implique une altération de la maturation des protéines, une accumulation de protéines de mauvaise conformation et initie la réponse UPR [361].

Comme décrit dans ce chapitre le stress du RE et le stress oxydatif sont très liés. En effet, les différentes voies du stress du RE régulent la production de ROS selon les différentes phases du stress. Le stress oxydatif est aussi capable d'induire le stress du RE dans sa globalité par altération de l'homéostasie du RE, ou spécifiquement en agissant sur certaines de ses voies, IRE1/TRAF2/ASK1/JNK ou ATF6. De part leur interconnexion, le stress du RE et le stress oxydatif sont des cibles de choix dans le traitement du cancer pour agir en synergie ou comme boucle d'amplification en réponse à un agent cytotoxique.

But de ce travail

Les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques métaboliques particulières dont une altération du métabolisme des lipides qui a pour conséquence une augmentation de la teneur en AGMI. Cette modification confère à la cellule cancéreuse un avantage prolifératif, et est associée à une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans leur biosynthèse. Il a également été mis en évidence une augmentation de l'expression des enzymes de la synthèse des AG dans les cancers colorectaux, dont SCD-1.

Le but de notre travail fut dans un premier temps d'évaluer le rôle de SCD-1 dans la prolifération de la cellule cancéreuse colique et de définir les mécanismes sous jacents. Ainsi, nous avons réprimé l'expression et l'activité de SCD-1 par des siRNA et des inhibiteurs pharmacologiques tels que le CVT-11127 et le MF-438 dans différentes lignées de cellules cancéreuses coliques, et nous en avons étudié les effets sur la viabilité cellulaire. Dans un second temps, notre travail fut d'apporter des éléments nouveaux sur les mécanismes à l'origine de l'effet anti-prolifératif des CLA sur les cellules cancéreuses coliques.

Résultats et discussion

1. L'inhibition de SCD-1 induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses coliques : implication de CHOP

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les conséquences de l'inhibition de l'activité SCD-1 dans les cellules cancéreuses coliques humaines, SW480 et HCT116, et dans la lignée d'ostéosarcome humaine, U2OS. Pour cela nous avons étudié la biosynthèse des AGMI, la survie des cellules cancéreuses et les mécanismes mis en jeu après l'abolition de l'activité SCD-1 par deux approches, soit l'extinction de l'expression de SCD-1 par des siRNA, soit l'inhibition de son activité par des inhibiteurs pharmacologiques.

Deux couples de siRNA dirigés contre l'ARNm *SCD-1*, *SCD-1.A* et *SCD-1.B*, ainsi qu'une séquence de siRNA contrôle (scr) ne ciblant aucune séquence d'ARNm du génome humain ont été utilisés. Pour conforter les résultats obtenus avec les ARN interférents, nous avons utilisé dans cette étude deux inhibiteurs pharmacologiques, le CVT-11127 et le MF-438, afin de réprimer l'activité SCD-1 dans les cellules cancéreuses.

Nous avons complété cette étude sur les cellules cancéreuses, par des travaux sur des cellules non transformées, les fibroblastes de peaux humains normaux (NHDF), afin de rechercher si l'abolition de SCD-1 conduit aux mêmes effets cytotoxiques sur cellules normales et cancéreuses.

1.1 Résultats

1.1.1 Inhibition de l'expression de *SCD-1* et suppression de la synthèse *de novo* des AGMI

Les cellules cancéreuses coliques transfectées par les siRNA *SCD-1.A* et *SCD-1.B*, montrent comme attendue une diminution de l'expression de la protéine SCD-1 observée dès 24h après la transfection (Figure 20) par rapport aux cellules témoins transfectées par le siRNA scr contrôle.

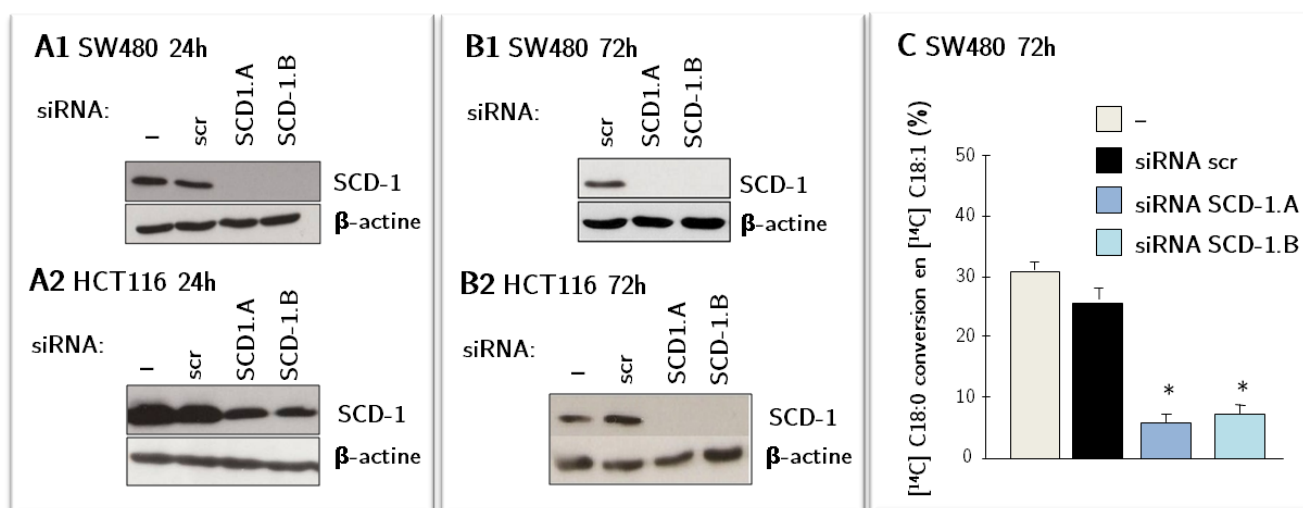


Figure 20 : Inhibition de l'expression de *SCD-1* et de son activité par siRNA dans les cellules cancéreuses coliques.

A. Expression de la protéine SCD-1 dans les cellules SW480 (A1) et HCT116 (A2) 24h après transfection par les différents siRNA, contrôle (scr), SCD-1.A et SCD-1.B. B. Expression de la protéine SCD-1 dans les cellules SW480 (B1) et HCT116 (B2) 72h après transfection. C. Niveau d'activité de SCD-1 dans les cellules SW480 72h après transfection.

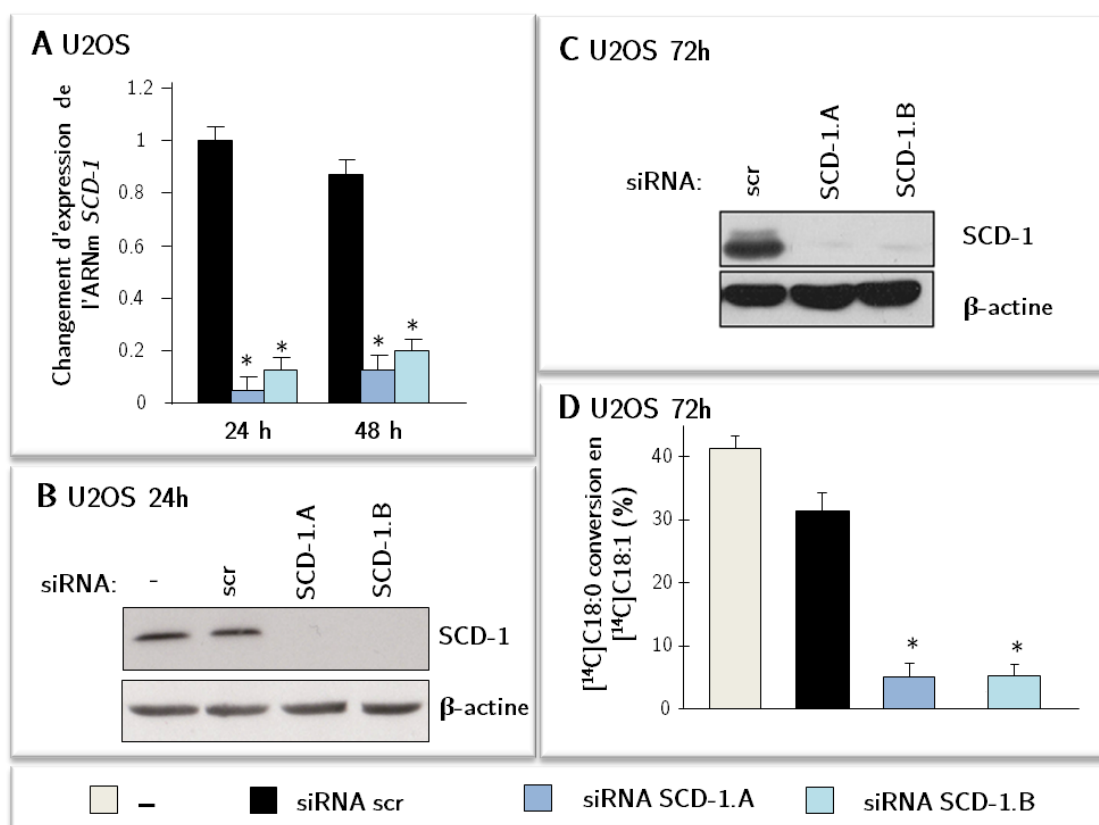


Figure 21 : Inhibition de l'expression de *SCD-1* par les siRNA dans les cellules U2OS.

A. Expression de l'ARNm *SCD-1* 24h et 48h après la transfection, évaluée par RT-PCR en temps réel. B. Expression de la protéine SCD-1 24h après transfection par les siRNA.

C. Expression de la protéine SCD-1 72h après transfection par les siRNA. D. Niveau d'activité de SCD 72h après transfection.

Dans la lignée d'ostéosarcome U2OS, on montre également une diminution de l'expression de *SCD-1* dès 24h après la transfection (Figure 21).

Après extinction de l'expression de *SCD-1* par les ARN interférents ou inhibition de son activité par les inhibiteurs pharmacologiques, CVT-11127 et MF-438, dans les cellules cancéreuses coliques et dans les cellules U2OS, on observe une réduction significative de l'activité de désaturation SCD mesurée par la conversion de l' $[^{14}\text{C}]$ -acide stéarique en $[^{14}\text{C}]$ -acide oléique (Figure 20C, Figure 21D, et Figure 22).

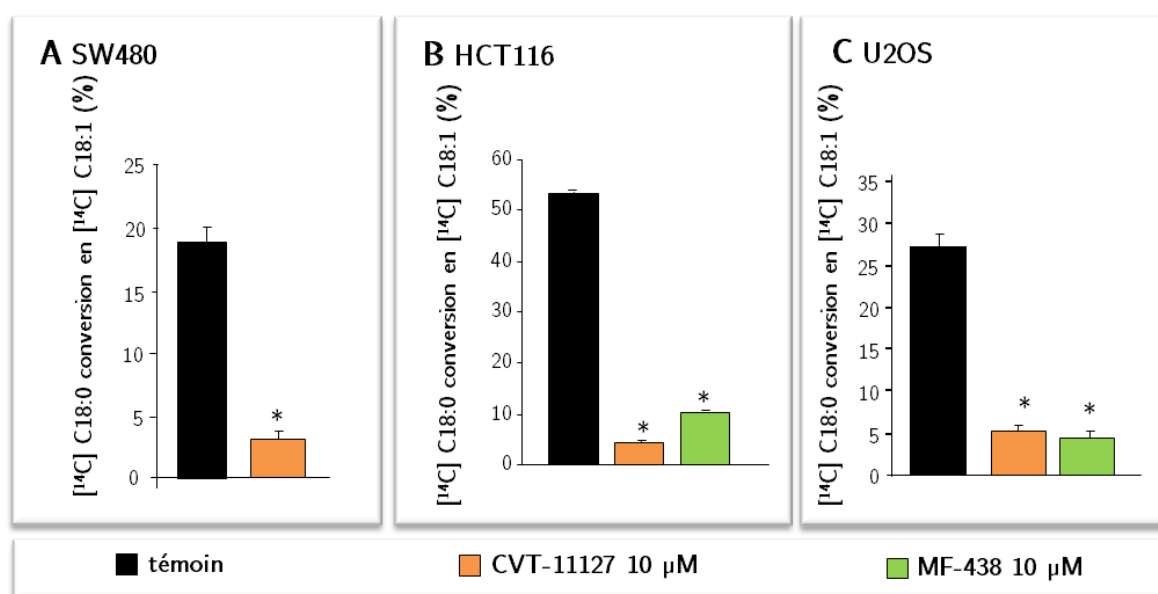


Figure 22 : Effet des inhibiteurs de SCD-1, CVT-11127 et MF-438, sur l'activité de désaturation SCD.

A. Activité de désaturation SCD dans les cellules SW480 après 24h de traitement à 10 µM
 B. Activité de désaturation de SCD dans les cellules HCT116 après 24h de traitement à 10 µM.
 C. Activité de désaturation SCD après traitement au CVT-11127 et au MF-438 à 10 µM pendant 24h dans les cellules U2OS.

Les deux approches utilisées pour cette étude permettent de réduire significativement l'expression de *SCD-1* et/ou son activité dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 et SW480, et la lignée d'ostéosarcome U2OS. Et par conséquent la synthèse *de novo* des AGMI est significativement réduite dans nos modèles.

1.1.2 L'extinction de SCD-1 induit l'apoptose des cellules cancéreuses

La détermination de la viabilité cellulaire par exclusion du bleu trypan montre une diminution de la viabilité des cellules SW480 (Figure 23A1) et U2OS (Figure 24A1) après 72h de transfection par les siRNA SCD-1 par rapport au contrôle, de manière plus prononcée pour les cellules U2OS.

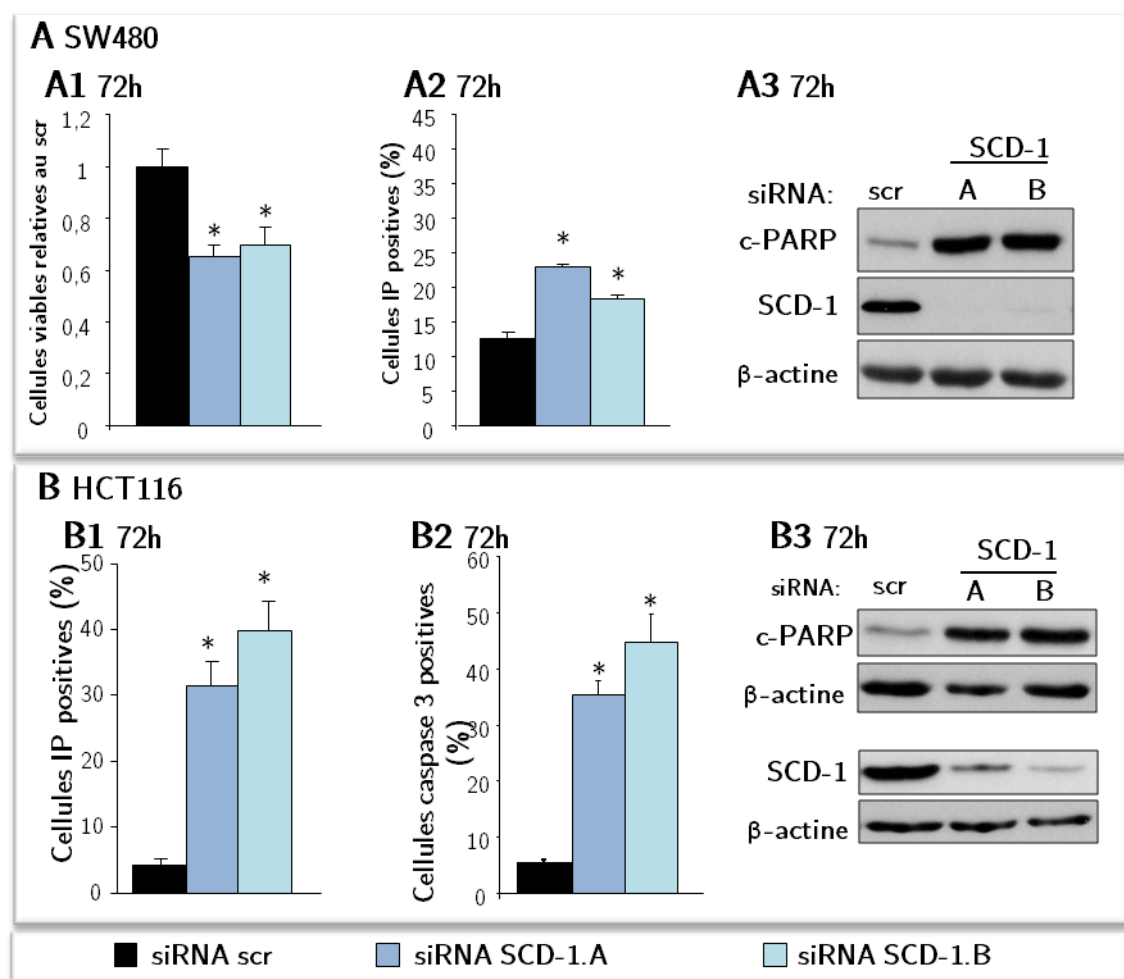


Figure 23 : Induction d'apoptose des cellules cancéreuses coliques SW480 et HCT116 par l'extinction de l'expression de SCD-1.

A. 72h après la transfection des cellules SW480. En A1, mesure de la viabilité des cellules au Bleu Trypan relative au siRNA contrôle (scr). En A2, la mortalité mesurée par marquage à l'iodure de propidium (IP) (% de cellules positives). En A3, l'expression de la protéine PARP-clivée (c-PARP) et de SCD-1. B. 72h après la transfection des cellules HCT116. En B1, l'évaluation de la mortalité par marquage IP. En B2, le pourcentage d'activité caspase-3. En B3, l'expression des protéines c-PARP et SCD-1.

Dans les cellules U2OS, on montre également que le nombre de cellules évalué indirectement par CyQuant®, après 24h, 48h, et 72h de transfection, diminue dès 48h dans les cellules dépourvues de SCD-1 (Figure 24A2).

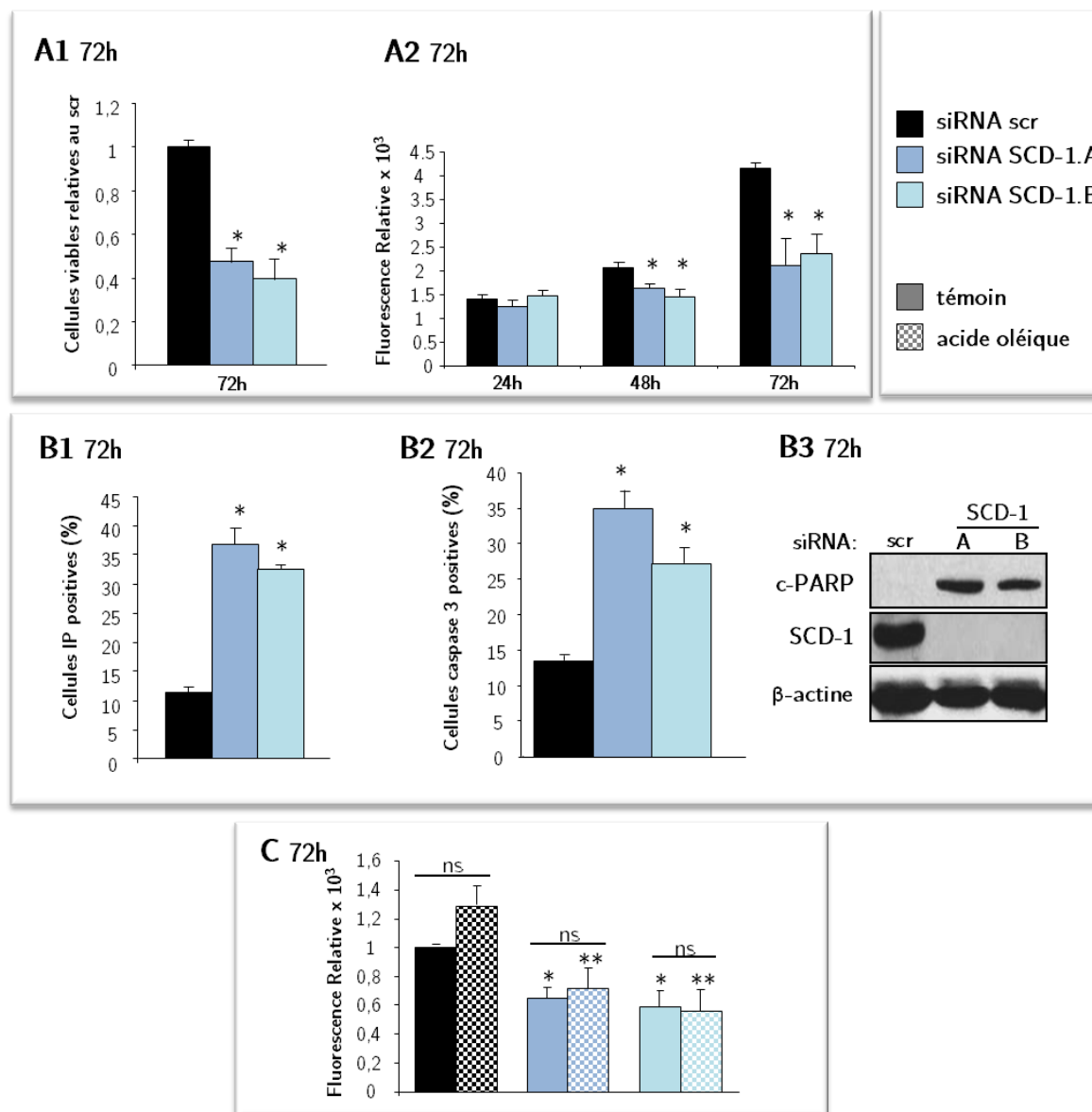


Figure 24 : Induction d'apoptose par l'extinction de l'expression de SCD-1 dans les cellules U2OS.

A. En A1, l'évaluation de la viabilité cellulaire au Bleu Trypan comparée au siRNA contrôle (scr). En A2, l'évaluation de la prolifération cellulaire, par mesure du nombre relatif de cellules (CyQuant®, en unité de fluorescence arbitraire) 0, 24, 48 et 72h après transfection. B. En B1, l'évaluation de la mortalité cellulaire en pourcentage de cellules marquées à l'IP. En B2, l'évaluation du pourcentage d'activité caspase-3 72h après la transfection. En B3, l'expression protéique de c-PARP et de SCD-1 72h après la transfection par les siRNA. C. Evaluation du nombre de cellule 72h après la transfection avec ou sans supplémentation en acide oléique à 100 μ M (motif en damier et motif uni respectivement). ns : non significatif.

Nous observons que l'extinction de l'expression de **SCD-1** comme l'inhibition de son activité par le CVT-11127 et le MF-438 induisent la mort des cellules cancéreuses coliques et des U2OS (Figure 23, Figure 24 et Figure 25). La mort induite par les inhibiteurs de SCD-1 est plus prononcée et apparaît plus tôt qu'avec les ARN interférents. De plus, la réponse est dose dépendante, mais la sensibilité aux inhibiteurs varie en fonction du composé et du type cellulaire (Figure 25).

L'activité caspase-3, et l'expression de la forme clivée de PARP (c-PARP) sont des **marqueurs** de l'apoptose. L'étude de ces marqueurs montre que l'extinction de l'expression de **SCD-1** et l'inhibition de son activité induisent, dans les cellules cancéreuses coliques et dans les cellules d'ostéosarcome, une **augmentation** du pourcentage de cellules caspase-3 positives et induit c-PARP (Figure 23, Figure 24B, et Figure 25).

Nous avons également montré qu'un apport exogène en acide oléique, produit de l'activité SCD-1, à raison de 100 μ M dans les cellules U2OS, ne s'oppose pas à l'effet de la déplétion en SCD-1 (Figure 24C).

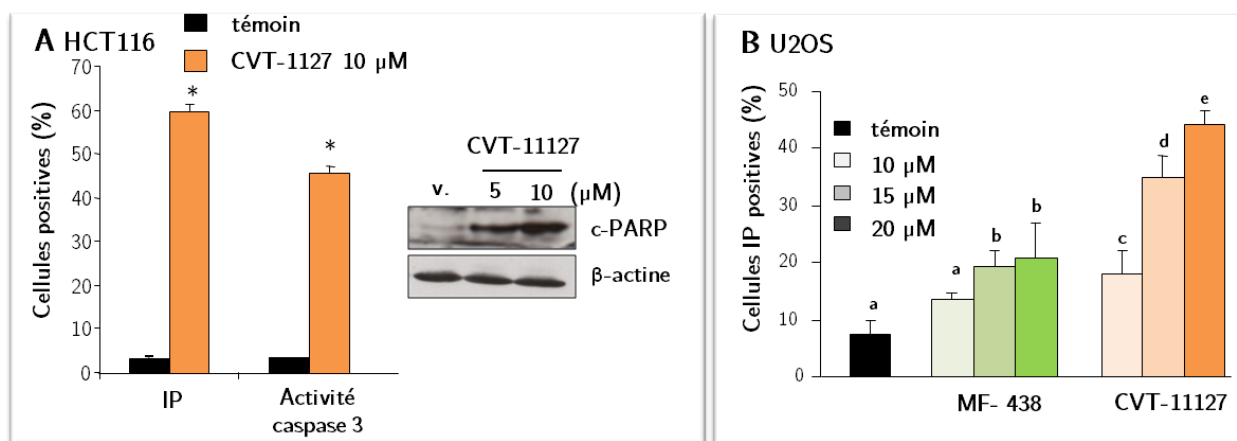


Figure 25 : Induction de la mort cellulaire par les inhibiteurs de SCD-1, CVT-11127 et MF-438.

A. Evaluation de la mortalité cellulaire en % de cellules marquées par l'IP et du niveau de cellules caspase-3 positives (%) chez HCT116 après 48h de traitement par CVT-11127 à 10 μ M, et l'expression de protéique de c-PARP après 48h de traitement. B. Evaluation de la mortalité (% de cellules IP positives) chez U2OS après 48h de traitement à des concentrations croissantes (10, 15 et 20 μ M) en MF-438 (vert) et CVT-11127 (orange).

Nous avons montré précédemment que l'extinction de l'expression de SCD-1 et/ou son inhibition conduisent à une abolition de la synthèse *de novo* d'acide oléique (Figure 20C et Figure 21C). Cette extinction de la synthèse des AGMI conduit à la mort par apoptose des cellules cancéreuses coliques et d'ostéosarcome (Figure 23, Figure 24, et Figure 25).

1.1.3 Induction partielle du stress du réticulum endoplasmique par l'inhibition de l'expression de *SCD-1*

Des perturbations de l'homéostasie du réticulum endoplasmique (RE) due à des altérations du métabolisme des lipides sont connues pour être à l'origine du stress du RE, jusqu'à induire la mort cellulaire lorsque le stress est soutenu et sévère.

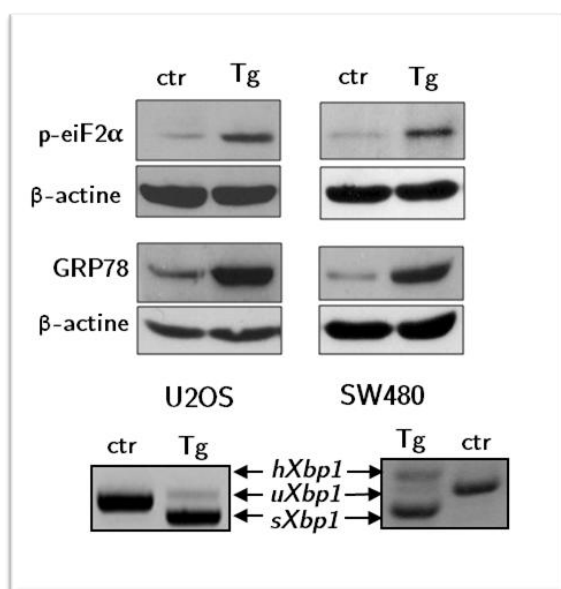


Figure 26 : Induction de l'expression des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique dans les lignées cellulaires U2OS et SW480 après traitement à la thapsigargine.

Expression de GRP78 et de phospho-eIF2α (p-eIF2α), par western blotting, après une nuit de traitement à la thapsigargine (Tg) 2 μM ou son véhicule (ctr). Epissage particulier du messenger de *XPB1* après un traitement d'une nuit à la Tg à 2 μM analysé par PCR semi-quantitative. *hXPB1* : hybride ; *uXPB1* : non épissé, *sXPB1* : épissé

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un stress du RE pouvait être induit suite à l'abolition de la synthèse des AGMI.

Nous avons d'abord recherché la présence des marqueurs du stress du RE les plus représentatifs dans les cellules UO2S et SW480 : GRP78/BIP, phospho-eIF2, ARNm *XPB1* épissé (*sXPB1*). La Figure 26 montre que les cellules U2OS et SW480 ont la machinerie moléculaire liée au stress du RE induit par une perturbation de l'homéostasie calcique lors du traitement par la thapsigargine (Tg) à 2 μM pendant une nuit.

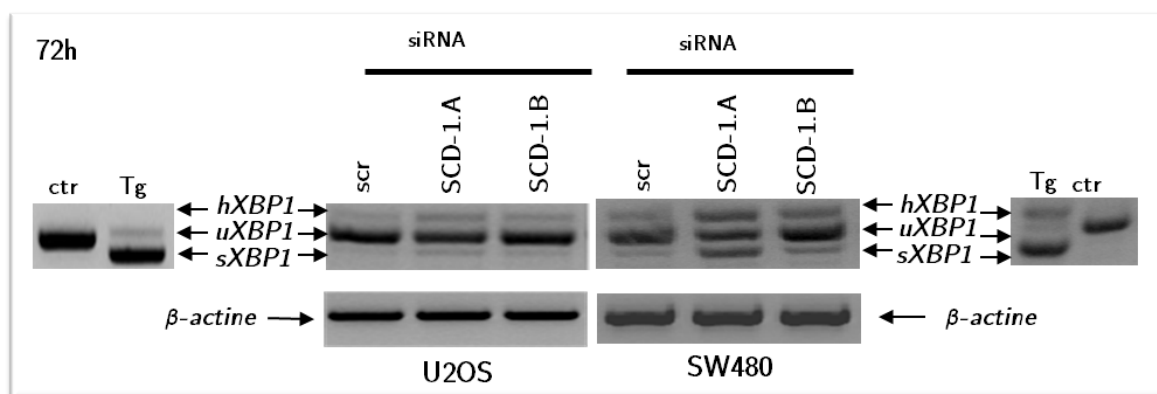


Figure 27 : Expression en ARNm *XBP1* après extinction de l'expression SCD-1 dans les cellules U2OS et SW480.

Analyse de l'expression de *XBP1* dans les cellules U2OS et SW480 72h après la transfection par RT-PCR semi-quantitative. Trois formes du transcrit sont observées, la forme épissée (*sXBP1*), la forme non-épissée (*uXBP1*) et la forme hybride (*hXBP1*). Le traitement d'une nuit par la thapsigargine (Tg) à 2 μ M est utilisé comme contrôle positif.

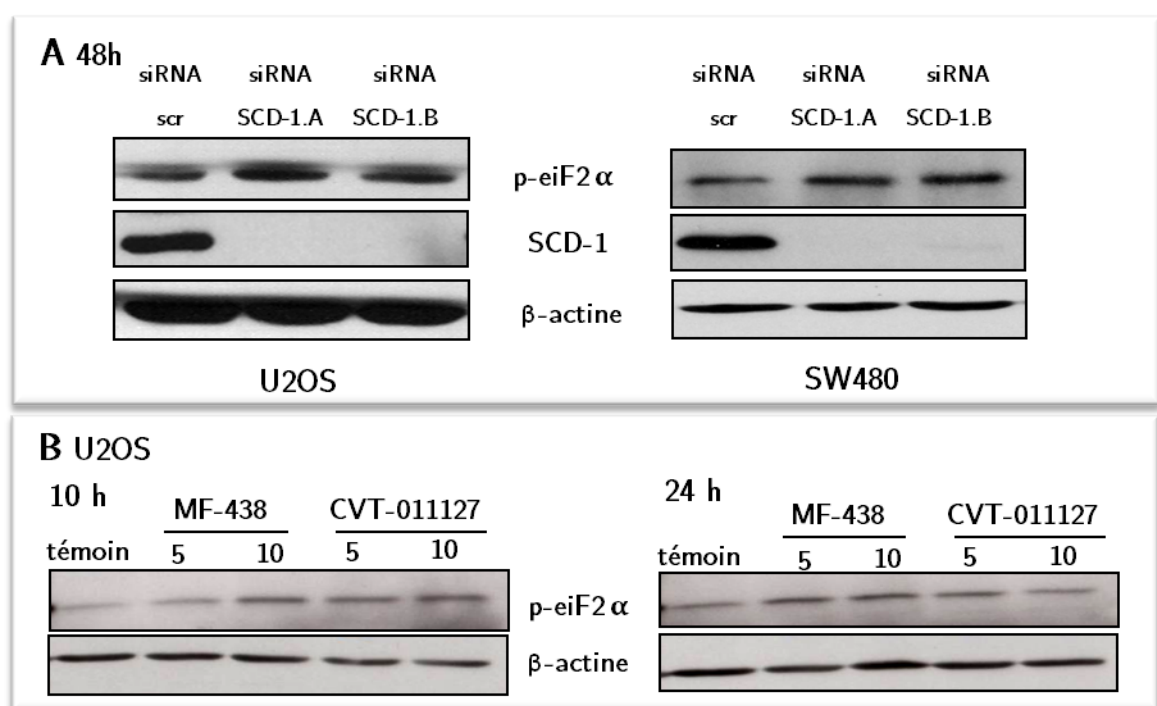
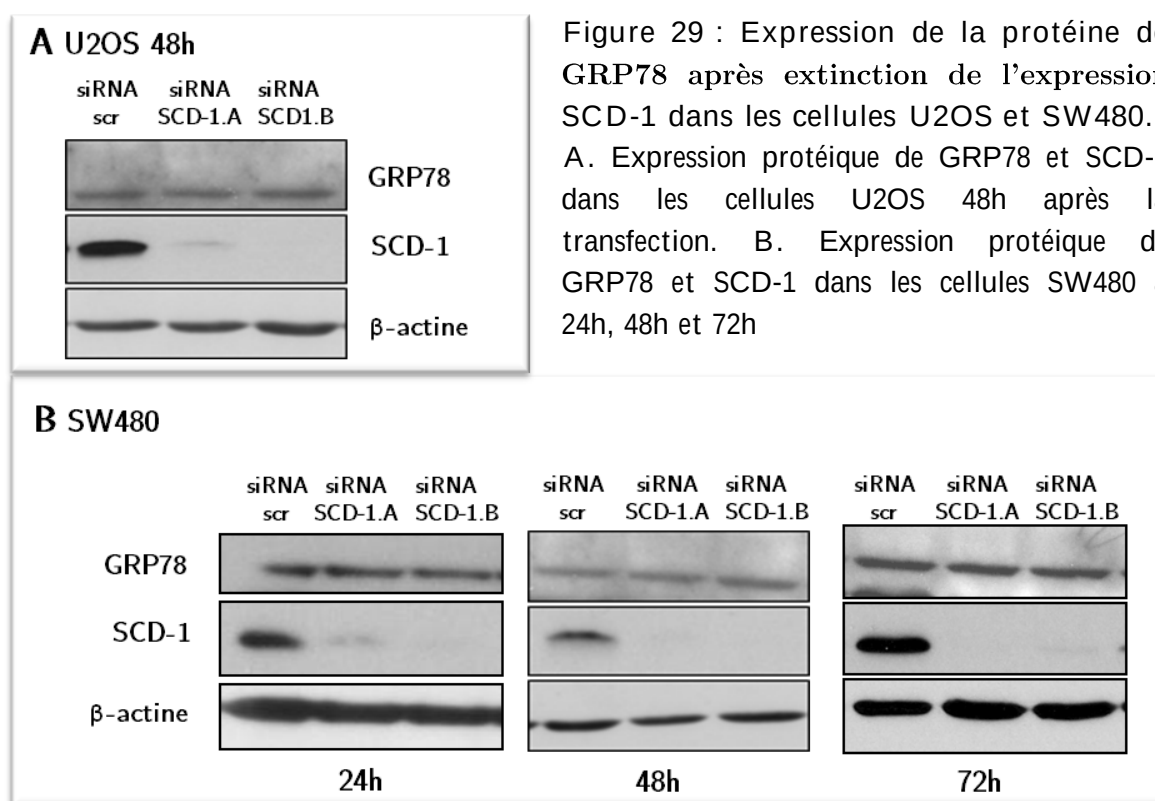


Figure 28 : Expression de la forme phosphorylée de la protéine eIF2 α après perte de l'activité SCD-1 dans les cellules U2OS et SW480.

A. Expression protéique de phospho-eIF2 α (p-eIF2 α) dans les cellules U2OS et SW480 48h après la transfection B. Expression protéique de p-eIF2 α dans les cellules U2OS après traitement par les inhibiteurs de SCD-1, MF-438 et CVT-11127, à 5 et 10 μ M pendant 10h et 24h.

L'étude des marqueurs du stress du RE après l'extinction de l'expression de *SCD-1* par les ARN interférents révèle la formation d'ARNm XBP1 hybride (*hXBP1*) et

épissé (sXBP1) dans les cellules U2OS et SW480 (Figure 27), ainsi que l'expression de p-eIF2 α (Figure 28A). L'apparition des formes hybrides et épissés indiquerait une activation de la voie IRE1 α , qui semble plus prononcée dans les cellules SW480 que dans les cellules U2OS. La phosphorylation d'eIF2 α peut être une réponse de la cellule à la transfection d'ARN interférents, variable en fonction de leur séquence. Nous avons donc étudié p-eIF2 α dans les cellules traitées par les inhibiteurs de SCD-1. On montre que l'abolition de la synthèse *de novo* des AGMI par le CVT-11127 et le MF-438, induit également p-eIF2 α dès 10h après le traitement dans les cellules U2OS (Figure 28B).



L'étude de la protéine chaperonne GRP78, régulant les voies du stress du RE montre, en revanche, que l'extinction de l'expression de SCD-1 ne modifie par son expression quel que soit le temps après la transfection (Figure 29).

Donc lors de l'abolition de la synthèse des AGMI dans les cellules cancéreuses coliques et dans les cellules U2OS par les ARN interférents ou par les inhibiteurs, nous observons la modulation de l'expression de certains marqueurs caractéristiques

de l'activation du stress du RE, *sXBP1* et p-eIF2 α mais aucune modification de l'expression de GRP78.

1.1.4 Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par l'extinction de *SCD-1*

Un stress du RE prolongé conduit à l'activation de voies de mort dont le facteur de transcription CHOP est un élément essentiel.

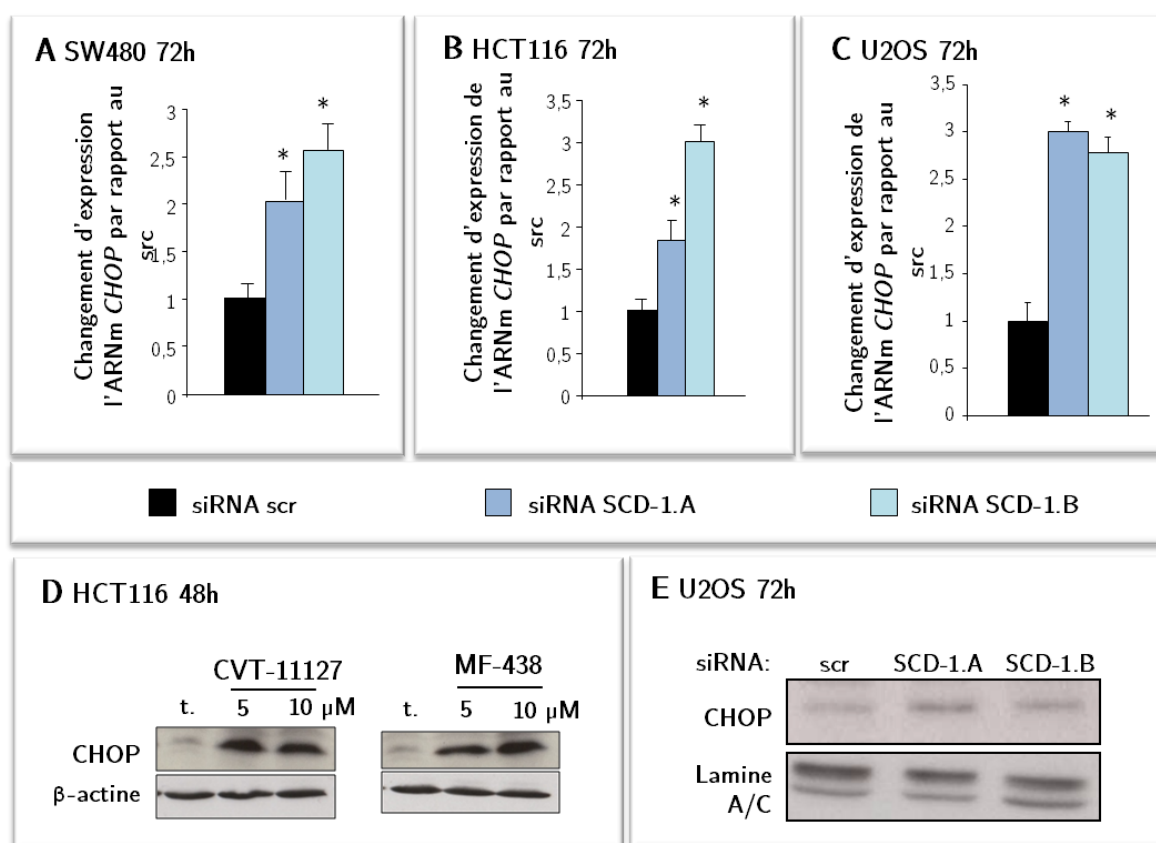


Figure 30 : Expression de CHOP après la perte d'activité SCD-1 dans les cellules cancéreuses coliques SW480 et HCT116 et les cellules U2OS.

Induction de l'ARNm *CHOP* dans les cellules comparée à l'expression dans les cellules contrôles (siRNA scr) 72h après la transfection génique évaluée par RT-qPCR en temps réel: A. SW480 B. HCT116 C. U2OS. D. Expression de la protéine CHOP 48h après traitement par CVT-11127 et MF-438 à 5 et 10 μ M. t. : témoin. Evaluée par western blotting sur extrait de protéines cellulaires totales. E. Expression de la protéine CHOP 72h après transfection des cellules U2OS par les siRNA SCD-1.A et .B et le siRNA contrôle (scr), évaluée par western blotting sur extrait nucléaire.

Nos résultats montrent qu'après extinction de l'expression de *SCD-1* par les siRNA SCD-1.A et SCD-1.B, ou après l'inhibition de son activité par le CVT-11127 et le

MF-438, l'expression de *CHOP* est augmentée dans les cellules cancéreuses coliques et dans les cellules d'ostéosarcome (Figure 30).

Pour étudier le rôle de CHOP dans la mort induite par l'extinction de SCD-1, nous avons utilisé deux approches afin de prévenir son induction, les cellules HCT116 BA-1 transfectées de manière stable par l'ADNc en orientation antisens de *CHOP* humain [362] (Figure 31A), et l'extinction de *CHOP* par un siRNA (siRNA *CHOP*) (Figure 31B).

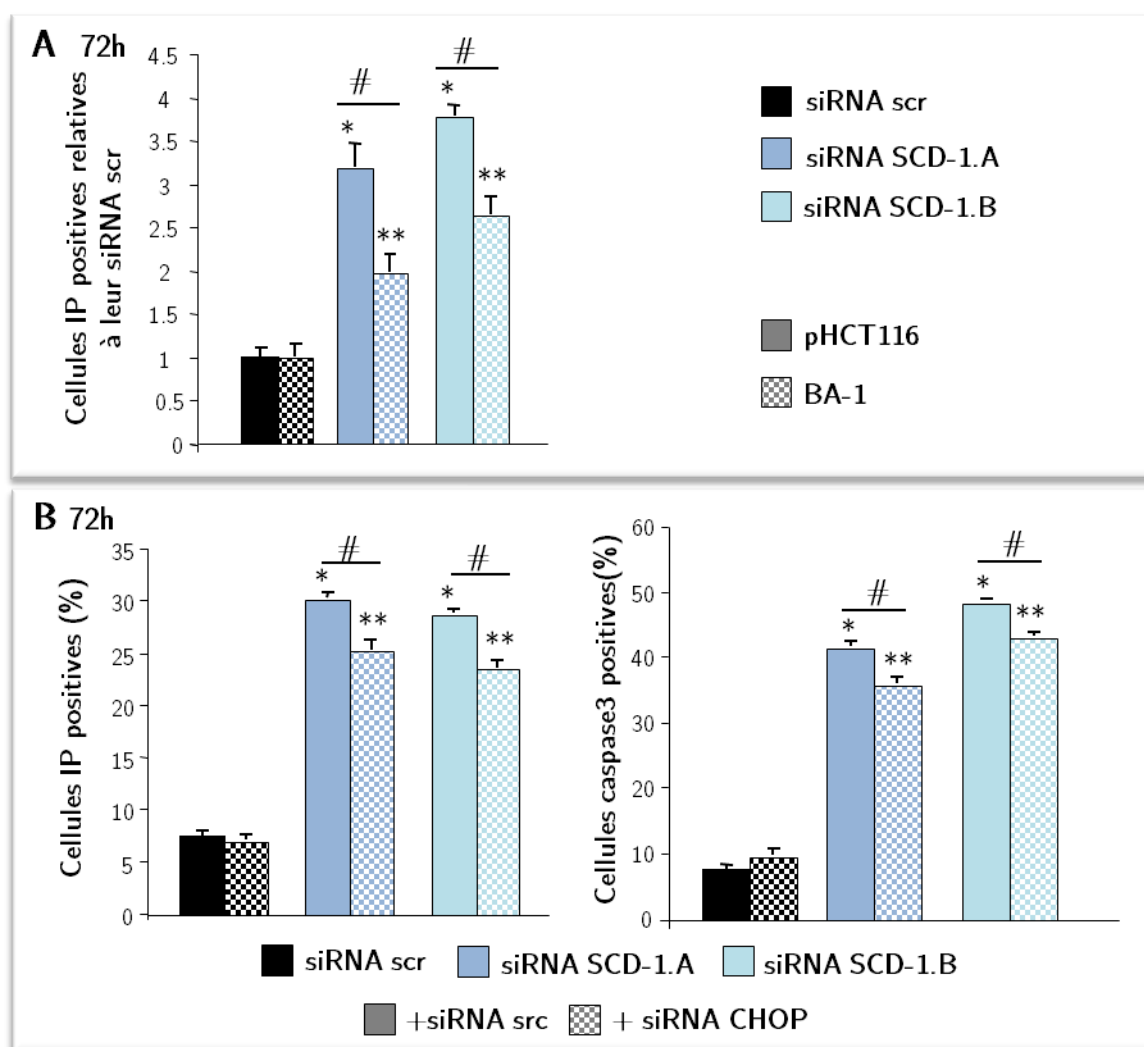


Figure 31 : Rôle de CHOP dans la mortalité des cellules HCT116 déficientes en SCD-1.

A. Evaluation de la mortalité des cellules HCT116 parentales (pHCT116, motif uni) et des BA-1 (HCT116 transfectées de manière stable par l'antisens de *CHOP*, motif damier). B. Evaluation de la mortalité et du pourcentage de cellules à activité caspase-3 72h après la transfection des cellules HCT116 par les siRNA SCD-1.A et .B (en couleur) et le contrôle

(scr, en noir), doublement transfectées par le siRNA CHOP (en damier) ou le siRNA contrôle (en unis).

Dans les cellules HCT116 BA-1, l'extinction de l'expression de *SCD-1* par les ARN interférents n'induit pas autant de mort par apoptose que dans les cellules HCT116 parentales (Figure 31A). Ces résultats sont confirmés par l'extinction de l'expression de *CHOP* par des ARN interférents dans les cellules HCT116 (Figure 31B). L'induction de *CHOP* apparait donc impliquée dans l'apoptose induite par l'extinction de *SCD-1*.

Dans les cellules U2OS, nous avons également montré l'implication de *CHOP* dans la mort induite par l'extinction de *SCD-1* à l'aide du vecteur dominant négatif *CHOP* (DN-CHOP) vs vecteur vide (ctr). La construction DN-CHOP est porteuse d'une mutation dans le domaine leucine zipper (L134A/L141A) qui prévient toute activité de facteur de transcription [363]. Nos résultats montrent que la surexpression du vecteur DN-CHOP réduit significativement la mort par apoptose induite par l'extinction de *SCD-1* (■) par rapport au vecteur vide (■) (Figure 32B).

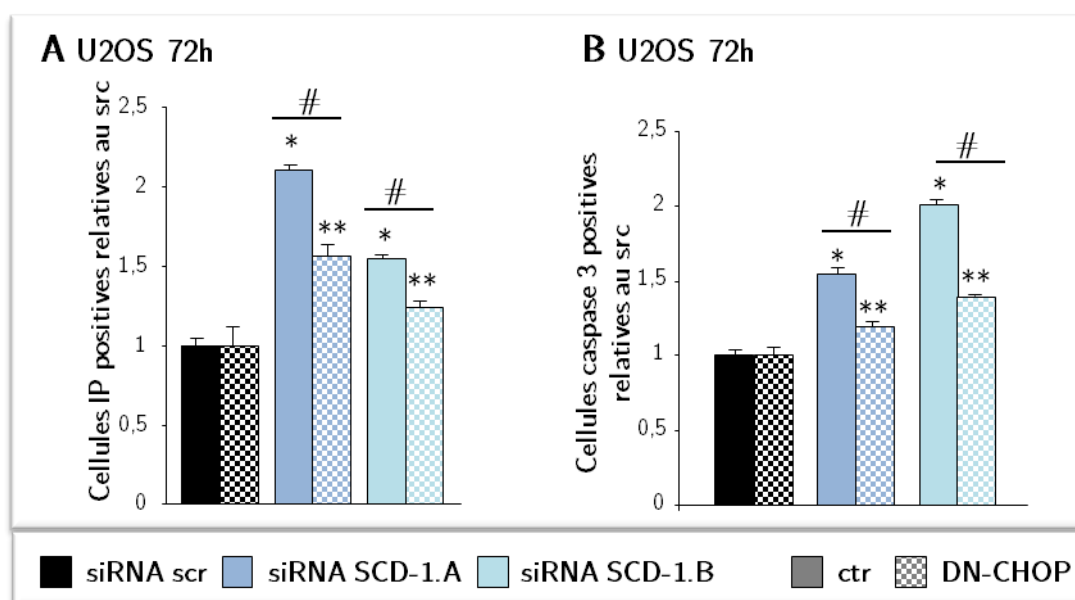


Figure 32 : Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par l'extinction de *SCD-1* dans les cellules U2OS.

Les cellules U2OS ont été dans un premier temps transfectées de manière transitoire par le plasmide vide (ctr, motif unis) ou par le plasmide dominant négatif *CHOP* (DN-CHOP, motif de damier), puis sélectionnées pendant trois jours au G418. Les cellules résistantes ont été transfectées par les siRNA, scr ou *SCD-1.A* et *B*. A. Evaluation de la mortalité par

marquage à l'iodure de propidium (IP) relative au contrôle (plasmide + siRNA scr). B. Evaluation du niveau de cellules caspase-3 positives relatif au contrôle (plasmide + siRNA scr).

On peut donc dire que la protéine CHOP participe à la mort induite par l'extinction de SCD-1 dans les cellules cancéreuses coliques et dans les cellules U2OS.

1.1.5 Effets ciblés de l'extinction de SCD-1 aux cellules cancéreuses

Nous avons montré que la viabilité des cellules cancéreuses est affectée par la déplétion de l'activité de désaturation SCD. Nous avons alors recherché l'effet d'une inhibition de la synthèse des AGMI sur des cellules non cancéreuses pour évaluer la spécificité possible de l'extinction de SCD-1. Ceci permettrait d'envisager le développement d'une molécule anticancéreuse, ciblant SCD-1, spécifique de la cellule tumorale, sans altérer la viabilité des cellules saines de l'organisme.

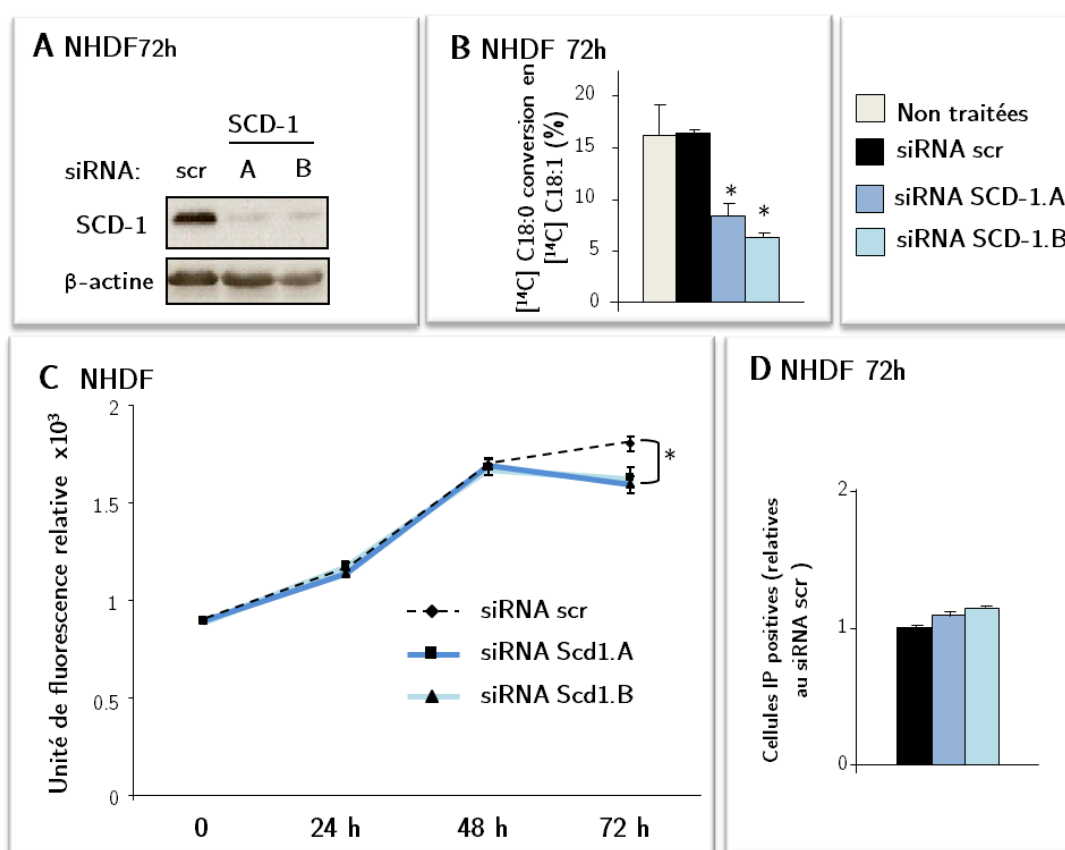


Figure 33 : Impact de l'inhibition de l'activité SCD-1 par les siRNA sur les fibroblastes de peau humains normaux (NHDF).

A. Efficacité de la transfection sur l'expression protéique de SCD-1 après 72h. B. Evaluation de l'activité SCD-1 72h après la transfection par les siRNA contrôle (scr), SCD-1.A et B. C. Evaluation de la prolifération cellulaire, par évaluation du nombre relatif de cellules

(CyQuant®, en unité de fluorescence arbitraire) à 0, 24, 48 et 72h après transfection.
D. Evaluation de la mortalité induit par les siRNA 72h après la transfection.

La transfection des cellules NHDF avec 200nM de siRNA SCD-1.A et .B réduit de manière significative l'expression protéique de SCD-1 par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle (Figure 33A). L'extinction de l'expression de SCD-1 conduit également à une réduction significative de l'activité de désaturation SCD (Figure 33B), bien que l'activité de désaturation de base soit plus faible que dans les cellules cancéreuses (Figure 20C et Figure 21C). Il apparaît que cela n'affecte pas le nombre de cellules NHDF au cours du temps à l'exception du point 72h par rapport au contrôle (Figure 33C). On observe qu'à 72h il n'y a pas de modification significative de la mortalité dans les cellules dont l'expression de *SCD-1* est éteinte par rapport aux cellules contrôles (Figure 33D), ce qui suggère un blocage de la prolifération mais pas d'altération de la viabilité cellulaire dans les cellules NHDF.

Ces résultats montrent qu'une perte de la synthèse des AGMI affecterait seulement la viabilité des cellules cancéreuses.

1.2 Discussion

L'objectif de cette étude fut d'évaluer le rôle de SCD-1, enzyme limitante de la synthèse des AGMI, dans la prolifération de la cellule cancéreuse colique et de définir les mécanismes sous jacents.

Nous avons montré que l'abolition de l'expression de *SCD-1* par les siRNA ou de son activité par les inhibiteurs, CVT-11127 ou MF-438, conduit à l'abolition de la synthèse des AGMI et altère la viabilité des cellules cancéreuses mais n'a aucun effets sur la survie des cellules non cancéreuses. De plus, l'addition exogène d'acide oléique, produit majeur de l'activité SCD, ne prévient pas la mort induite par la suppression de la synthèse endogène des AGMI. L'inhibition de l'expression de SCD-1 induit la mort des cellules cancéreuses. Celle-ci s'accompagne de l'expression des marqueurs de la réponse UPR, tels que l'épissage d'XBP1, p-eIF2 α , et CHOP. Nous avons mis en

évidence que la mort des cellules cancéreuses induite par la déficience en SCD-1 est dépendante de CHOP.

Différentes études ont montré que l'extinction de SCD-1 dans différents types de cellules cancéreuses, pulmonaires, mammaires, prostatiques et cervicales [102, 112, 183, 206], induit la mort par apoptose. Dans ce travail, nous avons montré que l'extinction de SCD-1 par les siRNA ou son inhibition pharmacologique induit une augmentation de l'activité caspase-3 et de c-PARP dans les cellules cancéreuses coliques, HCT116 et SW480, et les cellules issues d'un ostéosarcome, U2OS (Figure 23, Figure 24, et Figure 25). De plus, nous montrons que l'abolition de la synthèse *de novo* des AGMI altère uniquement la viabilité des cellules cancéreuses et pas celle de cellules saines comme les NHDF, bien que leur prolifération ralentisse légèrement (Figure 33C). La différence de sensibilité entre les cellules cancéreuses et les cellules saines vis-à-vis de l'absence de synthèse *de novo* des AGMI est peut être due à des besoins différents. Bien que proliférant, les cellules normales se multiplient plus lentement (Figure 33C) que les cellules cancéreuses. Elles ne présentent donc pas les mêmes besoins en AG, en termes de quantité et de rapidité d'utilisation des AG. La cellule cancéreuse du fait de sa multiplication rapide, nécessite un apport en AG plus important et rapide pour la synthèse de nouvelles membranes cellulaires. Par ailleurs, la multiplication des cellules cancéreuses ne dépend pas des apports exogènes en AG [81], mais elle est dépendante de sa propre synthèse. Elle possède la machinerie nécessaire pour produire *de novo*, une grande partie des AG dont elles ont besoin. C'est pourquoi, nous supposons que l'abolition de la synthèse *de novo* des AGMI n'affecte que la viabilité des cellules cancéreuses coliques et des cellules U2OS, sans affecter la viabilité des cellules NHDF.

Par ailleurs, il est connu que l'inhibition de la synthèse des AGMI par l'extinction de l'activité de SCD-1, conduit à une accumulation des substrats de l'activité SCD tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique [102, 108, 183]. Les effets cytotoxiques des AGS ont été rapportés dans les cellules cancéreuses et non cancéreuses. Une modification du ratio AGS/AGMI a des répercussions sur la composition des

phospholipides membranaires et peuvent à l'origine de l'activation d'un stress du RE, de l'altération du potentiel membranaire mitochondriale et de la modulation de voie de signalisation comme la voie PI3K et sont à l'origine de mort par apoptose [179-181, 183]. Il a été montré que la synthèse des AGMI par la SCD-1 permettait de réguler la teneur en AGS [112, 132, 179-181, 183]. Une réduction de la mortalité due aux AGS a été mise en évidence lors de la surexpression de la SCD-1, à l'inverse une déficience en SCD-1 l'augmente. Parmi les AGMI, l'acide oléique est le plus présent et possède des capacités cytoprotective et proliférative. Il a été rapporté que son addition sur des cellules cancéreuses induit la prolifération des cellules tumorales [180, 230]. L'acide oléique favoriserait la prolifération cellulaire par l'inhibition de l'expression de *PTEN* comme décrit dans les cellules d'hépatocarcinome [229]. Il pourrait aussi prévenir de l'apoptose induite par l'acide palmitique [179, 180, 229]. Dans notre étude, nous n'observons pas les effets protecteurs de l'acide oléique en supplémentation lors de la déficience en SCD-1 dans les cellules U2OS (Figure 24C). Scaglia et Igal [112], ont également décrit qu'aucun effet protecteur de l'acide oléique n'était observé dans les cellules fibroblastiques pulmonaires transformées par le virus SV40 KO SCD-1. Ces résultats sont en contradiction avec deux études qui montrent un maintien de la prolifération et de la survie cellulaire lors du traitement conjoint par l'acide oléique et la déplétion en SCD-1 dans les cellules cancéreuses Hela et H460 [171, 183]. Un mécanisme possible de l'effet protecteur de l'acide oléique est l'augmentation de la synthèse des triglycérides afin d'augmenter l'incorporation des AGS et protéger les cellules de l'apoptose [171, 175]. Nous n'avons pas étudié les modifications du profil lipidique des cellules U2OS dont l'expression SCD-1 est éteinte avec ou sans supplémentation en acide oléique, mais il est possible que l'absence d'effet protecteur d'acide oléique soit due à une capacité différente à incorporer les AGS dans les triglycérides.

La cellule cancéreuse nécessite pour proliférer d'un contenu important en lipides qui composent la membrane cellulaire, tels que les phospholipides et le cholestérol [168, 169]. Scaglia et Igal ont montré que l'inhibition de SCD-1 diminue la synthèse *de novo* des phospholipides et des lipides neutres [112]. Un blocage de la synthèse des phospholipides ou une forte réduction peut être à l'origine de la mort par apoptose

des cellules [112, 306, 364]. L'apoptose que nous observons lors de l'extinction ou de l'inhibition de SCD-1 dans les cellules cancéreuses coliques et d'ostéosarcome pourrait être due à une modification de la synthèse des phospholipides (Figure 23, Figure 24, et Figure 25). De plus, les changements de teneur en AGMI au profit des AGS tendent à modifier leur composition dans la membrane cellulaire. Il est connu que le remodelage des phospholipides joue un rôle clé dans la régulation des voies de signalisation liées à la membrane, notamment les voies de survie de la cellule [183]. Par ailleurs, la synthèse des phospholipides a lieu au niveau de la membrane du RE et des altérations de cette biosynthèse peuvent être à l'origine de l'activation du stress du RE [306].

Nous avons montré, une induction du stress du RE suite à l'extinction de l'expression de SCD-1 ou à l'inhibition de son activité dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 et SW480 et les cellules issues d'un ostéosarcome humain U2OS comme Aryiama *et al.* dans les cellules HeLa [183]. Toutefois cette activation du stress du RE est particulière, puisque nous n'observons pas de modification de l'expression de GRP78 au cours du temps (Figure 29). Ceci n'est pas lié à une incapacité des cellules à induire GRP78 puisque nous observons une augmentation de son expression en réponse à un stress de RE induit par la thaspigargine (Figure 26). GRP78 est une protéine chaperonne dont l'expression est augmentée lors du stress du RE. Elle est localisée dans le lumen du RE. C'est une clé de l'activation du stress, elle joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du RE et de la survie cellulaire [365]. GRP78 maintient les trois transducteurs du stress du RE (IRE1 α , PERK et ATF6) sous forme inactive par fixation à leur domaine intra-luminal. En cas d'anomalie de l'homéostasie du RE, notamment dans la maturation des protéines, GRP78 détecte les protéines mal formées. Ainsi, GRP78 libère les trois transducteurs du stress du RE pour se fixer aux protéines mal formées afin de les conduire vers le complexe ERAD de dégradation des protéines. L'augmentation de l'expression de GRP78 induite lors du stress du RE permet de stabiliser les transducteurs du stress du RE et un retour à l'homéostasie du RE. Il a été montré qu'une absence d'augmentation de son expression lors d'un stress du RE, conduit à une activation permanente des trois voies de signalisation, et qu'une inhibition de son expression

sensibilise les cellules à l'apoptose lors de chimiothérapies [366, 367]. Une activation du stress du RE, sans modification de l'expression de GRP78, a été rapportée notamment lors de l'inhibition de la synthèse de la phosphatidylcholine, de traitement avec l'acide palmitique ou le t10,c12-CLA [306, 368, 369]. Nous avons montré que l'activation du stress du RE lors de l'extinction de SCD-1 dans les cellules cancéreuses coliques et d'ostéosarcome induit leur mort par apoptose. L'absence de modulation de l'expression de GRP78 serait à l'origine de l'activation prolongée du stress et à l'induction de la mort.

L'extinction de *SCD-1* dans les cellules cancéreuses coliques et d'ostéosarcome induit l'épissage de l'ARNm *XBP1* caractéristique de la réponse UPR (Figure 27). Cet épissage est le résultat de l'activation de la voie IRE1 α [308], même sans modification de l'expression de GRP78.

De la même manière, GRP78 se dissocie de PERK et active la voie en phosphorylant le facteur de traduction eIF2 α . P-eIF2 α est observée après extinction de l'expression de SCD-1 mais aussi après inhibition de son activité avec les inhibiteurs CVT-11127 et MF-438 (Figure 28). La phosphorylation d'eIF2 α induit une inhibition générale de la traduction et favorise la traduction d'un facteur de transcription ATF4 qui cible la transcription de gène impliqué dans la restauration de l'homéostasie du réticulum [309]. La voie PERK a aussi été décrite comme étant impliquée dans la mort cellulaire [370], et l'inhibition de l'expression de PERK prévient la mort cellulaire induite par l'extinction de SCD-1 [183]. Ceci suggère un rôle pro-apoptotique de l'activation de la voie PERK et donc de p-eIF2 α .

ATF4 induit par p-eIF2 α est connu pour augmenter l'expression du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP dans un contexte de stress cellulaire [309]. L'extinction de l'expression de *SCD-1* et l'inhibition de son activité dans les cellules cancéreuses coliques et d'ostéosarcomes conduisent à l'induction de l'expression de CHOP (Figure 30). Nous avons montré que CHOP participe à la mort cellulaire par activation de l'apoptose avec induction d'activité caspase-3 et clivage de la protéine PARP (Figure 31 et Figure 32).

Lors d'un stress sévère du RE, la mort peut être induite par IRE1 α qui induit l'activation de la caspase-12 (chez les rongeurs) et la phosphorylation de JNK [327, 329]. Il n'est pas à exclure l'implication de la voie JNK qui participe également à la mort cellulaire induite par un stress du RE.

En conclusion, nos résultats montrent que l'abolition de la synthèse des AGMI, en modifiant l'expression ou l'activité de SCD-1 conduit à la mort par apoptose des cellules cancéreuses coliques et d'ostéosarcome. Cette mort par apoptose est dépendante du stress du RE, et en particulier du facteur de transcription CHOP impliqué dans la régulation de la balance des protéines anti-/pro- apoptotiques en faveur de l'apoptose.

Cette étude souligne le potentiel qu'ont les stratégies visant la synthèse des AGMI via SCD-1 et le stress du RE dans la lutte contre le cancer. Mais le rôle de SCD-1 dans l'induction du stress dans les cellules cancéreuses reste encore mal compris, bien que la synthèse des phospholipides ait été mise en cause dans la littérature. La déficience en SCD-1 peut modifier d'autres paramètres cellulaires, comme le statut oxydant de la cellule. En effet, il a été montré que la β -oxydation des AGS forme des intermédiaires et de sous produits capables d'induire la formation de ROS au niveau de la chaîne mitochondriale [371, 372]. Ces ROS pourrait être à l'origine du stress du RE [303]. L'étude d'autres voies impliquées dans la mort cellulaire induite par l'inhibition reste à être menée, telle que l'étude de JNK et son implication dans la voie intrinsèque de l'apoptose et les cascades de caspases associées.

Par ailleurs, il a été montré que la composition lipidique des membranes cellulaires serait responsable de la résistance à certains agents chimiothérapeutiques tels que le 5-fluorouracile et les dérivés du platine utilisés dans le traitement du cancer du côlon [373, 374]. La modulation de la composition lipidique des membranes cellulaires par des modifications de l'expression de SCD-1 pourrait permettre de sensibiliser des cellules cancéreuses résistantes aux chimiothérapies et d'agir en synergie avec l'induction du stress du réticulum.

2. Effets des CLA sur la survie des cellules cancéreuses coliques: induction des ROS et activation du stress du réticulum endoplasmique

L'*American Institute for Cancer Research* et le *World Cancer Research Fund* mentionnent l'existence probable d'une association entre la consommation de lait et un risque faible de développer un cancer colorectal [375, 376]. Les produits laitiers contiennent en effet de nombreux nutriments qui pourraient présenter des effets bénéfiques dans ce domaine. En particulier les isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) sont reconnus comme possédant des effets anti-prolifératifs, et anti-tumoraux. Une étude épidémiologique a montré qu'une alimentation riche en CLA est inversement corrélée à l'incidence du cancer colorectal [377]. Les principaux isomères de CLA présents dans les produits laitiers sont le c9,t11-CLA, et en plus faible proportion le t10,c12-CLA. Les CLA ont également la capacité d'inhiber l'activité SCD-1, et certains de leurs effets antiprolifératifs pourraient y être reliés.

Dans ces travaux, nous avons étudié les effets des deux principaux isomères conjugués de l'acide linoléique, le c9,t11-CLA et le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques humaines -SW480 et HCT116- mais également dans des cellules cancéreuses coliques de souris -CT26- en vue d'en étudier les effets *in vivo*. Les effets de ces acides gras *trans* (AGT) sur des cellules épithéliales coliques humaines non transformées -NCM460- ont également été évalués en comparaison avec les cellules cancéreuses. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence les mécanismes sous jacents aux effets des CLA dans les cellules cancéreuses coliques humaines.

2.1 Résultats

2.1.1 Incorporation des CLA dans les cellules cancéreuses

Nous avons tout d'abord montré que les CLA s'incorporaient dans les cellules cancéreuses en analysant la composition en AG totaux des cellules HCT116 après 24 et 48h par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (Tableau 3).

Tableau 3 : Enrichissement des cellules HCT116 en CLA 24 et 48h après traitement.

Exprimé en nmoles/mg de protéine $\pm$ SEM. Analyse des lipides réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse après extraction des lipides par la méthode Folch.[378]

	Traitements	c9,t11-CLA	t10,c12-CLA
24h	témoin	-	-
	c9,t11-CLA 50 μ M	91,32 $\pm$ 10,46	18,34 $\pm$ 4,60
	t10,c12-CLA 50 μ M	19,85 $\pm$ 0,55	132,58 $\pm$ 5,81
48h	témoin	-	-
	c9,t11-CLA 50 μ M	86,69 $\pm$ 7,08	18,31 $\pm$ 4,25
	t10,c12-CLA 50 μ M	24,50 $\pm$ 2,41	103,51 $\pm$ 4,84

Il est à noter que les deux isomères sont détectables dans les cellules après traitement par l'un ou l'autre des AG. Ceci est dû au fait que les solutions d'AGT contiennent une petite proportion du second conjugué.

2.1.2 Induction sélective de la mort par le t10,c12-CLA

Dans le but de déterminer les effets du c9,t11-CLA et du t10,c12-CLA sur les cellules cancéreuses coliques, des cellules HCT116, CT26 et SW480 ont été traitées par les CLA à 25 et 50 μ M dans un milieu complet.

Nos résultats montrent que le t10,c12-CLA induit une augmentation significative de la mortalité dans les cellules HCT116 et CT26 par rapport aux cellules témoins et aux cellules traitées par le c9,t11-CLA à 50 μ M en présence de 6%SVF (Figure 34A1 et Figure 34A2). Dans les mêmes conditions, le t10,c12-CLA induit la mort des cellules SW480 mais dans une moindre mesure (Figure 34B1). Afin d'étudier les effets d'un apport exclusif en AGT sur les cellules SW480, nous les avons traitées en présence de 10% de sérum délipidé (10%SD). Nos résultats montrent, qu'un traitement des cellules SW480 pendant 72h avec le t10,c12-CLA à 25 et 50 μ M induit un niveau mortalité similaire que dans les cellules HCT116 et CT26 en présence de 6%SVF (Figure 34B2). Le c9,t11-CLA induit quant à lui, une légère mortalité à 50 μ M dans les cellules SW480. L'effet des AGT sur les cellules SW480 est donc plus marquée lorsqu'ils sont apportés seuls.

Nous avons donc pour cette étude traité les cellules HCT116 et CT26 en présence de 6%SVF et les cellules SW480 en présence de 10%SD.

La mort cellulaire induite par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques s'accompagne d'une diminution significative du nombre de cellules par rapport au contrôle 72h après le traitement par le t10,c12-CLA (Figure 34B).

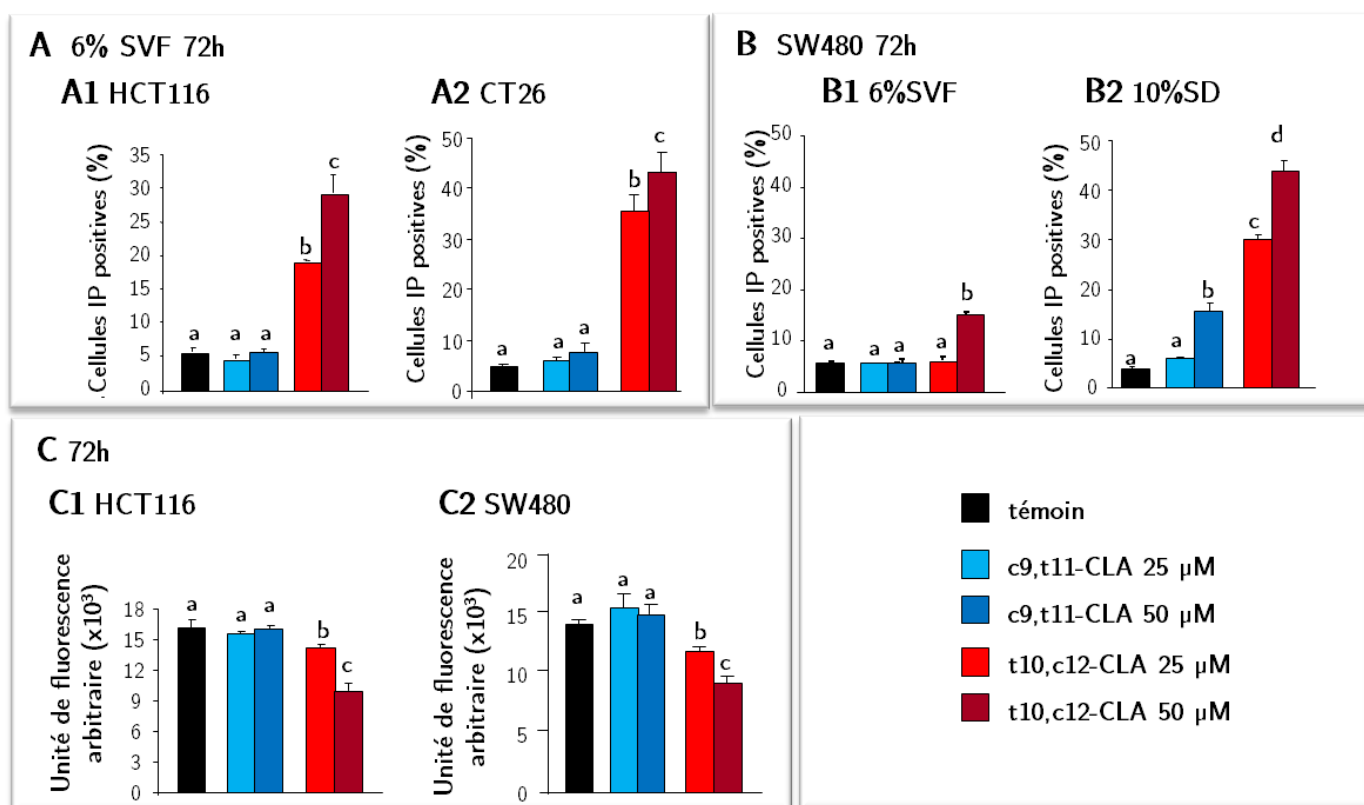


Figure 34 : Induction de mort par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.

A. Evaluation du pourcentage de cellules [HCT116 (A1) et CT26 (A2)] IP positives après 72h de traitement par le c9,t11-CLA et le t10,c12-CLA à 25 et 50 μM. B. Evaluation du pourcentage de cellules SW480 IP positives après 72h de traitement par le c9,t11-CLA et le t10,c12-CLA à 25 et 50 μM en présence de 6%SVF (B1) et de 10% sérum délipidé (10%SD) (B2). C. Evaluation relative du nombre de cellules [HCT116 (C1) et SW480 (C2)] après 72h de traitement (en unité de fluorescence arbitraire).

Afin de vérifier le potentiel anti-cancérigène du t10,c12-CLA, nous avons étudié ses effets sur les cellules épithéliales coliques humaines non transformées (NCM460). Pour cela nous avons traité les cellules NCM460 par les AGT dans les mêmes conditions que les cellules HCT116, CT26 et SW480. Aucune modification de la prolifération cellulaire n'a été observée après traitement par le c9,t11-CLA et le

t10,c12-CLA en présence de 6%SVF, alors qu'une légère diminution de la prolifération est observée en présence de 10%SD dès 48h de traitement par le t10,c12-CLA, et pour les deux isomères après 72h (Figure 35A). Cette baisse du nombre de cellules ne s'accompagne pas de mort cellulaire (Figure 35B), et serait le reflet d'un ralentissement de la division cellulaire.

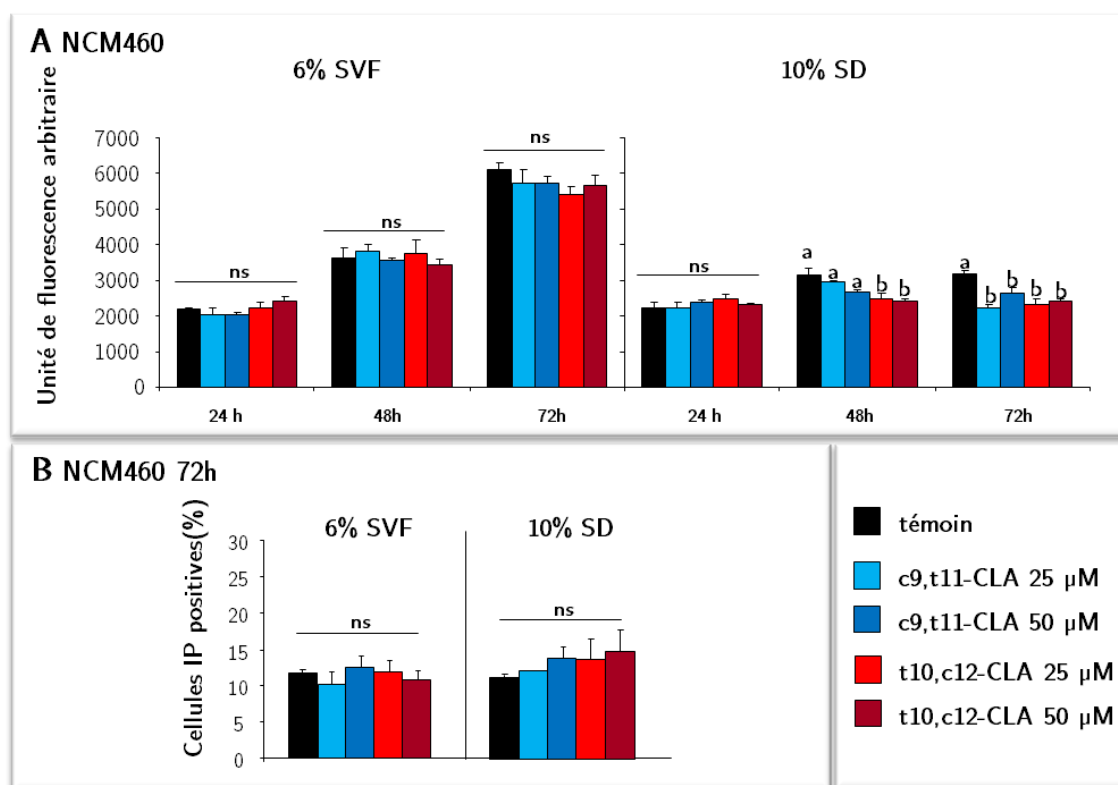


Figure 35 : Les CLA n'induisent pas de mortalité des cellules épithéliales coliques non transformées, NCM460.

Les cellules NCM460 sont traitées 72h par les acides gras *trans* (AGT) en présence de 6% SVF (cellules HCT116 et CT26), ou en présence de 10%SD (cellules SW480). A. Evaluation du nombre de cellules après 72h de traitement selon les deux conditions de traitement (en unité de fluorescence arbitraire). B. Evaluation de la mortalité en pourcentage de cellules marquées à l'iodure de propidium (IP) après 72h de traitement.

Nos résultats montrent donc, que seul le t10,c12-CLA induit significativement la mort des cellules cancéreuses coliques, et il n'affecte pas la survie des cellules épithéliales coliques saines.

2.1.3 Le t10,c12-CLA induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses coliques

La caractérisation de la mort induite par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques montre une augmentation significative du pourcentage de cellules Annexin V positives (jusqu'à 35%) dans les cellules HCT116 traitées pendant 72h par le t10,c12-CLA à 50 μ M (Figure 36A1) et près de 50% dans les cellules CT26 par rapport aux cellules témoins et traitées par le c9,t11-CLA (Figure 36A2). Dans les cellules SW480, on observe une augmentation significative du nombre de figures apoptotiques après marquage des noyaux au Hoechst après 72h de traitement par le t10,c12-CLA à 12,5 , 25 et 50 μ M comparé au c9,t11-CLA (Figure 36A3).

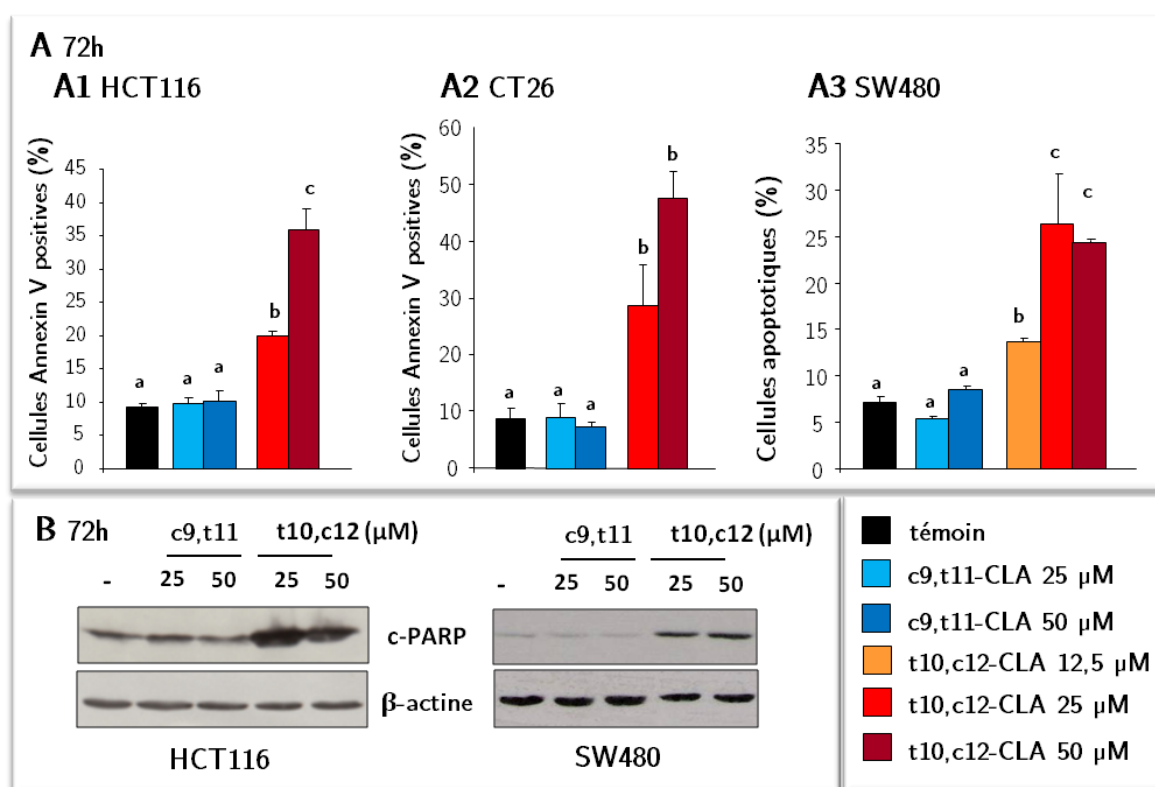


Figure 36 : Induction d'apoptose par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.

Les cellules HCT116 et CT26 sont traitées 72h par les AGT dans un milieu contenant 6% SVF, les cellules SW480 sont traitées 72h par les AGT en présence de 10% sérum délipidé (10%SD). A. Evaluation du pourcentage de cellules apoptotique. HCT116 (A1) et CT26 (A2) : évaluation du pourcentage de cellules apoptotiques par marquage à l'Annexin V évalué en cytométrie en flux. SW480 : évaluation du nombre de cellules présentant un noyau apoptotique, évalué par comptage au microscope à fluorescence après marquage au Hoechst. B. Expression de la protéine PARP clivé (c-PARP) par western blot 72h après traitement des cellules.

Comparée au c9,t11-CLA, cette augmentation du nombre de cellules apoptotiques après traitement des cellules cancéreuses coliques par le t10,c12-CLA s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la protéine c-PARP (Figure 36B) dans les cellules HCT116 et SW480.

2.1.4 t10,c12-CLA inhibe la synthèse *de novo* des AGMI dans les cellules cancéreuses coliques

Les CLA sont décrits généralement comme des régulateurs de la synthèse des AGMI, par régulation de l'expression de SCD-1 et/ou de son activité selon le type cellulaire [160, 295].

L'étude de l'expression de SCD-1 après traitement des cellules HCT116 et SW480 par les CLA montre une diminution de l'expression de la protéine dans les cellules HCT116 après 72h de traitement par le t10,c12-CLA (Figure 37A) mais une très faible modulation dans les cellules SW480 (Figure 37B). En revanche, l'analyse de l'activité de désaturation de SCD-1 dans les cellules SW480 montre une réduction de plus de 30% du taux de désaturation du [¹⁴C]18:0 en [¹⁴C]18:1. L'activité de désaturation résiduelle après 72h de traitement par le t10,c12-CLA à 25 et 50 µM n'est plus que de 5% (Figure 37C).

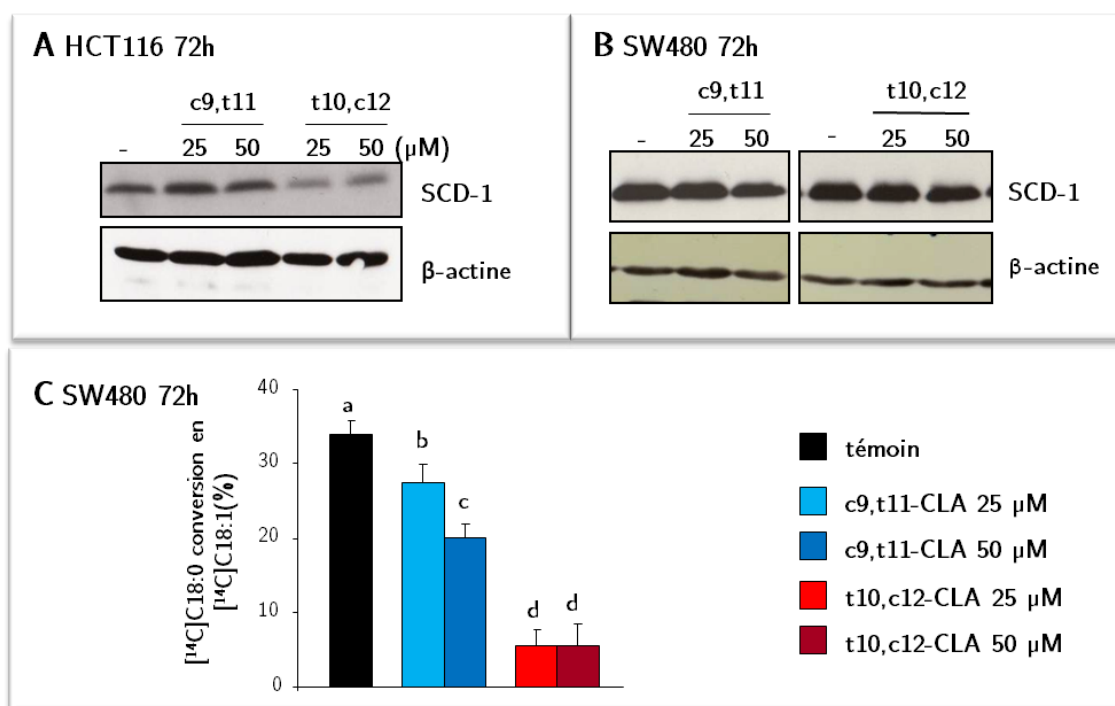


Figure 37 : Le t10,c12-CLA réduit la synthèse des AGMI dans les cellules cancéreuses coliques.

A. Expression de la protéine SCD-1 dans les cellules HCT116 après 72h de traitement par les CLA en présence de 6%SVF. B. Expression de la protéine SCD-1 dans les cellules SW480 après 72h de traitement par les CLA en présence de 10%SD. C. Evaluation de l'activité de désaturation SCD-1 après 72h de traitement des cellules SW480 par les CLA en présence de 10%SD.

2.1.5 Induction du stress du réticulum endoplasmique par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques

Nous avons montré dans la première partie de ces travaux que l'extinction de SCD-1 par des ARN interférants est à l'origine de l'induction d'un stress du RE, probablement du à une altération de la synthèse des lipides. Il apparait que dans les cellules cancéreuses coliques, que le t10,c12-CLA soit à l'origine d'une diminution de la synthèse des AGMI issus de l'activité SCD (Figure 37), nous avons donc étudié l'implication du stress du RE dans la mort induite par le t10,c12-CLA. Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps l'expression des marqueurs du stress du RE, tels que GRP78 (une protéine chaperonne qui prévient l'activation des différentes voies du stress du RE), sXBP1 (produit de l'activité d'IRE1 α) et p-eIF2 α (produit de l'activation de PERK).

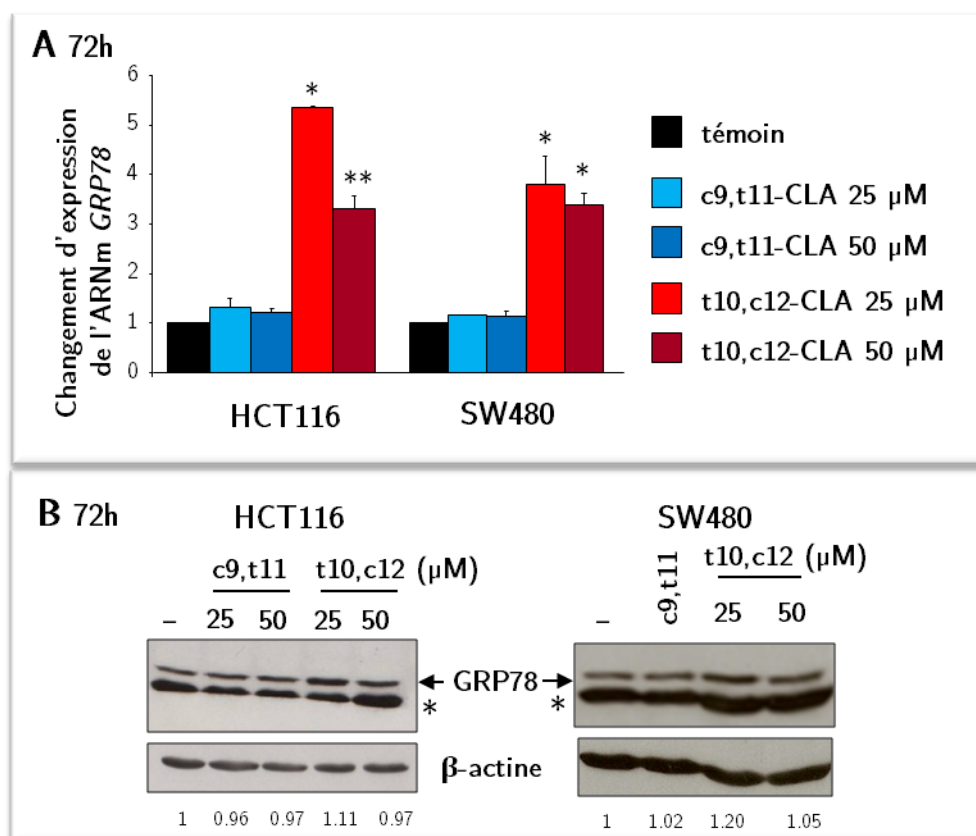


Figure 38 : Expression de GRP78 après traitement par les CLA dans les cellules cancéreuses coliques.

A. Evaluation de l'expression de l'ARNm *GRP78* par RT-qPCR en temps réel après 72h de traitement des cellules HCT116 par les CLA en présence de 6%SVF et des cellules SW480 en présence de 10%SD. B. Evaluation de l'expression de la protéine GRP78 après 72h de traitement.

L'analyse de l'ARNm *GRP78*, par RT-qPCR en temps réel, montre une augmentation de son expression dans les cellules coliques HCT116 et SW480 après traitement par le t10,c12-CLA à 25 et 50 μ M en comparaison aux cellules contrôles et aux cellules traitées par le c9,t11-CLA (Figure 38A). L'expression de la protéine GRP78 quant à elle semble très peu affectée par le traitement par le t10,c12-CLA dans les cellules HCT116 et SW480 72h après traitement à 25 μ M et 50 μ M (Figure 38B).

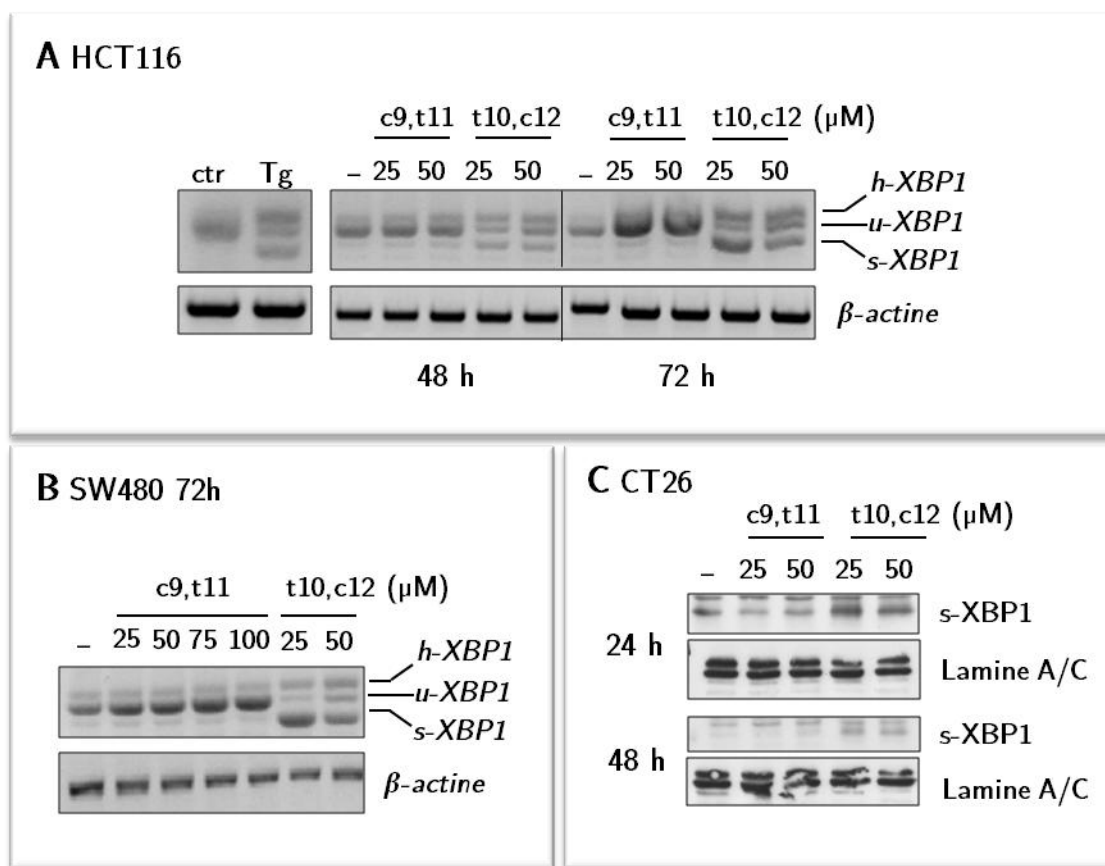


Figure 39 : Induction de l'épissage alternatif d'XBP1 après traitement par les CLA dans les cellules cancéreuses coliques.

A. Analyse de l'expression de l'ARNm *XBP1* dans les cellules HCT116 après 48h et 72h de traitement par les CLA, par RT-PCR semi-quantitative. Trois formes du transcrit sont observées, la forme épissée (*sXBP1*), la forme non-épissée (*uXBP1*) et la forme hybride (*hXBP1*). B. Analyse de l'expression de l'ARNm *XBP1* dans les cellules SW480 72h après traitement par les CLA, par RT-PCR semi-quantitative. C. Evaluation de l'expression de la protéine XBP1 dans les cellules CT26 24h et 48h après traitement par les CLA sur extrait nucléaire.

Le t10,c12-CLA induit la formation de l'ARNm hybride *XBP1* (*hXBP1*) et de *sXBP1* dans les deux lignées cancéreuses coliques humaines (Figure 39A et Figure 39B). Aucune modification notable des cellules témoins ou des cellules traitées par le c9,t11-CLA n'est observée. Nous avons ensuite recherché les effets des CLA sur les cellules cancéreuses coliques murines (CT26) si on observe une modification de l'expression protéique de XBP1 (Figure 39C). On observe une augmentation de l'expression de la protéine issue de la traduction de l'ARNm *sXBP1* 24 et après 48h de traitement par le t10,c12-CLA à 25 et 50 μM, ce qui indique qu'il induirait l'activation de la voie IRE1α dans les cellules cancéreuses coliques.

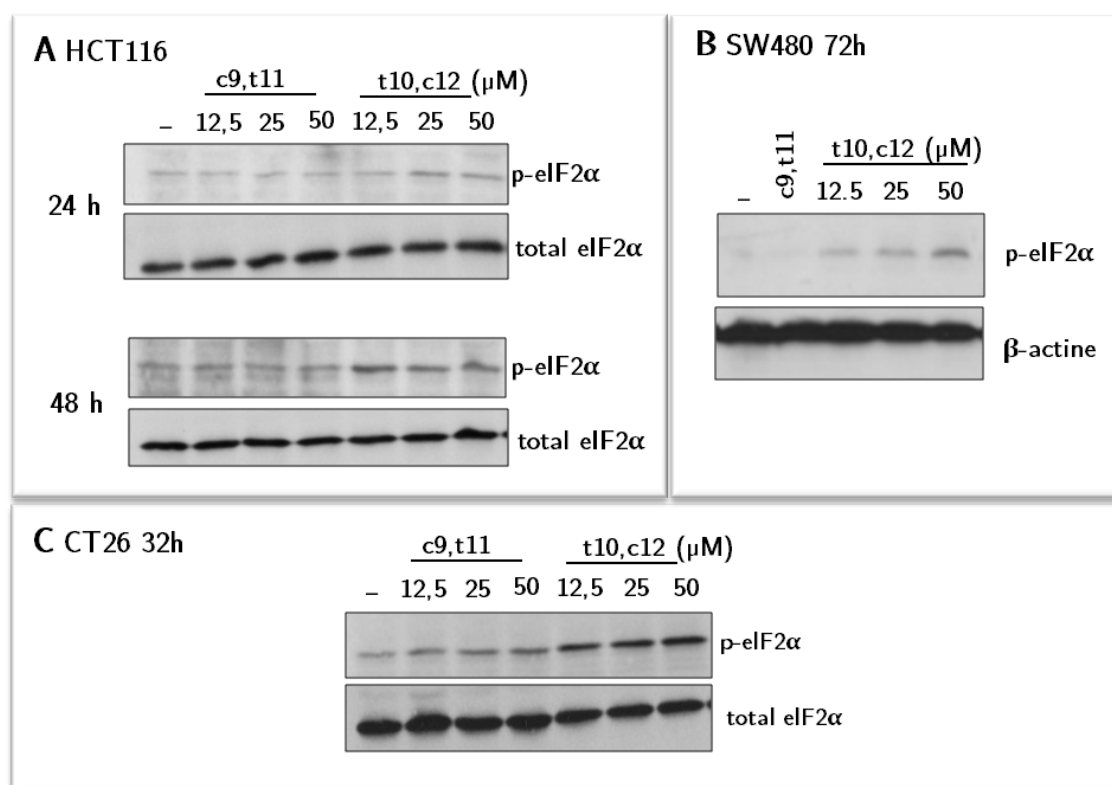


Figure 40 : Induction de la forme phosphorylée d'eIF2α par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.

A. Expression de la protéine eIF2α sous forme phosphorylée (p-eIF2α) après 24 et 48h de traitement par le t10,c12-CLA dans les cellules HCT116. B. Expression de p-eIF2α 72h après traitement par le t10,c12-CLA dans les cellules SW480. C. Expression de p-eIF2α phosphorylée 32h après traitement par le t10,c12-CLA dans les cellules CT26.

La phosphorylation d'eIF2α induit un blocage général de la traduction et favorise l'expression de certaines protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie du RE et de la survie cellulaire. Dans les cellules HCT116, le t10,c12-CLA induit l'expression de p-eIF2α par rapport aux cellules témoins et traitées par le c9,t11-CLA après 24h (Figure 40A) Nous avons mis en évidence un effet dose réponse à 32h pour les cellules CT26 (Figure 40C) et à 72h pour les cellules SW480 (Figure 40B).

2.1.6 Rôle de JNK dans la mort induite par le t10,c12-CLA

Puisque nous observons la mort des cellules cancéreuses coliques et l'induction du stress du RE suite au traitement par le t10,c12-CLA, nous avons exploré les différentes voies de signalisation impliquées dans la mort induite par le stress du RE, dont la voie JNK. Nous avons montré, Figure 41A, qu'un traitement des cellules HCT116 par le t10,c12-CLA à 50 μM induisait une augmentation de l'expression de

la forme phosphorylée de la protéine JNK1/2 (p-JNK1/2) à partir de 48h en comparaison aux cellules témoins et traitées par le c9,t11-CLA. Lorsque les cellules HCT116 sont traitées par le SP600125, un inhibiteur spécifique de p-JNK1/2, à une concentration de 2,5 , 5 et 10 μ M pendant le temps de traitement par les CLA à 50 μ M, on observe une diminution du pourcentage de mortalité de manière dose dépendante en inhibiteur (Figure 41B). Ceci montre une implication de la voie JNK dans la mort des cellules cancéreuses coliques traitées aux CLA.

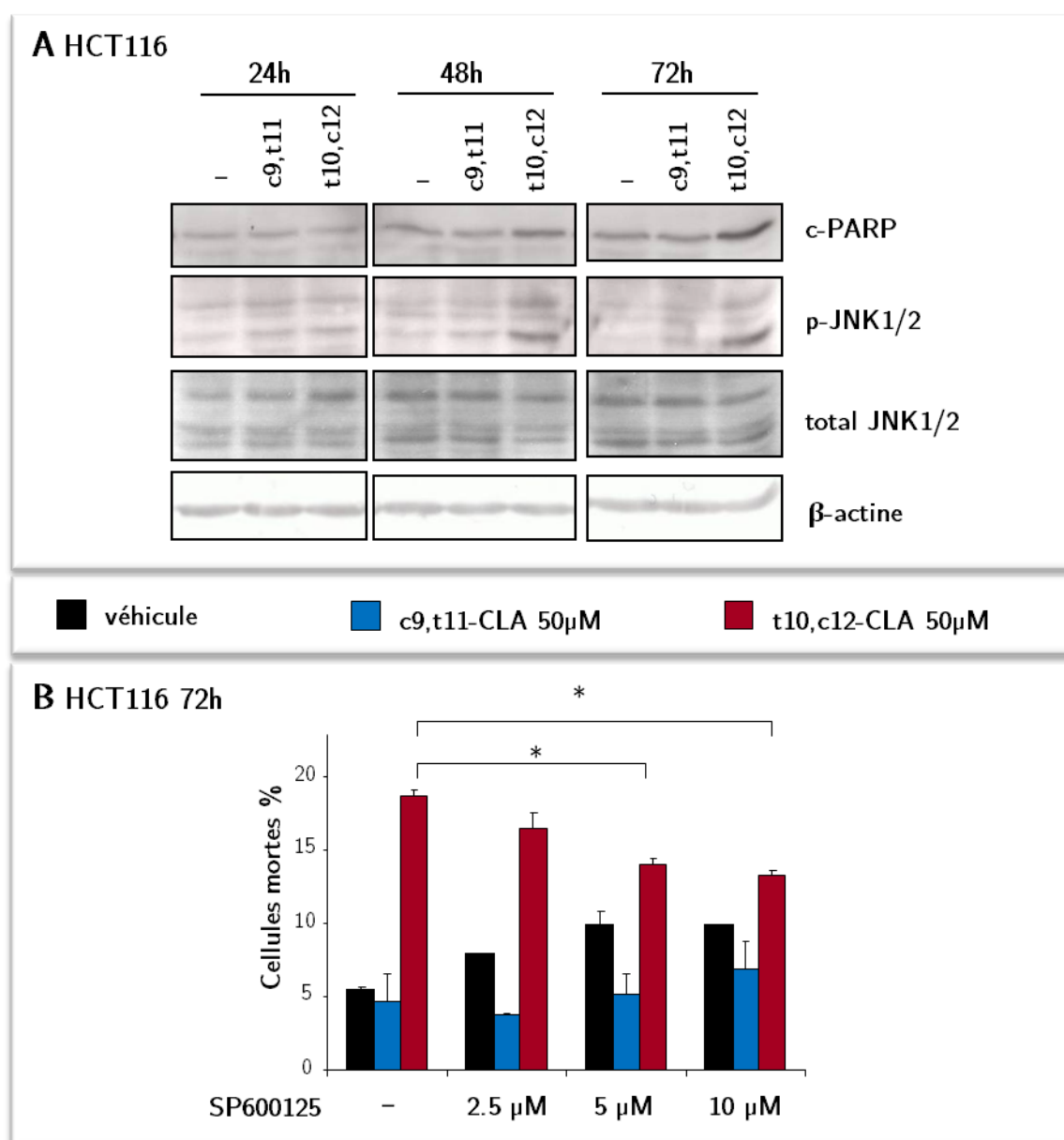


Figure 41 : Rôle de phospho-JNK1/2 dans la mort des cellules HCT116 induite par le t10,c12-CLA.

A. Expression de phospho-JNK1/2 (p-JNK 1/2), JNK1/2 total, et c-PARP dans les cellules HCT116 après 24, 48 et 72h de traitement par les AGT en présence de 6%SVF. B.

Evaluation de la mortalité par comptage au bleu trypan après 72h de traitement par les CLA en présence ou non de l'inhibiteur de JNK1/2, le SP600125, à une concentration de 2,5, 5 et 10 μ M.

2.1.7 Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par le t10,c12-CLA

Nous avons montré que le t10,c12-CLA induisait les marqueurs du stress de RE. CHOP étant connu pour être l'effecteur de mort essentiel dans la mort induite par le stress du RE, nous avons évalué l'expression de CHOP après traitement des cellules cancéreuses coliques HCT116 SW480 et CT26 par les AGT (Figure 42).

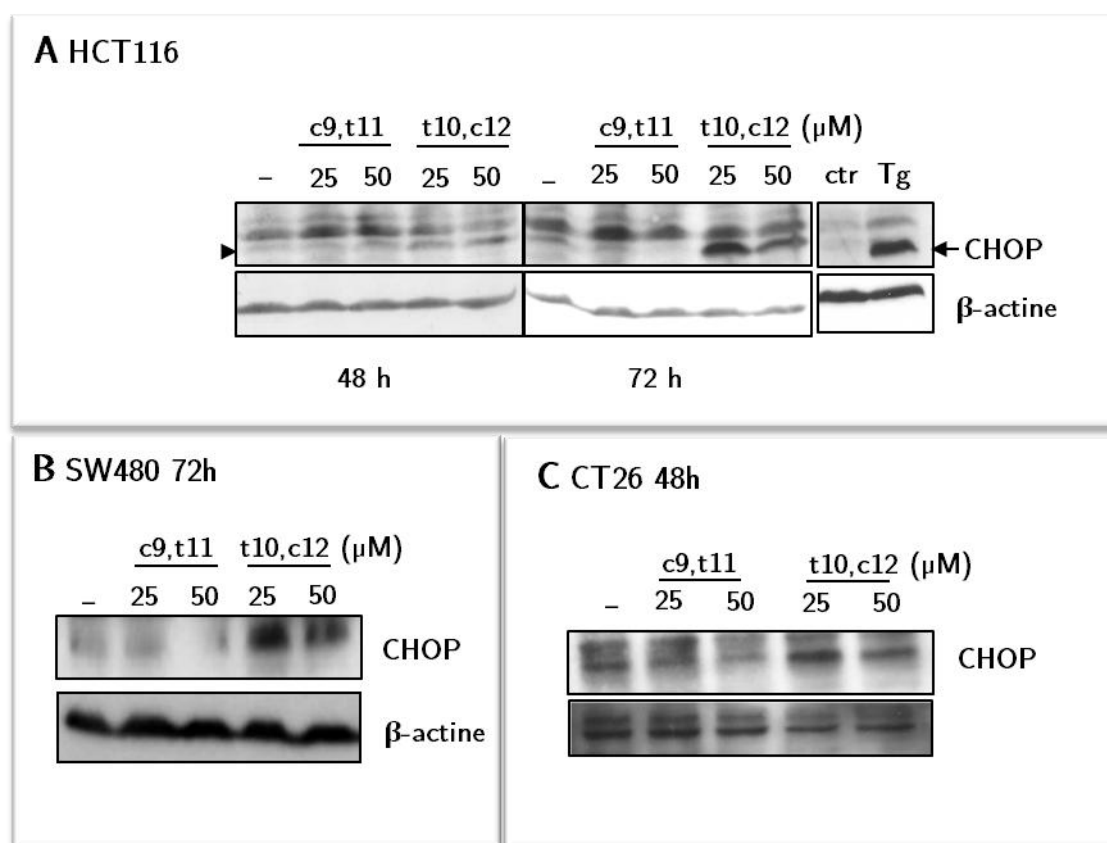


Figure 42 : Induction de l'expression de CHOP dans les cellules cancéreuses coliques après traitement par le t10,c12-CLA.

A. Expression de la protéine CHOP dans les cellules HCT116 après 48h et 72h de traitement par les CLA. B. Expression de la protéine CHOP après 72h de traitement par les CLA dans les cellules SW480. C. Expression de la protéine CHOP après 48h de traitement par les CLA dans les cellules CT26.

Nous n'observons pas de modification de l'expression de CHOP à 24h (résultats non présentés) mais elle apparaît à 48h lors du traitement par le t10,c12-CLA, dans les

cellules HCT116 et CT26, en comparaison aux cellules témoins et aux cellules traitées par le c9,t11-CLA à 25 μ M et 50 μ M (Figure 42A et Figure 42C). On note également une augmentation de l'expression de la protéine CHOP à 72h dans les cellules SW480 après traitement par le t10,c12-CLA (Figure 42B).

Dans les cellules dérivées d'un épithélium colique humain non transformée (cellules NCM460), aucune induction de l'expression de CHOP par les AG n'a pu être mise en évidence quelles que soient les conditions de traitement (Figure 43). L'absence d'induction de l'expression de CHOP dans les cellules NCM460 après traitement par le t10,c12-CLA est parallèle à une absence de mortalité (Figure 35B) et d'expression de c-PARP marqueur d'apoptose (Figure 43).

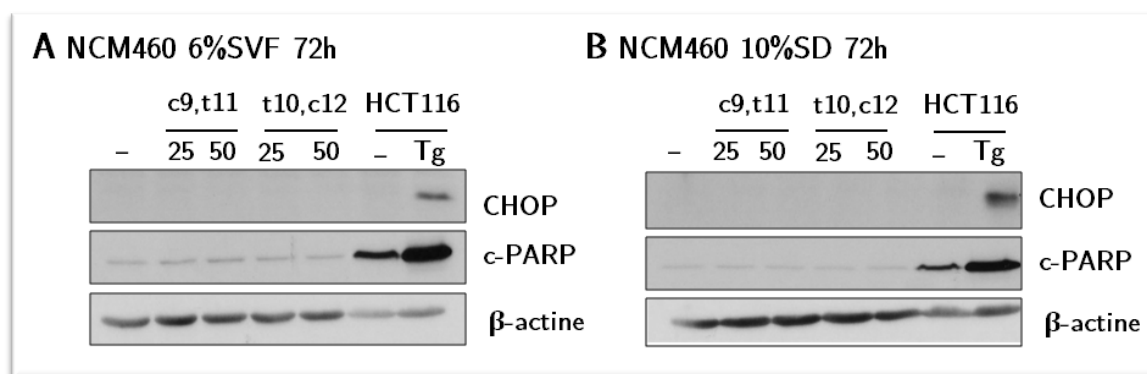


Figure 43 : Le t10,c12-CLA n'induit pas d'apoptose ni l'expression de CHOP dans les cellules non cancéreuses coliques.

Les cellules NCM460 sont traitées 72h par les AG en milieu 6% SVF (A) ou en milieu 10%SD (B). Expression de protéine de CHOP et de PARP clivé (c-PARP).

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer le rôle de CHOP dans la mort induite par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses. Pour cela, nous avons étudié, la mort induite par le t10,c12-CLA dans les cellules HCT116 BA-1 exprimant de façon stable l'ADNc *CHOP* en orientation antisens comparée aux HCT116 parentales. Puis nous avons conforté les résultats obtenus dans les cellules SW480 après extinction de l'expression de CHOP par ARN interférents (Figure 44).

Par rapport aux cellules HCT116 parentales, on observe dans les cellules HCT116 BA-1 traitées pendant 72h à 50 μ M que le t10,c12-CLA n'induit pas de mort par apoptose (Figure 44A). Nous n'observons pas non plus d'induction de l'expression de c-PARP par le t10,c12-CLA dans ces cellules (Figure 44B). Lorsque l'on traite, par

les CLA à 25 et 50 μ M, les cellules SW480 préalablement transfectées par les siRNA CHOP ou le siRNA contrôle, on constate que le t10,c12-CLA induit une réduction de la mortalité (Figure 44C), sans revenir au niveau de mortalité des cellules non traitées. Cette baisse de mortalité s'accompagne d'une diminution de l'expression de c-PARP (Figure 44D), ce qui suggère une diminution de l'apoptose induite par le t10,c12-CLA. CHOP participe donc à la mort induite par le t10,c12-CLA. L'effet de l'extinction de *CHOP* dans les cellules SW480 après traitement par les CLA est moins important du fait que l'extinction n'est pas totale avec les siRNA. Nous observons donc une expression résiduelle de la protéine (Figure 44D).

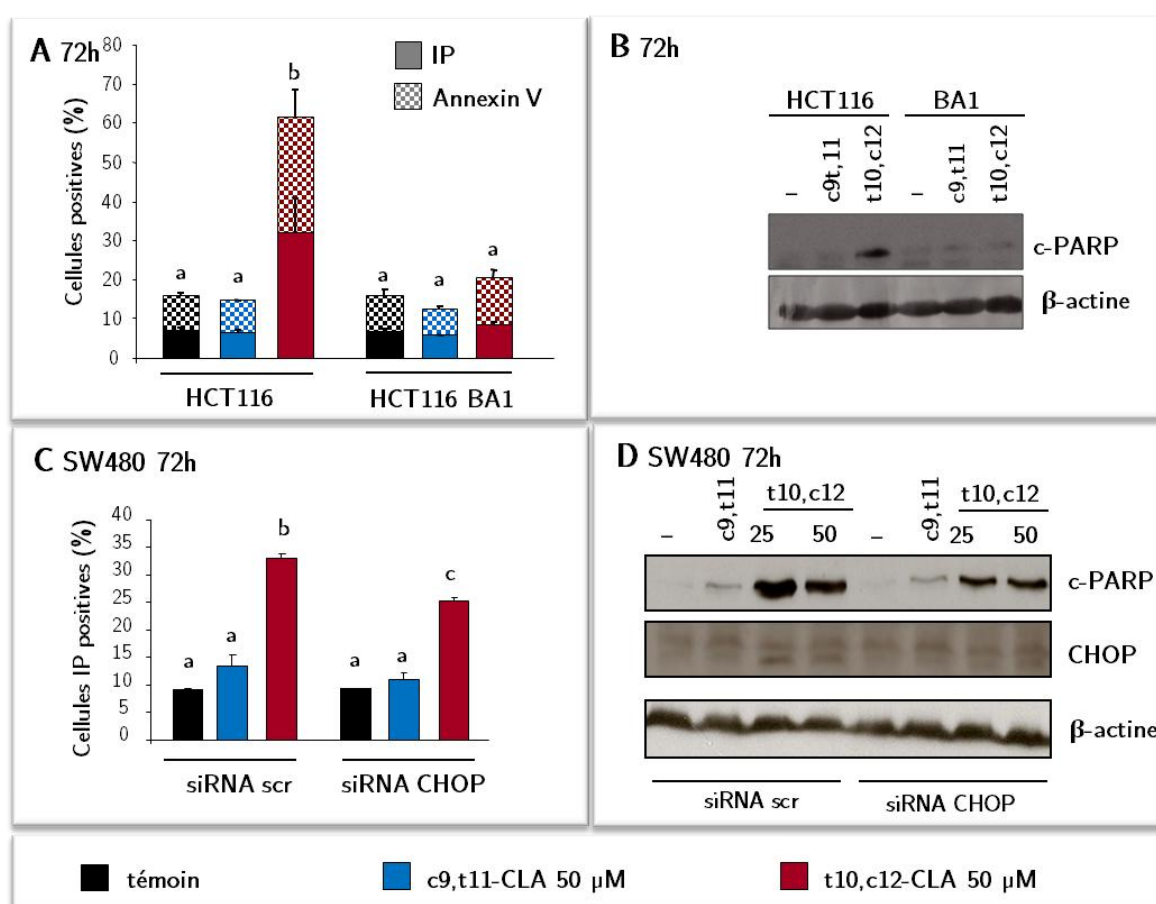


Figure 44 : Rôle de CHOP dans la mort par apoptose induite par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.

A. Evaluation de la mortalité en pourcentage de cellules IP positives (motif unis) et de l'apoptose en pourcentage de cellules Annexin V positives (motif en damier) dans les cellules HCT116 et BA-1. B. Expression de PARP clivé (c-PARP) après traitement avec les CLA dans les cellules HCT116 et BA-1. C. Evaluation de la mortalité en pourcentage de cellules IP positives dans les cellules SW480 72h après traitement par les CLA en conditions 10%SD suite à la transfection par le siRNA CHOP ou contrôle (scr). D. Expression de c-PARP

après transfection du siRNA dirigés contre CHOP et du siRNA contrôle (scr) et traitement par les CLA pendant 72h.

2.1.8 Les ROS induits par le t10,c12-CLA participent à l'induction de CHOP au cours du stress du réticulum endoplasmique

Nous avons montré précédemment que le t10,c12-CLA est à l'origine de l'activation du stress du RE dans les cellules cancéreuses coliques et à l'induction de leur mort par apoptose. Un des mécanismes activateurs du stress du RE est la production de ROS [303].

C'est pourquoi nous avons étudié la production de ROS dans les cellules HCT116 traitées par les CLA à 50 μ M après 24 et 48h de traitement, à l'aide d'une sonde fluorescente DCFH2DA (Figure 45A). On observe une induction de la production de ROS par le t10,c12-CLA 48h après le début du traitement.

Le cotraitement avec un antioxydant, le N-acétyl L-cystéine (NAC) à 0,5 mM, prévient la production des ROS suite au traitement par le t10,c12-CLA (Figure 45A). Nous montrons également que le traitement par le NAC réduit la mort par apoptose induite par le t10,c12-CLA (Figure 45B). Cette diminution de mortalité par le cotraitement t10,c12-CLA/NAC est associée à une diminution de l'expression de c-PARP (Figure 45D). Pour confirmer ces résultats, nous avons testé un autre inhibiteur des ROS, l' α -tocophérol une forme de la vitamine E. On observe que l' α -tocophérol à 100 μ M en cotraitement avec le t10,c12-CLA à 50 μ M restaure complètement la viabilité des cellules HCT116 après 72h en comparaison au traitement t10,c12-CLA à 50 μ M seul (Figure 45C).

Nous avons également pu mettre en évidence que le traitement par le NAC à 0,5 mM prévient l'induction de CHOP par le t10,c12-CLA comparée aux cellules contrôles ou c9,t11-CLA (Figure 45E), ce qui démontre que la production des ROS est à l'origine de la mort par apoptose des cellules cancéreuses coliques via l'expression de CHOP.

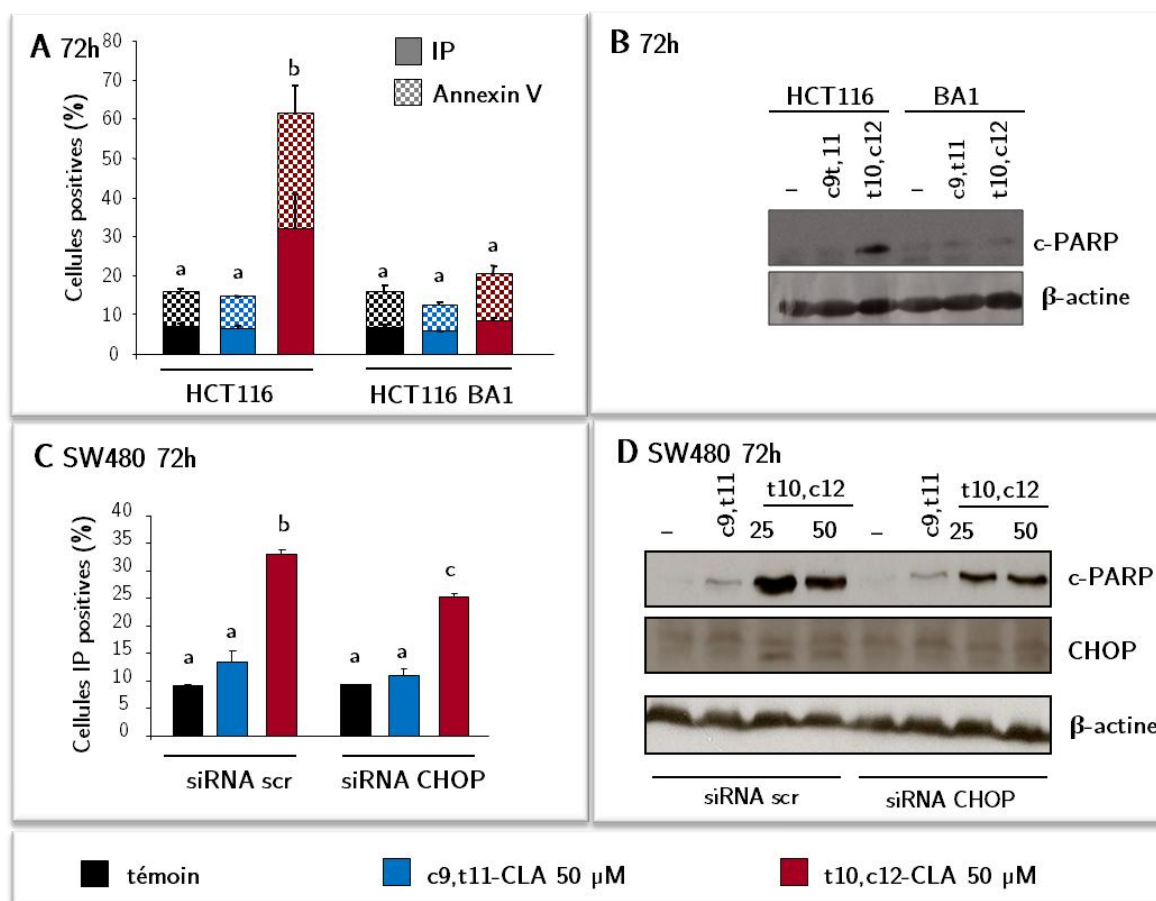


Figure 45 : Le t10,c12-CLA induit le stress du RE via l'induction de ROS.

A. Evaluation de l'induction des ROS après traitement par les CLA pendant 24 et 48h. B. Evaluation de la mortalité (pourcentage de cellules IP positives) et de l'apoptose (en pourcentage de cellules Annexin V positives) après 72h de traitement par les CLA en présence ou non d'un inhibiteur de la synthèse des ROS, le N-acétyl-L-cystéine (NAC) à 0,5 mM. C. Evaluation de la mortalité (pourcentage de cellules IP positives) et de l'apoptose (en pourcentage de cellules Annexin V positives) après 72h de traitement par les CLA en présence ou non d'α-tocophérol à 100μM. D. Etude de l'expression de PARP clivé (c-PARP) après traitement par les CLA en présence ou non de NAC à 0,5 mM. E. Etude de l'expression de la protéine CHOP 72h après traitement par les CLA en présence ou non de NAC à 0,5 mM.

2.2 Discussion

L'objectif de ce travail était de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine des effets anti-cancérigènes des AG alimentaires, c9,t11-CLA et t10,c12-CLA, dans les cellules cancéreuses coliques. Pour cela, nous avons évalué les effets de ces deux isomères conjugués de l'acide linoléique sur des cellules cancéreuses coliques humaines HCT116 et SW480, et murines CT26. Afin d'en mesurer le potentiel thérapeutique,

nous avons également évalué les effets sur des cellules dérivées d'un épithélium colique humain non transformé (NCM460).

Nous avons montré que seul le t10,c12-CLA induisait la mort des cellules cancéreuses coliques sans affecter la viabilité des cellules normales de manière significative. De plus, le t10,c12-CLA induit l'apoptose des cellules cancéreuses via l'activation du stress du RE. Nous avons montré que cette mort par apoptose était dépendante de l'expression de CHOP et de l'activation de JNK1/2. Par ailleurs, nous avons montré que le t10,c12-CLA induisait la production de ROS qui est à l'origine de l'expression de CHOP dans les cellules cancéreuses coliques.

Différentes études ont montré qu'un mélange de c9,t11-CLA et de t10,c12-CLA induisait l'apoptose d'une grande variété de cellules cancéreuses *in vitro* et ainsi que celle des cellules pré-néoplasiques *in vivo* [261, 379, 380]. Nous avons montré, dans cette étude, que le t10,c12-CLA induit spécifiquement la mort par apoptose des cellules cancéreuses coliques sans altérer la survie des cellules non transformées dérivées d'un épithélium colique humain (Figure 34 et Figure 35). Il a été montré chez le rat et la souris, que les épithéliums mammaires pré-néoplasiques étaient sensibles à l'apoptose induites par les CLA alors que les cellules indifférenciées de l'épithélium mammaire sain y sont résistantes [261, 285]. Le mécanisme de cette résistance est encore inconnu. Nous avons montré que dans les cellules cancéreuses coliques le t10,c12-CLA induisait une augmentation de la production des ROS qui est à l'origine de l'apoptose via CHOP (Figure 45). Dans les cellules NCM460, nous avons mis en évidence que le t10,c12-CLA n'induisait pas d'expression de CHOP, et ne modifie pas leur survie (Figure 43) ce qui suggère que les cellules non transformées ne sont pas sensibles au t10,c12-CLA et au modification du statut oxydatif qu'il induit. Il est possible que le système de régulation du statut oxydant soit plus efficace dans les cellules saines que dans les cellules cancéreuses [381, 382].

L'étude des marqueurs du stress du RE nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de sXBP1 (Figure 39), de p-eIF2 α (Figure 40) et de

l'ARNm *GRP78* (Figure 38) dans les différentes lignées cancéreuses coliques après traitement par le t10,c12-CLA sans effet du c9,t11-CLA. Ceci indique une activation claire du stress du RE par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques humaines et murines. Nous avons également mis en évidence une augmentation de l'expression du facteur de transcription CHOP dans les cellules HCT116, SW480 et CT26 après traitement par le t10,c12-CLA (Figure 42). Nous avons montré que CHOP participe à la mort induite par le t10,c12-CLA (Figure 44). L'augmentation de l'expression de CHOP induite par activation prolongée du stress du RE, joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose. En effet, CHOP favorise l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que BIM, TRB3 ou DR5, en inhibant la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que *Bcl-2* [383]. Il a été mis en évidence que le t10,c12-CLA induisait dans des cellules de cancer mammaire de souris, une diminution de *Bcl-2* et augmentait l'expression de BIM [384, 385]. L'ensemble de ces données pourrait expliquer l'action pro-apoptotique de CHOP induite par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques.

Par ailleurs, la voie IRE1 α , qui semble activée par le t10,c12-CLA, est connue pour induire des signaux de survie via l'épissage de l'ARNm *XBP1*, mais en cas de stress sévère et prolongé, elle induit des signaux pro-apoptiques via la phosphorylation de JNK1/2 par le complexe IRE1 α /TRAF2/ASK1 [383]. Nous avons montré dans ce travail une activation de la voie JNK1/2 par le t10,c12-CLA (Figure 41A) et qu'elle est impliquée dans l'effet cytotoxique du t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques, son inhibition par le SP600125 réduisant la mortalité induite par le t10,c12-CLA (Figure 41B). Cependant la voie IRE1 α ne serait pas la seule impliquée dans l'activation de JNK, au cours du stress du RE, CHOP est à l'origine de l'activation des protéines kinase calcium/calmoduline dépendantes (CaMK) via l'induction de ERO1- α [386]. Ces CaMK, en particulier CaMKII, sont connues pour être à l'origine de la libération de calcium à partir du RE et être à l'origine de l'activation de JNK dans les macrophages lors d'un stress du RE [387]. La régulation de JNK par la voie IRE1 α et par CHOP dans les cellules cancéreuses coliques pourrait amplifier et prolonger l'expression de la phosphorylation de JNK, induite par le t10,c12-CLA.

Des perturbations du statut oxydant de la cellule et du RE induites par des agents pro-oxydants externes ou issus du métabolisme cellulaire peuvent être à l'origine de l'induction du stress du RE [303]. Nous avons montré que les cellules HCT116 exposées au t10,c12-CLA augmentent leur production de ROS dans les 48h après le début du traitement (Figure 45A). Cette production de ROS induite par le t10,c12-CLA peut être prévenue par l'ajout d'un agent antioxydant, le NAC ou l' α -tocophérol, qui réduit la mort par apoptose des cellules traitées par le t10,c12-CLA (Figure 45). Il est rapporté que les ROS sont bien à l'origine de l'activation du stress du RE mais les mécanismes impliqués sont encore mal compris [388]. La production de ROS pourrait être induite par le stress du RE via CHOP et son interaction avec la voie ERO1 α [389]. Il a été rapporté que le traitement de cellules par le t10,c12-CLA ou un mélange d'isomères interférait avec l'homéostasie rédox et induisait la production de ROS entre autres via une altération de la chaîne mitochondriale et une activation de la NADPH oxydase [271, 390-392]. Nos résultats montrent que la formation de ROS débute autour de 48h après traitement des cellules HCT116 (Figure 45A). Dans les 48h, nous commençons à observer l'expression de différents marqueurs du stress du RE tels que XBP1, p-eIF2 α et CHOP (Figure 39, Figure 40 et Figure 42). Il a été montré que XBP1 jouait un rôle dans la protection de la cellule vis-à-vis du stress oxydatif et favorise l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du statut rédox [352]. Cette première phase du stress du RE permettrait à la cellule de mettre en place des moyens de protection vis-à-vis des effets pro-oxydants du t10,c12-CLA. On peut donc supposer que le t10,c12-CLA, dans les cellules cancéreuses coliques induit la formation de ROS. Et que le stress du réticulum est dans un premier temps activé afin de faire face à ces ROS.

Par ailleurs, l'oxydation des acides gras, tels que l'acide palmitique ou l'acide oléique, peut induire la formation de catabolites intermédiaires ou des sous produits à l'origine de la modulation de la formation des ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale [371, 372]. Le t10,c12-CLA et le c9,t11-CLA sont β -oxydés de manières différentes du fait de la position des doubles liaisons et conduisent à une augmentation de la β -oxydation des autres AG [393, 394], tels que l'acide oléique qui

est pourvoyeur d'intermédiaires et de sous produits générant des ROS dans les pré-adipocytes 3T3-L1 [394]. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la production de ROS dans les cellules cancéreuses coliques après traitement par le t10,c12-CLA.

Nous avons montré que l'inhibition de la production des ROS prévenait en partie la mort induite par le t10,c12-CLA, ce qui suggère une implication de l'altération du statut rédox (Figure 45). Toutefois, d'autres signaux promoteurs du stress du RE ne sont pas à exclure. En effet, les travaux développés dans la première partie de ce manuscrit présentent une activation du stress du RE suite à l'abolition de la synthèse des AGMI en ciblant l'extinction de *SCD-1* par ARN interférents [395]. Le traitement des cellules cancéreuses coliques par le t10,c12-CLA montre une diminution de la synthèse des AGMI, soit par une régulation au niveau de l'expression de *SCD-1*, soit par inhibition de son activité (Figure 37). Il a été montré que la synthèse des AGS et des AGMI était un moyen de protéger la cellule cancéreuse des attaques par des radicaux libres [396]. L'abolition de la synthèse des AGMI par le t10,c12-CLA, pourrait être à l'origine de la production de ROS.

En conclusion, nos résultats montrent que seul le t10,c12-CLA induit la mort apoptose via le stress du RE des cellules cancéreuses coliques sans affecter la viabilité des cellules épithéliales coliques normales. L'apoptose induite par le t10,c12-CLA dans les cellules cancéreuses coliques est dépendante de CHOP et induite par la génération de ROS.

Perspectives : Cette étude supporte le potentiel anti-cancérigène du t10,c12-CLA. Les résultats obtenus ici à la fois pour les lignées cancéreuses humaines et la lignée cancéreuse murine, restent à être confortés par des expérimentations *in vivo*. Nous chercherons à mettre en évidence l'effet du t10,c12-CLA sur la croissance tumorale chez la souris injectée en sous cutanée par CT26. Nous déterminerons alors la concentration circulante en t10,c12-CLA nécessaire pour réduire la progression tumorale et nous évaluerons les effets secondaires possibles.

Conclusion et Perspectives

Des altérations du métabolisme des AGMI et de SCD-1 ont été rapportées dans un certain nombre de pathologies, dont le cancer. L'augmentation de la synthèse *de novo* des AGS et des AGMI dans les cellules cancéreuses est le reflet de besoins accrus en lipides de la cellule en prolifération et en réponse aux signaux de l'environnement tumoral. Les AG ainsi synthétisés sont utilisés pour la formation de nouvelles membranes cellulaires, la signalisation cellulaire mais également comme pourvoyeur d'énergie [64]. Cibler les voies de biosynthèse des lipides et en particulier, la synthèse des AGMI, apparaît être une cible de choix pour induire la mort des cellules cancéreuses sans toucher les cellules saines même en prolifération. En effet, réprimer la biosynthèse des AGMI, c'est priver la cellule d'AGMI issus de la synthèse endogène, et perturbe toutes les voies de synthèse des lipides (phospholipides, triacylglycérol et esters de cholestérol). C'est aussi augmenter la teneur en AGS aux effets cytotoxiques [179, 180, 229], mais également la production de ROS régulés par les AGMI et l'activité SCD-1 [396]. Toutefois, des souris porteuses d'une mutation naturelle de *SCD-1* présentent de sévères problèmes cutanés et oculaires [161, 397]. Bien que l'absence d'activité SCD conduise à des effets protecteurs dans le cadre du syndrome métabolique (obésité, stéatose hépatique et insulino-résistance) [398], de récentes études suggèrent que, SCD-1 jouant un rôle critique dans la suppression de multiples maladies inflammatoires en transformant les AGS pro-inflammatoires en AGMI intégrés dans des lipides biologiquement neutres [399], une inhibition de son activité serait à l'origine de l'augmentation de l'inflammation. Il a été rapporté que la déficience en SCD-1 chez les rongeurs est à l'origine de l'augmentation de l'athérosclérose et de la réponse inflammatoire des macrophages, mais aussi de la mort des cellules β -pancréatiques *in vitro* et *in vivo* ce qui a des conséquences sur la tolérance au glucose [400, 401]. Il apparaît également que l'inhibition de SCD-1 a des répercussions sur l'inflammation intestinale [400, 401]. Chen *et al.* ont mis en évidence que les souris *SCD-1^{-/-}* sont plus sensibles au développement d'une l'inflammation intestinale [402]. Toutefois le rôle de la déficience en SCD-1 dans l'inflammation intestinale reste à être clarifié [403].

Inhiber la biosynthèse des AGMI en ciblant SCD-1 reste toutefois une stratégie envisageable, des inhibiteurs pharmacologiques de SCD-1 peuvent être donnés

conjointement à des agents anti-inflammatoires comme l'huile de poisson, où une intervention nutritionnelle par des AGPI modulant l'activité SCD-1 peut être mise en place. Les cellules cancéreuses colorectales présentent une accumulation en AGS et en AGMI au détriment des AGPI [86, 87, 90, 91]. Ces derniers ont un rôle important dans la prévention de certaines pathologies, telles que les maladies cardiovasculaires, l'insulino-résistance, l'obésité, les désordres du système immunitaires, les maladies neurodégénératives, et le vieillissement [404]. Les CLA, sont AGPI isomères conjugués de l'acide linoléique, ayant des effets pléiotropiques sur la cellule cancéreuse [20, 238-242, 253, 258-261], dont les effets pourraient être reliés à leur capacité à moduler l'activité SCD-1. Il a été montré que ces AG contiennent la progression tumorale, en modulant l'activité du système immunitaire, l'angiogenèse, et au niveau de la cellule tumorale en modulant les voies de signalisation de survie [20, 238-242, 253, 258-261].

Ces travaux montrent que la voie de biosynthèse des AGMI, en particulier SCD-1 sont des cibles du métabolisme lipidique qui permettraient de modifier la prolifération des cellules cancéreuses coliques. Les perspectives d'utilisation d'agents chimiothérapeutiques ciblant SCD-1 comme traitement de première ligne semblent encore éloignées. Cependant cibler cette voie de biosynthèse en traitement adjuvant avec les AGPI semble envisageable à plus court terme. Des AGPI naturels comme les CLA sont connus pour être des modulateurs de SCD-1 [114, 155, 159, 160], ce qui permet d'envisager une intervention nutritionnelle à titre thérapeutique -voire préventif- vis-à-vis du cancer colorectal mais aussi de nombreux autres cancers.

Moduler la synthèse des AGMI comme thérapie adjuvante est un point intéressant. En effet, modifier la synthèse *de novo* des AGMI c'est moduler de la composition des membranes lipidiques. Cette composition semble déterminante pour la résistance des cellules aux chimiothérapies [373, 374], et conditionne le recrutement des récepteurs de mort dans les radeaux lipidiques [405-407]. A la reconstitution de la membrane plasmique s'ajoute également une induction de l'expression des récepteurs de mort DR5 via CHOP [383]. L'augmentation de ce récepteur à la surface des cellules cancéreuses permet de sensibiliser des cellules à TRAIL, une cytokine de la famille des TNF, prometteuse dans le traitement des cancers coliques [408]. Par ailleurs, le

succès d'une chimiothérapie dépend de ses effets cytotoxiques contre les cellules cancéreuses mais aussi pour certaines molécules telles que les anthracyclines et l'oxaliplatine, à leur capacité à déclencher la mort des cellules cancéreuses en activant le système immunitaire. Ainsi, une telle chimiothérapie sera d'autant plus efficace car elle cible de manière directe et indirecte la cellule cancéreuse. Les dérivés du platine, oxaliplatine et cisplatine, ne présentent pas les mêmes propriétés vis-à-vis de l'induction de la mort immunogène. En effet, le cisplatine ne permet pas l'induction de cette mort par un défaut de translocation de la calréticuline, une protéine chaperonne du RE, à la membrane plasmique. Cette protéine a des propriétés immunogéniques et active le système immunitaire, la cellule cancéreuse ainsi marquée devient la cible du système immunitaire et est détruite. Il apparaît qu'un élément important dans la signalisation de cette relocalisation soit p-eIF2 α . Ce signal est manquant lors du traitement des cellules par le cisplatine. Il a été montré qu'un traitement conjoint de l'inducteur du stress du RE, la thaspigargine, et le cisplatine conduit à une mort immunogène et à la relocalisation de la calréticuline à la membrane plasmique [409]. Le cisplatine est une chimiothérapie principalement utilisée dans les cancers des poumons, de la vessie, des ovaires. Alors que l'oxaliplatine est indiqué dans le traitement des cancers colorectaux, car ils y sont plus sensibles. Une stratégie de traitement adjuvant avec les AGPI ou les inhibiteurs de SCD-1 permettrait d'augmenter le succès des traitements du cancer colorectal et des autres cancers, avec des effets directs des AG sur la cellule cancéreuse, en les rendant notamment plus sensibles aux agents chimiothérapeutiques [410], mais aussi avec des effets sur le système immunitaire.

En vue de valider le potentiel d'une intervention nutritionnelle par le 10,c12-CLA dans le traitement du cancer colorectal, nous envisageons de mettre en place une étude *in vivo*. Le but de cette étude sera d'évaluer l'impact du t10,c12-CLA sur la croissance tumorale chez la souris et de mesurer les effets secondaires d'un traitement par injection des CLA par voie intra péritonéale ou par administration dans le régime alimentaire pour comparaison. Le t10,c12-CLA a fait la preuve de son efficacité quant à la diminution de la progression de tumeurs mammaires et coliques [260, 283, 411]. Cependant, de récentes études ont mis en avant de possibles effets secondaires

d'une supplémentation en t10,c12-CLA. Il a été rapporté que le t10,c12-CLA stimulait la croissance de tumeurs mammaires chez la souris indépendamment des œstrogènes [284] et dans un modèle de souris transgénique [285]. Chez l'homme les effets secondaires adverses restent en débat et la transposition des observations chez les modèles murins à l'homme sont discutables. Cependant il est rapporté que le t10,c12-CLA conduit à l'altération de la sensibilité à l'insuline ou l'augmentation de marqueurs de l'inflammation chez l'homme [412-415]. C'est pourquoi, les études chez l'homme doivent prendre en compte ces risques et doivent être menées avec précaution afin de déterminer si le t10,c12-CLA est un AGT anti-cancérigène efficace et sans danger. Il existe d'autres isomères conjugués trans d'AGPI (les isomères conjugués de l'acide linoléique CLN, 18:3) aux effets anti-inflammatoires, immuno-modulateurs, anti-obésité et anti-carcinogènes [416-419]. Il apparaît qu'un de ces isomères, l'acide jacarique (c8,t10,c12-CLN), présente une capacité d'inhibition de l'expression de *SCD-1* dans le foie chez la souris [420]. Ces dérivés de l'acide linoléique sont peut être des AG anti-cancérigènes à effets CLA sans effets adverses et peuvent être intéressants.

Au final, notre étude apporte des éléments en faveur du métabolisme des lipides comme une cible intéressante dans le traitement du cancer colorectal.

Matériels et Méthodes

1. Culture cellulaire et traitements

1.1 Lignées cellulaires utilisées

Les cellules utilisées au cours de ces travaux sont, une lignée d'ostéosarcome humaine (U2OS), trois lignées de cellules issues de cancers coliques humains (SW480, HCT116 et les cellules HCT116 notée BA-1 stablement transfectées par l'antisens de *CHOP*), une lignée de cellules cancéreuses coliques de souris (CT26), deux lignées de cellules dites « normales », la lignée non transformée de cellules épithéliales coliques humaines NCM460 et enfin des fibroblastes de peau humains NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblast*) (Tableau 4).

Tableau 4 : Lignées cellulaires utilisée.

Lignées	Provenance	Type de cellules	Origine	Milieu d'entretien	D.E.
U2OS	ATCC HTB-96™	Ostéosarcome	H	DMEM 10%SVF	1:10
SW480	ATCC CCL-228™	Adénocarcinome colorectal	H	DMEM 10%SVF	1:10
HCT116*	Dr. J Martinez	Carcinome colorectal	H	DMEM 6%SVF	1:20
HCT116 BA-1*	Dr J Martinez	Carcinome colorectal	H	DMEM 6%SVF	1:20
NCM480	INCELL Corp	Dérivé de l'épithélium de la muqueuse colique saine	H	M3 10%SVF	1:3
NHDF	Invitrogen	Fibroblastes de peau normaux	H	MEM106 10%SVF	1:4
CT26	ATCC	Carcinome du côlon	S	RPMI 10%SVF	1:20

ATCC : American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) ; Invitrogen (Cergy-Pontoise, France) ; INCELL Corp (San Antonio, TX, USA) ; DMEM : Dulbecco's modified Eagle Medium, 4.5g/l de Glucose sans L-Glutamine (E15-001, PAA) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine (M11-004, 100X , PAA); M3 : M3Base™ (M300A500, INCELL Corp), RPMI : RPMI 1640 sans L-Glutamine (E15-041, PAA) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine ;MEM106 : supplémenté en LSGS (Invitrogen) ; SVF : sérum de veau foetal décomplémenté (A11-101, lot A10109-1886, PAA); H : humaine ; S : souris ; D.E. : dilution d'entretien.

1.2 Conditions de culture et traitements

1.2.1 Entretien des lignées

Les différentes lignées sont cultivées dans un incubateur sous atmosphère contrôlée à 37°C sous 5% CO₂. Lorsque les cellules sont à sub-confluence, elles sont passées, soit environ deux fois par semaine. Pour cela les cellules sont lavées avec du tampon PBS sans calcium et sans magnésium stérile (H15-002, PAA), puis les cellules sont recouvertes de Trypsine/EDTA (L11-004, 1X, PAA), elles sont incubées à 37°C pendant 1 à 3 min, l'arrêt de la trypsine est réalisé par l'ajout d'un grand volume de milieu complet. Les cellules sont ensuite réensemencées selon les dilutions indiquées dans le Tableau 4, par exemple pour U2OS, un dixième de la suspension cellulaire de la flasque à sub-confluence sera réensemencées dans une nouvelle flasque, avec un volume de milieu frais suffisant.

Les milieux que nous utilisons pour chaque type cellulaire sont décrits dans le Tableau 4. Chaque milieu est supplémenté ou non en L-Glutamine (M11-004, 100X, PAA) à raison de 2mM selon la composition de départ du milieu et en antibiotiques, pénicilline (100U/ml) et streptomycine (100µg/mL) (P11-010, 100X, PAA). Le sérum de veau foetal (SVF) utilisé est au préalable décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes avant d'être ajouté au milieu selon les proportions indiquées dans le Tableau 4.

1.2.2 Transfections par les ARN interférents

Les petits ARN interférants (siRNA) ont été synthétisés par Dharmacon Research Inc (Lafayette, CO, USA) (Tableau 5).

Tableau 5 : Séquences des ARN interférents (siRNA).

Cible des siRNA	Séquence cible des siRNA
Contrôle (scr)	CUUACGCUGAGUACUUCG
SCD-1.A	GAUAUGCUGUGGUGCUUAA
SCD-1.B	GAGAUAGUUGGAGACGAU
CHOP	CAAUUGUUCAUGCUUGGUG

Le kit de transfection OligoFectamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) a été utilisé pour les transfections sur cellules adhérentes. Les cellules sontensemencées à raison de 110 000 cellules par puits en plaque 6 puits en milieu DMEM supplémenté en SVF et en L-glutamine (2mM) sans antibiotiques. Le lendemain les cellules sont transfectées par les siRNA dirigés contre l'ARNm *SCD-1* selon les recommandations du fabricant à raison de 75nM final, pour U2OS, SW480 et HCT116, et 200nM final pour les NHDF et à raison de 50nM final pour le siRNA dirigé contre *CHOP*. Les cellules sont ensuite collectées au temps indiqués après la transfection.

1.2.3 Transfection de plasmides

Les transfections de plasmide ont été réalisées avec le kit de transfection Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Les cellules sontensemencées la veille de la transfection dans du DMEM complet sans antibiotique de façon à avoir une densité de 50 à 70%. La transfection est réalisée avec 4 µg de plasmide et 15 µL de lipofectamine 2000 selon les recommandations du fabriquant. La sélection des cellules transfectées se fait au G418 400µg/mL sur 3 jours.

1.2.4 Traitement avec les inhibiteurs de SCD-1

Les inhibiteurs de SCD-1, CVT-11127 et MF-438, nous ont été gracieusement donnés par Gilead Science, Inc et Merck Frosst respectivement [156, 157]. Les inhibiteurs sont conservés à -20°C dilués dans le DMSO, et utilisés aux concentrations indiquées, entre 5 et 20 µM par ajout dans le milieu de culture. Les cellules sont récupérées après 24h pour la mesure de l'activité de SCD-1 et aux temps indiqués pour l'analyse protéique.

1.2.5 Traitement par les acides gras

1.2.5.1 Préparation des solutions d'AG

Pour les expériences de supplémentation en AG, les solutions d'AG 10X sont préparées dans du DMEM [sans SVF, sans L-glutamine et sans antibiotiques et de la sérum albumine bovine (BSA) sans AG (ratio 1:4, une molécule de BSA pour quatre molécules d'AG)] à partir de solutions de c9,t11-CLA, t10,c12-CLA et d'acide oléique

conservées à -20°C dans le chloroforme ou l'éthanol. Le volume d'AG nécessaire est prélevé et mis à sec sous azote. L'AG est repris par un faible volume d'éthanol (1% du volume de la solution 10X). Puis le DMEM/BSA préalablement réchauffé à 37°C est ajouté sur les AG. Les tubes soviel sont fermés sous azote et agités énergiquement pendant 1 minute pour s'assurer de la liaison des AG aux molécules de BSA. Les solutions 10X sont filtrées (0,22µm) avant d'être utilisées pour traiter les cellules.

1.2.5.2 Vérification de la concentration des solutions d'AG

La concentration de la solution 10X d'AG est vérifiée par extraction des lipides d'une prise aliquote, suivie de la saponification et la méthylation des lipides extraits, puis de l'analyse de l'échantillon par chromatographie phase gazeuse.

- *Extraction des lipides en milieu aqueux*

L'extraction est réalisée en milieu aqueux selon la méthode de Bligh et Dyer [421]. Un volume donné de la solution préparée est mise en contact avec un mélange chloroforme/méthanol (1/2, v/v), de façon à avoir les rapports suivant, (CHCl₃/MetOH/H₂O, 1,5/3/1). On ajoute un standard interne, C15:0, afin de déterminer la concentration de nos solutions. Après une nuit à 4°C, les rapports CHCl₃/MetOH/H₂O sont modifiés par ajout de chloroforme et de KCl 0,37M (4/2/1,25). Les tubes sont bouchés sous azote avant d'être agités fortement et centrifugés à 500g pendant 10 minutes à 15°C. La phase inférieure contenant les acides gras est prélevée pour être saponifiée et méthylée.

- *Saponification des lipides et méthylation des acides gras*

Les lipides sont mis à sec sous flux d'azote puis saponifiée avec de la soude méthanolique 0,5N pendant 15 min à 55°C dans un tube bouché sous azote. La méthylation est réalisée selon la méthode de Slover et Lanza [422] à l'aide de BF₃ méthanolique 14%. Les esters méthyliques d'AG sont ensuite extraits après ajout d'hexane et de NaCl 35 %. Après centrifugation, 500g pendant 10 minutes à 15°C, la phase supérieure hexanique contenant les esters méthyliques d'AG est prélevée.

- *Analyse et quantification des acides gras par chromatographie en phase gazeuse*

Les esters méthyliques sont séparés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec un chromatographe Clarus 500 (Perkin Elmer) équipé d'une colonne capillaire [30 m de long, 0,32 mm de diamètre interne et 0,25 µm de film (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, USA)] contenant une phase stationnaire polaire (Carbowax 20M) et avec l'hélium comme gaz vecteur (débit de 3 mL/min). La température du détecteur, de type ionisation de flamme est de 230°C. Le four est programmé à une température initiale de 85°C puis augmente de 30°C/min pendant 3,5 min, puis de 3°C/min jusqu'à 220°C.

L'identification des esters méthyliques des échantillons est effectuée en comparant leurs temps de rétention avec ceux d'une solution de standards de composition connue. La quantification est déterminée grâce au standard interne.

1.2.5.3 Préparation des cellules et traitement

Les cellules sontensemencées la veille du traitement à raison de 220 000 cellules par boîte de 60 mm de diamètre. Le jour du traitement, le milieu est changé. Les cellules SW480 sont traitées en condition « délipidée » (même milieu mais avec 10% de sérum délipidé (S181L-500, lot S05608S181L, Biowest), HCT116 et CT26 sont traitées en condition DMEM complet 6% SVF. Aucune différence n'a été observée dans la réponse de ces cellules aux traitements entre 10 et 6% SVF. Les NCM460 sont traitées dans les deux conditions. L'AG est ajouté de façon à traiter à une concentration finale de 12,5 , 25 et 50 µM pour les CLA et 100 µM pour l'acide oléique.

1.2.6 Traitement avec des inhibiteurs des ROS : α-tocophérol et N-acétyl-L-cystéine

L'α-tocophérol (T3251, Sigma) est préparé dans l'éthanol à 100mM et stocké à 4°C à l'abri de la lumière. Il est ajouté dans le milieu de culture 15 minutes avant traitement par les AG, à une concentration finale de 100µM.

Le N-acétyl-L-cystéine ou L-NAC (A7250, Sigma) est dissous dans de l'eau ultrapure à raison de 100 mg/ml, puis il est filtré et stocké à 4°C. Il est utilisé comme antioxydant pour prévenir la formation des ROS et est ajouté sur les cellules dans le milieu de culture 15 minutes avant le traitement par les AG, à raison de 0,5 mM.

1.2.7 Traitement avec un inhibiteur de JNK : SP600125

Le SP600125 (A5567, Sigma) est dissous dans le DMSO à raison de 4,4 mg/ml (20 mM), et stocké à -20°C. Il est utilisé comme inhibiteur sélectif de c-JUN N-terminal kinase (JNK). Il est ajouté sur les cellules dans le milieu de culture 15 minutes avant le traitement par les AG, à raison de 2,5 à 10 µM.

1.2.8 Traitement avec la Thapsigargine : contrôle positif du stress du RE

La thapsigargine (T9033, Sigma) est dissoute dans l'éthanol à raison de 1,536 mM, et stocké à -20°C. Elle est utilisée comme inhibiteur des pompes calciques du réticulum endoplasmique, perturbant ainsi l'homéostasie calcique du RE et induisant un stress de RE. Les cellules sont traitées à raison de 2 µM une nuit pour SW480, HCT116 et 8h pour CT26.

1.2.9 Traitement avec l'étoposide : contrôle positif de l'apoptose

L'étoposide ou VP16 (E1383, Sigma) est dissous dans le DMSO à raison de 29,4 mg/ml (50 mM) et stocké à -20°C. Il est utilisé comme inducteur de l'apoptose caspase-3 dépendante. Les cellules sont traitées à raison de 50 µg/ml pendant 48h.

2. Mesure de la prolifération cellulaire et viabilité

2.1 Analyse de la prolifération cellulaire

L'analyse de la prolifération cellulaire a été menée avec le kit CyQuant®NF cell proliferation assay (Invitrogen). L'expérience se réalise en plaque 96 puits. Les cellules sontensemencées à raison de 3000 cellules par puits, puis traitées le lendemain selon l'expérience. Chaque condition de traitement est répétée trois fois sur la même plaque. Les plaques sont arrêtés au temps indiqué par élimination du

milieu et congélation à -80°C . Le nombre de cellules adhérentes est évalué indirectement par la mesure de fluorescence émise par le CyQuant GR dye qui lie de manière stochiométrique les acides nucléiques. La fluorescence est mesurée par un fluorimètre (VICTOR³™, PerkinElmer Life Sciences Inc, Wellesley, MA, USA) avec une excitation à 485 nm et une détection à 535 nm.

2.2 Analyse de la viabilité

La viabilité cellulaire a été évaluée par comptage au Bleu Trypan au microscope à contraste de phase aux temps indiqués après le traitement. Les cellules qui excluent le bleu trypan sont considérées comme viables. Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de 110 000 cellules par puits, puis traitées selon les conditions de l'expérience. Aux temps indiqués, les cellules adhérentes et flottantes sont collectées par trypsination et dans le surnageant, puis centrifugées à 520g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS 1X (H15-001, PAA). 100 μL de la suspension cellulaire sont prélevés et le même volume de solution de bleu Trypan 0,4% (T8154, Sigma) y est ajouté. Après 4 minutes à température ambiante les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Chaque condition est réalisée en double et est comptée trois fois.

3. Mort cellulaire et mort par apoptose

3.1 Evaluation de la mort cellulaire

La mort cellulaire est évaluée par marquage à l'iodure de propidium (IP) en cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson).

Les cellules sont décollées à la trypsine et culotées par centrifugation à 520g pendant 10 minutes, et lavées une fois par du PBS 1X. Le culot est repris par 1 mL de PBS 1X. L'IP est ajouté quelques minutes avant le passage au cytomètre afin d'obtenir une concentration finale de 1 $\mu\text{g/mL}$. La mortalité est représentée en pourcentage de cellules IP positives moyen de trois échantillons.

3.2 Evaluation de la mort par apoptose

3.2.1 Marquage Annexin V

L'évaluation de l'apoptose a été réalisée par marquage des cellules à l'Annexin V à l'aide du kit FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Pharmagen™) selon les recommandations du fabricant par cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson).

Comme pour le marquage IP, les cellules adhérentes et flottantes sont collectées, lavées au PBS 1X, et reprises dans le tampon contenu dans le kit (*binding buffer*) de façon à avoir une densité cellulaire de l'ordre de 10^6 cellules/mL. 100 µL sont ajoutés à 5 µL d'Annexin V. Après 15 minutes d'incubation dans le noir à température ambiante, 300 µL de tampon sont ajoutés et l'échantillon est passé au cytomètre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules Annexin V positives moyen de trois échantillons.

3.2.2 Marquage au Hoechst

Le marquage des noyaux au Hoechst 33258 permet de mettre en évidence la fragmentation de l'ADN, signe d'apoptose. Les cellules adhérentes et flottantes ont été collectées. Elles sont ensuite lavées au PBS 1X et fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 2% pendant 10 minutes à température ambiante, puis elles sont lavées au PBS 1X et marquées au Hoechst 33258 à raison de 1 µg/ml. Les échantillons sont ensuite observés au microscope à fluorescence (Axio Vert, Zeiss), où au moins 200 cellules ont été dénombrées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules présentant un ADN fragmenté ou condensé (cellules apoptotiques).

3.2.3 Marquage caspase-3

L'activité caspase-3 a été analysée dans les cellules après traitement à l'aide du kit CaspGLOW Fluorescein Caspase-3 staining kit (BioVision) et analysées par cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson). Le kit utilise l'inhibiteur de la caspase-3 DEVD-FMK conjugué au FITC (FITC-DEVD-FMK), qui se lie de manière irréversible à la caspase-3 active dans les cellules apoptotiques.

Comme précédemment, les cellules adhérentes et flottantes sont collectées et culotées. Le culot est repris dans du milieu de culture complet de façon à avoir une densité cellulaire de 10^6 cellules/mL. 300 μ L de suspension cellulaire sont ajoutés à 1 μ L de FITC-DEVD-FMK, puis incubé 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois et passées au cytomètre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules caspase-3 positives moyen de trois échantillons.

4. Extraction d'ARN et RT-PCR

4.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont purifiés à l'aide du kit RNeasy (Qiagen, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Au cours de cette purification sur colonne nous réalisons une digestion de l'ADN génomique avec la DNase (RQ1 RNase free DNase, Promega).

La concentration en acides nucléiques est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité de DO à 260 nm correspondant à 40 μ g/mL d'ARN totaux) sur un spectrophotomètre UV (Jenway, Stone, UK). Le rapport des DO à 260 nm et 280 nm doit être compris entre 1,8 et 2 pour s'assurer de la qualité des ARN.

4.2 Contrôle de l'intégrité des ARN

L'intégrité des ARN totaux est vérifiée en conditions dénaturantes (MOPS 2,4X ; formaldéhyde 14% ; DYE ; chauffage 10 min à 65°C) sur gel d'agarose (agarose 1% ; formaldéhyde 6,6% ; MOPS 1X), après lecture sous UV.

4.3 Transcription inverse

La synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir d'1 μ g d'ARN totaux à l'aide du kit de transcription inverse (RT) iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad), selon les instructions du fabricant. Chaque essai a été réalisé dans un volume final de 20 μ L contenant le tampon réactionnel constitué des amorces (oligodT et amorces aléatoires "random hexamer") et du tampon de réaction, et la iScript Reverse Transcriptase. Les étapes décrites dans le Tableau 6 sont effectuées en thermocycleur.

Tableau 6 : Etape de la transcription inverse dans le thermocycleur.

Durée	Température	Etape
5 min	25°C	Hybridation des amorces
30 min	42°C	Transcription inverse
5 min	85°C	Inactivation de l'enzyme
∞	4°C	Refroidissement rapide

Les ADNc sont conservés à -20°C.

4.4 La PCR semi-quantitative

La PCR semi-quantitative est utilisée pour l'analyse de l'épissage du messager de *XBP1* à l'aide de la GoTaq® Green Master Mix (Promega). Les amorces utilisées pour la PCR semi-quantitative sont indiquées dans le Tableau 7. Les amorces ont été désignées de manière à avoir une température d'hybridation voisine de 55°C (à 1 ou 2 degrés près). Pour réaliser la réaction, 2 µL d'ADNc sont prélevés auxquels sont ajoutés la GoTaq® Green Master Mix 2X contenant la Taq (enzyme thermostable de polymérisation) et du tampon de réaction (concentration finale 1X), les amorces sens et anti-sens du gène d'intérêt sont ajoutés pour une concentration finale de 1 µM, et de l'eau sans RNase pour un volume final de 25 µL. La réaction par polymérisation se déroule selon les étapes décrites dans le

Tableau 8. Le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour chaque gène étudié a été déterminé au préalable grâce à une cinétique, afin de se placer dans la phase exponentielle d'amplification.

Le résultat de l'amplification par PCR est visualisé sur gel d'agarose 1,5% TAE 1X, avec une migration dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-base, 1,14% (v:v) acide acétique glacial, 1 mM EDTA, pH 8,5) pendant environ 40 minutes à 100 volts. Le gel pour *XBP1* est un gel à 3% d'agarose qui migre environ 4 heures. L'analyse se fait par densitométrie sous UV. Le gène de la β -actine est utilisé comme contrôle interne de la quantité d'ADNc introduite pour chaque échantillon. L'analyse quantitative par densitométrie des produits de PCR pour le gène étudié est réalisée à l'aide du logiciel (Quantity One 4.1.1, Biorad).

Tableau 7 : Liste des amorces de PCR semi-quantitative.

N : Nombre de cycle

Cible	Séquence (sens/ Antisens)	Taille (pb)	N
<i>XBP1</i> (épissé)	5'-AACAGAGTAGCAGCTGAGATGC-3' 5'-TCGTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'	473 (447)	30
<i>β-actine</i>	5'-ATGATATCGCCGCGCTCGTCGTC-3' 5'-AGGTCCCGGCCAGCAGGTCCAG-3'	547	23
<i>SCD-1</i>	5'-TTCAGAAACACATGCTGATCCTCATAATTCCC-3' 5'-ATTAAGCACCCACAGCATATCGCAAGAAAGTCTG-3'	287	27

Tableau 8 : Programme de PCR semi-quantitative.

Durée	Température	Etape	Nombre de cycles
3 min	94°C	Dénaturation	1
45 s	94°C	Dénaturation	N
45 s	55°C	Hybridation	
45 s	72°C	Elongation	
7 min	72°C	Elongation finale	1
∞	+4°C	Conservation	1

4.5 La PCR en temps réel

La réaction d'amplification par PCR en temps réel est réalisée à partir des ADNc issus de la RT. Les essais sont réalisés en plaque 96 puits, par mélange de 12,5 μ L de iQ SYBR Green Supermix (BioRad) (KCl 100 mM ; Tris-HCl 40 mM pH 8.4 ; 0,4 mM de chaque dNTP ; iTaq DNA polymérase 50 U/ml ; MgCl₂ 6 mM ; SYBR Green I ; fluorescéine 20 nM ; stabilisateurs) et de 300 nM d'amorce sens, 300 nM d'amorce anti-sens (Tableau 9), dans un volume final de 25 μ L. Une gamme de concentration de mélange d'ADNc, de 1 à 1/200 est réalisée afin d'obtenir les courbes standards pour déterminer l'efficacité, ainsi qu'un blanc (sans échantillon) afin de vérifier d'éventuelles contaminations.

Les réactions d'amplification en temps réel sont effectuées dans un appareil iCycler (BioRad), selon le programme détaillé dans le Tableau 10.

Tableau 9 : Liste des amorces de PCR en temps réel.

Cible	Séquence (sens/antisens)
<i>CHOP</i>	5'-ACAGTGTCCCGAAGGAGAAAGG-3' 5'-GCCAAAATCAGAGCTGGAACCT-3'
<i>SCD-1</i>	5'-TTGGAGAAGCGGTGGATACA-3' 5'-TTGGAGAAGCGGTGGATACA-3'
<i>GRP78/BIP</i>	5'-GGAACACAGTGGTGCCTACCAA-3' 5'-GGAGCAGGAGGAATTCCAGTCA-3'
<i>18S</i>	5' GTCTGTGATGCCCTTAGATG 3' 5' AGCTTATGACCCGCACTTAC 3'
<i>β-actine</i>	5'- AGCCTCGCCTTTGCCGA-3' 5'- CTGGTGCCTGGGGCG-3'
<i>L19</i>	5'-AGGCACATGGGCATAGGTAA-3' 5'-CCATGAGAATCCGCTTGTTT-3'

Tableau 10 : Programme de PCR en temps réel.

Durée	Température	Etape	Nombre de cycles
2 min	95°C	Dénaturation	1
1 min	58°C	Hybridation et élongation	1
15 s	95°C	Dénaturation	40
1 min	60°C	Hybridation et élongation	
15 s	95°C	Dénaturation	

Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel iCycler (BioRad). La quantité relative du niveau d'expression des différents gènes est déterminée par la méthode des $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta C_t = C_{t_{rapporteur}} - C_{t_{gène}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{échantillon}} - \Delta C_{t_{contrôle}}$; $2^{-\Delta\Delta C_t}$ représente l'expression dans l'échantillon par rapport au contrôle). Les résultats sont normalisés grâce aux transcrits des gènes rapporteurs L19, β -actine et/ou 18S.

5. Western Blotting

5.1 Extraction des protéines

Les lysats cellulaires sont préparés selon deux méthodes en fonction des protéines étudiées. Les lysats de protéines cellulaires totales sont analysés pour l'étude de

l'expression de toutes les protéines à l'exception d'XBP1. Les lysats de protéines nucléaires sont analysés pour l'étude de l'expression d'XBP1 et de CHOP.

5.1.1 Extraction des protéines totales

Les cellules adhérentes sont lavées deux fois par du PBS 1X à 4°C, puis sont raclées dans le tampon de lyse, le tampon TRITON (Tris-HCL 20 mM pH 7,4 , NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, Triton X-100 1%) supplémenté en DTT (1 mM), PMSF (1 mM), anti-phosphatases (P5726, Sigma) et anti-protéases (065K4070, Sigma). Après 10 minutes d'action du tampon de lyse, les tubes sont placés dans un bain à ultrasons préalablement refroidi avec de la glace. A 1 minute d'intervalle, 3 séries de 20 secondes d'ultrason sont appliqués sur les cellules. Après 10 minutes, les microtubes sont centrifugés à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant, ainsi collecté, est notre extrait de protéines totales.

5.1.2 Extraction des protéines nucléaires

L'extraction des protéines nucléaires est réalisée en plusieurs étapes.

Les cellules adhérentes sont lavées deux fois au PBS 1X froid, elles sont grattées dans un premier tampon de lyse (10 mM HEPES, pH 7,9 ,50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 500 mM sucrose, 0,5% Triton X-100) supplémenté en DTT (1 mM), en PMSF (1 mM) et en anti-protéases. Les cellules sont alors transférées dans un microtube. Après 10 minutes de lyse dans la glace, les lysats sont centrifugés à 3000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est composé des protéines cytoplasmiques et le culot est composé de débris cellulaire et des noyaux.

Le culot ainsi obtenu est lavé par un tampon de lavage (10 mM HEPES, pH 7,9 , 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA) supplémenté en DTT (1 mM), en PMSF (1 mM) et en anti-protéases.

Le culot de noyaux est repris dans le tampon de lyse des noyaux (10 mM HEPES, pH 7,9 , 500 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,1% NP-40, avec les inhibiteurs de protéases) et incubé sur la glace pendant 30 minutes. Pendant ces 30 minutes, 4 séries de 20 secondes d'ultrason sont appliqués (comme décrits

précédemment). Le lysat est ensuite centrifugé à 24 000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est l'extrait de protéines nucléaires.

La quantité en protéines totales des échantillons est ensuite mesurée selon la méthode de dosage à l'acide bicinchoninique (kit de dosage BCA, BCA-1, Sigma).

5.2 Migration et transfert

30 à 50 µg de protéines additionnées de tampon de charge coloré (Tris-HCl 0,03 M pH 6,8 ; DTT 0,05 M ; glycérol 8% ; bleu de bromophénol 0,05% ; SDS 2% ; β-mercaptoéthanol 2,5%) sont dénaturés 3 minutes à 95°C puis déposées sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide dont le pourcentage dépend de la taille de la protéine recherchée, contenant du SDS 0,1%. La migration est effectuée dans un tampon Tris-glycine (Tris 72 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1%), puis le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose (Whatman, Springfield, England) ou PVDF (Polyfluorure de vinylidène, Perkin Elmer), selon la protéine recherchée, dans un tampon Tris-glycine (Tris 25 mM ; glycine 200 mM ; méthanol 20%).

5.3 Incubation des anticorps et révélation

Les membranes sont ensuite saturées pendant 1h à température ambiante dans un tampon salin TBS-T (TBS 1X ; Tween-20 0,1%) contenant 5% de BSA ou de lait écrémé. Les anticorps sont mis à incuber sur les membranes selon les conditions définies dans Tableau 11. Les anticorps secondaires, couplés à la peroxydase de raifort, sont tous appliqués à une dilution finale de 1/5 000 dans le tampon correspondant à l'anticorps primaire. Tous les rinçages sont effectués au TBS-T.

Tableau 11 : Liste des anticorps employés pour l'immuno-blotting.

Anti-	Origine et Référence	Firme	Dilution	PM cible (kDa)	Tampon extraction	Tampon saturation	Incubation
β -actine	M AC-15	S	1/1000	42	Triton	5% Lait	O/N +4°C
SCD-1	M sc-58420	SC	1/500	37	Triton	5% Lait	O/N +4°C
c-PARP	R #9541	CST	1/1000	89	Triton	5% BSA	O/N +4°C
p-eIF2 α (Ser51)	R #3597	CST	1/1000	38	Triton	5% BSA	O/N +4°C
eIF2 α	R #5324	CST	1/2000	38	Triton	5% BSA	O/N +4°C
GRP78/BIP	G sc-1050	SC	1/1000	78	Triton	5% Lait	O/N +4°C
CHOP	M sc-56107	SC	1/1000	30	Triton/Noyaux	5% BSA	O/N +4°C
XBP1	R sc-7160	SC	1/1000	~56	Noyaux	5% Lait	O/N +4°C
Lamine A/C	R #2032	CST	1/2000	70	Noyaux	5% Lait	O/N +4°C
p-JNK	R #4668	CST	1/1000	46, 54	Triton	5% BSA	O/N +4°C
JNK	R #9252	CST	1/1000	46, 54	Triton	5% BSA	O/N +4°C

PM : poids moléculaire ; O/N : sur la nuit ; M :souris ; R : lapin ; G : chèvre ; S : Sigma ; SC : Santa Cruz, Santa Cruz, Californie, USA ; CST : Cell Signaling Technology, Danvers, Massachussets, USA

La révélation est effectuée par ajout du réactif ECL (*Enhanced ChemiLuminescent*, Thermo Scientific) à l'obscurité et par application de la membrane sur film photographique.

6. Evaluation de l'activité SCD-1

L'activité SCD-1 a été évaluée par la mesure de la conversion du [^{14}C]-acide stéarique en [^{14}C]-acide oléique aux temps indiqués. Les cellules sont incubées avec 3 μM (0,25 μCi /boîte) de [^{14}C]-acide stéarique pendant 6h à 37°C sous 5% de CO_2 . Les cellules sont collectées et les lipides totaux sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer décrite précédemment dans la section *Matériels et Méthodes 1.2.5.2*. Les lipides sont ensuite saponifiés puis estérifiés. Les esters d'acide gras marqués au [^{14}C] sont séparés par chromatographie liquide haute performance (Packard Flow Scintillation Analyzer, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) couplées à un détecteur UV pour la détection des AG effectuée à 205 nm et d'un détecteur radioisotopique pour la détection du [^{14}C]. Le ratio [^{14}C]-acide oléique/([^{14}C]-acide stéarique + [^{14}C]-acide oléique) est considéré comme l'activité de désaturation SCD-1.

7. Evaluation du niveau de ROS intracellulaires

Les ROS intracellulaires sont mesurés par un agent fluorescent traversant la membrane cellulaire, le 2,7-dichlorodihydrofluoresceine diacetate (H2DCFDA; Molecular Probes). Les cellules ont été traitées par les AG 24 ou 48h. Aux temps indiqués, les cellules sont récoltées, et culottées. Une prise aliquote, soit environ 10^6 cellules, est prélevée et remise en suspension dans du milieu de culture complet, le H2DCFDA est ajouté à raison de 100 μ M. Le mélange réactionnel est incubé une heure à 37°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite placées dans la glace et rapidement analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives. Chaque condition est répétée 3 fois dans chaque expérience.

8. Statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (Erreur standard à la moyenne). La différence significative entre ces moyennes est déterminée par une analyse des variances (Anova) suivie d'un test de Tukey HSD (*honestly significant difference*). Un $p < 0,05$ est considéré comme significativement différent.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010, 127:2893-2917.
2. Michiels C, Boutron MC, Chatelain N, Quipourt V, Roy P, Faivre J: [Prognostic factors in colorectal adenocarcinoma of Dukes stage B. Study of a series of population]. *Gastroenterol Clin Biol* 1994, 18:456-461.
3. Benhamiche AM: [Colonic cancer: descriptive epidemiology and high-risk groups]. *Gastroenterol Clin Biol* 1998, 22:S3-11.
4. Viguier J, Bourlier P, Karsenti D, De Calan L, Danquechin Dorval E: Cancer du côlon. In *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, vol. 9-068-A-10, Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS edition; 2003.
5. Grady WM: Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* 2003, 124:1574-1594.
6. Hall MN, Chavarro JE, Lee IM, Willett WC, Ma J: A 22-year prospective study of fish, n-3 fatty acid intake, and colorectal cancer risk in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, 17:1136-1143.
7. Cai F, Dupertuis YM, Pichard C: Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012, 15:99-106.
8. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T: Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* 2011, 6:e20456.
9. Rohrmann S, Hermann S, Linseisen J: Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study. *Am J Clin Nutr* 2009, 89:1418-1424.
10. Zheng W, Lee SA: Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk. *Nutr Cancer* 2009, 61:437-446.
11. Trock B, Lanza E, Greenwald P: Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82:650-661.
12. Boutron-Ruault MC, Senesse P, Meance S, Belghiti C, Faivre J: Energy intake, body mass index, physical activity, and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nutr Cancer* 2001, 39:50-57.
13. Giovannucci E: Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* 1995, 6:164-179.
14. Boutron-Ruault MC, Senesse P, Faivre J, Couillaud C, Belghiti C: Folate and alcohol intakes: related or independent roles in the adenoma-carcinoma sequence? *Nutr Cancer* 1996, 26:337-346.
15. Boutron MC, Faivre J, Dop MC, Quipourt V, Senesse P: Tobacco, alcohol, and colorectal tumors: a multistep process. *Am J Epidemiol* 1995, 141:1038-1046.
16. Chao A, Thun MJ, Jacobs EJ, Henley SJ, Rodriguez C, Calle EE: Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:1888-1896.
17. Laurent-Puig P: Oncogénèse colorectale. *Bull Cancer* 2010, 97.
18. Harrison S, Benziger H: The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *Surgeon* 2011, 9:200-210.
19. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G: Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2012, 5:19-27.
20. Ha YL, Storkson J, Pariza MW: Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 1990, 50:1097-1101.

BIBLIOGRAPHIE

21. Grady WM, Carethers JM: Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008, 135:1079-1099.
22. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H: Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001, 3:433-438.
23. Fodde R, Smits R, Clevers H: APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001, 1:55-67.
24. Nishida N, Nagasaka T, Kashiwagi K, Boland CR, Goel A: High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers. *Cancer Biol Ther* 2007, 6:525-533.
25. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ: DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology* 2010, 56:167-179.
26. Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, Muzeau F, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G: Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:12122-12127.
27. Boland CR, Shin SK, Goel A: Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer. *Yonsei Med J* 2009, 50:309-321.
28. Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, Rat P, Bouvier AM, Laurent-Puig P, Faivre J, et al: Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res* 2008, 68:8541-8546.
29. Wu J, Issa JP, Herman J, Bassett DE, Jr., Nelkin BD, Baylin SB: Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:8891-8895.
30. el-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen RW, Falco JP, Hamilton SR, Baylin SB: High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88:3470-3474.
31. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M: Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010, 138:2101-2114 e2105.
32. Harpaz N, Polydorides AD: Colorectal dysplasia in chronic inflammatory bowel disease: pathology, clinical implications, and pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2010, 134:876-895.
33. Kraus S, Arber N: Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2009, 9:405-410.
34. Zisman TL, Rubin DT: Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008, 14:2662-2669.
35. Testro AG, Visvanathan K: Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009, 24:943-954.
36. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC, Xiong H: Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 2005, 65:5009-5014.
37. Balkwill F: TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25:409-416.
38. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR: Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 2006, 42:745-750.
39. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N: Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 2008, 118:560-570.
40. Lawrence T: The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, 1:a001651.

BIBLIOGRAPHIE

41. Wang D, Dubois RN: Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006, 55:115-122.
42. Doherty GA, Byrne SM, Molloy ES, Malhotra V, Austin SC, Kay EW, Murray FE, Fitzgerald DJ: Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009, 9:207.
43. Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000, 18:1967-1979.
44. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, et al: Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996, 13:343-346.
45. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, et al: MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996, 86:543-552.
46. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995, 55:5548-5550.
47. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M: Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997, 275:967-969.
48. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358:15-16.
49. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V, et al: Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27:5924-5930.
50. Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, Bucana CD, Fidler IJ: Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995, 1:19-31.
51. Cohen SJ, Cohen RB, Meropol NJ: Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer--more than skin deep. *J Clin Oncol* 2005, 23:5374-5385.
52. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2:127-137.
53. Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ: Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:4011-4015.
54. Smith S: The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* 1994, 8:1248-1259.
55. Guillou H, Zdravcov D, Martin PG, Jacobsson A: The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 2010, 49:186-199.
56. Brenner RR: The desaturation step in the animal biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 1971, 6:567-575.
57. Bourre JM, Piciotti M, Dumont O: Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging. *Lipids* 1990, 25:354-356.
58. Chen Q, Nilsson A: Desaturation and chain elongation of n - 3 and n - 6 polyunsaturated fatty acids in the human CaCo-2 cell line. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1166:193-201.
59. Irazu CE, Gonzalez-Rodriguez S, Brenner RR: Delta 5 desaturase activity in rat kidney microsomes. *Mol Cell Biochem* 1993, 129:31-37.

BIBLIOGRAPHIE

60. Sprecher H: Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1486:219-231.
61. Ray H, Suau F, Vincent A, Dalla Venezia N: Cell cycle regulation of the BRCA1/acetyl-CoA-carboxylase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 378:615-619.
62. Magnard C, Bachelier R, Vincent A, Jaquinod M, Kieffer S, Lenoir GM, Venezia ND: BRCA1 interacts with acetyl-CoA carboxylase through its tandem of BRCT domains. *Oncogene* 2002, 21:6729-6739.
63. Moreau K, Dizin E, Ray H, Luquain C, Lefai E, Foufelle F, Billaud M, Lenoir GM, Venezia ND: BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 2006, 281:3172-3181.
64. Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgamal AA, Eelen M, Vercaeren I, Joniau S, Van Poppel H, Baert L, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G: Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2000, 88:176-179.
65. Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Foufelle F, Heyns W, Verhoeven G: Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene* 2000, 19:5173-5181.
66. Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV: Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002, 62:642-646.
67. Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A: PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* 2005, 24:6465-6481.
68. Yoon S, Lee MY, Park SW, Moon JS, Koh YK, Ahn YH, Park BW, Kim KS: Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2007, 282:26122-26131.
69. Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M: Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol* 2010, 6:551-562.
70. Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, Destefanis G, Delogu S, Zimmermann A, Ericsson J, et al: Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011, 140:1071-1083.
71. Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, et al: Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Hepatol* 2011, 55:1400-1408.
72. Vinciguerra M, Sgroi A, Veyrat-Durebex C, Rubbia-Brandt L, Buhler LH, Foti M: Unsaturated fatty acids inhibit the expression of tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) via microRNA-21 up-regulation in hepatocytes. *Hepatology* 2009, 49:1176-1184.
73. Hallstrom TC, Nevins JR: Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle* 2009, 8:532-535.
74. Bhatia B, Hsieh M, Kenney AM, Nahle Z: Mitogenic Sonic hedgehog signaling drives E2F1-dependent lipogenesis in progenitor cells and medulloblastoma. *Oncogene* 2011, 30:410-422.
75. Nogueira V, Sundararajan D, Kwan JM, Peng XD, Sarvepalli N, Sonenberg N, Hay N: Akt-dependent Skp2 mRNA translation is required for exiting contact inhibition, oncogenesis, and adipogenesis. *EMBO J* 2012, 31:1134-1146.

BIBLIOGRAPHIE

76. Yamauchi Y, Furukawa K, Hamamura K: Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen. *Cancer Res* 2011, 71:4989-4997.
77. Huang WC, Li X, Liu J, Lin J, Chung LW: Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* 2011, 10:133-142.
78. Zadra G, Priolo C, Patnaik A, Loda M: New strategies in prostate cancer: targeting lipogenic pathways and the energy sensor AMPK. *Clin Cancer Res* 2010, 16:3322-3328.
79. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G: Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006, 9:358-365.
80. Sakai K, Okuyama H, Yura J, Takeyama H, Shinagawa N, Tsuruga N, Kato K, Miura K, Kawase K, Tsujimura T, et al.: Composition and turnover of phospholipids and neutral lipids in human breast cancer and reference tissues. *Carcinogenesis* 1992, 13:579-584.
81. Sabine JR, Abraham S, Chaikoff IL: Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res* 1967, 27:793-799.
82. Medes G, Thomas A, Weinhouse S: Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res* 1953, 13:27-29.
83. Ookhtens M, Kannan R, Lyon I, Baker N: Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol* 1984, 247:R146-153.
84. Kannan R, Lyon I, Baker N: Dietary control of lipogenesis in vivo in host tissues and tumors of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res* 1980, 40:4606-4611.
85. Robert J, Montaudon D, Hugues P: Incorporation and metabolism of exogenous fatty acids by cultured normal and tumoral glial cells. *Biochim Biophys Acta* 1983, 752:383-395.
86. Igal RA: Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* 2010, 31:1509-1515.
87. Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski ZA: Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue. *Mol Cell Biochem* 2007, 294:237-242.
88. Riboni L, Ghidoni R, Sonnino S, Omodeo-Sale F, Gaini SM, Berra B: Phospholipid content and composition of human meningiomas. *Neurochem Pathol* 1984, 2:171-188.
89. Yam D, Ben-Hur H, Dgani R, Fink A, Shani A, Berry EM: Subcutaneous, omentum and tumor fatty acid composition, and serum insulin status in patients with benign or cancerous ovarian or endometrial tumors. Do tumors preferentially utilize polyunsaturated fatty acids? *Cancer Lett* 1997, 111:179-185.
90. Bartsch H, Nair J, Owen RW: Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999, 20:2209-2218.
91. Rakheja D, Kapur P, Hoang MP, Roy LC, Bennett MJ: Increased ratio of saturated to unsaturated C18 fatty acids in colonic adenocarcinoma: implications for cryotherapy and lipid raft function. *Med Hypotheses* 2005, 65:1120-1123.
92. Dueck DA, Chan M, Tran K, Wong JT, Jay FT, Littman C, Stimpson R, Choy PC: The modulation of choline phosphoglyceride metabolism in human colon cancer. *Mol Cell Biochem* 1996, 162:97-103.
93. Monteggia E, Colombo I, Guerra A, Berra B: Phospholipid distribution in murine mammary adenocarcinomas induced by activated neu oncogene. *Cancer Detect Prev* 2000, 24:207-211.

BIBLIOGRAPHIE

94. Martin A, Duffy PA, Liossis C, Gomez-Munoz A, O'Brien L, Stone JC, Brindley DN: Increased concentrations of phosphatidate, diacylglycerol and ceramide in ras- and tyrosine kinase (fps)-transformed fibroblasts. *Oncogene* 1997, 14:1571-1580.
95. Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Muller B, Brockmoller S, Seppanen-Laakso T, Budczies J, Bucher E, Yetukuri L, Castillo S, et al: Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res* 2011, 71:3236-3245.
96. Oraldi M, Trombetta A, Biasi F, Canuto RA, Maggiora M, Muzio G: Decreased polyunsaturated Fatty Acid content contributes to increased survival in human colon cancer. *J Oncol* 2009, 2009:867915.
97. Milgram LA, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP: Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997, 3:2115-2120.
98. Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L, Heyns W, Verhoeven G: Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 2002, 98:19-22.
99. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR: Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:6379-6383.
100. Menendez JA, Lupu R: Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007, 7:763-777.
101. Roongta UV, Pabalan JG, Wang X, Ryseck RP, Fargnoli J, Henley BJ, Yang WP, Zhu J, Madireddi MT, Lawrence RM, et al: Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol Cancer Res* 2011, 9:1551-1561.
102. Fritz V, Benfodda Z, Rodier G, Henriquet C, Iborra F, Avances C, Allory Y, de la Taille A, Culine S, Blancou H, et al: Abrogation of de novo lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol Cancer Ther* 2010, 9:1740-1754.
103. Li J, Ding SF, Habib NA, Fermor BF, Wood CB, Gilmour RS: Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 1994, 57:348-352.
104. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ: Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1997, 20:204-215.
105. Thai SF, Allen JW, DeAngelo AB, George MH, Fuscoe JC: Detection of early gene expression changes by differential display in the livers of mice exposed to dichloroacetic acid. *Carcinogenesis* 2001, 22:1317-1322.
106. Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, Ohashi K, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, et al: Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2005, 41:1316-1322.
107. Falvella FS, Pascale RM, Gariboldi M, Manenti G, De Miglio MR, Simile MM, Dragani TA, Feo F: Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis* 2002, 23:1933-1936.
108. Scaglia N, Caviglia JM, Igal RA: High stearoyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1687:141-151.

109. Enoch HG, Catala A, Strittmatter P: Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem* 1976, 251:5095-5103.
110. Miyazaki M, Kim HJ, Man WC, Ntambi JM: Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem* 2001, 276:39455-39461.
111. Scaglia N, Chisholm JW, Igal RA: Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One* 2009, 4:e6812.
112. Scaglia N, Igal RA: Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem* 2005, 280:25339-25349.
113. Scaglia N, Igal RA: Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol* 2008, 33:839-850.
114. Ntambi JM: Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 1999, 40:1549-1558.
115. Ntambi JM, Miyazaki M: Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 2004, 43:91-104.
116. Kaestner KH, Ntambi JM, Kelly TJ, Jr., Lane MD: Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 1989, 264:14755-14761.
117. Mihara K: Structure and regulation of rat liver microsomal stearoyl-CoA desaturase gene. *J Biochem* 1990, 108:1022-1029.
118. Ntambi JM, Buhrow SA, Kaestner KH, Christy RJ, Sibley E, Kelly TJ, Jr., Lane MD: Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 1988, 263:17291-17300.
119. Stuke JE, McDonough VM, Martin CE: The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* 1990, 265:20144-20149.
120. Ideta R, Seki T, Adachi K, Nakayama Y: The isolation and characterization of androgen-dependent genes in the flank organs of golden Syrian hamsters. *Dermatology* 1998, 196:47-50.
121. Ward RJ, Travers MT, Vernon RG, Salter AM, Buttery PJ, Barber MC: The ovine stearyl-CoA desaturase gene: cloning and determination of gene number within the ovine genome. *Biochem Soc Trans* 1997, 25:S673.
122. Watts JL, Browse J: A palmitoyl-CoA-specific delta9 fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 272:263-269.
123. Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM: Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J* 1999, 340 (Pt 1):255-264.
124. Paton CM, Ntambi JM: Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, 297:E28-37.
125. Miyazaki M, Bruggink SM, Ntambi JM: Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Delta9-desaturase. *J Lipid Res* 2006, 47:700-704.
126. Sinner DI, Kim GJ, Henderson GC, Igal RA: StearoylCoA desaturase-5: a novel regulator of neuronal cell proliferation and differentiation. *PLoS One* 2012, 7:e39787.
127. Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi JM: Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 2006, 281:1251-1260.

128. Mauvoisin D, Mounier C: Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* 2011, 93:78-86.
129. Sampath H, Ntambi JM: Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha: independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006, 9:84-88.
130. Ettinger SL, Sobel R, Whitmore TG, Akbari M, Bradley DR, Gleave ME, Nelson CC: Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer Res* 2004, 64:2212-2221.
131. Chu K, Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM: Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol* 2006, 26:6786-6798.
132. Peter A, Weigert C, Staiger H, Rittig K, Cegan A, Lutz P, Machicao F, Haring HU, Schleicher E: Induction of stearoyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, 295:E339-349.
133. Chu CP: Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. *Med Hypotheses* 2011, 76:697-699.
134. Grimaldi PA: Fatty acid regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001, 4:433-437.
135. Chang Y, Wang J, Lu X, Thewke DP, Mason RJ: KGF induces lipogenic genes through a PI3K and JNK/SREBP-1 pathway in H292 cells. *J Lipid Res* 2005, 46:2624-2635.
136. Demoulin JB, Ericsson J, Kallin A, Rorsman C, Ronnstrand L, Heldin CH: Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 2004, 279:35392-35402.
137. Mason RJ, Pan T, Edeen KE, Nielsen LD, Zhang F, Longphre M, Eckart MR, Neben S: Keratinocyte growth factor and the transcription factors C/EBP alpha, C/EBP delta, and SREBP-1c regulate fatty acid synthesis in alveolar type II cells. *J Clin Invest* 2003, 112:244-255.
138. Samuel W, Nagineni CN, Kutty RK, Parks WT, Gordon JS, Prouty SM, Hooks JJ, Wiggert B: Transforming growth factor-beta regulates stearoyl coenzyme A desaturase expression through a Smad signaling pathway. *J Biol Chem* 2002, 277:59-66.
139. Jeffcoat R, James AT: The control of stearoyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett* 1978, 85:114-118.
140. Landschulz KT, Jump DB, MacDougald OA, Lane MD: Transcriptional control of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 200:763-768.
141. Miller CW, Ntambi JM: Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:9443-9448.
142. Minville-Walz M, Gresti J, Pichon L, Bellenger S, Bellenger J, Narce M, Rialland M: Distinct regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression by cis and trans C18:1 fatty acids in human aortic smooth muscle cells. *Genes Nutr* 2012, 7:209-216.
143. Waters KM, Miller CW, Ntambi JM: Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearoyl-CoA desaturase gene 1. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1349:33-42.
144. Bene H, Lasky D, Ntambi JM: Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element

- binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 284:1194-1198.
145. Zhang L, Ge L, Tran T, Stenn K, Prouty SM: Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element. *Biochem J* 2001, 357:183-193.
 146. Long SD, Pekala PH: Regulation of GLUT4 mRNA stability by tumor necrosis factor- α : alterations in both protein binding to the 3' untranslated region and initiation of translation. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 220:949-953.
 147. Sessler AM, Kaur N, Palta JP, Ntambi JM: Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996, 271:29854-29858.
 148. Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, Rogers MJ, Setlow B, Redline R: Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974, 71:4565-4569.
 149. Oshino N, Sato R: The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1972, 149:369-377.
 150. Mziaut H, Korza G, Ozols J: The N terminus of microsomal delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:8883-8888.
 151. Kato H, Sakaki K, Mihara K: Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. *J Cell Sci* 2006, 119:2342-2353.
 152. Mziaut H, Korza G, Benraiss A, Ozols J: Selective mutagenesis of lysyl residues leads to a stable and active form of delta 9 stearoyl-CoA desaturase. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1583:45-52.
 153. Hampton RY: ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14:476-482.
 154. Heinemann FS, Korza G, Ozols J: A plasminogen-like protein selectively degrades stearoyl-CoA desaturase in liver microsomes. *J Biol Chem* 2003, 278:42966-42975.
 155. Liu G: Stearoyl-CoA desaturase inhibitors: update on patented compounds. *Expert Opin Ther Pat* 2009, 19:1169-1191.
 156. Koltun DO, Parkhill EQ, Vasilevich NI, Glushkov AI, Zilbershtein TM, Ivanov AV, Cole AG, Henderson I, Zautke NA, Brunn SA, et al: Novel, potent, selective, and metabolically stable stearoyl-CoA desaturase (SCD) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2009, 19:2048-2052.
 157. Leger S, Black WC, Deschenes D, Dolman S, Falgout JP, Gagnon M, Guiral S, Huang Z, Guay J, Leblanc Y, et al: Synthesis and biological activity of a potent and orally bioavailable SCD inhibitor (MF-438). *Bioorg Med Chem Lett* 2010, 20:499-502.
 158. Hovik KE, Spydevold OS, Bremer J: Thia fatty acids as substrates and inhibitors of stearoyl-CoA desaturase. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1349:251-256.
 159. Lin X, Loo JJ, Herbein JH: Trans10,cis12-18:2 is a more potent inhibitor of de novo fatty acid synthesis and desaturation than cis9,trans11-18:2 in the mammary gland of lactating mice. *J Nutr* 2004, 134:1362-1368.
 160. Park Y, Storkson JM, Ntambi JM, Cook ME, Sih CJ, Pariza MW: Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1486:285-292.
 161. Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM: Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J Nutr* 2001, 131:2260-2268.

BIBLIOGRAPHIE

162. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzierski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD: Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:11482-11486.
163. Ntambi JM, Miyazaki M: Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Curr Opin Lipidol* 2003, 14:255-261.
164. Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM: The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 2000, 275:30132-30138.
165. Payne AP: The harderian gland: a tercentennial review. *J Anat* 1994, 185 (Pt 1):1-49.
166. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM: Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:6409-6414.
167. Dobrzyn A, Ntambi JM: The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005, 73:35-41.
168. Jackowski S: Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem* 1996, 271:20219-20222.
169. Siperstein MD: Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res* 1984, 25:1462-1468.
170. Sugimoto H, Banchio C, Vance DE: Transcriptional regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog Lipid Res* 2008, 47:204-220.
171. Hess D, Chisholm JW, Igal RA: Inhibition of stearoylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLoS One* 2010, 5:e11394.
172. Malumbres M, Barbacid M: Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009, 9:153-166.
173. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH: Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:10878-10882.
174. de Vries DJ, Rao KS, Willis RH: Application of a radioreceptor assay to the screening and characterisation of compounds from marine organisms with activity at the phorbol ester binding site of protein kinase C. *Toxicon* 1997, 35:347-354.
175. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE: Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:3077-3082.
176. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY: Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 2001, 50:69-76.
177. Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL: Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 2004, 145:5087-5096.
178. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG: Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 2001, 50:1771-1777.
179. Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y: Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* 2003, 278:31861-31870.

180. Hardy S, Langelier Y, Prentki M: Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 2000, 60:6353-6358.
181. Wei Y, Wang D, Pagliassotti MJ: Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells. *Mol Cell Biochem* 2007, 303:105-113.
182. Schaffer JE: Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003, 14:281-287.
183. Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H: Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem* 2010, 285:22027-22035.
184. Doble BW, Woodgett JR: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003, 116:1175-1186.
185. Arteaga CL: Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002, 7 Suppl 4:31-39.
186. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV: RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase- α gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005, 65:6719-6725.
187. Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V: Acetyl-CoA carboxylase α is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res* 2006, 66:5287-5294.
188. Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K, Verhoeven G, Swinnen JV: Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* 2007, 67:8180-8187.
189. Zhou W, Han WF, Landree LE, Thupari JN, Pinn ML, Bililign T, Kim EK, Vadlamudi A, Medghalchi SM, El Meskini R, et al: Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007, 67:2964-2971.
190. Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, Pinn ML, Ronnett GV, Kuhajda FP: Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res* 2003, 63:7330-7337.
191. Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, McFadden JM, Kuhajda FP: Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* 2005, 24:39-46.
192. Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, Lupu R: Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:10715-10720.
193. Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV: Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 2005, 280:5636-5645.
194. Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP: Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res* 1996, 56:1189-1193.
195. Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ: Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res* 2007, 67:1262-1269.
196. Jung SY, Jeon HK, Choi JS, Kim YJ: Reduced expression of FASN through SREBP-1 down-regulation is responsible for hypoxic cell death in HepG2 cells. *J Cell Biochem* 2012.
197. Lupu R, Menendez JA: Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr Pharm Biotechnol* 2006, 7:483-493.

BIBLIOGRAPHIE

198. Eberhard Y, Gronda M, Hurren R, Datti A, MacLean N, Ketela T, Moffat J, Wrana JL, Schimmer AD: Inhibition of SREBP1 sensitizes cells to death ligands. *Oncotarget* 2011, 2:186-196.
199. Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Takano Y, Saito K, Furuta E, Iizumi M, et al: Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66:5934-5940.
200. Pandey PR, Okuda H, Watabe M, Pai SK, Liu W, Kobayashi A, Xing F, Fukuda K, Hirota S, Sugai T, et al: Resveratrol suppresses growth of cancer stem-like cells by inhibiting fatty acid synthase. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 130:387-398.
201. Knowles LM, Yang C, Osterman A, Smith JW: Inhibition of fatty-acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4. *J Biol Chem* 2008, 283:31378-31384.
202. Knowles LM, Smith JW: Genome-wide changes accompanying knockdown of fatty acid synthase in breast cancer. *BMC Genomics* 2007, 8:168.
203. Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW: A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 2004, 279:30540-30545.
204. Lee JS, Sul JY, Park JB, Lee MS, Cha EY, Song IS, Kim JR, Chang ES: Fatty Acid Synthase Inhibition by Amentoflavone Suppresses HER2/neu (erbB2) Oncogene in SKBR3 Human Breast Cancer Cells. *Phytother Res* 2012.
205. Vossen RC, van Dam-Mieras MC, Hornstra G, Zwaal RF: Differential effects of endothelial cell fatty acid modification on the sensitivity of their membrane phospholipids to peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995, 52:341-347.
206. Morgan-Lappe SE, Tucker LA, Huang X, Zhang Q, Sarthy AV, Zakula D, Verneti L, Schurdak M, Wang J, Fesik SW: Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res* 2007, 67:4390-4398.
207. Mason P, Liang B, Li L, Fremgen T, Murphy E, Quinn A, Madden SL, Biemann HP, Wang B, Cohen A, et al: SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLoS One* 2012, 7:e33823.
208. Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, Kellerer M: Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 299:853-856.
209. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ: Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004, 40:185-194.
210. Kong JY, Rabkin SW: Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1485:45-55.
211. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ: Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006, 281:12093-12101.
212. Morgan NG, Dhayal S, Diakogiannaki E, Welters HJ: The cytoprotective actions of long-chain mono-unsaturated fatty acids in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 2008, 36:905-908.
213. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W: Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2001, 276:38061-38067.
214. Srivastava S, Chan C: Hydrogen peroxide and hydroxyl radicals mediate palmitate-induced cytotoxicity to hepatoma cells: relation to mitochondrial permeability transition. *Free Radic Res* 2007, 41:38-49.

215. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ: Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 291:E275-281.
216. Guo W, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z: Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, 293:E576-586.
217. Habib NA, Wood CB, Apostolov K, Barker W, Hershman MJ, Aslam M, Heinemann D, Fermor B, Williamson RC, Jenkins WE, et al.: Stearic acid and carcinogenesis. *Br J Cancer* 1987, 56:455-458.
218. Jung KC, Park CH, Hwang YH, Rhee HS, Lee JH, Kim HK, Yang CH: Fatty acids, inhibitors for the DNA binding of c-Myc/Max dimer, suppress proliferation and induce apoptosis of differentiated HL-60 human leukemia cell. *Leukemia* 2006, 20:122-127.
219. Calonghi N, Cappadone C, Pagnotta E, Farruggia G, Buontempo F, Boga C, Brusa GL, Santucci MA, Masotti L: 9-Hydroxystearic acid upregulates p21(WAF1) in HT29 cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 314:138-142.
220. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L: Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, 299:E1096-1105.
221. Miller TA, LeBrasseur NK, Cote GM, Trucillo MP, Pimentel DR, Ido Y, Ruderman NB, Sawyer DB: Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 336:309-315.
222. Askari B, Carroll MA, Capparelli M, Kramer F, Gerrity RG, Bornfeldt KE: Oleate and linoleate enhance the growth-promoting effects of insulin-like growth factor-I through a phospholipase D-dependent pathway in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002, 277:36338-36344.
223. Ciapaite J, van Bezu J, van Eikenhorst G, Bakker SJ, Teerlink T, Diamant M, Heine RJ, Krab K, Westerhoff HV, Schalkwijk CG: Palmitate and oleate have distinct effects on the inflammatory phenotype of human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1771:147-154.
224. Lamers D, Schlich R, Greulich S, Sasson S, Sell H, Eckel J: Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 2011, 15:1177-1188.
225. Lu G, Morinelli TA, Meier KE, Rosenzweig SA, Egan BM: Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. *Circ Res* 1996, 79:611-618.
226. Renard CB, Askari B, Suzuki LA, Kramer F, Bornfeldt KE: Oleate, not ligands of the receptor for advanced glycation end-products, promotes proliferation of human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia* 2003, 46:1676-1687.
227. Yun MR, Lee JY, Park HS, Heo HJ, Park JY, Bae SS, Hong KW, Sung SM, Kim CD: Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Pharmacol Res* 2006, 54:97-102.
228. Arous C, Naimi M, Van Obberghen E: Oleate-mediated activation of phospholipase D and mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates proliferation and rapamycin sensitivity of hepatocarcinoma cells. *Diabetologia* 2011, 54:954-964.
229. Vinciguerra M, Carrozzino F, Peyrou M, Carlone S, Montesano R, Benelli R, Foti M: Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN. *J Hepatol* 2009, 50:1132-1141.

230. Hardy S, St-Onge GG, Joly E, Langelier Y, Prentki M: Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* 2005, 280:13285-13291.
231. Soto-Guzman A, Navarro-Tito N, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Salazar EP: Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2010, 27:505-515.
232. Soto-Guzman A, Robledo T, Lopez-Perez M, Salazar EP: Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008, 294:81-91.
233. Navarro-Tito N, Soto-Guzman A, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Salazar EP: Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2010, 42:306-317.
234. Llor X, Pons E, Roca A, Alvarez M, Mane J, Fernandez-Banares F, Gassull MA: The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin Nutr* 2003, 22:71-79.
235. Menendez JA, Vellon L, Colomer R, Lupu R: Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann Oncol* 2005, 16:359-371.
236. Fernanda Cury-Boaventura M, Cristine Kanunfre C, Gorjao R, Martins de Lima T, Curi R: Mechanisms involved in Jurkat cell death induced by oleic and linoleic acids. *Clin Nutr* 2006, 25:1004-1014.
237. Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM: Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem* 2007, 282:2483-2493.
238. Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N, Tringali G, Navarra P, Ranelletti FO, Palozza P: n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* 2004, 25:2303-2310.
239. Ramos EJ, Middleton FA, Laviano A, Sato T, Romanova I, Das UN, Chen C, Qi Y, Meguid MM: Effects of omega-3 fatty acid supplementation on tumor-bearing rats. *J Am Coll Surg* 2004, 199:716-723.
240. Schonberg SA, Lundemo AG, Fladvad T, Holmgren K, Bremseth H, Nilsen A, Gederaas O, Tvedt KE, Egeberg KW, Krokan HE: Closely related colon cancer cell lines display different sensitivity to polyunsaturated fatty acids, accumulate different lipid classes and downregulate sterol regulatory element-binding protein 1. *FEBS J* 2006, 273:2749-2765.
241. Wynter MP, Russell ST, Tisdale MJ: Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *In Vivo* 2004, 18:543-547.
242. Hull MA: Omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011, 25:547-554.
243. Sauer LA, Blask DE, Dauchy RT: Dietary factors and growth and metabolism in experimental tumors. *J Nutr Biochem* 2007, 18:637-649.
244. Wen ZH, Su YC, Lai PL, Zhang Y, Xu YF, Zhao A, Yao GY, Jia CH, Lin J, Xu S, et al: Critical role of arachidonic acid-activated mTOR signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis. *Oncogene* 2012.
245. Begin ME, Eills G, Das UN, Horrobin DF: Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Natl Cancer Inst* 1986, 77:1053-1062.

BIBLIOGRAPHIE

246. Das UN: Tumoricidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer Lett* 1991, 56:235-243.
247. Sagar PS, Das UN: Cytotoxic action of cis-unsaturated fatty acids on human cervical carcinoma (HeLa) cells in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995, 53:287-299.
248. Pariza MW, Ha YL: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1990, 7:169-171.
249. Pariza MW, Park Y, Cook ME: The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 2001, 40:283-298.
250. O'Shea M, Devery R, Stanton C, Lawless F: The effect of a conjugated dienoic derivative of linoleic acid on the in vitro growth of MCF-7 and SW480 human cancer cell lines. *Biochem Soc Trans* 1998, 26:S61.
251. Banni S: Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002, 13:261-266.
252. Rainer L, Heiss CJ: Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. *J Am Diet Assoc* 2004, 104:963-968, quiz 1032.
253. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW: Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987, 8:1881-1887.
254. Carta G, Angioni E, Murru E, Melis MP, Spada S, Banni S: Modulation of lipid metabolism and vitamin A by conjugated linoleic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002, 67:187-191.
255. Belury MA: Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J Nutr* 2002, 132:2995-2998.
256. Masso-Welch PA, Zangani D, Ip C, Vaughan MM, Shoemaker S, Ramirez RA, Ip MM: Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. *Cancer Res* 2002, 62:4383-4389.
257. Lee KW, Lee HJ, Cho HY, Kim YJ: Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005, 45:135-144.
258. Ip C, Banni S, Angioni E, Carta G, McGinley J, Thompson HJ, Barbano D, Bauman D: Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J Nutr* 1999, 129:2135-2142.
259. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW: Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 1991, 51:6118-6124.
260. Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA: Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res* 1994, 54:1212-1215.
261. Thompson H, Zhu Z, Banni S, Darcy K, Loftus T, Ip C: Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res* 1997, 57:5067-5072.
262. Aro A, Mannisto S, Salminen I, Ovaskainen ML, Kataja V, Uusitupa M: Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Cancer* 2000, 38:151-157.
263. Lavillonniere F, Bougnoux P: Conjugated linoleic acid (CLA) and the risk of breast cancer. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* 1999, 1:276-282.
264. Liu JR, Li BX, Chen BQ, Han XH, Xue YB, Yang YM, Zheng YM, Liu RH: Effect of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid on cell cycle of gastric adenocarcinoma cell line (SGC-7901). *World J Gastroenterol* 2002, 8:224-229.
265. Kemp MQ, Jeffy BD, Romagnolo DF: Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells. *J Nutr* 2003, 133:3670-3677.

BIBLIOGRAPHIE

266. Drouin G, Douillette A, Lacasse P, Paquette B: [Radiosensitizing effect of conjugated linoleic acid on tumor cells MCF-7 and MDA-MB-231]. *Can J Physiol Pharmacol* 2004, 82:94-102.
267. Miller A, Stanton C, Devery R: Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res* 2002, 22:3879-3887.
268. Palombo JD, Ganguly A, Bistrian BR, Menard MP: The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett* 2002, 177:163-172.
269. Wahle KW, Heys SD: Cell signal mechanisms, conjugated linoleic acids (CLAs) and anti-tumorigenesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002, 67:183-186.
270. Cho HJ, Kwon GT, Park JH: trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid induces depolarization of mitochondrial membranes in HT-29 human colon cancer cells: a possible mechanism for induction of apoptosis. *J Med Food* 2009, 12:952-958.
271. Bergamo P, Luongo D, Rossi M: Conjugated linoleic acid--mediated apoptosis in Jurkat T cells involves the production of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem* 2004, 14:57-64.
272. Moon EJ, Lee YM, Kim KW: Anti-angiogenic activity of conjugated linoleic acid on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Oncol Rep* 2003, 10:617-621.
273. Moya-Camarena SY, Van den Heuvel JP, Belury MA: Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1436:331-342.
274. Moya-Camarena SY, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA: Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. *J Lipid Res* 1999, 40:1426-1433.
275. Kim EJ, Shin HK, Cho JS, Lee SK, Won MH, Kim JW, Park JH: trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid inhibits the G1-S cell cycle progression in DU145 human prostate carcinoma cells. *J Med Food* 2006, 9:293-299.
276. Majumder B, Wahle KW, Moir S, Schofield A, Choe SN, Farquharson A, Grant I, Heys SD: Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *FASEB J* 2002, 16:1447-1449.
277. Urquhart P, Parkin SM, Rogers JS, Bosley JA, Nicolaou A: The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1580:150-160.
278. Iwakiri Y, Sampson DA, Allen KG: Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002, 67:435-443.
279. Ochoa JJ, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD, Wahle KW: Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis* 2004, 25:1185-1191.
280. Tanmahasamut P, Liu J, Hendry LB, Sidell N: Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. *J Nutr* 2004, 134:674-680.
281. Oh YS, Lee HS, Cho HJ, Lee SG, Jung KC, Park JH: Conjugated linoleic acid inhibits DNA synthesis and induces apoptosis in TSU-Pr1 human bladder cancer cells. *Anticancer Res* 2003, 23:4765-4772.

BIBLIOGRAPHIE

282. Kim EJ, Kang IJ, Cho HJ, Kim WK, Ha YL, Park JH: Conjugated linoleic acid downregulates insulin-like growth factor-I receptor levels in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* 2003, 133:2675-2681.
283. Ip C, Jiang C, Thompson HJ, Scimeca JA: Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997, 18:755-759.
284. Berryhill GE, Gloviczki JM, Trott JF, Aimo L, Kraft J, Cardiff RD, Paul CT, Petrie WK, Lock AL, Hovey RC: Diet-induced metabolic change induces estrogen-independent allometric mammary growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:16294-16299.
285. Ip MM, McGee SO, Masso-Welch PA, Ip C, Meng X, Ou L, Shoemaker SF: The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis* 2007, 28:1269-1276.
286. Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA: Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 244:678-682.
287. Belury MA, Mahon A, Banni S: The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Nutr* 2003, 133:257S-260S.
288. Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O: Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 2000, 49:1534-1542.
289. Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW: Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1994, 108:19-25.
290. Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ: Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 1997, 22:266-277.
291. Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza M: Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult Sci* 1993, 72:1301-1305.
292. Miller CC, Park Y, Pariza MW, Cook ME: Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 198:1107-1112.
293. Riserus U, Arner P, Brismar K, Vessby B: Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2002, 25:1516-1521.
294. Riserus U, Basu S, Jovinge S, Fredrikson GN, Arnlov J, Vessby B: Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. *Circulation* 2002, 106:1925-1929.
295. Lee KN, Pariza MW, Ntambi JM: Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248:817-821.
296. Choi Y, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM: The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 2000, 130:1920-1924.
297. Bretillon L, Chardigny JM, Gregoire S, Berdeaux O, Sebedio JL: Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. *Lipids* 1999, 34:965-969.

298. Choi Y, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM: Regulation of stearyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 284:689-693.
299. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A: Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006, 7:880-885.
300. Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N: Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 2003, 94:15-21.
301. Corazzari M, Lovat PE, Armstrong JL, Fimia GM, Hill DS, Birch-Machin M, Redfern CP, Piacentini M: Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: the role of stress proteins ERdj5 and ERp57. *Br J Cancer* 2007, 96:1062-1071.
302. Schonthal AH: Targeting endoplasmic reticulum stress for cancer therapy. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012, 4:412-431.
303. Malhotra JD, Kaufman RJ: Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 2007, 9:2277-2293.
304. Pineau L, Ferreira T: Lipid-induced ER stress in yeast and beta cells: parallel trails to a common fate. *FEMS Yeast Res* 2010, 10:1035-1045.
305. Ron D, Walter P: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:519-529.
306. van der Sanden MH, Houweling M, van Golde LM, Vaandrager AB: Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem J* 2003, 369:643-650.
307. Sidrauski C, Walter P: The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1997, 90:1031-1039.
308. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K: XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001, 107:881-891.
309. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D: Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000, 5:897-904.
310. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K: ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2000, 20:6755-6767.
311. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ: A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 1998, 12:1812-1824.
312. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D: Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 1998, 17:5708-5717.
313. Kaneko M, Yasui S, Niinuma Y, Arai K, Omura T, Okuma Y, Nomura Y: A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett* 2007, 581:5355-5360.
314. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K: Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 1998, 273:33741-33749.

BIBLIOGRAPHIE

315. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA: Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 2003, 23:7198-7209.
316. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, et al: An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003, 11:619-633.
317. van Huizen R, Martindale JL, Gorospe M, Holbrook NJ: P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. *J Biol Chem* 2003, 278:15558-15564.
318. Schleicher SM, Moretti L, Varki V, Lu B: Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist Updat* 2010, 13:79-86.
319. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D: CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998, 12:982-995.
320. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D: Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 2001, 153:1011-1022.
321. Yamaguchi H, Wang HG: CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004, 279:45495-45502.
322. Sung B, Ravindran J, Prasad S, Pandey MK, Aggarwal BB: Gossypol induces death receptor-5 through activation of the ROS-ERK-CHOP pathway and sensitizes colon cancer cells to TRAIL. *J Biol Chem* 2010, 285:35418-35427.
323. Cazanave SC, Mott JL, Bronk SF, Werneburg NW, Fingas CD, Meng XW, Finnberg N, El-Deiry WS, Kaufmann SH, Gores GJ: Death receptor 5 signaling promotes hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2011, 286:39336-39348.
324. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H: TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 2005, 24:1243-1255.
325. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ: Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001, 21:1249-1259.
326. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H: ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002, 16:1345-1355.
327. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M: Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001, 276:13935-13940.
328. Zhang C, Kawauchi J, Adachi MT, Hashimoto Y, Oshiro S, Aso T, Kitajima S: Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 289:718-724.
329. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D: Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000, 287:664-666.
330. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH: Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway

- through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 2006, 26:3071-3084.
331. Yang Q, Kim YS, Lin Y, Lewis J, Neckers L, Liu ZG: Tumour necrosis factor receptor 1 mediates endoplasmic reticulum stress-induced activation of the MAP kinase JNK. *EMBO Rep* 2006, 7:622-627.
 332. Tobiume K, Saitoh M, Ichijo H: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol* 2002, 191:95-104.
 333. Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, Yagita H, Okumura K, Harding H, Nakano H: Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* 2005, 280:33917-33925.
 334. Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E: Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004, 279:50375-50381.
 335. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ: BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 2003, 300:135-139.
 336. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB: Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003, 162:59-69.
 337. Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ: Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J* 2004, 23:1207-1216.
 338. Li J, Lee B, Lee AS: Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 2006, 281:7260-7270.
 339. Cheung HH, Lynn Kelly N, Liston P, Korneluk RG: Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs. *Exp Cell Res* 2006, 312:2347-2357.
 340. Dahmer MK: Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 2005, 80:576-583.
 341. Di Sano F, Ferraro E, Tufi R, Achsel T, Piacentini M, Cecconi F: Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem* 2006, 281:2693-2700.
 342. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, et al: Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 2004, 165:347-356.
 343. Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA: Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2006, 281:16016-16024.
 344. Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E: Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 293:722-726.
 345. Stadtman ER: Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 2002, 33:597-604.
 346. Han D, Williams E, Cadenas E: Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001, 353:411-416.

347. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990, 186:343-355.
348. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002, 33:337-349.
349. Miao L, St Clair DK: Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 2009, 47:344-356.
350. Luo D, Rando TA: The regulation of catalase gene expression in mouse muscle cells is dependent on the CCAAT-binding factor NF-Y. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 303:609-618.
351. Hattori H, Imai H, Kirai N, Furuhashi K, Sato O, Konishi K, Nakagawa Y: Identification of a responsible promoter region and a key transcription factor, CCAAT/enhancer-binding protein epsilon, for up-regulation of PHGPx in HL60 cells stimulated with TNF alpha. *Biochem J* 2007, 408:277-286.
352. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD: XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 2007, 27:53-66.
353. Liu Y, Adachi M, Zhao S, Hareyama M, Koong AC, Luo D, Rando TA, Imai K, Shinomura Y: Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ* 2009, 16:847-857.
354. Liu Y, Zhang X, Liang Y, Yu H, Chen X, Zheng T, Zheng B, Wang L, Zhao L, Shi C, Zhao S: Targeting X box-binding protein-1 (XBP1) enhances sensitivity of glioma cells to oxidative stress. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011, 37:395-405.
355. Li B, Li X, Zhang X, Zhu B, Liu D, Xing X, Wang X, Ma Y, Sun G: Effects of inorganic arsenic on mRNA expression of Nrf2 and Nrf2-regulated downstream anti-oxidant enzymes in Chang hepatocytes. *Wei Sheng Yan Jiu* 2011, 40:468-471.
356. Doudican NA, Wen SY, Mazumder A, Orlov SJ: Sulforaphane synergistically enhances the cytotoxicity of arsenic trioxide in multiple myeloma cells via stress-mediated pathways. *Oncol Rep* 2012.
357. Yen CC, Ho TJ, Wu CC, Chang CF, Su CC, Chen YW, Jinn TR, Lu TH, Cheng PW, Su YC, et al: Inorganic arsenic causes cell apoptosis in mouse cerebrum through an oxidative stress-regulated signaling pathway. *Arch Toxicol* 2011, 85:565-575.
358. Lu TH, Su CC, Chen YW, Yang CY, Wu CC, Hung DZ, Chen CH, Cheng PW, Liu SH, Huang CF: Arsenic induces pancreatic beta-cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. *Toxicol Lett* 2011, 201:15-26.
359. Binet F, Chiasson S, Girard D: Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 391:18-23.
360. Banhegyi G, Benedetti A, Csala M, Mandl J: Stress on redox. *FEBS Lett* 2007, 581:3634-3640.
361. Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI: Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat Res* 2009, 674:3-22.
362. Qiao D, Im E, Qi W, Martinez JD: Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1583:108-116.
363. Thomas KC, Sabnis AS, Johansen ME, Lanza DL, Moos PJ, Yost GS, Reilly CA: Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007, 321:830-838.

364. Cui Z, Houweling M, Chen MH, Record M, Chap H, Vance DE, Terce F: A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1996, 271:14668-14671.
365. Yeung BH, Kwan BW, He QY, Lee AS, Liu J, Wong AS: Glucose-regulated protein 78 as a novel effector of BRCA1 for inhibiting stress-induced apoptosis. *Oncogene* 2008, 27:6782-6789.
366. Jiang CC, Mao ZG, Avery-Kiejda KA, Wade M, Hersey P, Zhang XD: Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 2009, 30:197-204.
367. Pyrko P, Schonthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS: The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 2007, 67:9809-9816.
368. Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A: Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 2006, 147:3398-3407.
369. Ou L, Wu Y, Ip C, Meng X, Hsu YC, Ip MM: Apoptosis induced by t10,c12-conjugated linoleic acid is mediated by an atypical endoplasmic reticulum stress response. *J Lipid Res* 2008, 49:985-994.
370. Lin JH, Li H, Zhang Y, Ron D, Walter P: Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One* 2009, 4:e4170.
371. Santos LR, Rebelato E, Graciano MF, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR: Oleic acid modulates metabolic substrate channeling during glucose-stimulated insulin secretion via NAD(P)H oxidase. *Endocrinology* 2011, 152:3614-3621.
372. Seifert EL, Estey C, Xuan JY, Harper ME: Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 2010, 285:5748-5758.
373. Kok JW, Veldman RJ, Klappe K, Koning H, Filipeanu CM, Muller M: Differential expression of sphingolipids in MRP1 overexpressing HT29 cells. *Int J Cancer* 2000, 87:172-178.
374. Santini MT, Romano R, Rainaldi G, Filippini P, Bravo E, Porcu L, Motta A, Calcabrini A, Meschini S, Indovina PL, Arancia G: The relationship between ¹H-NMR mobile lipid intensity and cholesterol in two human tumor multidrug resistant cell lines (MCF-7 and LoVo). *Biochim Biophys Acta* 2001, 1531:111-131.
375. Aune D, Lau R, Chan DS, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T: Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol* 2012, 23:37-45.
376. Lampe JW: Dairy products and cancer. *J Am Coll Nutr* 2011, 30:464S-470S.
377. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A: High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am J Clin Nutr* 2005, 82:894-900.
378. Shaner RL, Allegood JC, Park H, Wang E, Kelly S, Haynes CA, Sullards MC, Merrill AH, Jr.: Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. *J Lipid Res* 2009, 50:1692-1707.
379. Ip C, Ip MM, Loftus T, Shoemaker S, Shea-Eaton W: Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, 9:689-696.
380. Lee SH, Yamaguchi K, Kim JS, Eling TE, Safe S, Park Y, Baek SJ: Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. *Carcinogenesis* 2006, 27:972-981.

381. Zhang Y, Du Y, Le W, Wang K, Kieffer N, Zhang J: Redox control of the survival of healthy and diseased cells. *Antioxid Redox Signal* 2011, 15:2867-2908.
382. Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J: Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol* 2012, 86:1649-1665.
383. Tabas I, Ron D: Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011, 13:184-190.
384. Hsu YC, Meng X, Ou L, Ip MM: Activation of the AMP-activated protein kinase-p38 MAP kinase pathway mediates apoptosis induced by conjugated linoleic acid in p53-mutant mouse mammary tumor cells. *Cell Signal* 2009, 22:590-599.
385. Ou L, Ip C, Lisafeld B, Ip MM: Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 356:1044-1049.
386. Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I: Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2009, 186:783-792.
387. Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, Backs J, Backs T, Bassel-Duby R, Olson EN, Anderson ME, Tabas I: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest* 2009, 119:2925-2941.
388. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR: Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 2009, 11:2409-2427.
389. Namba T, Tanaka K, Ito Y, Ishihara T, Hoshino T, Gotoh T, Endo M, Sato K, Mizushima T: Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis. *Am J Pathol* 2009, 174:1786-1798.
390. Hsu YC, Ip MM: Conjugated linoleic acid-induced apoptosis in mouse mammary tumor cells is mediated by both G protein coupled receptor-dependent activation of the AMP-activated protein kinase pathway and by oxidative stress. *Cell Signal* 2011, 23:2013-2020.
391. Schonfeld P, Wojtczak L: Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2008, 45:231-241.
392. Stachowska E, Baskiewicz-Masiuk M, Dziedziejko V, Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Marchlewicz M, Dolegowska B, Wiszniewska B, Machalinski B, Chlubek D: Conjugated linoleic acid increases intracellular ROS synthesis and oxygenation of arachidonic acid in macrophages. *Nutrition* 2008, 24:187-199.
393. Demizieux L, Degrace P, Gresti J, Loreau O, Noel JP, Chardigny JM, Sebedio JL, Clouet P: Conjugated linoleic acid isomers in mitochondria: evidence for an alteration of fatty acid oxidation. *J Lipid Res* 2002, 43:2112-2122.
394. Evans M, Lin X, Odle J, McIntosh M: Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 2002, 132:450-455.
395. Minville-Walz M, Pierre AS, Pichon L, Bellenger S, Fevre C, Bellenger J, Tessier C, Narce M, Rialland M: Inhibition of stearyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells. *PLoS One* 2010, 5:e14363.
396. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, Van Veldhoven PP, Waltregny D, Daniels VW, Machiels J, et al: De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res* 2010, 70:8117-8126.

BIBLIOGRAPHIE

397. Binczek E, Jenke B, Holz B, Gunter RH, Thevis M, Stoffel W: Obesity resistance of the stearoyl-CoA desaturase-deficient (scd1-/-) mouse results from disruption of the epidermal lipid barrier and adaptive thermoregulation. *Biol Chem* 2007, 388:405-418.
398. Sampath H, Ntambi JM: The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2011, 1243:47-53.
399. Brown JM, Rudel LL: Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 inhibition and the metabolic syndrome: considerations for future drug discovery. *Curr Opin Lipidol* 2010, 21:192-197.
400. Brown JM, Chung S, Sawyer JK, Degirolamo C, Alger HM, Nguyen T, Zhu X, Duong MN, Wibley AL, Shah R, et al: Inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation* 2008, 118:1467-1475.
401. Liu X, Strable MS, Ntambi JM: Stearoyl CoA desaturase 1: role in cellular inflammation and stress. *Adv Nutr* 2011, 2:15-22.
402. Chen C, Shah YM, Morimura K, Krausz KW, Miyazaki M, Richardson TA, Morgan ET, Ntambi JM, Idle JR, Gonzalez FJ: Metabolomics reveals that hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 downregulation exacerbates inflammation and acute colitis. *Cell Metab* 2008, 7:135-147.
403. Macdonald ML, Bissada N, Vallance BA, Hayden MR: Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 does not promote DSS-induced acute colitis. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1791:1166-1172.
404. Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A: Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011, 155:195-218.
405. Gajate C, Mollinedo F: Lipid rafts and Fas/CD95 signaling in cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2011, 6:274-283.
406. Hueber AO: Role of membrane microdomain rafts in TNFR-mediated signal transduction. *Cell Death Differ* 2003, 10:7-9.
407. Muppidi JR, Siegel RM: Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 2004, 5:182-189.
408. Van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S: Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist Updat* 2004, 7:345-358.
409. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, Michaud M, Menger L, Gdoura A, Tajeddine N, et al: Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 2011, 30:1147-1158.
410. Bognoux P, Hajjaji N, Maheo K, Couet C, Chevalier S: Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* 2010, 49:76-86.
411. Liew C, Schut HA, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH: Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 1995, 16:3037-3043.
412. Brouwer IA, Wanders AJ, Katan MB: Effect of animal and industrial trans fatty acids on HDL and LDL cholesterol levels in humans--a quantitative review. *PLoS One* 2010, 5:e9434.
413. Desroches S, Chouinard PY, Galibois I, Corneau L, Delisle J, Lamarche B, Couture P, Bergeron N: Lack of effect of dietary conjugated linoleic acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men. *Am J Clin Nutr* 2005, 82:309-319.

BIBLIOGRAPHIE

414. Tricon S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Jones EL, Grimble RF, Williams CM, Yaqoob P, Calder PC: Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2004, 80:614-620.
415. Wanders AJ, Leder L, Banga JD, Katan MB, Brouwer IA: A high intake of conjugated linoleic acid does not affect liver and kidney function tests in healthy human subjects. *Food Chem Toxicol* 2010, 48:587-590.
416. Tanaka T, Hosokawa M, Yasui Y, Ishigamori R, Miyashita K: Cancer chemopreventive ability of conjugated linolenic acids. *Int J Mol Sci* 2011, 12:7495-7509.
417. Degen C, Ecker J, Piegholdt S, Liebisch G, Schmitz G, Jahreis G: Metabolic and growth inhibitory effects of conjugated fatty acids in the cell line HT-29 with special regard to the conversion of t11,t13-CLA. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1811:1070-1080.
418. Grossmann ME, Mizuno NK, Dammen ML, Schuster T, Ray A, Cleary MP: Eleostearic Acid inhibits breast cancer proliferation by means of an oxidation-dependent mechanism. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009, 2:879-886.
419. Serini S, Piccioni E, Merendino N, Calviello G: Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. *Apoptosis* 2009, 14:135-152.
420. Shinohara N, Ito J, Tsuduki T, Honma T, Kijima R, Sugawara S, Arai T, Yamasaki M, Ikezaki A, Yokoyama M, et al: jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, reduces stearyl-CoA desaturase expression in liver of mice. *J Oleo Sci* 2012, 61:433-441.
421. Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959, 37:911-917.
422. Slover HT, Lanza EJ: Quantitative analysis of food fatty acids by capillarity gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 1979, 56:933-943.

Publications et communications

Publications en co-premier auteur :

- M Minville-Walz, AS Pierre, L Pichon, S Bellenger, C Fèvre, J Bellenger, C Tessier, M Narce and M Rialland. *Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Expression Induces CHOP-Dependent Cell Death in Human Cancer Cells*. PLoS ONE 5(12): e14363. doi:10.1371/journal.pone.0014363 (2010)
- AS Pierre, M Minville-Walz, C Fèvre, A Hichami, J Gresti, L Pichon, S Bellenger, J Bellenger, F Ghiringhelli, M Narce and M Rialland. *Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through Reactive oxygen species-mediated ER stress* Biochim Biophys Acta (Soumise le 14 Aout 2012)

Collaborations :

- C Fèvre, S Bellenger, AS Pierre, M Minville, J Bellenger, J Gresti, M Rialland, M Narce, and C Tessier. *The metabolic cascade leading to eicosanoid precursors--desaturases, elongases, and phospholipases A2--is altered in Zucker fatty rats*. Biochim Biophys Acta. 2011 Jun;1811(6):409-17. Epub 2010 Dec 21.
- Z Zou, S Bellenger, K A Massey, A Nicolaou, A Geissler, B Bonnotte, AS Pierre, M Minville-Walz, M Rialland, J Seubert, J X Kang, M Narce and J Bellenger. *Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice*. Cancer Res (Soumise le 30 Juillet 2012)

Communications affichées :

- M Minville, AS Pierre, J Gresti, C Fèvre, J Bellenger, S Bellenger, L Pichon, M Narce and M Rialland. *Conjugated linoleic acids induce cell death of colon tumor cells: possible Stearoyl-CoA desaturase and ER stress involvement*. 5° Congrès International du Pôle VITAGORA 2010 (Dijon, France)
- M Minville, AS Pierre, J Gresti, C Fèvre, J Bellenger, S Bellenger, L Pichon, M Narce and M Rialland. *Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 induces cell death and activates of AMPK pathway in cancer cells*. The 21st Meeting of the European Association for Cancer Research- 2010 (Oslo, Norvège)
- M Minville, AS Pierre, J Gresti, C Fèvre, J Bellenger, S Bellenger, L Pichon, M Narce and M Rialland. *Conjugated linoleic acids induce cell death of colon tumor cells: possible Stearoyl-CoA desaturase and ER stress implication*. Séminaire inter-cancéropôles CGE-CLARA 2010 (Dijon France)

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- AS Pierre, M Minville-Walz, A Varin, J Gresti, S Bellenger, J Bellenger, M Narce and M Rialland. *Dietary polyunsaturated fatty acids and colon cancer cell death: role of endoplasmic reticulum stress*. 6^o Congrès International du Pôle VITAGORA 2011 (Dijon, France) (2nd Prix Poster)
- AS Pierre, M Minville-Walz, L Odoul, A Varin, J Gresti, S Bellenger, J Bellenger, M Narce and M Rialland. *Dietary polyunsaturated fatty acids and colon cancer cell death: role of endoplasmic reticulum stress*. 17^o Forum des Jeunes Chercheurs 2011 (Dijon, France)
- AS Pierre, M Minville-Walz, J Gresti, S Bellenger, J Bellenger, M Narce and M Rialland. *Alteration of monounsaturated fatty acid metabolism induces cell death through ER stress in colon cancer cells*. An AACR Special Conference Metabolism and Cancer October 16-19, 2011 (Baltimore, MD)
- AS Pierre, M Minville-Walz, J Gresti, S Bellenger, J Bellenger, M Narce and M Rialland. *Alteration of monounsaturated fatty acid metabolism induces cell death through ER stress in colon cancer cells*. CGE 6^{ième} forum 13-14 Novembre 2012 (Strasbourg, France)
-

Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Expression Induces CHOP-Dependent Cell Death in Human Cancer Cells

Méline Minville-Walz¹, Anne-Sophie Pierre¹, Laurent Pichon, Sandrine Bellenger, Cécile Fèvre, Jérôme Bellenger, Christian Tessier, Michel Narce, Mickaël Rialland*

Université de Bourgogne, Centre de Recherche INSERM «Lipides, Nutrition, Cancer» UMR866, Dijon, France

Abstract

Background: Cancer cells present a sustained de novo fatty acid synthesis with an increase of saturated and monounsaturated fatty acid (MUFA) production. This change in fatty acid metabolism is associated with overexpression of stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1), which catalyses the transformation of saturated fatty acids into monounsaturated fatty acids (e.g., oleic acid). Several reports demonstrated that inhibition of Scd1 led to the blocking of proliferation and induction of apoptosis in cancer cells. Nevertheless, mechanisms of cell death activation remain to be better understood.

Principal Findings: In this study, we demonstrated that Scd1 extinction by siRNA triggered abolition of de novo MUFA synthesis in cancer and non-cancer cells. Scd1 inhibition-activated cell death was only observed in cancer cells with induction of caspase 3 activity and PARP-cleavage. Exogenous supplementation with oleic acid did not reverse the Scd1 ablation-mediated cell death. In addition, Scd1 depletion induced unfolded protein response (UPR) hallmarks such as Xbp1 mRNA splicing, phosphorylation of eIF2 α and increase of CHOP expression. However, the chaperone GRP78 expression, another UPR hallmark, was not affected by Scd1 knockdown in these cancer cells indicating a peculiar UPR activation. Finally, we showed that CHOP induction participated to cell death activation by Scd1 extinction. Indeed, overexpression of dominant negative CHOP construct and extinction of CHOP partially restored viability in Scd1-depleted cancer cells.

Conclusion: These results suggest that inhibition of de novo MUFA synthesis by Scd1 extinction could be a promising anti-cancer target by inducing cell death through UPR and CHOP activation.

Citation: Minville-Walz M, Pierre A-S, Pichon L, Bellenger S, Fèvre C, et al. (2010) Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Expression Induces CHOP-Dependent Cell Death in Human Cancer Cells. PLoS ONE 5(12): e14363. doi:10.1371/journal.pone.0014363

Editor: Michael Polymenis, Texas A&M University, United States of America

Received: July 23, 2010; **Accepted:** November 26, 2010; **Published:** December 16, 2010

Copyright: © 2010 Minville-Walz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from INSERM, Region Bourgogne and the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mickael.rialand@u-bourgogne.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Cancer cells exhibit metabolism alterations characterised by increased glycolysis and lipogenesis [1,2]. Active proliferating cancer cells present not only quantitative changes in *de novo* lipid biosynthesis but also modifications of lipid membrane composition affecting membrane fluidity, signal transduction and gene expression [3,4]. Changes in lipid membrane composition are observed in a wide variety of cancers, mainly characterised by saturated (SFA) and monounsaturated fatty acid (MUFA) accumulation which appears less due to increased uptake of SFA and MUFA than to exacerbated endogenous fatty acids synthesis, irrespective of adequate lipid nutritional supply [5,6,7,8,9,10,11]. These modifications of SFA and MUFA content are associated with the modulation of the expression and activity of lipogenic enzymes. Thus, overexpression of acetyl Co-A carboxylase α and fatty acid synthase, involved in the first steps of fatty acid biosynthesis, were described in various cancers [12,13,14,15,16,17].

Increased MUFA content could be also due to an up-regulation of stearoyl Co-A desaturase (Scd, delta-9 desaturase) expression, the rate-limiting enzyme of MUFA synthesis. Indeed, Scd catalyzes the introduction of a double bond between carbons 9 and 10 of several saturated fatty acids such as palmitic (16:0) and stearic (18:0) acids to yield palmitoleic (16:1) and oleic (18:1) acids, respectively. This endoplasmic reticulum resident enzyme exists under two isoforms in humans, Scd1 and Scd5 [18]. Scd1 is found in almost all tissues with a major expression in liver while Scd5 expression is restricted to pancreas and brain. Scd1 expression, correlated with MUFA content, is increased in hepatocellular adenoma, colonic and oesophageal carcinoma, as well as in genetically- and chemically-induced tumors [19,20,21]. For prostate cancer, two studies present contradictory results on Scd1 expression level [22,23]. Thus, Scd1 expression can be related to carcinogenesis processes involving alteration of proliferation/apoptosis balance. Indeed, Scd1 over-expressing cells present a growth advantage while scd1 knock-down leads to slower rates of cell proliferation and cell death *in vivo* and *in vitro* [24,25,26,27]. The mechanism of cell death observed in Scd1-deficient lung cancer cells

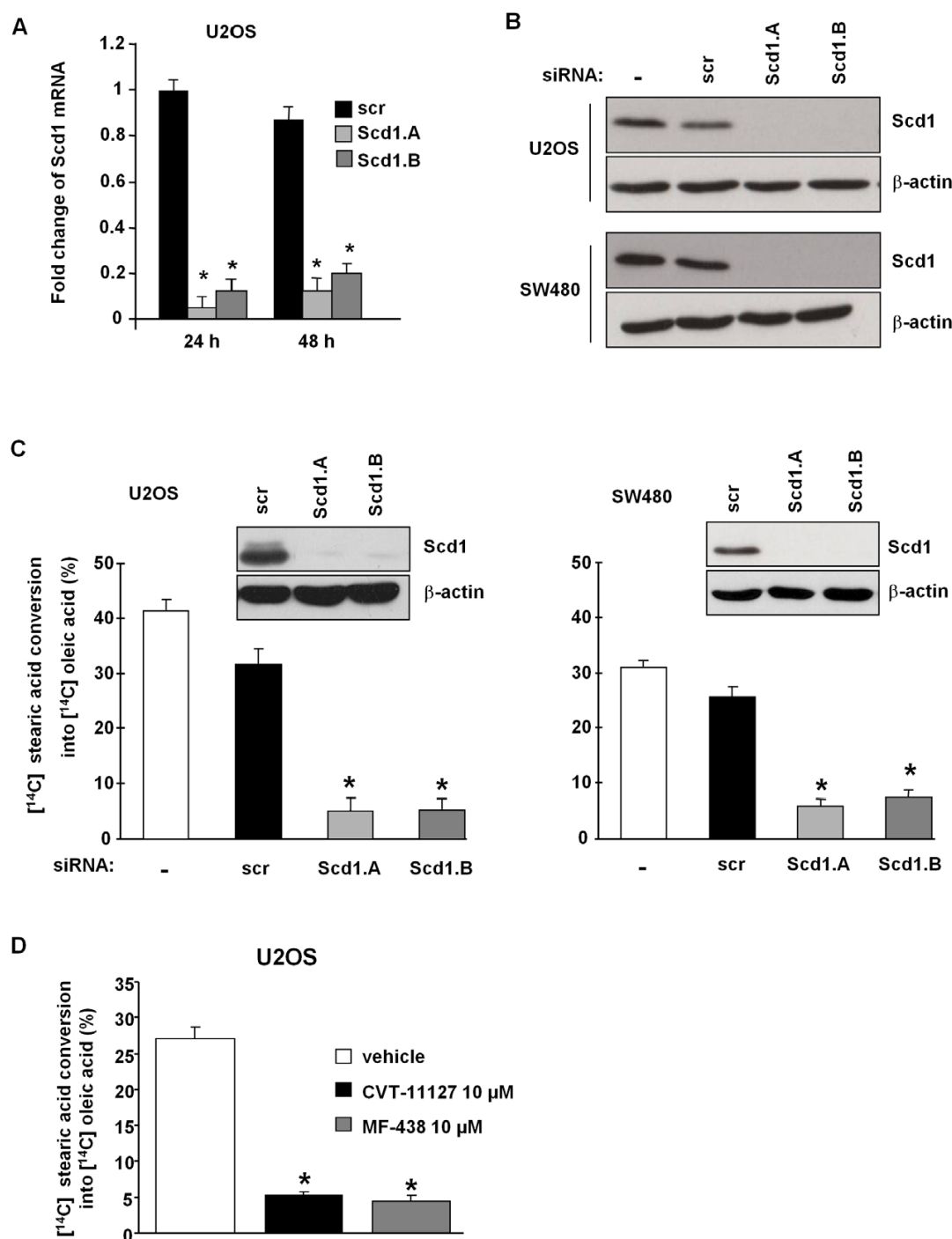


Figure 1. Efficient suppression of Scd1 expression and activity by siRNA targeting Scd1. **A)** U2OS cells were transfected with siRNA control (scr) or with siRNA against Scd1 (Scd1.A and Scd1.B) and collected 24 and 48 h post-transfection for Scd1 mRNA expression by real time RT-PCR. Scd1 mRNA expression was normalized to β -actin expression. Values represent the mean $\pm$ SEM relative to Scd1 mRNA expression in scr-treated U2OS cells at 24 h. *, $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated cells by Anova analysis followed by Tuckey test. **B)** U2OS and SW480 cells were treated with oligofectamine (-), siRNA control (scr) or with siRNA against Scd1 (Scd1.A and Scd1.B). Cells were collected 24 h after transfection for Scd1 expression analysis by Western-Blotting. **C)** U2OS and SW480 cells treated 72 h with siRNA were incubated for further 6 h with [14 C] stearic acid and total lipid

extraction was performed. Scd activity was evaluated by HPLC as the rate of [14 C] stearic acid conversion into [14 C] oleic acid in cells treated with siRNA for 72 h. Scd activity was expressed as the % ratio of [14 C] oleic acid to [14 C] oleic and stearic acids. Values represent the mean $\pm$ SEM from at least two separate experiments. *, $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated cells by Anova analysis followed by Tuckey test. A representative expression of Scd1 protein was shown for 72 h of siRNA treatment. D) U2OS cells were exposed to DMSO as vehicle, Scd1 inhibitors (CVT-11127 or MF-438) at 10 μ M for 24 h and prepared as above C) for measuring Scd activity. Values represent the mean $\pm$ SEM from three experiments. *, $p < 0.05$ vs. vehicle-treated cells by Anova analysis followed by Tuckey test. doi:10.1371/journal.pone.0014363.g001

seems to involve the modification of a SFA/MUFA ratio that triggers inhibition of the Akt pathway and activation of the AMPK pathway [24,28]. Indeed, in absence of Scd1, the SFA content increases which alleviates Akt activation normally obtained by MUFA (e.g. oleic acid) for sustaining cell proliferation and survival [29]. Furthermore, different cancer cells lacking Scd1 activity reduce *de novo* lipogenesis through activation of the AMPK pathway [22,24]. The alteration of lipid production in Scd1-deficient cells mainly concerns a reduction of phospholipid biosynthesis, which triggers cellular stress and expression of the apoptosis-related protein C/EBP homologous protein (CHOP/GADD153) [26,27,30,31]. CHOP belongs to a peculiar stress pathway named endoplasmic reticulum (ER) stress that may induce apoptosis.

ER stress is triggered by different stress conditions such as alterations in post-translational protein status and lipid synthesis, hypoxia, disruption of calcium homeostasis and nutrient deprivation, and leads to the activation of an adaptive program, known as the Unfolded Protein Response (UPR), to re-establish equilibrium [32]. Activation of the canonical UPR engages three distinct concerted signalling branches mediated by ER membrane anchored sensors: RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α) [33]. In stressed cells, the chaperone protein GRP78 dissociates from UPR sensors PERK, ATF6 and IRE1 α leading to their activation to first alleviate ER stress. PERK phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor (eIF)2 α , thereby inhibiting global protein synthesis. Active ATF6 translocates to the Golgi and is cleaved from the membrane by site-1 and -2 proteases. Then cleaved ATF6 localises to the nucleus and induces transcription of Xbp1 and ER chaperones such as GRP78. IRE1 α disposes of an endoribonuclease activity that alternatively splices the Xbp1 mRNA (sXbp1), which is translated into an active transcription factor. However, in a severe or prolonged stress, the UPR can trigger pro-apoptotic signals through activation of the transcription factor CHOP, which acts to repress the bcl-2 gene expression, thus down-regulating anti-apoptotic Bcl-2 protein and rendering cells sensitive to the pro-apoptotic effects of BH3-only proteins [34,35,36].

While these data clearly support the involvement of Scd1 as a central regulator of lipogenesis in cancer cells, the link between Scd1 and the induction of ER stress and cell death in cancer cells remains to be better understood. In this study, we were consequently interested in seeking for UPR induction in cancer cells lacking Scd1 expression and in investigating the role of this stress pathway on the cancer cell viability during Scd1 extinction. We demonstrated that Scd1 depletion in cancer cells activated UPR markers and induced cancer cell death with no effect on non cancer cell viability. Moreover, we evidenced that CHOP participated to Scd1-mediated cell death.

Results

Efficient inhibition of Scd1 expression and suppression of *de novo* MUFA synthesis

In this study we investigated the effect of Scd1 silencing using siRNA in different human cancer cell lines (U2OS, SW480 and HCT116). Cancer cells were transfected with 75 nM siRNA

targeting unrelated human mRNA (siRNA scr) and Scd1 mRNA (siRNA Scd1.A and Scd1.B). Both siRNA directed against Scd1 compared to control siRNA (scr) drastically suppressed expression of Scd1 mRNA and protein as soon as 24 h after transfection (Figures 1A and 1B).

As Scd1 catalyzes the conversion of stearic acid into oleic acid, a decrease in oleic acid production would evidence the abolition of Scd1 activity by siRNA targeting this enzyme. In order to address Scd activity after 72 h of Scd1 silencing, we further treated U2OS and SW480 cells for 6 h with radiolabelled [14 C] stearic acid leading to measure the production of [14 C] oleic acid in Scd1-deficient cells compared to control scr-treated cells. The incorporation of [14 C] stearic acid was similar in siRNA scr and Scd1-treated cells (data not shown). Cancer cells transfected by the non-targeting human mRNA siRNA (scr) presented a desaturation rate of 31.49% for U2OS and 25.66% for SW480. In the two cell lines, Scd1 extinction led to a drop-off in oleic acid biosynthesis with a remaining desaturation rate of 5.135% and 5.28% in U2OS treated by siRNA Scd1.A and Scd1.B, respectively, and 5.89% and 7.55%, respectively, in SW480 (Figure 1C). Furthermore, we exposed U2OS cells for 24 h to the Scd1 inhibitors CVT-11127 and MF-438 (10 μ M). We obtained similar capability with Scd1 inhibitors than siRNA directed against Scd1 to inhibit the production of oleic acid from stearic acid in U2OS cells (Figure 1D).

Altogether, these results demonstrated a drastic inhibition of Scd activity in siRNA Scd1-treated cells. Moreover, in these cancer cell lines, Scd1 appears as the main enzyme involved in the endogenous production of oleic acid.

Scd1 extinction promotes apoptosis-cell death

In order to assess effect of Scd1 knockdown on cell viability, we first determined cell number at 24 h, 48 h and 72 h post-transfection using CyQuant[®] reagent which quantifies the amount of nucleic acids. As soon as 48 h post-transfection, cell number was significantly less in Scd1-depleted U2OS cells compared to control cells. While relative fluorescence (RF) increased for siRNA scr-treated cells all along the 72 h post-transfection, RF did not significantly change for siRNA Scd1-silenced cells during the time course. We observed that RF was twice fold higher in siRNA scr cells compared to siRNA Scd1-depleted U2OS 72 h post-transfection indicating proliferation inhibition or cell death induction in Scd1-ablated cells (Figure 2A). Then, we demonstrated by trypan blue exclusion cell count 72 h after transfection of siRNA that Scd1 knockdown led to a diminution of cell viability both in U2OS and SW480 cells but much more drastically in U2OS cells (Figure 2B). More than 30% of Scd1 siRNA-treated U2OS and approximately 20% of Scd1 siRNA-treated SW480 were positive for PI representing an increase of three and two folds compared to siRNA scr-treated U2OS and SW480 cells, respectively (Figure 2C). Inhibition of Scd1 activity by both compounds (CVT-11127 and MF-438) also led to increase cell death at 48 h in a dose-response manner (Figure 2D). However, we found that these compounds differently affected cell viability with CVT 11127 more potent for cell death induction than MF-438 in U2OS. Moreover, we showed that Scd1 depletion induced

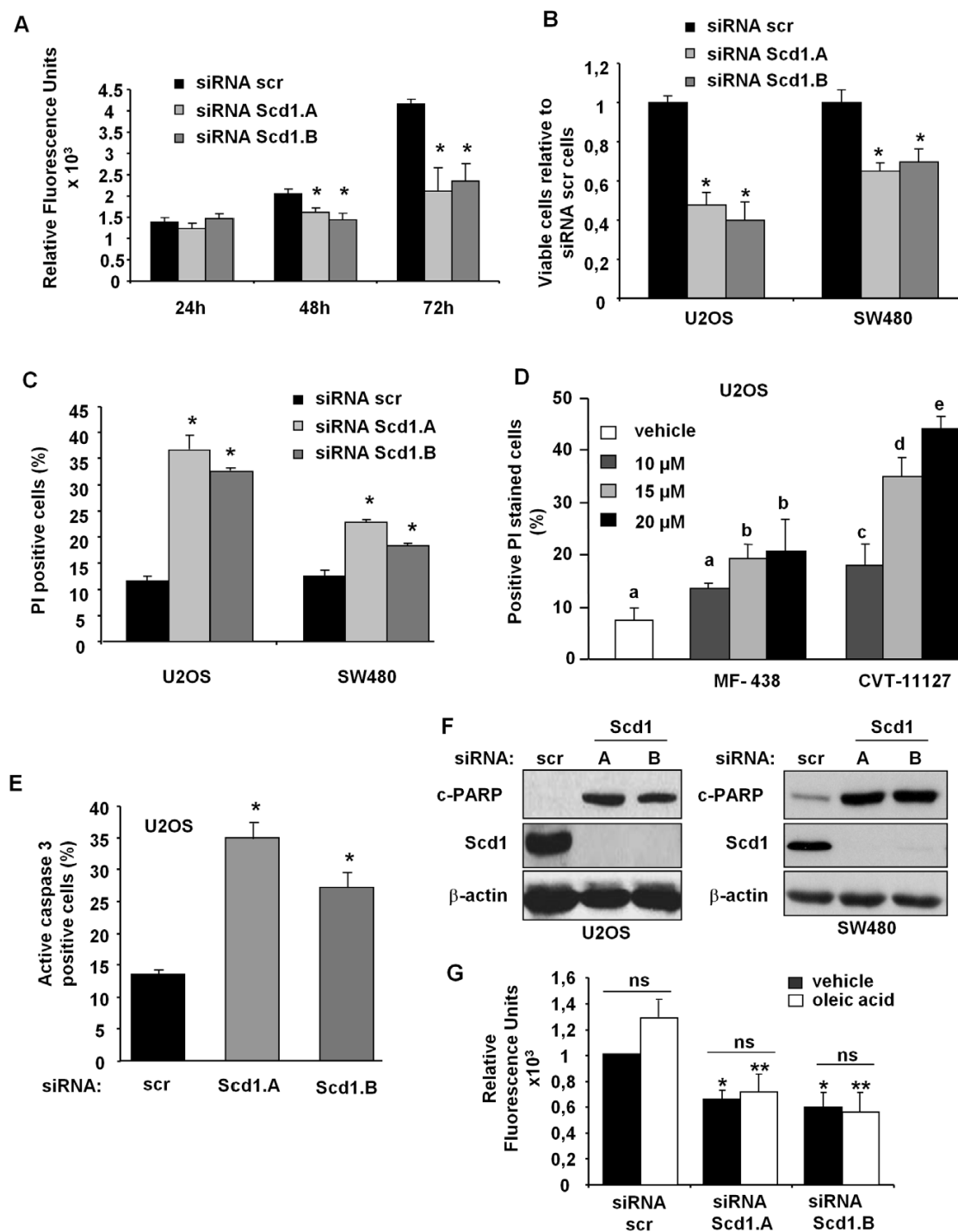


Figure 2. Scd1 knockdown promoted apoptosis-cell death. **A**) U2OS cells were treated with siRNA scr (control) and targeting Scd1 (Scd1.A and Scd1.B), and collected 24 h, 48 h or 72 h post-transfection. Proliferation status was determined by the CyQuant® proliferation assay. Each value is the mean of relative fluorescence units $\pm$ SEM of triplicate and representative of three independent experiments. **B**) U2OS and SW480 cells were cultured for 72 h post-siRNA transfection and harvested for trypan blue dye exclusion assay. Values are the mean $\pm$ SEM of triplicate and representative of two others independent experiments. **C**) U2OS and SW480 cells treated 72 h with siRNA were collected and total cell death was

analysed by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI). Data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **D)** U2OS cells were treated for 48 h with Scd1 inhibitors at indicated concentrations and were harvested for propidium iodide staining. Data represent the mean $\pm$ SEM from three experiments. **E)** U2OS cells were collected 72 h post-transfection and prepared for caspase 3 activity measurement by flow cytometry as detailed in the materials and methods. Data are shown as fold increase over the control (siRNA scr) and represent the mean $\pm$ SEM of two independent experiments. **F)** Whole-cell lysates were prepared 72 h post-transfection with siRNA and PARP cleavage (c-PARP) level was determined by Western-blot. **G)** U2OS cells were treated for 72 h with siRNA control (scr) and targeting Scd1 in absence (vehicle) or presence of 100 μ M oleic acid bound to BSA. Cell number was quantified by CyQuant[®] proliferation assay as previously described. Data are shown as fold change over the vehicle siRNA scr-treated cells and represent the mean of relative fluorescence units $\pm$ SEM of triplicate. *, ** $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated vehicle and oleic acid cells, respectively, by Anova analysis followed by Tuckey test. doi:10.1371/journal.pone.0014363.g002

activation of apoptosis as shown by high-level induction of caspase 3 activity and PARP cleavage (Figures 2E and 2F).

We then postulated that cell death was triggered by reduction of oleic acid cell content. Thus, we undertook to supplement siRNA Scd1-depleted cells with 100 μ M oleic acid in order to evaluate the capability of exogenous supplementation to reverse cell death. Figure 2G evidenced that exposure of Scd1-deficient U2OS cells to exogenous oleic acid did not change the rate of cytotoxicity.

Inhibition of Scd1 expression activates partially unfolded protein response

Perturbations of ER homeostasis lead to ER stress by UPR activation that could trigger cell death. In order to monitor activation of the UPR pathway, we investigated the expression level of GRP78, phospho-eIF2 α and unconventional splicing of Xbp1 mRNA. U2OS and SW480 cells have the functional machinery to respond to thapsigargin-induced ER stress, as we observed splicing of Xbp1, up-regulation of GRP78 and phospho-eIF2 α expression (Figures 3A and B). Then, we analyzed these ER stress markers in Scd1-deficient cells. Abolition of Scd1 in U2OS and SW480 cells led to a partial processing of Xbp1 mRNA: spliced- and hybrid-Xbp1 (s- and h-Xbp1) mRNA species were increased in Scd1-deficient cells indicating activation of IRE1 α arm in both cell lines, in a more pronounced manner in SW480 cells (Figure 3A). Translation of s-Xbp1 produces the functional Xbp1 transcription factor, which participates to a transcription program in order to first re-establish ER function and cell survival. The chaperone GRP78 also regulates the pro-survival pathway during ER stress through its up-regulation. However, we were not able to observe such regulation in U2OS and SW480 cells silenced for Scd1 48 h post-transfection (Figure 3C). We did not observe any change in mRNA and protein level for GRP78 expression at different post-transfection time (24, 48 and 72 h, data not shown). PERK also belongs to UPR and its activation induces phosphorylation of eIF2 α triggering repression of general translation. We observed at 48 h post-transfection that cells depleted in Scd1 expressed higher amount of phospho-eIF2 α compared to control cells suggesting activation of the PERK arm (Figure 3D). In order to assign phosphorylation of eIF2 α to Scd1 extinction and not to an artefact due to PKR activation by siRNA transfection, we analysed phospho-eIF2 α level in U2OS treated with 5 and 10 μ M of Scd1 inhibitor (CVT-11127 and MF-438) for 10 and 24 h. We observed increase of p-eIF2 α expression as soon as 10 h for both inhibitors demonstrating that phosphorylation of eIF2 α was induced by extinction of Scd1 activity (Figure 3E).

CHOP participates to Scd1 depletion-induced cell death

In ER stress-mediated apoptosis, CHOP expression increases and appears as an essential effector of this cell death program. We first addressed evaluation of CHOP expression in cancer cells treated with siRNA scr or against Scd1. We observed an increase of CHOP mRNA and protein expression in cells that lost Scd1 expression compared to control cells (Figures 4A and

4B). To ascertain the role of CHOP in cell death induction, we transiently transfected empty vector (ctr) or dominant-negative form of CHOP (DN-CHOP) in U2OS cells. DN-CHOP construct harbours mutations in the leucine zipper domain (L134A/L141A) that prevents its transcriptional activity [37]. We showed by PI staining that DN-CHOP overexpression reduced cytotoxicity induced by Scd1 inhibition compared to the control-transfected cells (ctr) (Figure 4C). Moreover, we estimated the effect of enforced expression of DN-CHOP on active caspase 3 induction in Scd1-silenced U2OS. We showed a decrease of caspase 3 activation in Scd1 knockdown-U2OS cells expressing DN-CHOP and evidenced a protective effect of DN-CHOP against apoptosis induced by Scd1 depletion (Figure 4D).

CHOP extinction partially alleviates Scd1 depletion-induced apoptosis

The protection observed by CHOP inhibition against Scd1 depletion-mediated U2OS cell death has also been evaluated in HCT116 colon tumor cell line. In this aim, we used transitory CHOP knockdown-HCT116 and BA1 cells that are HCT116 cells stably transfected with antisense human CHOP cDNA construct [38]. Depletion of Scd1 with siRNA in HCT116 induced more than 30% of cell death as attested by PI staining (Figure 5A). We also showed at 72 h that extinction of Scd1 activity by siRNA and inhibitors (data not shown) induced apoptosis in HCT116 evidenced by active caspase 3 or PARP-cleavage detection (Figures 5B and 5C). In those cells, we also found that abolition of Scd1 expression led to up-regulation of CHOP mRNA expression as already observed for U2OS and SW480 cells (Figure 5D). Furthermore, we confirmed as in U2OS that reduction of CHOP expression partially alleviated cytotoxicity induced by Scd1 silencing. Indeed, we observed a diminution of PI staining in BA1 cells compared to their parental HCT116 (p-HCT116) counterparts when Scd1 expression was abolished (Figure 5E). Moreover, the protection against Scd1 silencing-mediated cell death induced by CHOP extinction seemed to be specific and not a protection against all pro-apoptotic factors. Indeed, extinction of CHOP did not modify apoptosis induction by etoposide in DN-CHOP U2OS or BA1 compared to their respective control cells (data not shown). We have also undertaken to evaluate effect of CHOP extinction by siRNA treatment on apoptosis induced by Scd1 abolition. For this purpose, we performed co-treatment of HCT116 cells with siRNA control (scr) or directed against Scd1 (Scd1.A and Scd1.B), and with siRNA CHOP or control (-). We validated CHOP siRNA in HCT116 cells and showed that CHOP siRNA did not modify Scd1 mRNA extinction level induced by Scd1 siRNAs (data not shown). In order to estimate CHOP function in Scd1-induced apoptosis, we then performed siRNA co-transfection. We observed 72 h after transfection that CHOP silencing protected HCT116 against apoptosis-cell death induced by Scd1 extinction (Figures 5F and 5G).

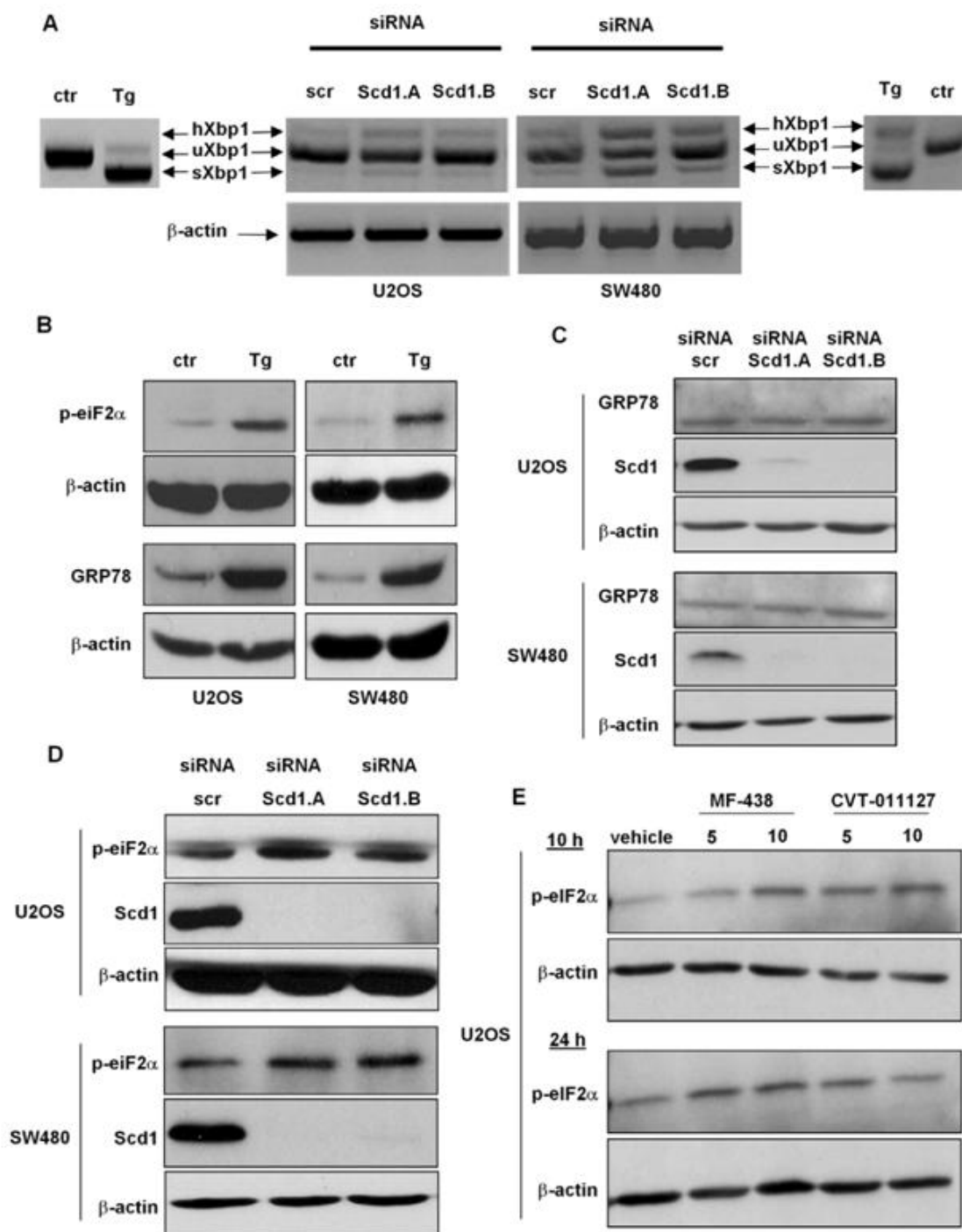


Figure 3. Inhibition of Scd1 partially induced UPR markers. U2OS and SW480 cells were treated with siRNA control (scr) and siRNA against Scd1 for 72h. **A**) Samples were prepared for mRNA analyses of Xbp1 processing by semi-quantitative RT-PCR. The PCR products were run on a 3% agarose gel and the spliced Xbp1 (sXbp1), unspliced Xbp1 (uXbp1) and hybrid Xbp1 (hXbp1) mRNA species were observed in siRNA-treated cells (ctr) and thapsigargin-treated cells (Tg) as positive control of UPR activation. **B**) Total protein lysates were prepared from untreated and thapsigargin-treated cells (Tg, 0.2 μ M, 16 h) and analysed for eIF2 α phosphorylation and GRP78 up-regulation by western-blotting. **C and D**) Scd1-depleted U2OS and SW480 cells were prepared as in 3B) and analysed by western-blotting for Scd1, GRP78 and phospho-eIF2 α expression. **E**) U2OS cells were treated with 5 and 10 μ M of Scd1 inhibitors (MF-438 and CVT-11127) and were collected after 10 h and 24 h of treatment for phospho-eIF2 α expression analysis by western-blotting. Blots are representative of at least two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0014363.g003

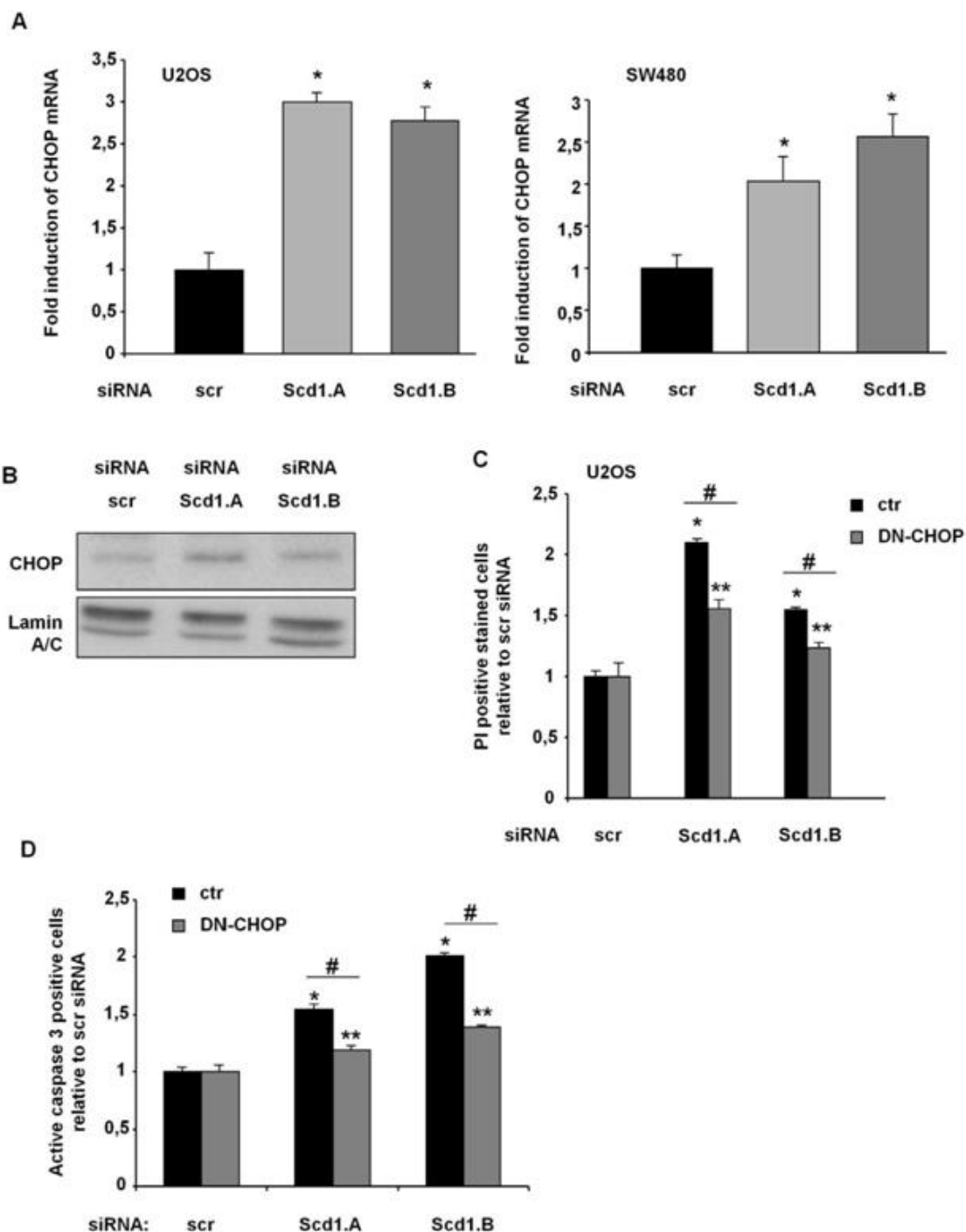


Figure 4. Inhibition of CHOP activity reduced siRNA Scd1-mediated U2OS cell death. **A)** U2OS and SW480 cells were treated with siRNA control (scr) and siRNA against Scd1 for 72h. Total RNA was isolated and CHOP mRNA expression normalized to β -actin mRNA expression was quantified by real time RT-PCR. Results were represented as mean fold induction $\pm$ SEM relative to siRNA scr-treated cells from at least three independent experiments. *, $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated cells by Anova analysis followed by Tuckey test. **B)** Nuclear extracts from U2OS were prepared 72 h after siRNA addition. CHOP expression was analysed by western-blotting and lamin A/C was loading control of nuclear extract samples. **C)** U2OS cells were transiently transfected with empty (ctr) or dominant-negative CHOP (DN-CHOP) expression vector and selected for three days in G418. Resistant cells transfected by ctr or DN-CHOP construct were treated by siRNA control scr or against Scd1 (Scd1.A and Scd1.B) for 72 h and

harvested for propidium iodide staining analysis by flow cytometry. Values were shown as fold increase over the controls (siRNA scr) and represent the mean $\pm$ SEM of two independent experiments. *, **, $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated ctr and DN-CHOP cells, respectively, by Anova analysis followed by Tuckey test. #, $p < 0.05$ by Anova analysis followed by Tuckey test. **D**) U2OS cells were prepared as C) and harvested for active caspase 3 analysis by flow cytometry. Values were shown as fold increase over the controls (siRNA scr) and represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. *, **, $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated ctr and DN-CHOP cells, respectively, by Anova analysis followed by Tuckey test. #, $p < 0.05$ by Anova analysis followed by Tuckey test.
doi:10.1371/journal.pone.0014363.g004

Scd1 depletion did not affect the viability of non cancer cells

Cancer cells were sensitive to Scd1 depletion-mediated cell death. We were then interested in analysing the potential effect of an absence of *de novo* MUFA synthesis in non cancer cells. In this aim, we evaluated impact of Scd1 inhibition using siRNA on normal human dermal fibroblasts (NHDF). These cells have a basal desaturation rate about 15% lower than U2OS and SW480 cells as shown previously in Figure 1C. Their treatment with siRNA Scd1.A or Scd1.B led to a reduction of Scd activity to reach a remaining activity of 8.3% and 6.3%, respectively (Figure 6B). The residual Scd activity was similar to the one obtained for cancer cells treated with the siRNA Scd1. As shown above, ablation of Scd activity in cancer cells led to cytotoxicity whereas depletion of Scd1 expression did not induce cell death in NHDF but reduced very slightly their cell number (Figures 6C and 6D). Then, in non cancer cells, Scd1 abrogation might block proliferation without affecting cell viability.

Discussion

In the present study, we demonstrated that Scd1 expression silencing led to induction of UPR markers (Xbp1 splicing, p-eIF2 α and CHOP) and CHOP-dependent cell death in cancer cells. We also showed that abrogation of *de novo* MUFA synthesis pathway by extinction of its rate-limiting enzyme Scd1 altered viability of cancer cells without changing the survival of non cancer cells. This data suggests different needs in *de novo* MUFA synthesis for normal and tumoral cells. Nevertheless, exogenous addition of oleic acid, the major MUFA product of Scd1 activity, did not prevent cell death of cancer cells in which endogenous MUFA biosynthesis was suppressed.

In this report, we agree with previous reports describing that Scd1 extinction led to cell death by apoptosis in different types of cancer cells [22,25,27,39]. Indeed, we observed induction of caspase 3 activity and PARP-cleavage (Figures 2D et 2E) in Scd1-depleted cells.

We also evidenced in this work that normal and cancer cells did not respond in the same manner to the prevention of MUFA synthesis by Scd1 extinction. Indeed, while cancer cells were killed by Scd1 depletion, non cancer cells were still alive. However, we observed a slight decrease in cell number in Scd1-treated NHDF that a block or a slower rate of proliferation could explain. We can then hypothesise that viability of non cancer cells remained unaffected due to the fact that they do not require such a rapid and high MUFA synthesis. Indeed, they proliferate at lower rate (Figure 6C) and preferentially sustained new membrane synthesis from exogenous fatty acids up-take whereas cancer cells proliferate at higher rate and need *de novo* fatty acid synthesis [10].

We and others showed that abolition of Scd1 activity decreased *de novo* MUFA production (Figure 1C) and in consequence increased SFA content (e.g. palmitic and stearic acids) [22,26,27,40]. Induction of lipotoxicity by SFA in cancer and non cancer cells has been previously described, and that the level of Scd1 expression controlled SFA effect since overexpression of Scd1 reduced SFA-mediated cell death when a down-regulation

increased it [27,29,39,41,42,43]. Among MUFA, oleic acid is the most represented and has been characterised by cytoprotective and proliferative actions. Its addition promotes tumoral cell proliferation that could be obtained through down-regulation of the tumor suppressor Pten as described for hepatocarcinoma cells but also prevents palmitate-stimulated apoptosis [29,41,44]. As already reported for SV40-transformed lung fibroblasts lacking Scd1 expression, we were not able to observe any rescue of siRNA Scd1-induced U2OS cell death (Figure 2F) [39]. This observation is in discrepancy with recent results indicating that oleic acid could reverse the impairing effects of Scd1 depletion on proliferation and survival in Hela and H460 tumor cells [27,45]. A possible mechanism of oleic acid protection is the increase of triglyceride production that could incorporate SFA excess into triglycerides and protects cells from apoptosis [45,46]. The observed discrepancy could be due to a different ability of Scd1-depleted U2OS cells placed under oleic acid supplementation to channel SFA into triglyceride pool.

Scd1 controls the *de novo* synthesis of MUFA, and, more globally appears as a key regulator of lipid metabolism. In order to maintain their high proliferating rate, cancer cells require an elevated production of cellular membrane components membrane such as cholesterol and phospholipids [47,48]. Interfering with the phospholipid Kennedy's pathway is described to block phospholipid synthesis and to induce apoptosis [30,49,50]. Thus, extinction of Scd1 activity decreases *de novo* phospholipid and neutral lipid synthesis, and cell death obtained by Scd1 depletion in different cancer cells could be related to this change [39].

On the other hand, the phospholipid remodelling which represented the decrease of unsaturated fatty acid incorporation consecutive to Scd1 depletion played a predominant role in cell survival by triggering cell death [27].

Thus, both phospholipid synthesis and remodelling pathways seemed to be involved in Scd1 inhibition-mediated cell death. Additionally, changes in phospholipid metabolism can induce ER stress response that could explain its activation in Scd1-depleted cells [30].

Indeed, we clearly showed, in the present study, a peculiar ER stress activation since GRP78 expression was not modified. GRP78, a stress-inducible chaperone localized in the ER, is a key component of the UPR required to alleviate ER stress, maintain ER function and protect cells against apoptosis [51]. Lack of anti-apoptotic GRP78 induction could contribute to cell death in maintaining the three transducers of ER stress (PERK, IRE1 α and ATF6) under an activated status and down-regulation of GRP78 is known to sensitize tumor cells to apoptosis induced by current anti-cancer therapies [52,53,54]. The observation concerning GRP78 expression in Scd1-depleted cells was not related to the inability of U2OS and SW480 cells to increase GRP78 expression in ER stress response since thapsigargin-treated cells overexpressed GRP78 protein. Few reports already mentioned such a lack of GRP78 induction during ER stress. Among them, inhibition of phosphatidylcholine synthesis, treatment with palmitic acid or trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid triggered ER stress and cell death without affecting GRP78 content [30,55,56].

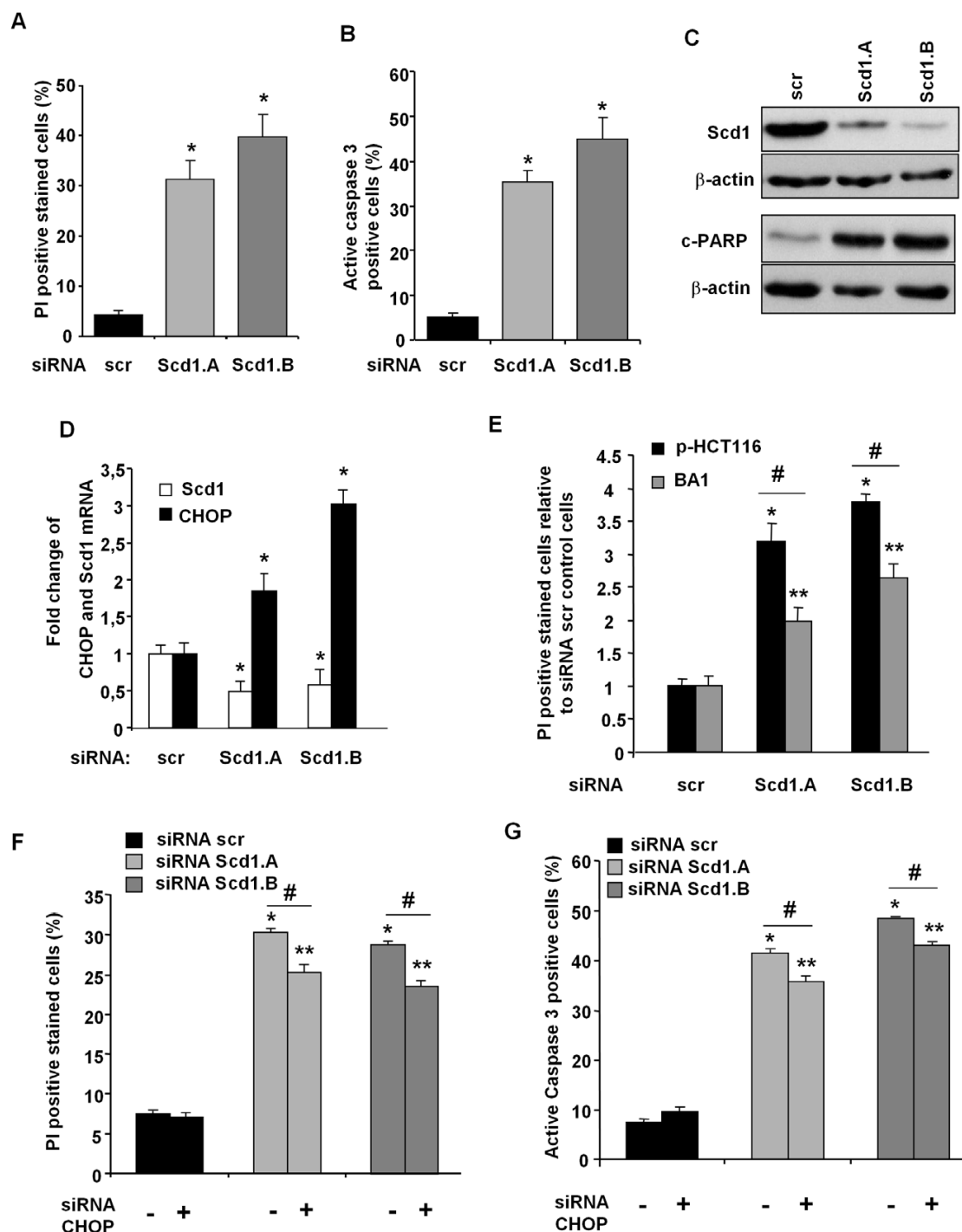


Figure 5. Extinction of CHOP expression reduced Scd1 knockdown-mediated HCT116 apoptosis. **A)** HCT116 cells treated 72 h with siRNA control (scr) or targeting Scd1 (Scd1.A and Scd1.B) were collected and total cell death was analysed by flow cytometry after staining with propidium iodide. Results were the mean $\pm$ SEM of three experiments performed in triplicate. **B)** HCT116 cells treated by siRNA were collected 72 h post-transfection and prepared for caspase 3 activity measurement by flow cytometry as detailed in the materials and methods. Data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **C)** HCT116 were treated as in A) and harvested for analysis of Scd1 and PARP-cleavage expression by Western-blotting. **D)** HCT116 were treated as in A) and harvested for total RNA purification. CHOP and Scd1 mRNA expression was analyzed by real

time RT-PCR after normalization to β -actin. All experiments represent at least two repetitions in triplicate. **E)** HCT116 cells were stably transfected with antisense human CHOP cDNA construct and its empty control vector. BA1 and p-HCT116 are HCT116 clones with antisense CHOP construct and control vector, respectively. Cells were silenced by siRNA Scd1.A and Scd1.B for 72 h, and harvested for total cell death analysis by flow cytometry after staining with propidium iodide. Results were the mean of fold change for PI positive cells relative to the corresponding siRNA scr HCT116 cells $\pm$ SEM of one representative experiment from three experiments performed in triplicate. *, **, $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated p-HCT116 and BA1 cells, respectively, by Anova analysis followed by Tuckey test. #, $p < 0.05$ by Anova analysis followed by Tuckey test. **F)** and **G)** HCT116 cells were transfected with siRNA scr, Scd1.A or Scd1.B at 75 nM, and either with 25 nM siRNA scr (-) or siRNA CHOP. Cells were collected at 72 h post-transfection for PI staining and active caspase 3 analyses by flow cytometry. Results were the mean $\pm$ SEM of one representative experiment from two independent experiments performed in triplicate. *, **, $p < 0.05$ vs. corresponding siRNA scr-treated HCT116 cells by Anova analysis followed by Tuckey test. #, $p < 0.05$ by Anova analysis followed by Tuckey test. doi:10.1371/journal.pone.0014363.g005

We pointed out in the present study that the extinction of de novo MUFA synthesis via Scd1 knockdown led to the most characteristic UPR induction with activation of PERK and IRE1 α arms. Indeed, Scd1 depletion-induced ER stress triggered Xbp1 mRNA splicing (Figure 3A) demonstrating activation of IRE1 α arm as previously described [57]. Xbp1 processing, even partial, highlighted IRE1 α activation through dissociation from GRP78 in response to Scd1 inhibition. This data was confirmed by the increased amount of phospho-eIF2 α that we observed in Scd1-depleted cells indicating activation of PERK via its dissociation from GRP78 (Figure 3D). Phosphorylation of eIF2 α leads to inhibition of global translation, concomitant with selective translation of a subset of transcripts including the ATF4 transcription factor, to first cope with ER stress and restore ER function [33].

However, activation of PERK arm was also described as part of a pathway involved in cell death [58]. Thus, Ariyama et al. showed that Scd1 extinction triggered PERK activation and confirmed that PERK arm could be a pro-apoptotic signal in preventing Scd1 extinction-mediated cell death by down-regulating PERK expression [27]. Our observation on phosphorylation of eIF2 α highlighted data about PERK activation in Scd1-ablated cells but others stress-inducible eIF2 α kinases (e.g. GCN2, PKR) could also induce this post-translational modification and the associated cell death [59].

The phosphorylation of eIF2 α triggers ATF4 mRNA translation, which is known to up-regulate the expression of the pro-apoptotic transcription factor CHOP in cellular stress context [33]. CHOP could trigger apoptosis at least through transcription induction of pro-apoptotic genes (e.g. BIM) and transcription repression of anti-apoptotic ones (e.g. Bcl-2) [34,60]. Here, we confirmed that Scd1 knockdown enhanced CHOP expression and activated apoptosis evidenced by PARP-cleavage and active caspase 3 production. Although CHOP inactivation led to a decrease of apoptosis induction in Scd1-depleted cells, we were not able to fully restore the viability suggesting that other pathways are probably involved in cell death induced by Scd1 inactivation. During severe ER stress, apoptosis at least appears through CHOP induction. However, caspase 12 (in rodents) and JNK pathway are also involved in ER stress-mediated apoptosis and might participate to Scd1 extinction-induced apoptosis [61].

In conclusion, our results provided evidences that Scd1 extinction induced UPR and cell death in cancer cells through CHOP activation. Thus, this study highlights that components of de novo MUFA synthesis and UPR pathway represent promising targets for cancer therapy.

Materials and Methods

Materials

U2OS human osteosarcoma cancer cells, SW480 human colorectal adenocarcinoma cancer cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). BA1 cells

stably expressing human CHOP antisense cDNA construct and their parental HCT116 cells counterparts were graciously given by Dr. Jesse Martinez. Normal human dermal fibroblasts (NHDF) were obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Cell culture supplies were from Dutscher (France). Anti-Scd1, anti-CHOP/GADD153, anti-GRP78 were purchased from Santa-Cruz biotechnologies, anti-peIF2 α , anti-cleaved PARP, anti-lamin A/C from Cell Signaling Technology and anti- β -actin from Sigma. Oleic acid was obtained from NuCheck Prep (Elysian, MN) and [14 C] stearic acid from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). Scd1 inhibitors CVT-11127 and MF-438 were generous gift from Gilead Sciences, Inc. and Merck Frosst, respectively [62,63].

Cell culture and transfections

U2OS, SW480, HCT116 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), L-glutamine (2 mM). NHDF were cultivated in MEM106 (Invitrogen) supplemented with LSGS (Invitrogen), 10% heat inactivated FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), L-glutamine (2 mM). For experiments of fatty acid supplementation, oleic acid bound to BSA (ratio 4:1) was used at 100 μ M.

Small interfering RNAs (siRNA) were synthesized by Dharmacon Research Inc. (Lafayette, CO) and were transfected into cells with Oligofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Transfected cells were collected at indicated post-transfection time. siRNA control (scr) targets unrelated human mRNA CUUACGCUGAGUACUUCG; siRNAs against Scd1 target GAUAUGCUGUGGUGCUUAA (Scd1A) and GAGAUAGUUGGAGACGAU (Scd1B); siRNA CHOP targets CAAUUGUUC AUGCUUGGUG sequence [25].

Scd1 inhibitors CVT-11127 (Gilead Sciences, Inc.) and MF-438 (Merck Frosst) were dissolved in DMSO and used at indicated concentrations [62,63].

U2OS were transiently transfected with empty or dominant-negative CHOP (DN-CHOP) expression vector with lipofectamine 2000 (Invitrogen) and selected next day in G418 (400 μ g/ml) for three days. Then, cells were trypsinised and seeded at 130 000 cells/well in 6-well plate. Next day, siRNA transfection was performed as described above.

Cell proliferation, viability and death analyses

Cell proliferation analysis was carried out using CyQuant[®] NF cell proliferation assay (Invitrogen). Adherent cells were washed and frozen at 80°C. Cells were thawed and treated with CyQuant GR dye, which binds stoichiometrically to nucleic acids and, thus, measures cell number. Fluorescence quantification was measured using a microtiter plate fluorimeter (VICTOR³™, PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA) with excitation at 485 nm and detection at 535 nm.

Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion assay using phase contrast microscopy at indicated time after siRNA

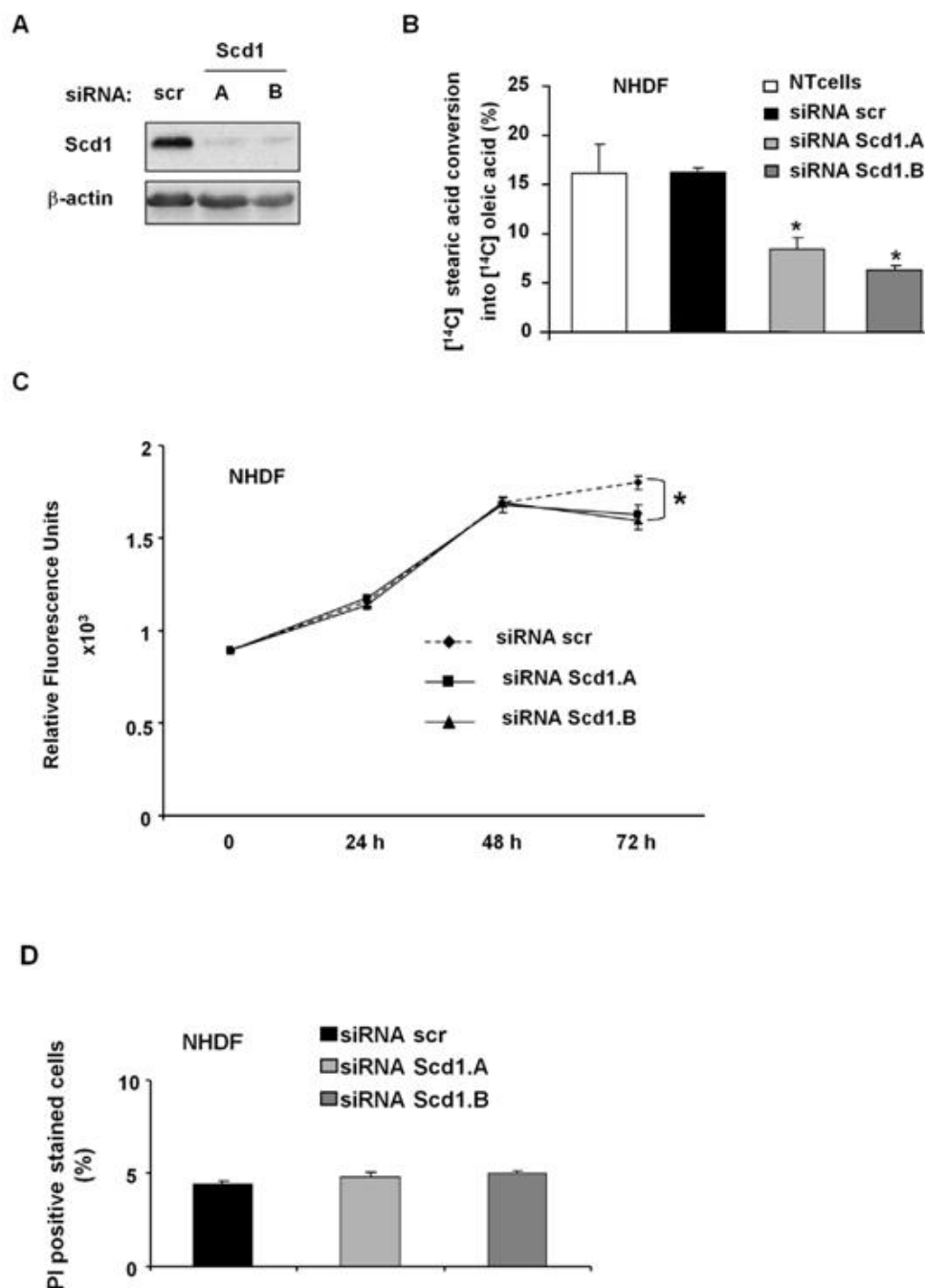


Figure 6. Scd1 depletion did not affect viability of non cancer cells. Normal human dermal fibroblasts (NHDF) were transfected with siRNA control (scr) and siRNA targeting Scd1 (Scd1.A and Scd1.B). NHDF cells were harvested after 72 h siRNA treatment and harvested for further analyses. **A)** Total proteins were prepared for Scd1 expression analysis by western-blotting. **B)** NHDF treated 72 h with siRNA were incubated for further 6 h with [¹⁴C] stearic acid and total lipid extraction was carried out. Conversion of [¹⁴C] stearic acid into oleic acid was performed by HPLC. Scd activity was expressed as the % ratio of [¹⁴C] oleic acid to [¹⁴C] oleic and stearic acids. Values represent the mean $\pm$ SEM for at least two separate experiments. **C)** Proliferation status of siRNA-treated NHDF was determined at indicated time by the CyQuant[®] proliferation assay. Each value is the mean of relative fluorescence units $\pm$ SEM of three independent experiments. **D)** NHDF were collected 72 h post-transfection and total cell death analysis was performed by flow cytometry after staining with propidium iodide. Results were the mean $\pm$ SEM of PI positive cells (%) of one representative from two experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$ vs. siRNA scr-treated cells by Anova analysis followed by Tuckey test. doi:10.1371/journal.pone.0014363.g006

treatment. Cells that exclude trypan blue dye are considered to be viable.

Total cell death was determined by propidium iodide staining (PI) using flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson). Cells were collected 72 h after siRNA treatment. PI (1 µg/ml) was added to cells and positive PI staining cells were considered as dead cells.

Caspase 3 activity was determined using CaspGLOW Fluorescein Caspase-3 Staining Kit by flow cytometry. The assay utilizes the caspase-3 inhibitor, DEVD-FMK, conjugated to FITC (FITC-DEVD-FMK) that irreversibly binds to activated caspase-3 in apoptotic cells.

RNA purification and RT-PCR

Total RNA was purified using RNEasy kit (Qiagen, Germany). Reverse transcription was performed with 1 µg RNA using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

For analysis of Xbp1 mRNA splicing, semi-quantitative PCR analysis was performed with Gotaq green master mix (Promega) and the following primers were used:

5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3' and 5'-TCC-TTCTGGG-TAGACCTCTGGGAG-3'; and β-actin: 5'-ATGA-TATCGCGCGCTCGTCGTC-3' and antisense 5'-AGGT-CCCGG CCAGCCAGGTCCAG-3'.

RNA expression level was quantified by real-time PCR using iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad) using a Bio-Rad iCycler iQ with the following primers:

CHOP: sense 5'-ACA CAG ATG AAA ATG GGG GTA CCT-3' and antisense 5'-AGA AGC AGG ATC AAG AGT GGT-3'; Scd1: sense 5'-TTC AGA AAC ACA TGC TGA TCC TCA TAA TTC CC-3' and antisense 5'-ATT AAG CAC CAC AGC ATA TCG CAA GAA AGT CTG-3'; β-actin: sense 5'-CTG GTG CCT GGG GCG-3' antisense 5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA 3'.

Western Blotting

For whole-cell extracts, cells were washed with ice-cold PBS and lysed in ice-cold triton buffer (Tris-HCL 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, Triton X-100 1%), containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma cocktails I and II) for 15 min on ice. We cleared protein lysate at 10 000 g, 10 min at 4°C. Thirty micrograms of total proteins were loaded for SDS-PAGE electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane.

For nuclear extracts, cells were washed with ice-cold PBS and harvested in lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 500 mM sucrose, 0.5% Triton X-100 with protease inhibitors as described above. After swelling for 10 min

on ice, cytosolic fraction was obtained by centrifugation at 2000 × g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in nuclei lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% NP-40 with protease inhibitors) and incubated on ice for 30 min with vortexing every 5 min. The suspension was centrifuged at 24,000 × g for 15 min at 4°C and the resulting supernatant was the nuclear extract.

Immunoblotting was performed with antibodies raised against phospho-eIF2α (1/1000), anti-Scd1 (1/500), anti-cleaved PARP (1/1000), anti-GRP78 (1/200), anti-CHOP/GADD153 (1/200), anti-lamin A/C (1/1000) and anti-β-actin (1/4000). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used at 1/5000.

Determination of Scd activity

We evaluated Scd activity by measuring the conversion of [¹⁴C] stearic acid into [¹⁴C] oleic acid after siRNA (72 h) or Scd1 inhibitor (24 h) treatment. Cells were incubated with 3 µM (0.25 µCi/dish of [¹⁴C] stearic acid) for 6 h at 37°C in 5% CO₂ incubator. Cells were collected and total lipids were extracted according to Bligh and Dyer method. Lipids were saponified and esterified. Radiolabelled fatty acid methyl esters were separated by RP-HPLC and detected on line by a radioisotope detector (Packard Flow Scintillation Analyser, PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA). The [¹⁴C] oleic acid/[¹⁴C] oleic and stearic acids) ratio was determined as Scd activity.

Statistical analysis

Results are presented as means ± standard error mean (SEM). Statistical significance of results was determined by OneWay Anova analysis followed by Tuckey HSD test. Values of p<0.05 were considered significant.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Jesse Martinez for providing the BA1 cell line and to Dr. Christopher Reilly for the dominant-negative CHOP construct. We thank Dr. Jeff Chisholm for providing CVT-11127, and Dr. Renata Oballa for MF-438. We are sincerely grateful to Joseph Gresti for his expertise with lipid experiments. We also thank Arlette Hammann and Anabelle Sequeira-Legrand for flow cytometry experiments. We would like sincerely to thank Dr. Dominique Delmas and Dr. Gérard Lizard for discussions about this project.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MMW ASP MN MR. Performed the experiments: MMW ASP LP CF MR. Analyzed the data: MMW ASP JB MN MR. Contributed reagents/materials/analysis tools: LP SB CF JB CT MR. Wrote the paper: MMW ASP LP MN MR.

References

- Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 18: 54–61.
- Young CD, Anderson SM (2008) Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res* 10: 202.
- Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, et al. (2003) Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 898–903.
- Chajes V, Lanson M, Fétissov F, Lhuillery C, Bougnoux P (1995) Membrane fatty acids of breast carcinoma: contribution of host fatty acids and tumor properties. *Int J Cancer* 63: 169–175.
- Riboni L, Ghidoni R, Sonnino S, Omodeo-Sale F, Gaini SM, et al. (1984) Phospholipid content and composition of human meningiomas. *Neurochem Pathol* 2: 171–188.
- Robert J, Montaudon D, Hugues P (1983) Incorporation and metabolism of exogenous fatty acids by cultured normal and tumoral glial cells. *Biochim Biophys Acta* 752: 383–395.
- Yam D, Ben-Hur H, Dgani R, Fink A, Shani A, et al. (1997) Subcutaneous, omentum and tumor fatty acid composition, and serum insulin status in patients with benign or cancerous ovarian or endometrial tumors. Do tumors preferentially utilize polyunsaturated fatty acids? *Cancer Lett* 111: 179–185.
- Szchowiec-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski ZA (2007) Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue. *Mol Cell Biochem* 294: 237–242.
- Sakai K, Okuyama H, Yura J, Takeyama H, Shinagawa N, et al. (1992) Composition and turnover of phospholipids and neutral lipids in human breast cancer and reference tissues. *Carcinogenesis* 13: 579–584.
- Sabine J, Abraham S, Chaikoff I (1967) Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res* 27: 793–799.
- Kannan R, Lyon I, Baker N (1980) Dietary control of lipogenesis in vivo in host tissues and tumors of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res* 40: 4606–4611.

12. Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP (1997) Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 3: 2115–2120.
13. Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgmal AA, Eelen M, Vercaeren I, et al. (2000) Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer* 88: 176–179.
14. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, et al. (1994) Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6379–6383.
15. Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, et al. (2002) Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 98: 19–22.
16. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, et al. (2000) The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 31: 1068–1073.
17. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, et al. (1997) Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 150: 201–208.
18. Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, et al. (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearoyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 735–742.
19. Falvella FS, Pascale RM, Gariboldi M, Manenti G, De Miglio MR, et al. (2002) Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis* 23: 1933–1936.
20. Griffiths J, Tesiram Y, Reid GE, Saunders D, Floyd RA, et al. (2009) In vivo MRS assessment of altered fatty acyl unsaturation in liver tumor formation of a TGF α /c-myc transgenic mouse model. *J Lipid Res* 50: 611–622.
21. Li J, Ding SF, Habib NA, Femor BF, Wood CB, et al. (1994) Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 57: 348–352.
22. Fritz V, Benfodda Z, Rodier G, Henriquet C, Iborra F, et al. (2010) Abrogation of de novo lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol Cancer Ther* 9: 1740–1754.
23. Moore S, Knudsen B, True LD, Hawley S, Etzioni R, et al. (2005) Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 114: 563–571.
24. Scaglia N, Chisholm JW, Igal RA (2009) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One* 4: e6812.
25. Morgan-Lappe SE, Tucker LA, Huang X, Zhang Q, Sarthy AV, et al. (2007) Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearoyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res* 67: 4390–4398.
26. Scaglia N, Caviglia JM, Igal RA (2005) High stearoyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1687: 141–151.
27. Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H (2010) Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem*.
28. Scaglia N, Igal RA (2008) Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol* 33: 839–850.
29. Hardy S, Langelier Y, Prentki M (2000) Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 60: 6353–6358.
30. van der Sanden MH, Houweling M, van Golde LM, Vaandrager AB (2003) Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem J* 369: 643–650.
31. van der Sanden MH, Meems H, Houweling M, Helms JB, Vaandrager AB (2004) Induction of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible protein 153 expression during inhibition of phosphatidylcholine synthesis is mediated via activation of a C/EBP-activating transcription factor-responsive element. *J Biol Chem* 279: 52007–52015.
32. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519–529.
33. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, et al. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099–1108.
34. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, et al. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129: 1337–1349.
35. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, et al. (2002) Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109: 525–532.
36. Zinsner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, et al. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12: 982–995.
37. Thomas KC, Sabnis AS, Johansen ME, Lanza DL, Moos PJ, et al. (2007) Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 830–838.
38. Qiao D, Im E, Qi W, Martinez JD (2002) Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1583: 108–116.
39. Scaglia N, Igal RA (2005) Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem* 280: 25339–25349.
40. Almaguez FG, Liu JW, Pacheco FJ, Casiano CA, De Leon M (2009) Activation and reversal of lipotoxicity in PC12 and rat cortical cells following exposure to palmitic acid. *J Neurosci Res* 87: 1207–1218.
41. Hardy S, El-Asaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, et al. (2003) Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* 278: 31861–31870.
42. Peter A, Weigert C, Staiger H, Rittig K, Cegan A, et al. (2008) Induction of stearoyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E339–349.
43. Wei Y, Wang D, Pagliassotti MJ (2007) Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells. *Mol Cell Biochem* 303: 105–113.
44. Vinciguerra M, Carrozzino F, Peyrou M, Carlone S, Montesano R, et al. (2009) Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN. *J Hepatol* 50: 1132–1141.
45. Hess D, Chisholm JW, Igal RA (2010) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLoS One* 5: e11394.
46. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., et al. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077–3082.
47. Jackowski S (1996) Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem* 271: 20219–20222.
48. Siperstein MD (1984) Role of cholesterol synthesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res* 25: 1462–1468.
49. Baburina I, Jackowski S (1998) Apoptosis triggered by 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine is prevented by increased expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem* 273: 2169–2173.
50. Cui Z, Houweling M, Chen MH, Record M, Chap H, et al. (1996) A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 271: 14668–14671.
51. Yeung BH, Kwan BW, He QY, Lee AS, Liu J, et al. (2008) Glucose-regulated protein 78 as a novel effector of BRCA1 for inhibiting stress-induced apoptosis. *Oncogene* 27: 6782–6789.
52. Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Wang YF, Kiejda KA, et al. (2007) Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res* 67: 9750–9761.
53. Jiang CC, Mao ZG, Avery-Kiejda KA, Wade M, Hersey P, et al. (2009) Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 30: 197–204.
54. Pytko P, Schonthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 67: 9809–9816.
55. Karasikov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, et al. (2006) Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 147: 3398–3407.
56. Ou L, Wu Y, Ip C, Meng X, Hsu YC, et al. (2008) Apoptosis induced by t10,c12-conjugated linoleic acid is mediated by an atypical endoplasmic reticulum stress response. *J Lipid Res* 49: 985–994.
57. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107: 881–891.
58. Lin JH, Li H, Zhang Y, Ron D, Walter P (2009) Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One* 4: e4170.
59. Jiang HY, Wek RC (2005) Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J Biol Chem* 280: 14189–14202.
60. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21: 1249–1259.
61. Rasheva VI, Domingos PM (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14: 996–1007.
62. Koltun DO, Parkhill EQ, Vasilevich NI, Glushkov AI, Zilbershtein TM, et al. (2009) Novel, potent, selective, and metabolically stable stearoyl-CoA desaturase (SCD) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 2048–2052.
63. Leger S, Black WC, Deschenes D, Dolman S, Falgout JP, et al. (2010) Synthesis and biological activity of a potent and orally bioavailable SCD inhibitor (MF-438). *Bioorg Med Chem Lett* 20: 499–502.

Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through Reactive oxygen species-mediated ER stress

Anne-Sophie Pierre^{1, 2}, Méline Minville-Walz^{1, 2}, Cécile Fèvre¹, Aziz Hichami¹, Joseph Gresti¹, Laurent Pichon¹, Sandrine Bellenger¹, Jérôme Bellenger¹, François Ghiringhelli¹, Michel Narce^{1,2} and Mickaël Rialland^{1,2}

¹ Université de Bourgogne, Centre de recherche INSERM, UMR866, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

² These authors contributed equally to this work

Running title: t10,c12 CLA induced ER stress-dependent apoptosis

Corresponding author: Mickaël Rialland

Université de Bourgogne
Centre de recherche INSERM UMR866,
6, boulevard Gabriel
21000 Dijon- France
Tel: +33 3 80 39 63 14;
Fax : +33 3 80 39 63 30 ;
e-mail : mickael.rialland@u-bourgogne.fr

Abbreviations:

CHOP C/EBP homologous protein

CLA conjugated linoleic acids

ER endoplasmic reticulum

IRE1 inositol requiring enzyme 1

JNK c-Jun NH(2)-terminal kinase

PERK RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase

ROS Reactive oxygen species

UPR unfolded protein response

ABSTRACT

Dietary conjugated linoleic acids (CLA) are fatty acid isomers with anticancer activities produced naturally in ruminants or from vegetable oil processing. The anticancer effects of CLA differ upon the cancer origin and the CLA isomers. In this study, we carried out to precise the effects of CLA isomers, c9,t11 and t10,c12 CLA, on mechanisms of cell death induction in colon cancer cells. We first showed that only t10,c12 CLA treatment (25 and 50 μ M) for 72 hours triggered apoptosis in colon cancer cells without affecting viability of normal-derived colon epithelial cells. Exposure of colon cancer cells to t10,c12 CLA activated ER stress characterized by induction of eIF2 phosphorylation, splicing of Xbp1 mRNA and CHOP expression. Furthermore, we evidenced that inhibition of CHOP expression and JNK signaling decreased t10,c12 CLA-mediated cancer cell death. Finally, we showed that CHOP induction by t10,c12 CLA was dependent on ROS production and that the anti-oxidant N-acetyl-cysteine reduced CHOP induction-dependent cell death.

These results highlight that t10,c12 CLA exert its cytotoxic effect through ROS generation and a subsequent ER stress-dependent apoptosis in colon cancer cells.

Supplementary key words: fatty acid, endoplasmic reticulum stress, ROS, CHOP, JNK, apoptosis

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid and its acronym CLA refer to a mixture of positional and geometric conjugated dienoic isomers of linoleic acid. CLA are naturally found in ruminant foods and dairy products, in which cis-9,trans-11 (c9,t11 CLA) is the most abundant isomer. CLA such as trans-10,cis-12 CLA (t10,c12 CLA), are also produced under strong alkaline conditions during hydrogenation of linoleic acid-rich vegetable oils or as food supplements (1).

Anticancer properties have been recently attributed to CLA. Indeed, an epidemiologic study indicates that long-term consumption of CLA is inversely correlated with colorectal cancer incidence (2). Furthermore, when incorporated at once or individually in the diet as purified nutrients, c9,t11 and t10,c12 CLA exert notable anti-carcinogenic effects in rodent models of grafted tumor cells or chemically-induced cancers (3-7). Nevertheless, the relationship between dietary intake of CLA and tumor incidence remains to be ascertained in humans (8-9). Suppression of tumor growth with CLA treatment can be attributed either to induction of apoptosis or inhibition of cell cycle and angiogenesis (10-13). c9,t11 and t10,c12 CLA present different potency for cancer cell death induction according to the cancer cell model (14). In colon cancer cells, t10,c12 CLA triggers a more pronounced cytotoxic effect than c9,t11 CLA but the molecular mechanisms are not well understood (15-17). However, it has been reported that cell death mediated by t10,c12 CLA is at least a caspase-dependent apoptosis through activation of caspases 9 and 3 in association with mitochondrial events such as alteration of mitochondrial membrane potential and release of cytochrome C (17-19).

Moreover, alteration of the endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in colon cancer cells could also be a signal for apoptotic program activation, which has been reported for polyunsaturated fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids) (20). ER stress first triggers an adaptive program, known as the unfolded protein response (UPR), to reestablish ER equilibrium (21-22). Activation of the canonical UPR engages three distinct concerted signaling branches mediated by ER membrane anchored sensors: RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and inositol requiring enzyme 1 (IRE1). PERK phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor (eIF)2 α , thereby inhibiting global protein synthesis. Active ATF6 translocates to the Golgi and is cleaved from the membrane by site-1 and -2 proteases. Cleaved ATF6 localizes to the nucleus and induces transcription of Xbp1 and ER chaperones such as GRP78 (23-24). IRE1 disposes of an endoribonuclease activity that alternatively splices the Xbp1 mRNA

(sXbp1), which is translated into an active transcription factor (21-22). In severe or prolonged ER stress, the UPR switches from a cytoprotective to a pro-apoptotic signal through transcriptional induction of the transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP, also called GADD153), and activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) by phosphorylation (25-26).

In this study, we evaluated the effect of c9,t11 and t10,c12 CLA on cell death induction and the link with ER stress activation in normal and colon cancer cells. We found that t10,c12 CLA triggered only in colon cancer cells a drastic cell death induction, which was related to JNK activation. We also demonstrated that increase of CHOP expression was involved in apoptosis triggered by t10,c12 CLA during ER stress and dependent of Reactive oxygen species production (ROS).

MATERIALS AND METHODS

Cell culture supplies were obtained from Dutscher (France). All fatty acids were purchased from Sigma. SiRNA against unrelated human mRNA and CHOP were purchased from Dharmacon Research Inc (Lafayette, CO). N-acetyl-L-cysteine (NAC) and SP600125 were obtained from Sigma.

Cells and treatment

Human colorectal cancer cell lines (SW480 and HCT116) were from American Type Culture Collection (Rockville, MD). HCT116 (BA1) cells stably expressing human CHOP antisense cDNA construct were graciously given by Dr. Jesse Martinez with their parental HCT116 cells counterparts (27). Normal-derived colon epithelial cells (NCM460) were obtained from INCELL Corporation (28). Cancer cell lines were maintained either in RPMI (SW480) or in DMEM (HCT116) supplemented with 6% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine (2 mM). NCM460 cells were propagated in M3:10TM medium (INCELL Corporation).

For experimental conditions, cells were treated with fatty acids bound to fatty acid free-bovine serum albumin (BSA) (ratio 4:1) in DMEM supplemented with 6% FBS or with 10% delipidated FBS (DLP).

Inhibition of ROS generation and JNK signaling were carried out by treatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC) and SP600125, respectively. Cells were pre-treated 15 minutes before fatty acid treatment for 72 hours with 0.5 mM for NAC and 2.5 to 10 µM for SP600125.

Cell proliferation assay

Cell proliferation analysis was carried out using CyQuant® NF cell proliferation assay (Invitrogen). Adherent cells were harvested at indicated times and frozen at -80°C. Cells were thawed and treated with CyQuant GR dye, which binds stoichiometrically to nucleic acids and, thus, quantifies cell number. Fluorescence quantification was measured using a microtiter plate fluorimeter (VICTOR^{3V}TM, PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA) with excitation at 485 nm and detection at 535 nm.

Quantification of cell death

Total cell death was determined either by propidium iodide (PI) staining using flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) or trypan blue exclusion assay using phase contrast microscopy. Floating and adherent cells were collected 72 hours after treatment and PI (1µg/ml) or trypan blue solution (0.4%) was added to cell suspension. Positive PI or trypan blue stained cells were considered as dead cells.

Apoptosis was detected either by annexin V-FITC (BD Pharmingen) or nuclei Hoechst staining. Annexin V-FITC staining was performed as recommended by the manufacturer. For apoptotic nuclei staining, floating and adherent cells were collected and fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were stained with Hoechst 33258 (1µg/ml) and at least 200 nuclei per sample were counted under microscope (AxioVert, Zeiss).

Cell transfection

SW480 were transfected with 50 nM siRNA directed against unrelated human mRNA (siRNA scr, against luciferase sequence) and CHOP (siRNA CHOP) using Oligofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Sequences of siRNA were: siRNA scr: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAUU-3' and 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGUU-3'; siRNA CHOP: 5'-CAAUUGUUCAUGCUUGGUGUU-3' and 5'-CACCAAGCAUGAACAAUUGUU-3'. SW480 cells transfected with siRNA were next day treated with fatty acids for further 72 hours.

RNA purification and RT-PCR

Total RNA was purified using RNEasy kit (Qiagen, Germany). Reverse transcription was performed with 1 µg RNA using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Semi-quantitative RT-PCR was performed for analysis of Xbp1 mRNA processing using Gotaq green master mix (Promega) with the following primers for Xbp1: 5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3' and 5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'.

Real-time RT-qPCR was performed for GRP78 mRNA expression with iQSYBR Green supermix (Bio-Rad) using a Bio-Rad iCycler iQ with the following primers: GRP78: 5'-GGAACACAGTGGTGCCTACCAA- 3' and 5'-GGAGCAGGAGGAATTCCAGTCA-3', and β -actin: 5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3' and 5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'. The relative amount of GRP78 expression was determined using $\Delta\Delta C_t$ method. The normalized delta cycle threshold (ΔC_t) was calculated by subtracting the GRP78 cycle threshold

value from the β -actin cycle threshold value ($\Delta Ct = Ct_{\beta\text{-actin}} - Ct_{\text{gene}}$). Comparative gene expression between two independent samples, or $\Delta\Delta Ct$, was obtained by subtracting the vehicle delta cycle threshold from the sample delta cycle threshold ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$). Fold change expression was defined with $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

Immunoblotting

For whole-cell lysate, cells were washed with ice-cold PBS and lysed in ice-cold Triton buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, Triton X-100 1 %), containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma cocktails I and II) for 15 min on ice. We cleared protein lysate at 10 000 g, 10 min at 4°C. For nuclear extracts, cells were washed with ice-cold PBS and harvested in lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 500 mM sucrose, 0.5% Triton X-100 with protease inhibitor. After swelling for 10 min on ice, cytosolic fraction was obtained by centrifugation at 2000 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in nuclei lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% NP-40 with protease inhibitors) and incubated on ice for 30 min. The suspension was centrifuged at 24 000 g for 15 min at 4°C and the resulting supernatant was the nuclear extract.

Thirty micrograms of proteins were loaded for SDS-PAGE electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane.

Anti-CHOP (sc-56107) and anti-GRP78 (sc-1050) were purchased by Santa-Cruz biotechnologies, anti- β -actin (AC-15) by Sigma, anti-lamin A/C, anti-eIF2 (D7D3), anti-phospho eIF2 (119A11), anti-phospho-JNK (81E11), anti-JNK (56G8) and anti-cleaved PARP (9541) by Cell Signaling Technology.

Determination of intracellular ROS level

Intracellular ROS were measured using the membrane-permeable fluorescent dye 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; Molecular Probes). Cells treated for 72 hours with fatty acids were incubated with 100 μ M of H2DCFDA for 1 hour at 37°C. Cells were placed on ice before analysis by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) for quantification of ROS generation.

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ standard error mean (SEM). Statistical significance of results was determined by OneWay Anova analysis followed by Tuckey HSD test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Selective cancer cell death is induced by t10,c12 CLA

In order to explore the effect of c9,t11 and t10,c12 CLA on proliferation of colon cancer cells, we treated for 72 hours colon cancer cell lines with these different fatty acids. Two experimental conditions for the treatment with CLA were used in this study; HCT116 cells in DMEM supplemented with 6% FBS and SW480 cells supplemented with 10% delipidated FBS. As presented in Figure 1A, HCT116 cells in 6% FBS treated by t10,c12 CLA at 12.5, 25 and 50 μ M for 72 hours showed by PI staining a significant increase (more than 4 fold at 50 μ M) of cell death compared to control and c9,t11 CLA (Fig. 1A). In the same experimental condition, the treatment of SW480 cells with 50 μ M t10,c12 CLA for 72 hours only induced a two fold increase of cell death compared to control and c9,t11 CLA treatment (data not shown). This result led us to place SW480 cells with 10% delipidated FBS for the treatment with the fatty acids. In this condition, we observed that exposure of SW480 cells to t10,c12 CLA (25 and 50 μ M for 72 hours) triggered a drastic increase of cell death compared to control and c9,t11 CLA treatment (Fig. 1B). We also found that treatment with 50 μ M of c9,t11 CLA induced a modest increase of PI positive SW480 cells compared to control cells (Fig. 1B). The consequence of the cell death induced by t10,c12 CLA treatment was a decrease of cancer cell proliferation evidenced by Cyquant assayTM analysis at 72 hours (Fig. 1C and 1D).

Interestingly the treatment with t10,c12 CLA as with c9,t11 CLA did not affect the viability of normal-derived colon epithelial cells (NCM460) analyzed by PI staining when they were exposed to concentrations up to 50 μ M of these fatty acids for 72 hours in 6% FBS or 10% delipidated FBS (Fig. 1E and 1F).

t10,c12 CLA killed colon cancer cells by apoptosis

We evaluated the contribution of apoptosis in HCT116 and SW480 cell death induced by t10,c12 CLA treatment. We showed that t10,c12 CLA (25 and 50 μ M for 72 hours) induced an increase of Annexin-V positive HCT116 cells in a dose-response manner compared to control and c9,t11 CLA-treated cells (Fig. 2A). In SW480 cells, we did not observe neither apoptosis analyzed by Hoechst nuclei staining in c9,t11 CLA and control treatment whereas t10,c12 CLA already triggered apoptosis at 12.5 μ M to raise a maximum at 25 μ M (Fig. 2B).

The t10,c12 CLA treatment also led to an induction of cleaved-PARP expression in HCT116 and SW480 cells at 72 hours of treatment (Fig. 2C and 2D).

ER stress pathway is activated by t10,c12 CLA in colon cancer cells

We studied the expression of characteristic ER stress markers among the arms of UPR. Under ER stress, this pathway is activated by the release of GRP78 protein from the UPR transducers anchored in the ER membrane. Concomitantly, transcription of GRP78 gene is enhanced. We demonstrated here that addition of t10,c12 CLA at 25 and 50 μ M for 72 hours in SW480 and HCT116 cell lines increased GRP78 mRNA content compared to vehicle and c9,t11 CLA (Fig. 3A). However, GRP78 protein expression was only modestly changed in SW480 and HCT116 cell lines treated by 25 μ M of t10,c12 CLA for 72 hours (Fig 3B). We also showed that treatment with t10,c12 CLA triggered processing of Xbp1 mRNA evidenced by hybrid (h-Xbp1) and non conventional spliced Xbp1 (s-Xbp1) transcripts in both cell lines (Fig. 3C). Moreover, we found that eIF2 a PERK substrate, was phosphorylated by t10,c12 CLA in a dose-response manner at 24 hours for HCT116 cells (Fig. 3D). We confirmed in SW480 cells that t10,c12 CLA increased expression of phospho-eIF2 (Fig. 3D).

Altogether theses findings highlighted the activation of the main ER stress hallmarks in colon cancer cells treated with t10,c12 CLA.

JNK activation contributed to t10,c12 CLA-mediated colon cancer cell death

Sustained activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) has been implicated in ER stress-induced cell death. Therefore, we were interested in analyzing the expression of phospho-JNK in HCT116 cells at 72 hours of treatment. We found that HCT116 cells exposed to t10,c12 CLA (50 μ M) showed a sustained increase of p-JNK expression compared to control and c9,t11 CLA; still detected after 72 hours of treatment (Fig. 4A). We further characterized the role of JNK signaling activation in t10,c12 CLA-induced cell death by repressing JNK activity with SP600125 (2.5, 5 and 10 μ M). We confirmed by trypan blue exclusion assay that HCT116 cancer cells treated with 50 μ M t10,c12 CLA for 72 hours showed an increase cell death whereas we observed a dose-response decrease of cell death for cells exposed to co-treatment with SP600125 (Fig. 4B).

Extinction of CHOP expression reduced t10,c12 CLA-induced colon cancer cell death

In condition of severe ER stress, induction of CHOP expression appeared as a main effector of apoptotic program activation. In HCT116 cancer cells exposed to t10,c12 CLA (25 and 50 μ M) compared to control and c9,t11 CLA treatment, we showed an increase of CHOP protein expression at 48 and 72 hours of treatment (Fig. 5A). We did not observe any CHOP induction at 24 hours of treatment (data not shown); CHOP expression was first barely increased at 48 hours (Fig. 5A). In SW480 cancer cells treated for 72 hours, we also detected induction of CHOP expression with 25 and 50 μ M of t10,c12 CLA treatment (Fig. 5B). We then evaluated the role of CHOP in t10,c12 CLA-mediated cell death. For this purpose, we used HCT116-BA1 cell line, in which CHOP expression is repressed by stable transfection of antisense CHOP construct. Therefore, we showed that increase of nuclear CHOP expression under t10,c12 CLA effect in parental HCT116 cells was repressed in HCT116 BA1 in the same conditions (Fig. 5C). Although t10,c12 CLA treatment (50 μ M for 72 hours) induced approximately 30% of cell death (PI positive stained cells) and apoptosis hallmarks (Annexin V staining and c-PARP) in wild-type parental HCT116 cells, the treatment was inefficient for cell death activation in HCT116-BA1 cells (Fig. 5D and 5E). We confirmed in SW480 cells at 72 hours of treatment that inhibition of CHOP induction by siRNA CHOP partially protected from 50 μ M t10,c12 CLA-mediated cell death compared to siRNA scr SW480 cells (Fig. 5F). We also observed in t10,c12 CLA-treated SW480 cells in which CHOP induction is inhibited by siRNA CHOP, a decrease of c-PARP expression compared to siRNA scr SW480 cells (5G).

Finally, we observed that normal-derived colon cells (NCM460) in both cell culture conditions (6% FBS and 10% DLP) treated with 25 and 50 μ M of t10,c12 CLA for 72 hours did not show increase expression of CHOP compared to c9,t11 CLA and control cells (Fig. 5H). The lack of CHOP induction is correlated with absence of cell death (Fig. 1F) and of c-PARP increase (Fig. 5H).

Here, we demonstrated that increase of CHOP expression participated to t10,c12 CLA-induced apoptosis.

ROS production by t10,c12 CLA treatment induced ER stress-mediated apoptosis

Apoptosis triggered in ER stress context could be induced by ROS (29). Therefore, we analyzed ROS level in HCT116 cells treated with the CLA isomers (50 μ M) by quantification of H2DCFDA fluorescence by flow cytometry. We found that ROS production was induced approximately 5 folds by t10,c12 CLA treatment at 48 hours and that co-treatment with the anti-oxidant NAC prevented the ROS increase (Fig. 6A). The reduction of ROS production by NAC treatment for 72 hours significantly decreased the percentage of PI and Annexin V positive cells exposed to t10,c12 CLA (50 μ M for 72 hours) compared to the control and c9,t11 CLA (Fig. 6B). The NAC treatment (0.5 mM) did not change the percentage of PI and Annexin V staining in vehicle- and c9,t11 CLA-treated cells (Fig. 6B). Furthermore, we showed that expression of c-PARP was decreased in HCT116 cells co-treated by t10,c12 CLA and NAC compared to t10,c12 CLA-treated HCT116 cells (Fig. 6C). We finally observed that induction of CHOP expression in t10,c12 CLA-treated HCT116 cells for 72 hours compared to control and c9,t11 CLA treatment was attenuated by co-treatment with NAC (Fig. 6D).

Therefore, we evidenced that increase of ROS generation by t10,c12 CLA treatment triggered CHOP induction-mediated apoptosis.

DISCUSSION

Define the molecular mechanisms of how dietary c9,t11 and t10,c12 CLA exert their anticancer effects might be of great interest in the development of new colorectal anticancer therapies. In this purpose, we undertook to evaluate the effect of CLA isomers on viability of colon cancer and normal-colon derived cells, and to analyze the involvement of ER stress in apoptosis of colon cancer cells.

We evidenced that only t10,c12 CLA was able to induce cell death in colon cancer cells without affecting normal cell viability (Fig. 1). Solely exposure of colon cancer cells to t10,c12 CLA had the ability to activate ER stress-mediated apoptosis. Indeed, in addition to increase expression of phospho-eIF2 α , GRP78 and spliced-Xbp1 mRNA, we clearly demonstrated that induction of CHOP participated to t10,c12 CLA-mediated apoptosis (Fig. 3 and 5). In ER stress context, CHOP might play its pro-apoptotic function through down-regulation of Bcl-2, up-regulation of TRB3, BIM or DR5 (30). It has been reported that t10,c12 CLA treatment of breast cancer cells decreased expression of the pro-survival Bcl-2 protein and increased expression of the pro-apoptotic BIM protein. Furthermore, ectopic expression of Bcl-2 or ablation of BIM expression by siRNA counteracted the t10,c12 CLA-induced apoptosis (19, 31). These findings could explain how CHOP would exert its pro-apoptotic effect in colon cancer cells treated by t10,c12 CLA. Moreover, a prolonged activation of IRE1 branch has also been described as a signal for apoptosis induction. The IRE1 branch under ER stress has to deal either with pro-survival signal through Xbp1 mRNA splicing or with pro-apoptotic signal through activation of JNK by IRE1 /TRAF2/ASK1 pathway (30). In our study, we observed in t10,c12 CLA-treated colon cancer cells an increase of the cytoprotective signal Xbp1 mRNA splicing and of the pro-cytotoxic JNK activation strongly suggesting activation of IRE1 arm (Fig. 3C and 4A). We demonstrated that activation of JNK pathway was involved in the cytotoxic effect of t10,c12 CLA-induced ER stress since inhibition of this pathway decreased cell death (Fig. 4B). However, the prolonged JNK activation might also originate from CHOP/CaMKII induction as it has been identified in ER stressed macrophages (32-33). The possible regulation by both IRE1 arm and CHOP could amplify and prolonged the activation of JNK pathway leading to ER stress-dependent apoptosis in colon cancer cells exposed to t10,c12 CLA.

Oxidative disturbance is able to induce severe ER stress and colon cancer cell death (29, 34). Oxidative stress occurs as a consequence of increase ROS production and a deficit in antioxidant defence system. We found that HCT116 cells exposed to t10,c12 CLA produced ROS and that the potent antioxidant factor NAC inhibited ROS generation, CHOP induction and subsequent apoptosis (Fig. 6). The fact that NAC prevented CHOP increase and the kinetic of ROS formation argued for an upstream event of ER stress-dependent apoptosis activated by t10,c12 CLA. Although induction of ER stress through excessive ROS level is now well established, the mechanisms remain not completely understood (35). Additionally, ROS formation can occur downstream the UPR activation and ER stress for instance by CHOP/ERO1 pathway (36). Therefore, it is tempting to speculate that oxidative stress might be the source of ER stress activation and that this activation would induce an amplification loop of ROS production in cells treated by t10,c12 CLA .

The delivery of t10,c12 CLA or mixture CLA to cells has been already described to interfere with redox homeostasis and induced ROS formation, which could be generated by multiple mechanisms such as the mitochondrial electron transport chain and NADPH oxydases (37-40). Furthermore, oxidation of fatty acids (e.g. palmitic or oleic acids) might produce catabolic intermediates or by-products that could modulate ROS formation by respiratory chain in mitochondria (41-42). Both t10,c12 and c9,t11 CLA isomers are differently β -oxidized and differently modify consecutive β -oxidation of palmitic or oleic acids (43-44). In preadipocytes 3T3-L1 cells, t10,c12 CLA improved β -oxidation of oleic acid providing potential intermediates or by-products regulating increase generation of ROS (44).

We clearly demonstrated that induction of ER stress by t10,c12 CLA was partially dependent of ROS production. We can not exclude that others signals contribute to ER stress induction in presence of t10,c12. For instance, we recently showed that inhibition of the monounsaturated fatty acid synthesis by repressing the activity of the Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) induced ER stress (45). Therefore, the fact that t10,c12 CLA has a more potent capability to abolish Scd1 expression or activity than c9,t11 CLA in colon cancer cells (unpublished data), hepatoma and breast cancer cells might be an element of the t10,c12 CLA-induced ER stress pathway (46-47).

This study supports the fact that the anticancer effect of t10,c12 CLA could be exerted by its ability to inhibit cancer cell proliferation via ER stress-mediated apoptosis.

Further *in vivo* investigations would deserve to be performed in order to comfort these *in vitro* observations and to evaluate the possible side-effects of t10,c12 CLA.

In conclusion, we demonstrated that t10,c12 CLA was a more potent pro-apoptotic fatty acid than c9,t11 CLA for colon cancer cells. Furthermore, we evidenced that apoptosis induced by t10,c12 CLA was dependent of CHOP induction through ROS generation, which might initiate the activation of ER stress observed in colon cancer cells and not in normal colon cells treated with t10,c12 CLA.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. MP Moyer for providing NCM460 cells. We also thank A. Hammann and A. Sequeira-Legrand for flow cytometry experiments. This work was supported by grants from INSERM, Région Bourgogne and the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière. The authors confirm that they are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Belury, M. A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 22: 505-531.
2. Larsson, S. C., L. Bergkvist, and A. Wolk. 2005. High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am J Clin Nutr* 82: 894-900.
3. Ha, Y. L., J. Storkson, and M. W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1101.
4. Hubbard, N. E., D. Lim, and K. L. Erickson. 2003. Effect of separate conjugated linoleic acid isomers on murine mammary tumorigenesis. *Cancer Lett* 190: 13-19.
5. Ip, C., S. F. Chin, J. A. Scimeca, and M. W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124.
6. Shiraishi, R., R. Iwakiri, T. Fujise, T. Kuroki, T. Kakimoto, T. Takashima, Y. Sakata, S. Tsunada, Y. Nakashima, T. Yanagita, and K. Fujimoto. 2010. Conjugated linoleic acid suppresses colon carcinogenesis in azoxymethane-pretreated rats with long-term feeding of diet containing beef tallow. *J Gastroenterol* 45: 625-635.
7. Yasui, Y., R. Suzuki, H. Kohno, S. Miyamoto, F. Beppu, M. Hosokawa, K. Miyashita, and T. Tanaka. 2007. 9trans,11trans conjugated linoleic acid inhibits the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Nutr Cancer* 59: 82-91.
8. Bougnoux, P., N. Hajjaji, K. Maheo, C. Couet, and S. Chevalier. 2010. Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* 49: 76-86.
9. Cho, E., D. Spiegelman, D. J. Hunter, W. Y. Chen, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, and W. C. Willett. 2003. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 1079-1085.
10. Majumder, B., K. W. Wahle, S. Moir, A. Schofield, S. N. Choe, A. Farquharson, I. Grant, and S. D. Heys. 2002. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *FASEB J* 16: 1447-1449.
11. Masso-Welch, P. A., D. Zangani, C. Ip, M. M. Vaughan, S. Shoemaker, R. A. Ramirez, and M. M. Ip. 2002. Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. *Cancer Res* 62: 4383-4389.
12. Palombo, J. D., A. Ganguly, B. R. Bistrian, and M. P. Menard. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett* 177: 163-172.
13. Park, H. S., J. H. Ryu, Y. L. Ha, and J. H. Park. 2001. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-

treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86: 549-555.

14. Kelley, N. S., N. E. Hubbard, and K. L. Erickson. 2007. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J Nutr* 137: 2599-2607.
15. Cho, H. J., W. K. Kim, J. I. Jung, E. J. Kim, S. S. Lim, D. Y. Kwon, and J. H. Park. 2005. Trans-10,cis-12, not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid decreases ErbB3 expression in HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 11: 5142-5150.
16. Lee, S. H., K. Yamaguchi, J. S. Kim, T. E. Eling, S. Safe, Y. Park, and S. J. Baek. 2006. Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. *Carcinogenesis* 27: 972-981.
17. Miller, A., C. Stanton, and R. Devery. 2002. Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res* 22: 3879-3887.
18. Cho, H. J., G. T. Kwon, and J. H. Park. 2009. trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid induces depolarization of mitochondrial membranes in HT-29 human colon cancer cells: a possible mechanism for induction of apoptosis. *J Med Food* 12: 952-958.
19. Ou, L., C. Ip, B. Lisafeld, and M. M. Ip. 2007. Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 1044-1049.
20. Jakobsen, C. H., G. L. Storvold, H. Bremseth, T. Follestad, K. Sand, M. Mack, K. S. Olsen, A. G. Lundemo, J. G. Iversen, H. E. Krokan, and S. A. Schonberg. 2008. DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *J Lipid Res* 49: 2089-2100.
21. Ron, D., and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529.
22. Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman, and A. Samali. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7: 880-885.
23. Lee, K., W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori, and R. J. Kaufman. 2002. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16: 452-466.
24. Okada, T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi, and K. Mori. 2002. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366: 585-594.
25. Puthalakath, H., L. A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P. N. Kelly, N. D. Huntington, P. D. Hughes, E. M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet, and A. Strasser. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129: 1337-1349.

26. Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens, and D. Ron. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12: 982-995.
27. Qiao, D., E. Im, W. Qi, and J. D. Martinez. 2002. Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1583: 108-116.
28. Moyer, M. P., L. A. Manzano, R. L. Merriman, J. S. Stauffer, and L. R. Tanzer. 1996. NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 315-317.
29. Malhotra, J. D., and R. J. Kaufman. 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 9: 2277-2293.
30. Tabas, I., and D. Ron. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13: 184-190.
31. Hsu, Y. C., X. Meng, L. Ou, and M. M. Ip. 2010. Activation of the AMP-activated protein kinase-p38 MAP kinase pathway mediates apoptosis induced by conjugated linoleic acid in p53-mutant mouse mammary tumor cells. *Cell Signal* 22: 590-599.
32. Li, G., M. Mongillo, K. T. Chin, H. Harding, D. Ron, A. R. Marks, and I. Tabas. 2009. Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 186: 783-792.
33. Timmins, J. M., L. Ozcan, T. A. Seimon, G. Li, C. Malagelada, J. Backs, T. Backs, R. Bassel-Duby, E. N. Olson, M. E. Anderson, and I. Tabas. 2009. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest* 119: 2925-2941.
34. Sung, B., J. Ravindran, S. Prasad, M. K. Pandey, and B. B. Aggarwal. 2010. Gossypol induces death receptor-5 through activation of the ROS-ERK-CHOP pathway and sensitizes colon cancer cells to TRAIL. *J Biol Chem* 285: 35418-35427.
35. Santos, C. X., L. Y. Tanaka, J. Wosniak, and F. R. Laurindo. 2009. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 11: 2409-2427.
36. Namba, T., K. Tanaka, Y. Ito, T. Ishihara, T. Hoshino, T. Gotoh, M. Endo, K. Sato, and T. Mizushima. 2009. Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis. *Am J Pathol* 174: 1786-1798.

37. Bergamo, P., D. Luongo, and M. Rossi. 2004. Conjugated linoleic acid--mediated apoptosis in Jurkat T cells involves the production of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem* 14: 57-64.
38. Hsu, Y. C., and M. M. Ip. 2011. Conjugated linoleic acid-induced apoptosis in mouse mammary tumor cells is mediated by both G protein coupled receptor-dependent activation of the AMP-activated protein kinase pathway and by oxidative stress. *Cell Signal* 23: 2013-2020.
39. Schonfeld, P., and L. Wojtczak. 2008. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45: 231-241.
40. Stachowska, E., M. Baskiewicz-Masiuk, V. Dziedziejko, I. Gutowska, I. Baranowska-Bosiacka, M. Marchlewicz, B. Dolegowska, B. Wiszniewska, B. Machalinski, and D. Chlubek. 2008. Conjugated linoleic acid increases intracellular ROS synthesis and oxygenation of arachidonic acid in macrophages. *Nutrition* 24: 187-199.
41. Santos, L. R., E. Rebelato, M. F. Graciano, F. Abdulkader, R. Curi, and A. R. Carpinelli. 2011. Oleic acid modulates metabolic substrate channeling during glucose-stimulated insulin secretion via NAD(P)H oxidase. *Endocrinology* 152: 3614-3621.
42. Seifert, E. L., C. Estey, J. Y. Xuan, and M. E. Harper. 2010. Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H₂O₂ emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 285: 5748-5758.
43. Demizieux, L., P. Degrace, J. Gresti, O. Loreau, J. P. Noel, J. M. Chardigny, J. L. Sebedio, and P. Clouet. 2002. Conjugated linoleic acid isomers in mitochondria: evidence for an alteration of fatty acid oxidation. *J Lipid Res* 43: 2112-2122.
44. Evans, M., X. Lin, J. Odle, and M. McIntosh. 2002. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 132: 450-455.
45. Minville-Walz, M., A. S. Pierre, L. Pichon, S. Bellenger, C. Fevre, J. Bellenger, C. Tessier, M. Narce, and M. Rialland. 2010. Inhibition of stearyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells. *PLoS One* 5: e14363.
46. Choi, Y., Y. Park, J. M. Storkson, M. W. Pariza, and J. M. Ntambi. 2002. Inhibition of stearyl-CoA desaturase activity by the cis-9,trans-11 isomer and the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 785-790.
47. Park, Y., J. M. Storkson, J. M. Ntambi, M. E. Cook, C. J. Sih, and M. W. Pariza. 2000. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochim Biophys Acta* 1486: 285-292.

Figure 1

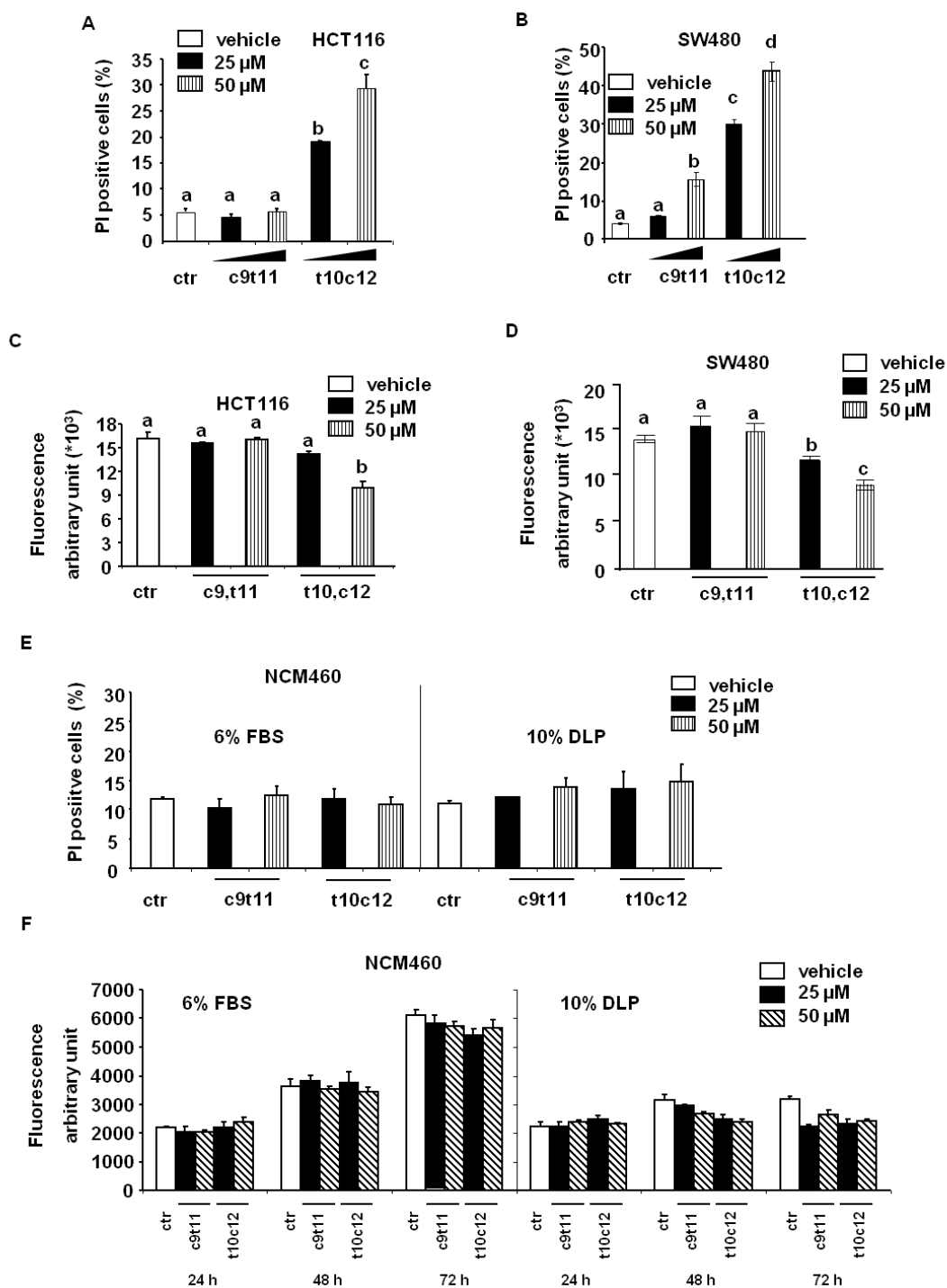


Fig. 1. Colon cancer cell proliferation inhibited by t10,c12 CLA. (A) and (B) HCT116 and SW480 cell death was measured by flow cytometry with propidium iodide (PI) staining at 72 hours post-treatment with control (ctr), c9,t11 CLA (25 and 50 μ M) and t10,c12 CLA (25 and 50 μ M) in 6 % FBS (HCT116 cells) and 10 % delipidated (DLP) FBS (SW480 cells). Each value was the mean of three independent experiments $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (C) and (D) Proliferation status of HCT116 and SW480 colon cancer cells was

determined by CyQuant® proliferation assay. Each value was the mean of relative fluorescence unit $\pm$ SEM of triplicate and representative of three independent experiments. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (E) Cell death of normal-derived colon cells (NCM460) was evaluated at 72 hours as (A) and (B). Each value was the mean of relative fluorescence unit $\pm$ SEM of triplicate and representative of three independent experiments. (F) Proliferation of NCM460 cells in both conditions of cell culture as (A) and (B) was determined by CyQuant® proliferation assay. Each value was the mean of relative fluorescence unit $\pm$ SEM of triplicate and representative of three independent experiments.

Figure 2

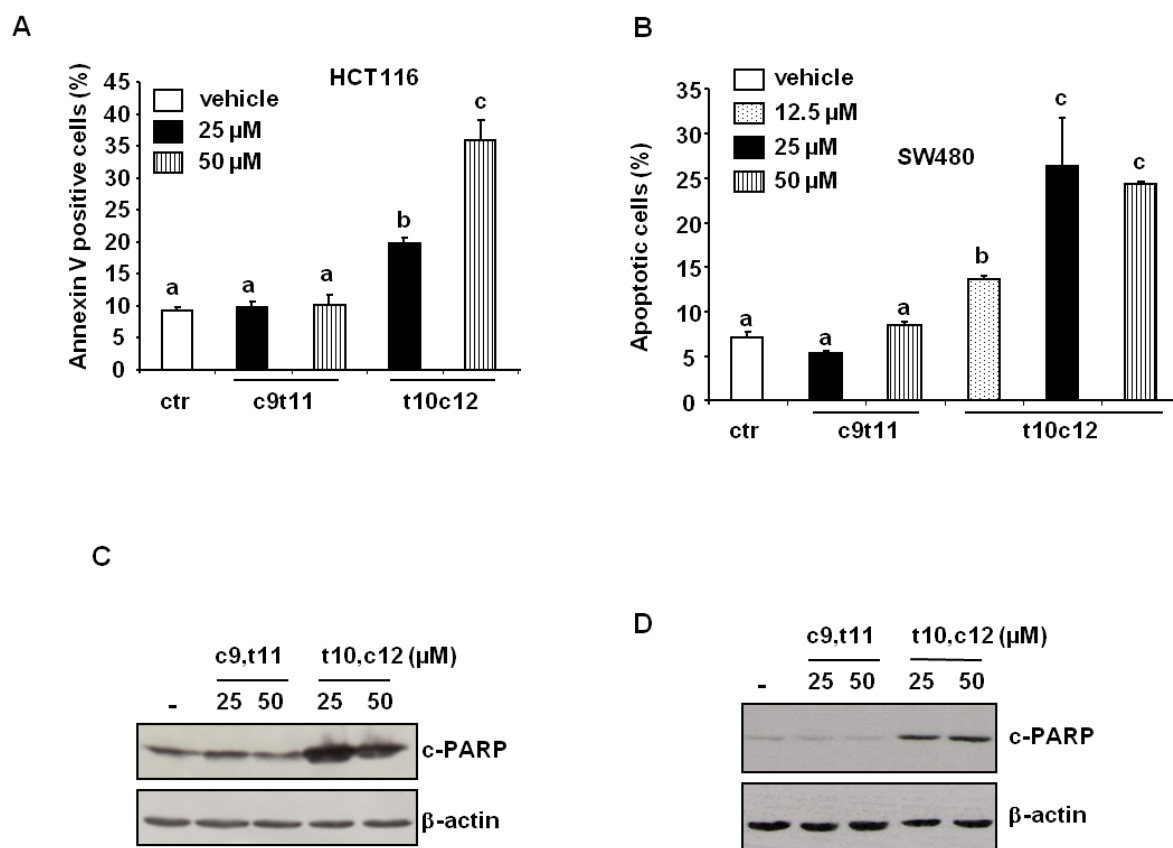


Fig. 2. Apoptosis in t10,c12 CLA-treated colon cancer cells. (A) HCT116 cells treated for 72 hours with control vehicle (ctr) and indicated concentrations of CLA isomers were stained with Annexin V-FITC for measurement of apoptosis. Each value was the mean of three independent experiments $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (B) Apoptosis in SW480 cells in was evaluated 72 hours after treatment by Hoeschst staining at indicated concentrations. Nuclei were counted using phase contrast microscope and results were expressed as % of positive apoptotic nuclei / total nuclei. Each value was the mean of three independent experiments $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (C) and (D) Protein whole-cell lysates were prepared 72 hours after treatment and PARP cleavage (c-PARP) was determined by western-blot.

Figure 3

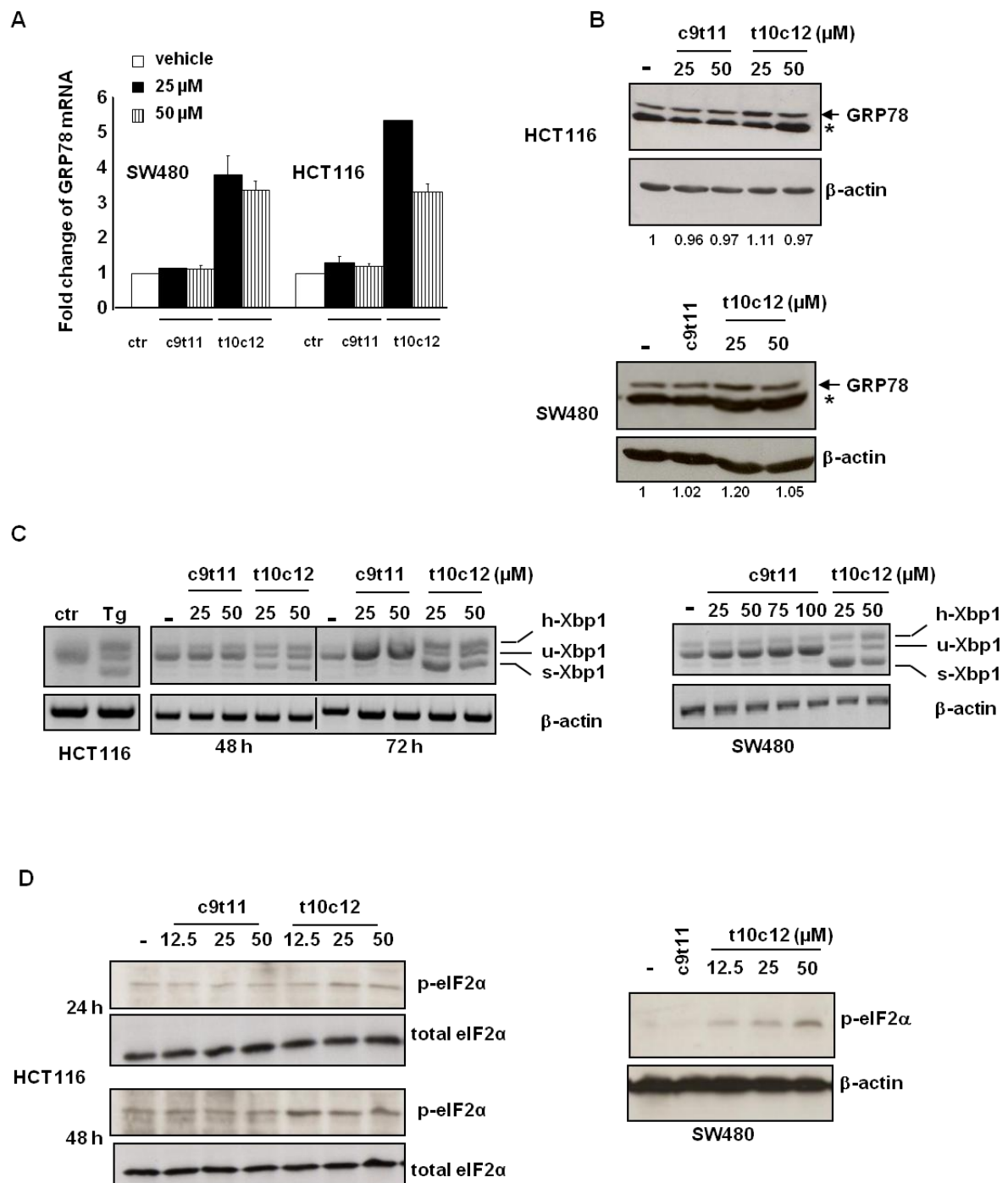


Fig. 3. ER stress pathway is activated by t10,c12 CLA. (A) Cancer cells were treated 72 hours with vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 and 50 μ M. GRP78 mRNA expression has been analyzed by RT-qPCR and normalized to β -actin expression. Values represented GRP78 mRNA expression in CLA treated-cells relative to GRP78 expression in vehicle-treated cancer cells and were the mean of three independent experiments performed in triplicate $\pm$ SEM. (B) Analysis of GRP78 protein expression

was performed by western-blotting. Protein whole-cell lysates were prepared from SW480 and HCT116 cells treated for 72 hours with vehicle (-), c9,t11 CLA (50 μ M) and t10,c12 CLA (25 and 50 μ M). *, non specific. β -actin was used to normalize loading. (C) Treatment of HCT116 cells for 48 and 72 hours, and SW480 cells for 72 hours was performed at indicated concentrations with c9,t11 and t10,c12 CLA. Xbp1 mRNA processing was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The detected Xbp1 mRNA species were spliced- (s-Xbp1), unspliced- (u-Xbp1) and hybrid-Xbp1 (h-Xbp1) mRNA. Thapsigargin (Tg) was used as positive control of Xbp1 mRNA splicing. (D) HCT116 cells (24 and 48 hours post-treatment) and SW480 cells (72 hours post-treatment) at indicated concentrations were collected for phospho-eIF2 α protein expression analysis.

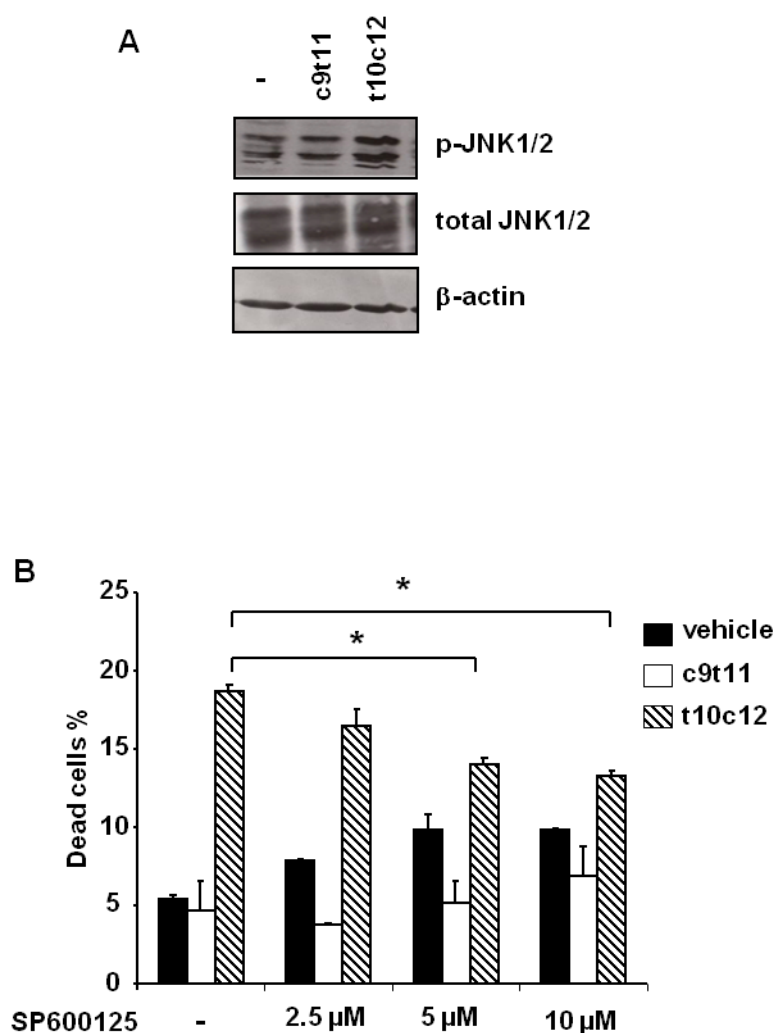
Figure 4

Fig. 4. JNK signaling contributed to t10,c12 CLA-induced cell death. (A) HCT116 cells were collected 72 hours after treatment by vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA (50 μ M) for phospho-JNK, total JNK protein expression analysis by western-blotting. (B) Inhibition of JNK signaling in HCT116 cell death treated with vehicle (-) or 50 μ M of CLA isomers for 72 hours was performed with indicated concentrations of SP600125. Analysis of cell death was realized by trypan blue exclusion assay. The graph is representative of three independent experiments. Each value was the mean of triplicate $\pm$ SEM. * statistically different ($p < 0.05$).

Figure 5

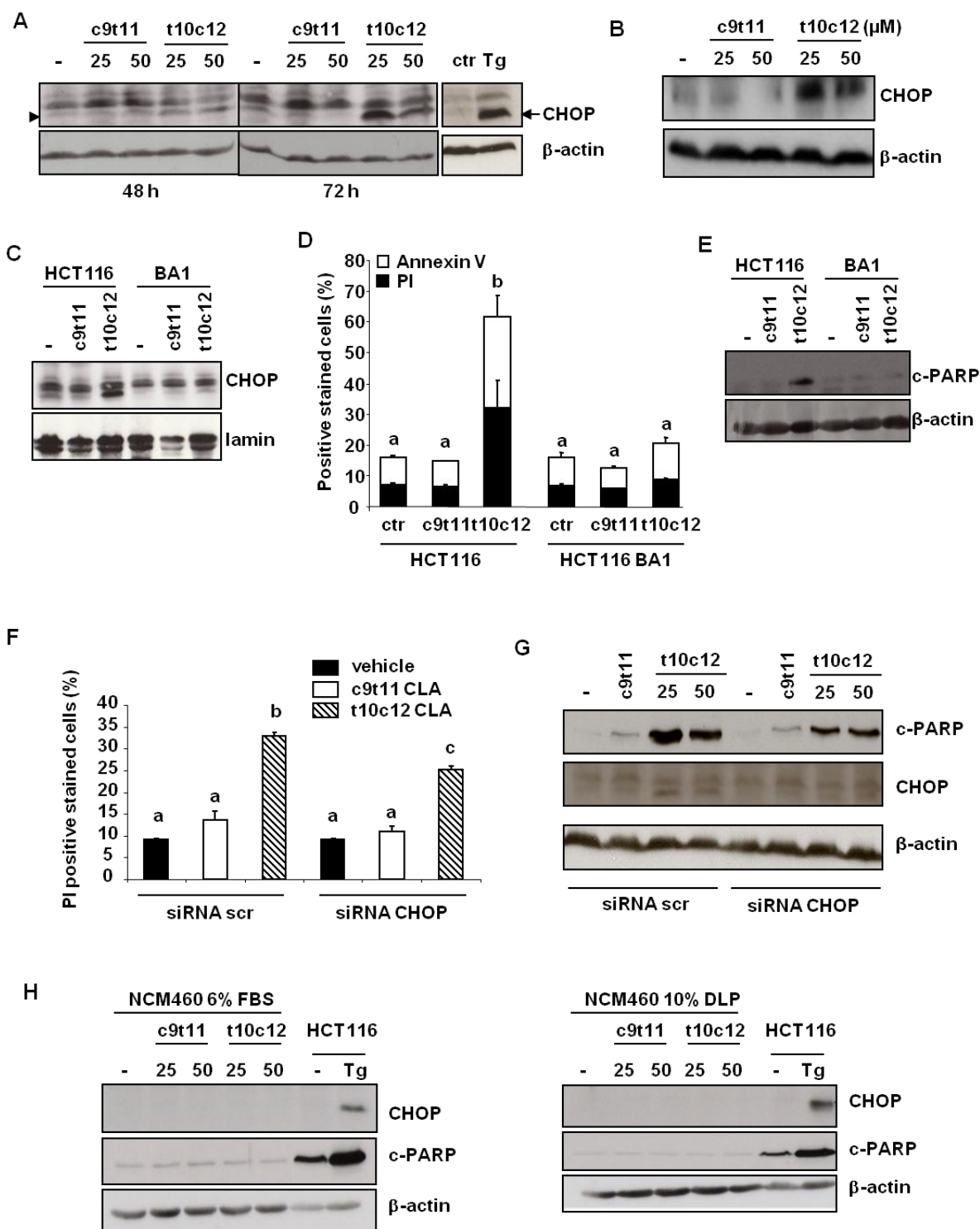


Fig. 5. Inhibition of CHOP expression reduced t10,c12 CLA-induced apoptosis. (A) HCT116 cells were collected 48 hours and 72 hours post-treatment with vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 and 50 μ M for CHOP protein expression analysis by western-blotting. Thapsigargin (Tg) treatment was used as positive control of CHOP

induction. (B) SW480 cells were collected 72 hours post-treatment with vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 and 50 μ M for CHOP protein expression analysis by western-blotting. (C) HCT116-BA1 (with CHOP antisense cDNA construct) and HCT116 cells treated for 72 hours with vehicle control (ctr) or CLA isomers were collected for preparation of nuclear proteins. Analysis of nuclear CHOP expression was performed by western-blotting. Lamin A/C was used as loading control of nuclear extract samples. (D) HCT116-BA1 and HCT116 cells treated for 72 hours with vehicle control (ctr) or 50 μ M CLA isomers were stained with PI or Annexin V-FITC. Each value was the mean of three independent experiments $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (E) HCT116-BA1 and HCT116 cells treated for 72 hours with control vehicle (-) or 50 μ M CLA isomers were collected for c-PARP expression analysis by western-blotting. (F) SW480 cells were transfected with siRNA against unrelated human mRNA (scr) and CHOP (siRNA CHOP). Next day, SW480 cells were exposed to vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 50 μ M for 72 hours. Death status was measured by flow cytometry with propidium iodide (PI) staining. Each value was the mean of three independent experiments performed in triplicate $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (G) SW480 cells were transfected and treated as in (F) with vehicle (-), c9,t11 CLA (50 μ M), and t10,c12 CLA (25 and 50 μ M). Protein whole-cell lysates were prepared for PARP cleavage and CHOP expression analysis by western-blot. (H) Normal-derived colon cells (NCM460) were treated for 72 hours with indicated concentrations of CLA isomers in 6 % FBS or 10 % delipidated (DLP) FBS. NCM460 cells were collected for analysis of CHOP and c-PARP expression by western-blotting.

Figure 6

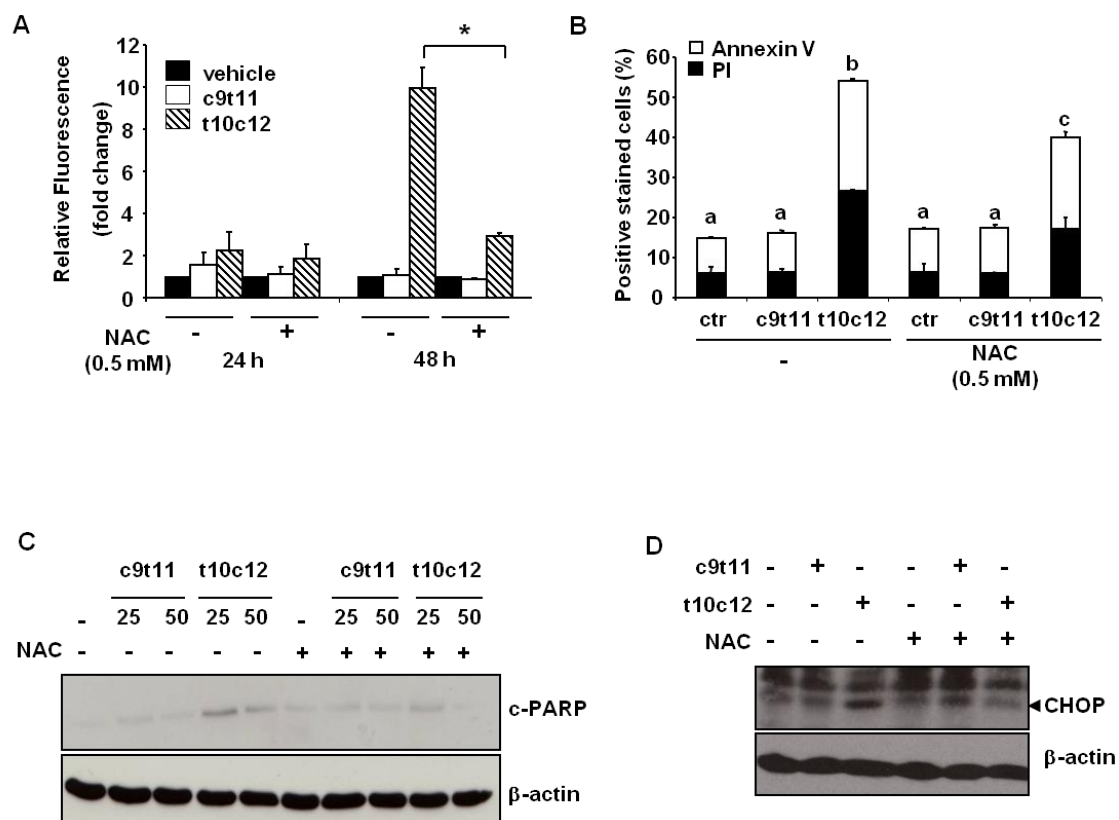


Fig. 6. ROS generation induced t10,c12 CLA-mediated apoptosis. (A) HCT116 cells treated for 24 and 48 hours with c9,t11 and t10,c12 CLA at 50 μ M in presence or absence of 0.5 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC) were analyzed for their ROS content by H2DCFDA fluorescence. Values represented H2DCFDA fluorescence in CLA treated-cells relative to H2DCFDA fluorescence in vehicle-treated cancer cells. Each value was the mean of three independent experiments performed in triplicate $\pm$ SEM. * statistically different ($p < 0.05$). (B) HCT116 cells treated for 72 hours with vehicle control (ctr) and 50 μ M CLA isomers in presence or absence of 0.5 mM NAC were stained with PI or Annexin V-FITC. Each value was the mean of three independent experiments $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (C) HCT116 cells were treated as in (B) with c9,t11 and t10,c12 CLA (25 and 50 μ M). Protein whole-cell lysates were prepared 72 hours after treatments and PARP cleavage expression was analyzed by western-blot. (D) HCT116 cells were treated as in (B) with c9,t11 and t10,c12 CLA (50 μ M). Protein whole-cell lysates were prepared 72 hours after treatments and CHOP expression was analyzed by western-blot.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbalip

The metabolic cascade leading to eicosanoid precursors – desaturases, elongases, and phospholipases A₂ – is altered in Zucker fatty rats

Cécile Fèvre, Sandrine Bellenger, Anne-Sophie Pierre, Méline Minville, Jérôme Bellenger, Joseph Gresti, Mickaël Rialland, Michel Narce*, Christian Tessier*

INSERM UMR 866/Université de Bourgogne, Lipides Nutrition Cancer, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2010

Received in revised form 18 November 2010

Accepted 10 December 2010

Available online 21 December 2010

Keywords:

Metabolic syndrome

Desaturase

Elongase

Phospholipase A₂

ABSTRACT

Metabolic syndrome characterized by insulin resistance and obesity is accompanied by severe lipid metabolism perturbations and chronic low-grade inflammation. However, many unresolved questions remained regarding the regulation that underlie dyslipidemia, particularly the regulation of the metabolic cascade (synthesis and release) leading to eicosanoid precursors release. This study was undertaken to investigate the regulation of desaturases/elongases and phospholipases A₂ during the establishment of metabolic syndrome. Our results showed that delta-6 desaturase as well as elongase-6 expressions were upregulated in 3-month-old Zucker fatty rats as compared to lean littermates, independently of SREBP-1c activation. We also demonstrated for the first time an increase of liver group VII phospholipase A₂ gene expression in the obese animals together with a strong specific inhibition of type IVA and VIA phospholipases A₂. These results suggest that the regulation of unsaturated fatty acids biosynthesis and signalling cascade could contribute to the development of liver lipid dysregulation related to metabolic syndrome and may be considered as new potential targets in such pathological conditions.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MS) is a complex disease marked by the dysfunction of glucose and lipid metabolism, which is often associated with chronic low-grade inflammation. A wide variety of bioactive lipid mediators including prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and lipoxins exert potent and pleiotropic effects modulating inflammatory responses. These compounds are generated via phospholipase A₂ (PLA₂) hydrolysis [1]. The PLA₂ superfamily consists of many different groups of enzymes that catalyze the hydrolysis of the sn-2 ester bond, releasing fatty acid, and particularly arachidonic acid (AA), from a variety of phospholipids. Five main types of PLA₂ have been identified, which are the secreted sPLA₂s, the cytosolic cPLA₂s, the Ca²⁺ independent iPLA₂s, the platelet activating factor acetyl hydrolase/oxidized lipid lipoprotein associated (Lp)-PLA₂s, and the lysosomal PLA₂s [2,3].

These enzymes mediate a variety of important physiological and pathological functions such as cellular proliferation, apoptosis,

atherosclerosis [4–6]. PLA₂ isoforms play different but complementary roles in inflammatory processes [7]. Nevertheless, these enzymes have never been investigated in MS-linked inflammation. While type IIA sPLA₂ was the major enzyme found elevated in the systemic circulation of patients with various acute and inflammatory diseases [8], other sPLA₂ isoforms have been reported to be elevated locally at sites of inflammation and cell injury [9]. In addition, an increase of secreted PLA₂ level in the plasma, such as sPLA₂ IIA and Lp-PLA₂, is a new potential marker of inflammation [10]. Besides, type IVA cPLA₂ and type VIA iPLA₂, sources of AA [11,12], seems to be particularly implicated in inflammatory processes. More specifically, the importance of type IVA Ca²⁺-dependent cPLA₂ in many different inflammatory processes has been proven through the use of null mice showing significant decreases in allergic response, damage from acute lung injury and post-ischemic brain injury [13–15]. Type VIA iPLA₂ has also been shown to play an important role in driving acute inflammation [16]. Consequently, the role of the different PLA₂ isoforms remains to be clearly delineated, notably in MS-linked inflammation conditions.

Regarding MS, it is now accepted that inflammation associated with visceral obesity induces insulin resistance, which is sufficient to promote the progression of cardiovascular diseases. This is accompanied by severe liver lipid metabolism perturbations leading to liver steatosis [17]. However, many contradictory and unresolved questions remain regarding the molecular and cellular mechanisms that underlie this hepatic lipid dysregulation. Nevertheless, higher liver

Abbreviations: MS, metabolic syndrome; AA, arachidonic acid; UFA, unsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid; MUFA, mono-unsaturated fatty acid; ZF, Zucker fatty; ZL, Zucker lean; PUFA, poly-unsaturated fatty acid

* Corresponding authors. Narce is to be contacted at Tel.: +33 3 80 39 63 17. Tessier, Tel.: +33 3 80 39 63 23.

E-mail addresses: michel.narce@u-bourgogne.fr (M. Narce), christian.tessier@u-bourgogne.fr (C. Tessier).

expression of elongases (Elovl-5 and -6) and desaturases (delta-5, -6, and SCD-1) have been shown in ob/ob mice, compared with their lean littermates [18]. In contrast, resistance to high-fat-diet-induced hepatosteatosis and obesity has been associated with an increased capacity to convert *n*-6 unsaturated fatty acids (UFA) into AA via higher expressions of microsomal Elovl-5 and delta-5, -6 desaturases [19].

Altogether, these data underlie that the regulation of the different steps leading to the synthesis and release of eicosanoid precursors could play an important part in the modulation of MS-associated inflammation. We still do not know how liver UFA biosynthetic and signalling enzymes (desaturases, elongases, and phospholipases A₂) are regulated during the establishment of MS. To better understand these aspects, we investigated here the liver UFA biosynthesis and signalling pathways (desaturases, elongases, and phospholipases A₂) in 3-month-old Zucker rats. Indeed, it is important to understand cellular mechanisms leading to liver steatosis in order to prevent and to develop novel therapeutic strategies targeting for liver insulin resistance during MS.

2. Materials and methods

2.1. Animals, organs, and blood parameters measurements

Animal experimental procedures were approved by the Ethic Committee on Experimental Animals of the University of Burgundy, Dijon, France. Ten-week-old male Zucker fatty (*fa/fa*, ZF) and Zucker lean (*fa/+*, ZL) rats (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed under controlled temperature (25 ± 1 °C) and humidity (60 ± 5%) with a 12-h day/12-h night cycle. Animals were fed standard laboratory chow (commercial standard pellets; Safe, U.A.R. A04, Villemoisson-sur-Orge, France) containing 4% lipids and were all sacrificed at 14 weeks of age.

For oral glucose tolerance test (OGTT) at 12 weeks of age, rats received, after a 12-h overnight fast, an oral glucose injection (2 g glucose/kg body weight). Glycemia were measured using a One Touch II glucometer (Lifescan, Johnson and Johnson, Milpitas, CA, USA) before gavage, and after 15, 30, 60, and 120 min.

For plasma triglycerides and cholesterol measurements, rats were fasted 12-h overnight and blood samples were collected on 10% EDTA under isoflurane anesthesia. Plasma were isolated by centrifugation (20 min at 200g) and then stored at -80 °C until use. Plasmatic triglycerides and cholesterol were measured according to the manufacturer's instructions, using a colorimetric kit (Diasys, Condom, France). Before insulin measurement, plasma were centrifuged to remove fat and insulin was measured using an ELISA kit (Linco Research, St. Charles, MO, USA).

At 14 weeks of age, non-anesthetized, fed rats were sacrificed and plasma were prepared as previously described. Livers and pancreas were isolated and stored at -80 °C until use. For immunofluorescence studies, pancreas were incubated for 24 h in a 30% sucrose solution. They were then embedded in a matrix (Shandon M-1 embedding matrix, Thermo Fisher Scientific, Cergy-Pontoise, France) and rapidly frozen at -20 °C until use. Pancreas were then cut with a cryostat (Leica CM 3050 S, Leica Camera AG, Solms, Germany) into 10-µm thin cross-sections, stuck on microscope Superfrost slides (Microm, Francheville, France) and stored at -80 °C.

2.2. Secreted PLA₂ activity

sPLA₂ activity was carried out directly on plasma collected at sacrifice, using a sPLA₂ Assay Kit (SPI-bio, Montigny-le-Bretonneux, France) according to the manufacturer's instructions. Enzyme activity measurement is based on the hydrolysis of 1,2-dithio analog of diheptanoyl phosphatidylcholine by sPLA₂. Thiols released in solution by PLA₂ activities present in homogenates combined with DNTB

added to the reaction medium to form a colored compound, detected at 414 nm.

Proteins quantity was measured using the bicinchoninic acid method (BCA kit, Sigma, Lyon, France).

2.3. Pancreas immunofluorescence

Pancreatic slices were dried 2 h at 37 °C, fixed in a solution containing 75% methanol, 20% formaldehyde, 5% acetic acid, and rehydrated in PBS 10 mM pH 7.4. Cross-sections were permeabilized and saturated with TBS 10 mM, 10% BSA, 0.1% Triton X100, 0.2% Tween 20 at room temperature. Slices were then incubated overnight at +4 °C in a wet room with anti-insulin antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) at a 1:200 final dilution in TBS 10 mM, 4% BSA, 0.01% Triton X100, 0.02% Tween 20. Control slices were treated with TBS-BSA-Triton-Tween alone. Slices were then exposed for 3 h at room temperature to a rhodamine-antirabbit IgG (1:200 dilution) (Jackson ImmunoResearch). Nuclei were stained with a Hoechst 33342 solution (1:100 dilution) for 5 min. The coverslips were mounted in FluoPrep medium (BioMérieux, Craponne, France), and images were acquired using an inverted fluorescence microscope Axiovert 200 M (Zeiss, Oberkochen, Germany) with appropriate filters and a cooled charged-coupled device camera controlled with AxioVision software (Zeiss).

2.4. Liver microsomes preparation

At sacrifice, livers were quickly removed and rinsed with 0.15 M NaCl and weighed. 3.5 g of each liver were cut into thin slices and homogenized at 4 °C in a Potter-Elvehjem homogenizer with 18 mL of a solution containing 0.05 M phosphate buffer pH 7.4 and 0.25 M saccharose. Liver microsomes were then prepared as previously described [20]. Microsomal protein concentration was determined by the method of Layne [21], using bovine serum albumin as standard.

2.5. SCD-1, delta-6 *n*-3, and delta-6 *n*-6 desaturase activities

SCD-1, delta-6 *n*-3, and delta-6 *n*-6 desaturase activities were estimated in liver microsomes, using 50, 40, and 40 nmol of [1-¹⁴C] stearic, [1-¹⁴C] alpha-linolenic or [1-¹⁴C] linoleic acids, respectively, as substrates. 2.5 mg of microsomal proteins were incubated at 37 °C for 20 min in a shaken glass with a total volume of 1.1 mL incubation medium containing 72 mM phosphate buffer pH 7.4, 4.8 mM MgCl₂, 0.5 mM coenzyme A, 3.6 mM ATP, and 1.2 mM NADPH. Incubations were stopped by adding 7.5 mL of chloroforme/methanol (1:1, v/v) [22]. Total lipids were extracted from incubation mixtures, according to Narce et al. [23]. Briefly, 2 mL chloroform, HCl 0.05 M, and NaCl 35% were added to an aliquot (4 mL) of the incubation mixtures; total lipids were extracted after centrifugation. Then saponification and transmethylation were carried out using methanol NaOH 0.5 M and 14% boron trifluoride in methanol, respectively, for 20 min at 80 °C, according to Slover and Lanza [24]. The distribution of radioactivity between each substrate and the corresponding products was determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography as described by Bellenger et al. [25] using a Waters Set (510 HPLC pump and 410 differential refractometer; Millipore, Molsheim, Germany) equipped with two monolithic columns [26]. Analyses were carried out isocratically using pure acetonitrile or acetonitrile/water (93:7, v/v) for SCD-1 and D6D, respectively, as a mobile phase, at a flow rate of 1 mL/min. The fatty acid methyl ester mixtures were dissolved in pure acetonitrile before injection. ¹⁴C radioactivity was directly measured by liquid scintillation with a Packard Tri-Carb model 1900 TR (Packard, Meriden, CT, USA) liquid scintillation analyzer. The fatty acid methyl esters were identified according to their retention times by comparison with standards: mixture reference standard 1B (Nu Check Prep, Elysian, MN, USA) for SCD-1

activity, grape-seed oil for the delta-6 n-3 desaturation and mixture reference standard 1C (Nu Check Prep) for the delta-6 n-6 desaturation.

2.6. Fatty acid of total lipids composition

Fatty acid composition of liver total lipids was determined by gas-liquid chromatography [23]. Briefly, total lipids were extracted and methylated using methanol NaOH and boron trifluoride, as described above. Fatty acid methyl esters (FAME) were then extracted with 2 mL hexane and separated by gas-liquid chromatography (438A model, Packard) equipped with a FID and a 30-m long and 0.32-mm diameter capillary glass column coated with Carbowax 20 M (Applied Science Labs, State College, PA, USA). FAME were identified by their relative retention times (gas-liquid chromatography model mixture reference standard 68B; Nu Check Prep).

2.7. RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR analysis

Total RNA from liver or pancreas was extracted using Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, RNAs were extracted using chloroform and precipitated with isopropanol, and finally washed with 75% ethanol.

Oligonucleotide primer pairs (MWG, Ebersberg, Germany), used for mRNA analysis by RT-PCR, were based on the sequences of rat genes (Table 1), designed by the OligoPerfect Designer software (Invitrogen). 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using random hexamers and oligo-dT, provided by the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) at 42 °C for 30 min. 30 µL of nuclease-free water was added to the 20 µL final volume of reaction mixture at the end of the RT reaction. The cDNA were stored at −20 °C until use.

Table 1
Primers sequences used for RT-PCR.

Gene	Primer sequences	Expected size (pb)	Number of cycles
β-Actin	S: 5' ATGATATCGCCGCTCGTCGTC 3' AS: 5' AGGTCCCGGCCAGCCAGTCCAG 3'	547	23
L19	S: 5' CTGAAGGTCAAGGGAATGTG 3' AS: 5' GGACAGAGTCTTGATGATCTC 3'	195	23
FAS	S: 5' CTCACCCAGGGGTAGAGATAAGTA 3' AS: 5' AGACTCCAACGAGCTAGAGACATT 3'	440	25
SCD-1	S: 5' TGGGAAGTGAAGCGAGCAACCG 3' AS: 5' AGAGGGGACCTTCTTCTCTCTC 3'	149	22
D6D	S: 5' ATGGGGAAGGAGGTAAC 3' AS: 5' GAAATCCAGGTCCAGGTG 3'	243	24
D5D	S: 5' CAACCATCTCTCTCC 3' AS: 5' AGGTGATTCATGTTGAGGTG 3'	204	24
Elovl-1	S: 5' CCTACCTTTGGTGAAGAA 3' AS: 5' TCCAGATGAGGTGGATGATG 3'	136	30
Elovl-2	S: 5' TTGGCTGTCTATCTTCA 3' AS: 5' GGGAAACCATCTTCACTTC 3'	134	30
Elovl-5	S: 5' TCAACAGCTTCATCCAGTC 3' AS: 5' AGAGGCCCTTCTTGTGT 3'	266	21
Elovl-6	S: 5' GCCATGTTTCATCCTTGTG 3' AS: 5' CGCATGTAGGCTCCTCAAGAA 3'	191	27
SREBP-1c	S: 5' GCACAGCAACAGAACTCA 3' AS: 5' CCAGGTCTTTCAGTGATTGC 3'	177	25
sPLA ₂ IIA	S: 5' CTGGAGTTTGGGCAATGAT 3' AS: 5' ACGTTTCTCCAGCGGTTGT 3'	165	27
sPLA ₂ VII	S: 5' TTCCAAGGCTCTCAGTGCA 3' AS: 5' ATCAAGGGCAATCCACATC 3'	202	30
cPLA ₂ IVA	S: 5' CCACCTGATTTCCAGAGA 3' AS: 5' GGCAACATCAGCTCTGACA 3'	316	27
cPLA ₂ VIA	S: 5' GCCAACAGCAGAGAAATGA 3' AS: 5' CTGTAGCACTGGGGATTGT 3'	180	27
Insulin	S: 5' CACCTTTGTGGTCTCTCACT 3' AS: 5' GACGGGACCTGGGTGTGTAG 3'	82	18
Glucagon	S: 5' AACAACTTGGCAACGTC 3' AS: 5' CAGCTATGGCGACTCTCTCC 3'	125	23

For PCR amplification, 12.5 µL of Go Taq Green Master Mix (Promega, Charbonnières, France), containing Taq polymerase, 400 µM of each dNTP, 3 mM MgCl₂, reaction buffer, and loading buffer were mixed with specific oligonucleotide primers (1 µM each) and 2 µL cDNA. The total volume was increased to 25 µL with nuclease-free water. For PCR amplification of gene products, two sets of amplification cycles were used. In the first five cycles, annealing/extension step temperature (69 °C) for 5 min was followed by denaturation temperature (95 °C) for 1 min. In the second set of amplification, for 18–30 cycles depending on each PCR-amplified product (Table 1), annealing temperature of the primer (62 °C) for 1 min was followed by extension temperature (72 °C) for 1 min and another denaturation temperature (95 °C) for 1 min. The conditions were such that amplification of the product was in exponential phase, and the assay was linear with respect to the amount of input cDNA. Rat β-actin or L19 was used as internal control to normalize the data. Reaction products were electrophoresed on a 1% agarose gel impregnated with ethidium bromide. The RNA pattern was visualized by UV transillumination and quantified using the Quantity One software (BioRad).

2.8. Western blotting

For Western blot analysis, 50–80 mg of livers were homogenized in RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.5, NP40 1%, SDS 0.1%, deoxycholate 0.5%, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) containing protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma) using a Potter-Elvehjem homogenizer and a syringe with a 25-G needle, and centrifuged at 10,000g for 10 min at +4 °C. Supernatants were collected and proteins were dosed using the bicinchoninic acid method (BCA kit, Sigma). 30–50 µg proteins were added to the loading buffer (Tris-HCl 0.03 M pH 6.8, DTT 0.05 M, glycerol 8%, bromophenol blue 0.05%, SDS 2%, β-mercaptoethanol 2.5%) and warmed 3 min at 95 °C.

Proteins were separated on an acrylamide/bisacrylamide gel SDS 0.1% in a Tris-glycine buffer (Tris 72 mM, glycine 200 mM, SDS 0.1%), blotted to nitrocellulose membrane (Whatman, Springfield, England) in a transfer buffer (Tris 25 mM, glycine 200 mM, methanol 20%, SDS 0.2%) and immunodetected using the ECL Western blotting procedure (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Antibodies were used as shown in Table 2. Secondary antibodies (goat anti-rabbit or goat anti-mouse, Jackson Immuno-Research) were used at a 1:10,000 dilution and incubated 1 h at RT.

2.9. Statistical analysis

Results are shown as mean ± SEM. Statistical analysis of data was carried out using the Student t-test and statistical difference was accepted at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***).

3. Results

3.1. Zucker rats carbohydrate and lipid status

As shown in Fig. 1A, at the age of 14 weeks, ZF rat body weight was increased of about +20% compared to their lean littermates, in association with higher liver weight (Fig. 1A), severe hypertriglyceridemia, and hypercholesterolemia (Fig. 1B). As expected, plasma adiponectin levels were significantly lower in ZF rats, whereas no difference was observed for blood glucose (Fig. 1B).

Table 2
Antibodies used for Western blotting.

Antibody	Producer	Reference	Dilution	Size	Incubation
β-Actin	Mouse	Sigma ac-15	1:1000	42 kDa	1 h RT
SREBP-1c	Rabbit	SC-366	1:200	Precursor: 125 kDa Mature: 68 kDa	O/N + 4 °C

OGTT (Fig. 1C) carried out on 12-week-old rats revealed a strong glucose intolerance. Indeed, 15 min after oral glucose injection, glycemia of ZF rats were more than 2-fold higher than the level of lean animals. ZF rats glycemia was elevated during all the test and was not normalized 2 h after glucose overload. The ZF rats glucose intolerance was associated with a significant increase of their plasma insulin level compared to ZL rats, as well as a higher insulin and glucagon mRNA expression (about 50%) in the pancreas of obese animals (Fig. 1C). Insulin immunofluorescence carried out on pancreas cross-

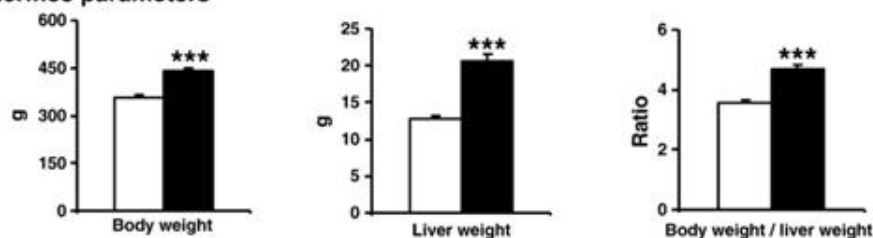
sections, as shown in Fig. 1C, indicated a hypertrophy of Langerhans islets and corroborated the hyperinsulinemia observed in ZF rats.

3.2. Unsaturated fatty acid metabolism

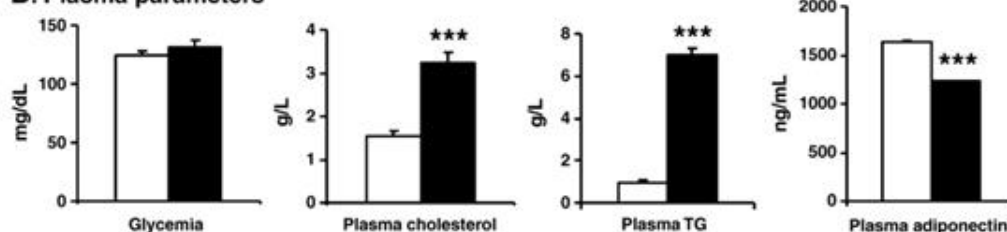
3.2.1. Biosynthesis

Among the target tissues of insulin, liver plays a major role in regulating blood glucose. Liver normally insulin-sensitive becomes resistant to insulin during development of MS, and this is associated

A. Sacrifice parameters



B. Plasma parameters



C. Insulin parameters

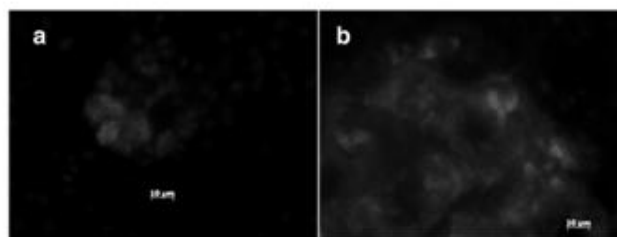
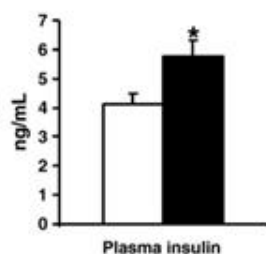
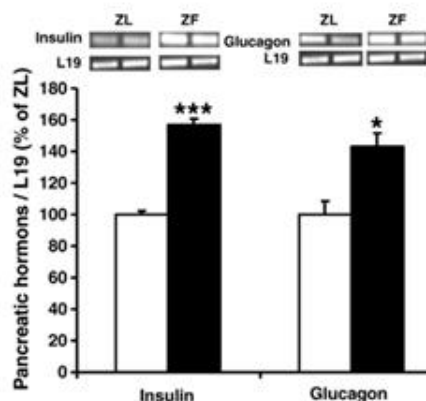
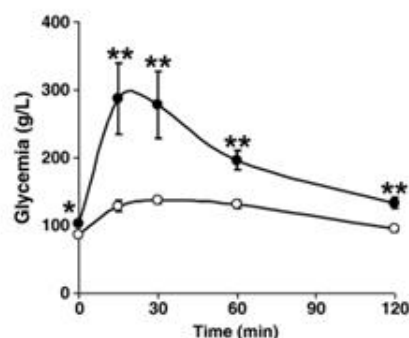


Fig. 1. Characterization of ZL (□) and ZF (■) rats. **A:** Sacrifice parameters at 14 weeks of age. Body weight, liver weight, and ratio of body weight/liver weight. **B:** Plasma parameters. Glycemia during feeding. Plasma cholesterol and triglycerides (TG) after a 12-h fasting. Plasma adiponectin levels in non-fasting Zucker rats. **C:** Insulin parameters. Oral glucose tolerance test (OGTT): after a 12-h overnight fasting, rats were administered a 50% glucose solution (2 g/kg body weight). Glycemia were measured at different time, before and after glucose administration. Plasma insulin levels in Zucker rats after a 12-h fasting. Insulin and glucagon mRNA expressions in pancreas of Zucker rats. Immunofluorescence on pancreas slices of lean (a) and fatty (b) rats. 10-μm-thick pancreas slices were labelled with insulin antibody, revealed with rhodamin (in red), as described in Materials and methods. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (in blue). Values are expressed as means ± SEM of four rats per lot. *Shows significant difference at $p < 0.05$, ** at $p < 0.01$, and *** at $p < 0.001$. No asterisk means no significant difference.

with fat accumulation in this tissue. FAS and SCD-1 are known to be the two main enzymes involved in saturated fatty acid (SFA) and mono-unsaturated fatty acid (MUFA) biosynthesis, respectively. Thus, we sought to know their liver mRNA expression (Fig. 2A). Both FAS and SCD-1 mRNA expressions were markedly increased in ZF liver compared to ZL. To confirm our results, hepatic desaturation activities were determined *in vitro* on microsomes in the presence of stearate as precursor for SCD-1 (Fig. 2A). Activity of SCD-1 was strongly increased in microsomes of ZF compared to ZL rats.

Since the relationship between liver glucose and poly-unsaturated fatty acid (PUFA) metabolism remains unclear during metabolic syndrome, we then studied hepatic biosynthesis of PUFA.

We first determined liver total lipid composition, which usually reflects the activity of hepatic lipid biosynthesis. The amount of total hepatic lipids is presented in Table 3. Liver total lipids were 3.5 fold higher in ZF than in ZL rats. This was mostly due to a strong increase of SFA (4.5-fold) and MUFA (10-fold) in the liver of ZF animals, which corroborated the liver increased FAS and SCD-1 expression observed in Fig. 2A. In contrast, *n*-6 PUFA were slightly reduced (17%) in obese animals when compared to leans, resulting in a significant decrease in PUFA total mass, while the amount of *n*-3 PUFA was not significantly changed.

We then examined hepatic expression of major enzymes implicated in PUFA biosynthesis as shown in Fig. 2B: D6D and D5D, the two

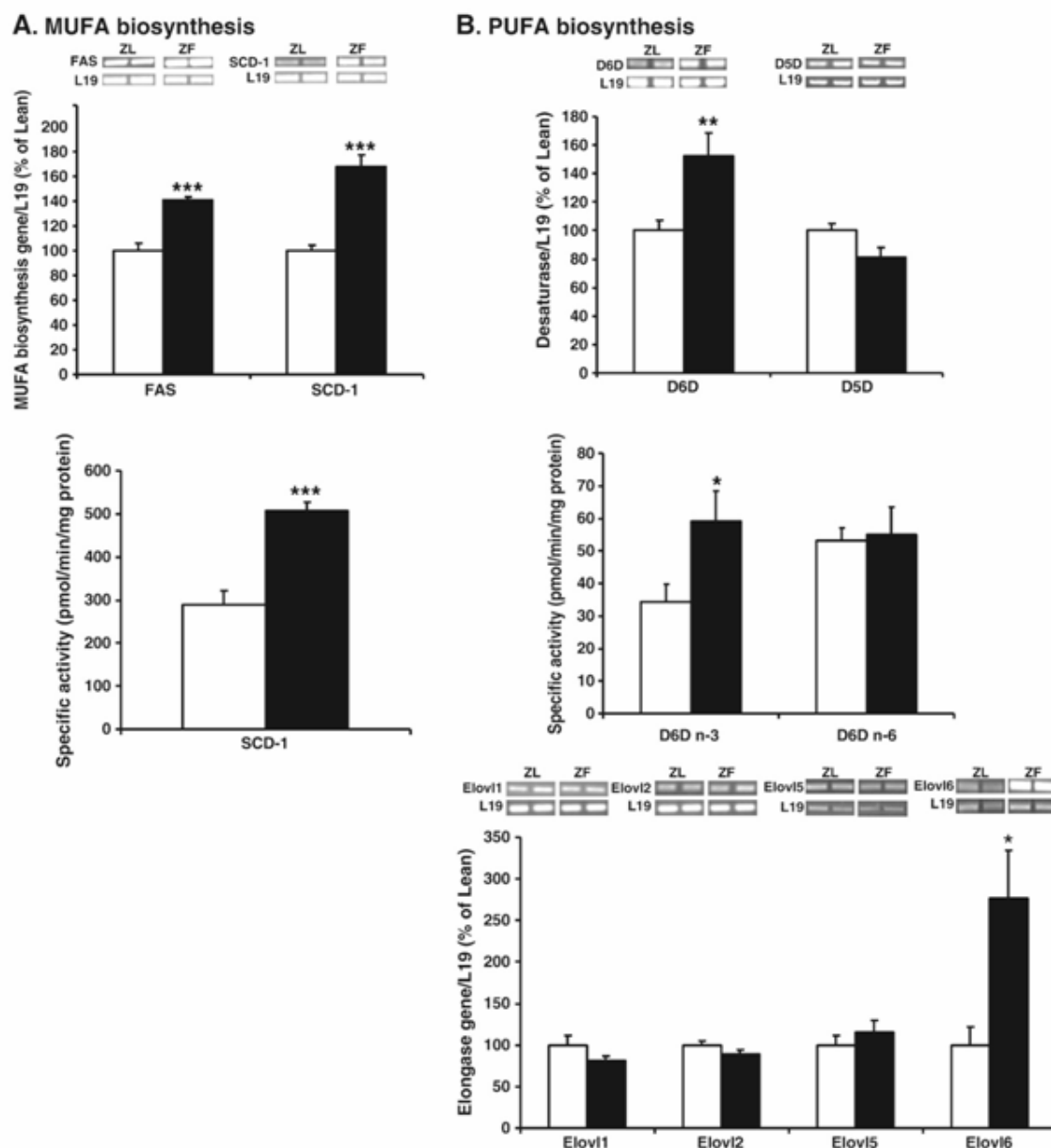


Fig. 2. Fatty acid biosynthesis enzymes expression and activity in the liver of ZL (□) and ZF (■) rats. A: FAS and SCD-1 hepatic gene expression, and SCD-1-specific activity. B: Desaturases and elongases hepatic mRNA expression, and D6D n-3 and n-6 specific activities. C: Hepatic SREBP-1c gene and protein expression. Values are expressed as means ± SEM of eight rats per lot. *Shows significant difference at $p < 0.05$, ** at $p < 0.01$, and *** at $p < 0.001$. No asterisk means no significant difference.

C. SREBP-1c expression

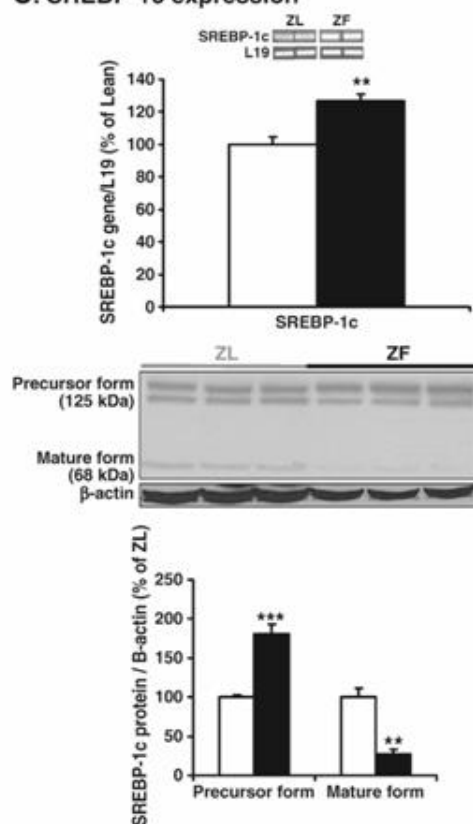


Fig. 2 (continued).

major desaturases that introduce double bonds in fatty acids, and four isoforms of elongases, Elovl-1, -2, -5, and -6, catalyzing the elongation of fatty acids. Interestingly, ZF rat liver showed a strong increase of D6D (+50%), the rate-limiting enzyme of PUFA biosynthesis, as well as Elovl-6 (+177%) mRNA expressions compared to ZL group. No significant difference was observed for hepatic D5D as well as Elovl-1,

Table 3

Composition in fatty acids of total lipids in the liver of Zucker rats (mg FA/g of liver). Values are expressed as means $\pm$ SEM of eight rats per lot. *Shows significant difference at $p < 0.05$, ** at $p < 0.01$, *** at $p < 0.001$. No asterisk means no significant difference.

FA	ZL	ZF
14:0	0.20 $\pm$ 0.02	2.00 $\pm$ 0.16***
16:0	6.32 $\pm$ 0.21	33.71 $\pm$ 4.01***
16:1	0.82 $\pm$ 0.11	9.63 $\pm$ 0.84***
18:0	3.05 $\pm$ 0.10	7.14 $\pm$ 1.41*
18:1	3.02 $\pm$ 0.22	26.91 $\pm$ 6.16**
18:2 n-6	4.52 $\pm$ 0.30	4.06 $\pm$ 0.24
18:3 n-3	0.11 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02
20:4 n-6	6.95 $\pm$ 0.35	4.89 $\pm$ 0.27***
20:5 n-3	0.14 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02
22:5 n-6	0.16 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.01**
22:5 n-3	0.37 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01***
22:6 n-3	2.62 $\pm$ 0.14	2.21 $\pm$ 0.40
SFA	9.57 $\pm$ 0.30	42.85 $\pm$ 4.33***
MUFA	3.84 $\pm$ 0.30	36.54 $\pm$ 6.82***
n-3 PUFA	3.24 $\pm$ 0.15	2.79 $\pm$ 0.41
n-6 PUFA	11.64 $\pm$ 0.61	9.25 $\pm$ 0.31**
Total PUFA	14.87 $\pm$ 0.73	12.04 $\pm$ 0.59*
Total	28.29 $\pm$ 1.06	91.42 $\pm$ 9.98***

-2 and -5 mRNA expression. Delta-6 n-3 and n-6 desaturation activities were determined *in vitro* on microsomes (Fig. 2B). The activity of delta-6 desaturation n-3 was higher (+68.7%) in the liver of ZF animals when compared with their lean littermates, whereas the activity of delta-6 desaturation n-6 did not significantly change.

As desaturases and elongases are known to be highly regulated by SREBP-1c, we investigated its hepatic mRNA and protein expression (Fig. 2C). Very interestingly, the mRNA expression as well as the precursor form of this protein was higher in the liver of ZF rats, while the mature form was strongly decreased, indicating an inactivation of SREBP-1c in ZF rats.

3.2.2. Signalling

Once PUFA are biosynthesized and incorporated into membranes, they can be released and transformed into downstream signalling molecules such as eicosanoids.

We first measured the level of sPLA₂ in the plasma of Zucker rats. Interestingly, at sacrifice, young adults ZF rats showed a significant lower total sPLA₂ activity in the plasma compared with ZL rats (Fig. 3A).

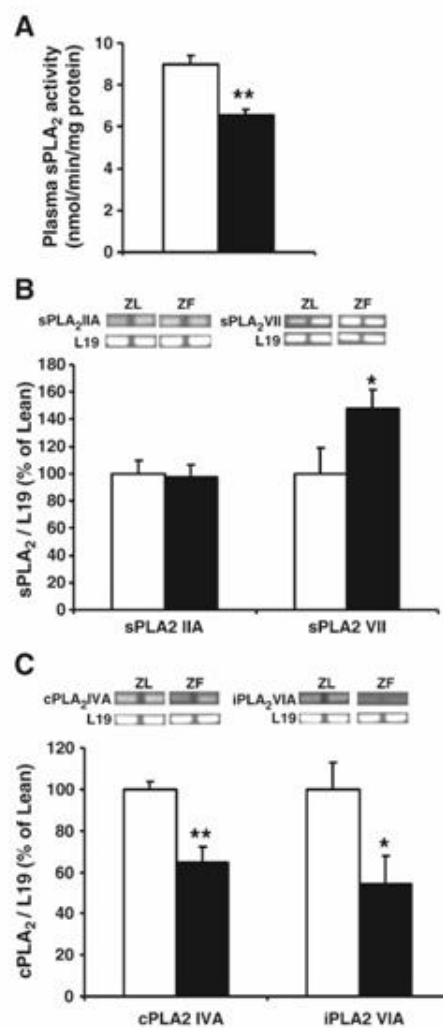


Fig. 3. Phospholipase A₂ regulation in ZL (□) and ZF (■) rats. A: Plasma sPLA₂ activity. B: Hepatic secreted (sPLA₂ IIA and sPLA₂ VII) mRNA expression. C: Hepatic cytosolic PLA₂ (cPLA₂ IVA and cPLA₂ VIA) gene expression. Values are expressed as means $\pm$ SEM of eight rats per lot. *Shows significant difference at $p < 0.05$, ** at $p < 0.01$.

Among the different hepatic isoforms of PLA₂, we studied two forms of secreted PLA₂ implicated in inflammation: type IIA and type VII PLA₂. We also investigated cytosolic PLA₂ type IVA and VIA that are specifically involved in the release of arachidonic acid. The hepatic expression of these enzymes is shown Fig. 3B and C. Whereas mRNA expression of sPLA₂ type IIA did not significantly change between the two groups of animals, we evidenced a significant increase of type VII sPLA₂ (also named Lp-PLA₂). In contrast, we observed a drastic decrease of both cPLA₂ IVA (−36%) and cPLA₂ VIA (−46%) expressions in ZF rats when compared to ZL rats.

4. Discussion

The findings of the present study support an important role for UFA metabolism (biosynthesis and signalling) during establishment of MS in ZF rats. A key observation in this regard was the decrease of both plasmatic sPLA₂ activity and liver type IVA and VIA PLA₂ mRNA expression in young obese animals compared with their lean littermates. The impairments of lipid signalling were accompanied with specific gene expression and/or enzyme activity disturbances of hepatic UFA biosynthetic enzymes (increase of FAS, SCD-1, D6D, and Elovl-6) in ZF rats.

As expected, the 3-month-old ZF rats of this study were characterized by obesity, glucose intolerance, corroborated by plasmatic hyperinsulinemia, as well as high triglycerides and cholesterol, and low adiponectin plasma levels, contributing to the development of MS in adults, usually accompanied by hepatic modifications such as steatosis, and liver lipid impairments [27]. In the present study, the development of liver steatosis was confirmed by higher liver weights in 3-month-old obese animals and a marked increase of liver SFA and MUFA (essentially 16:0, 18:0, 16:1, and 18:1). These results were confirmed by high FAS and SCD-1 enzymes, involved in saturated and mono-unsaturated FA biosynthesis, demonstrating a high *de novo* lipogenesis. Hepatic FAS and SCD-1 were shown to be increased in high-fat-diet-induced obesity and non-alcoholic fatty liver diseases [28]. Moreover, it has been demonstrated that mice lacking SCD-1 are resistant to high-fat-diet-induced obesity and insulin resistance [29]. Although the precise mechanisms regulating these enzymes during MS are not fully understood, our results demonstrated that both FAS and SCD-1 enzymes are important metabolic control points in liver lipid metabolism during establishment of MS.

Besides, our results also showed specific disturbances in liver PUFA biosynthesis enzymes, since both D6D and Elovl-6 were increased in ZF animals, whereas no change was observed for D5D, Elovl-1, -2, and -5. Moreover, liver fatty acid of total lipids analysis revealed a decline in ZF hepatic PUFA content (i.e., 20:4 n-6 and 22:6 n-3). This decrease has also been observed in ob/ob mice [18] and might appear inconsistent with the increase in D6D activity and expression. However, similarly to ob/ob mice, Zucker rats are hyperphagic and their ingestion of excessive calories increased insulin pancreatic and plasmatic content, leading to enhance *de novo* lipogenesis and MUFA synthesis.

D6D, which catalyzes the first desaturation reaction, is one of the rate-limiting step of PUFA biosynthesis pathway. This enzyme is known to be highly regulated by several physio-pathological conditions such as diabetes [18,30] and obesity [18]. The observed increase of both liver D6D expression (+50%) and activity (+73% D6D n-3) in ZF developing MS agree with the changes in hepatic D6D activity and expression in 6-week-old ob/ob mice [18,31]. However, previous studies conducted in our laboratory suggested no difference between ZF and ZL rats on the delta-6 desaturation rate [32]. This discrepancy may be related with the glucose status of the animals: in the present case, studies were carried out on young adults rats (3 months) with glucose intolerance, whereas the previous works were realized on 6-month animals, with installed type 2 diabetes. Indeed, a previous

report has evidenced in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rat, that desaturases were not modified [33]. Additionally, no change in delta-5 and delta-6 desaturation has been observed in mice rendered type 2 diabetics by a high-fat diet [18]. In contrast to desaturases, elongases have been only recently recognized as important contributors for the regulation of hepatic lipid composition [18]. These enzymes have been shown to be highly regulated in metabolic diseases [34], but physiological control of fatty acid elongation remains poorly defined. In rat, Elovl-1 and -6 elongate SFA and MUFA, Elovl-2 is responsible for C20-22 elongation [35] and Elovl-5 uses a broad substrate array, C16-22 [18]. Our results evidenced for the first time that Elovl-6 mRNA expression was strongly increased during MS establishment, whereas Elovl-1, -2, and -5 were not. Both Elovl-5 and -6 are also upregulated in ob/ob mice [18], and Elovl-5 has recently been shown to regulate hepatic lipid and carbohydrate composition [36]. The present work showed that Elovl-6 may also contribute specifically to the fatty liver phenotype since this enzyme is induced along with *de novo* lipogenesis and SCD-1 activity.

Elongase and desaturase gene expressions are known to be regulated by certain transcription factors, notably SREBP-1c [17,37,38]. In this study, the precursor form of SREBP-1c was enhanced in ZF rats, but the mature form was decreased, indicating that SREBP-1c was inactivated. Whereas several studies have shown the implication of SREBP-1c in regulating SCD-1, delta-6, and -5 desaturases as well as elongases [17,37,38], this work indicated that this transcription factor may not be implicated in the development of fatty liver during the establishment of MS. Such liver SREBP-independent desaturase regulation has been yet observed in SHR fed a PUFA diet [25]. SREBP-1c was also shown to be inactive in stimulating SCD-1 transcription in Chinese Hamster Ovary cells [39]. Moreover, in rat hepatocyte primary cell culture, SREBP-1c was not sufficient to induce lipogenic enzymes in response to insulin treatment [40]. The mechanisms of liver genes regulation by SREBP-1c are complex and may involve other transcription factors.

Once PUFA, and more specifically AA, are biosynthesized into membrane phospholipids, they can be released by the action of PLA₂ enzymes and then transformed into downstream signalling molecules such as eicosanoids, cyclooxygenase, and lipoxygenase metabolites of AA. There is general agreement that the PLA₂-mediated hydrolysis of phospholipids is the major pathway controlling AA mobilization in cells [41]. As desaturases and elongases, the physiological involvement of this superfamily of enzymes, during establishment of MS, is not yet elucidated. However, PLA₂ might be attractive targets for drugs to control type 2 diabetes, fatty liver disease, and other manifestations of the MS.

MS being characterized by a chronic inflammation, sPLA₂ – in particular sPLA₂ IIA and Lp-PLA₂ – being described as novel plasma increased markers of inflammation [42,43], we measured total plasma sPLA₂ activity. Our results showed an unexpected decrease of sPLA₂ activity in ZF rat plasma, compared to diverse inflammatory conditions [5]. Moreover, 3-month-old ZF animals showed all the feature of MS: obesity, glucose intolerance corroborated by hyperinsulinemia, and fatty liver lipid dysregulation. Furthermore, the enzymatic assay kit used in this study allows the detection of secreted PLA₂, except Lp-PLA₂. This enzyme has been recently described as a novel risk factor for cardiovascular disease [42,44]. Our results showed a significant increase of hepatic mRNA expression of Lp-PLA₂, which may indicate a novel role for this enzyme in the establishment of MS.

Several studies have shown the implication of different isoforms of PLA₂ in the development of metabolic diseases. Thus, sPLA₂-IB-null mice have been found to be resistant to high-fat-diet-induced obesity and insulin resistance and to exhibit reduced postprandial hyperglycemia, superior glucose tolerance, and increased insulin sensitivity compared with wild-type littermates [45]. Using type IVA PLA₂-deficient mice, it was found that this isoform was involved in the storage of lipids in the liver under normal and high-fat diet [46,47].

More recently, it has been shown that male iPLA₂ type VIA-null mice exhibited impaired glucose tolerance, but transgenic null mice that overexpress this isoform in insulin-secreting β -cells of pancreatic islets exhibited improved glucose tolerance [48]. In contrast, mice-deficient group VII PLA₂ exhibited relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet [49]. Here, we showed for the first time a specific decrease of liver gene expression type IVA and VIA PLA₂ during installation of MS, which evidenced that these PLA₂ isoforms may play an important and previously unrecognized role in liver homeostasis. The exact role and the mechanism of regulation of these PLA₂ isoforms remained to be elucidated.

Altogether, our data show that the development of MS is accompanied with a strong upregulation of both liver fatty acid elongases (and more specifically Elovl-6) and desaturase (SCD-1 and delta-6) expressions. We evidenced here for the first time that specific PLA₂ isoforms (type IVA and VIA) are differently regulated in the fatty liver of obese animals and are important contributors to liver lipid homeostasis, suggesting that these enzymes can be potential targets to ameliorate liver lipid dysregulation during the establishment of MS.

Acknowledgments

This work was supported by funding from INSERM and the Regional Council of Burgundy. Cécile Fèvre was supported by INSERM/Regional Council of Burgundy. The authors highly acknowledge Dr. André Bouchot for technical assistance for the immunofluorescence study. The authors wish also to thank Jean-Pierre Gay for proofreading the manuscript.

References

- [1] G. Perez-Chacon, A.M. Astudillo, D. Balmora, M.A. Balboa, J. Balsinde, Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 1103–1113.
- [2] J.E. Burke, E.A. Dennis, Phospholipase A2 biochemistry, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (2009) 49–59.
- [3] J.E. Burke, E.A. Dennis, Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling, *J. Lipid Res.* 50 (Suppl.) (2009) S237–S242.
- [4] E.A. Capper, L.A. Marshall, Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis, *Prog. Lipid Res.* 40 (2001) 167–197.
- [5] B.B. Boyanovsky, N.R. Webb, Biology of secretory phospholipase A2, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (2009) 61–72.
- [6] Y. Kita, T. Ohto, N. Uozumi, T. Shimizu, Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1317–1322.
- [7] V. Magrioti, G. Kokotos, Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases, *Expert Opin. Ther. Pat.* 20 (2010) 1–18.
- [8] J.J. Seilhamer, W. Pruzanski, P. Vadas, S. Plant, J.A. Miller, J. Kloss, L.K. Johnson, Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritis synovial fluid, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5335–5338.
- [9] S. Masuda, M. Murakami, K. Komiyama, M. Ishihara, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, Various secretory phospholipase A2 enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells, *FEBS J.* 272 (2005) 655–672.
- [10] S.M. Boekholdt, T.T. Keller, N.J. Wareham, R. Luben, S.A. Bingham, N.E. Day, M.S. Sandhu, J.W. Jukema, J.J. Kastelein, C.E. Hack, K.T. Khaw, Serum levels of type II secretory phospholipase A2 and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 839–846.
- [11] J.D. Clark, L.L. Lin, R.W. Kriz, C.S. Ramesha, L.A. Sultzman, A.Y. Lin, N. Milona, J.L. Knopf, A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP, *Cell* 65 (1991) 1043–1051.
- [12] J. Balsinde, L.D. Bianco, E.J. Ackermann, K. Condeelis, E.A. Dennis, Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8527–8531.
- [13] S. Tabuchi, N. Uozumi, S. Ishii, Y. Shimizu, T. Watanabe, T. Shimizu, Mice deficient in cytosolic phospholipase A2 are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury, *Acta Neurochir. Suppl.* 86 (2003) 169–172.
- [14] T. Nagase, N. Uozumi, S. Ishii, K. Kume, T. Izumi, Y. Ouchi, T. Shimizu, Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 42–46.
- [15] N. Uozumi, K. Kume, T. Nagase, N. Nakatani, S. Ishii, F. Tashiro, Y. Komagata, K. Maki, K. Ikuta, Y. Ouchi, J. Miyazaki, T. Shimizu, Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition, *Nature* 390 (1997) 618–622.
- [16] D.W. Gilroy, J. Newson, P. Sawmynaden, D.A. Willoughby, J.D. Croxtall, A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation, *FASEB J.* 18 (2004) 489–498.
- [17] R. Meshkani, K. Adeli, Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease, *Clin. Biochem.* 42 (2009) 1331–1346.
- [18] Y. Wang, D. Botolin, J. Xu, B. Christian, E. Mitchell, B. Jayaprakasam, M.G. Nair, J.M. Peters, J.V. Busik, L.K. Olson, D.B. Jump, Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 2028–2041.
- [19] D. Hall, C. Poussin, V.R. Velagapudi, C. Empsen, M. Joffraud, J.S. Beckmann, A.E. Geerts, Y. Ravussin, M. Ibberson, M. Oresic, B. Thorens, Peroxisomal and microsomal lipid pathways associated with resistance to hepatic steatosis and reduced pro-inflammatory state, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 31011–31023.
- [20] J.P. Poisson, Y.S. Huang, D.E. Mills, R.J. de Antueno, P.R. Redden, X. Lin, M. Narce, D. F. Horrobin, Effect of salt-loading and spontaneous hypertension on in vitro metabolism of [1-¹⁴C]linoleic and [2-¹⁴C]dihomo-gamma-linolenic acids, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 49 (1993) 57–66.
- [21] E. Layne, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, *Meth. Enzymol.* 3 (1957) 447–455.
- [22] S. Bellenger-Germain, J.P. Poisson, M. Narce, Antihypertensive effects of a dietary unsaturated FA mixture in spontaneously hypertensive rats, *Lipids* 37 (2002) 561–567.
- [23] M. Narce, P. Asdrubal, M.C. Delachambre, J. Grest, J.P. Poisson, Influence of spontaneous hypertension on n-3 delta-6-desaturase activity and fatty acid composition of rat hepatocytes, *Mol. Cell. Biochem.* 152 (1995) 7–12.
- [24] H.T. Slover, E.J. Lanza, Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56 (1979) 933–943.
- [25] J. Bellenger, S. Bellenger, L. Clement, S. Mandard, C. Diot, J.P. Poisson, M. Narce, A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension, *FASEB J.* 18 (2004) 773–775.
- [26] J.-F. Merlin, J. Grest, S. Bellenger, M. Narce, Fast high performance liquid chromatography analysis in lipidomics: separation of radiolabelled fatty acids and phosphatidylcholine molecular species using on monolithic C18 silica column, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 163–167.
- [27] K.D. Bruce, C.D. Byrne, The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder, *Postgrad. Med. J.* 85 (2009) 614–621.
- [28] M.T. Flowers, J.M. Ntambi, Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 85–91.
- [29] J.M. Ntambi, M. Miyazaki, J.P. Stoeber, H. Lan, C.M. Kendziorski, B.S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J.M. Friedman, A.D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11482–11486.
- [30] C. Comte, S. Bellenger, J. Bellenger, C. Tessier, J.P. Poisson, M. Narce, Effects of streptozotocin and dietary fructose on delta-6 desaturation in spontaneously hypertensive rat liver, *Biochimie* 86 (2004) 799–806.
- [31] S. Hughes, D.A. York, Hepatic delta-6-desaturase activity in lean and genetically obese ob/ob mice, *Biochem. J.* 225 (1985) 307–313.
- [32] J.P. Blond, C. Henchiri, J. Bezaud, Delta 6 and delta 5 desaturase activities in liver from obese Zucker rats at different ages, *Lipids* 24 (1989) 389–395.
- [33] M.A. Montano, O.J. Rimoldi, R.A. Igal, S. Montenegro, M.C. Tarres, S.M. Martinez, R.R. Brenner, Hepatic delta9, delta6, and delta5 desaturases in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rats, *Lipids* 38 (2003) 827–832.
- [34] Y. Wang, D. Botolin, B. Christian, J. Busik, J. Xu, D.B. Jump, Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 706–715.
- [35] A.E. Leonard, S.L. Pereira, H. Sprecher, Y.S. Huang, Elongation of long-chain fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 36–54.
- [36] Y. Wang, M. Torres-Gonzalez, S. Tripathy, D. Botolin, B. Christian, D.B. Jump, Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1538–1552.
- [37] T. Matsuzaka, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Yoshikawa, A.H. Hasty, Y. Tamura, J. Osuga, H. Okazaki, Y. Iizuka, A. Takahashi, H. Sone, T. Gotoda, S. Ishihashi, N. Yamada, Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 107–114.
- [38] J.D. Horton, N.A. Shah, J.A. Warrington, N.N. Anderson, S.W. Park, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 12027–12032.
- [39] J.T. Pai, O. Guryev, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26138–26148.
- [40] A.K. Stoeckman, H.C. Towle, The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27029–27035.
- [41] J. Balsinde, M.V. Winstead, E.A. Dennis, Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Lett.* 531 (2002) 2–6.
- [42] M.A. Corson, P.H. Jones, M.H. Davidson, Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker, *Am. J. Cardiol.* 101 (2008) 41F–50F.
- [43] D. Divchev, B. Schaeffer, The secretory phospholipase A2 group IIA: a missing link between inflammation, activated renin-angiotensin system, and atherosclerosis? *Vasc. Health Risk Manage.* 4 (2008) 597–604.
- [44] M. Madjid, M. Ali, J.T. Willerson, Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature, *Tex. Heart Inst. J.* 37 (2010) 25–39.

- [45] K.W. Huggins, A.C. Boileau, D.Y. Hui, Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in Group 1B PLA2-deficient mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (2002) E994–E1001.
- [46] H. Ii, N. Yokoyama, S. Yoshida, K. Tsutsumi, S. Hatakeyama, T. Sato, K. Ishihara, S. Akiba, Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A2-knockout mice, *PLoS ONE* 4 (2009) e8089.
- [47] H. Ii, S. Hatakeyama, K. Tsutsumi, T. Sato, S. Akiba, Group IVA phospholipase A2 is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 86 (2008) 12–17.
- [48] S. Bao, H. Song, M. Wohltmann, S. Ramanadham, W. Jin, A. Bohrer, J. Turk, Insulin secretory responses and phospholipid composition of pancreatic islets from mice that do not express Group VIA phospholipase A2 and effects of metabolic stress on glucose homeostasis, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20958–20973.
- [49] H. Song, M. Wohltmann, S. Bao, J.H. Ladenson, C.F. Semenkovich, J. Turk, Mice deficient in group VIB phospholipase A2 (iPLA2gamma) exhibit relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2010) E1097–E1114.

Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1 transgenic mice.

Zuquan Zou^{1,2,8}, Sandrine Bellenger^{1,2}, Karen A. Massey³, Anna Nicolaou³, Audrey Geissler⁴, Bernard Bonnotte⁵, Anne-Sophie Pierre^{1,2}, Mélaine Minville-Walz^{1,2}, Michaël Rialland^{1,2}, John Seubert⁶, Jing X Kang⁷, Michel Narce^{1,2} and Jérôme Bellenger^{1,2}

¹Université de Bourgogne, UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

²INSERM UMR U866 Lipides Nutrition Cancer, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

³School of Pharmacy, University of Bradford, Richmond Road, Bradford BD7 1DP, UK.

⁴INSERM UMR866, IFR100 Imagerie Cellulaire Histologie, Faculté de Médecine et Pharmacie, F21000 Dijon, France

⁵Université de Bourgogne, UMR1098, Faculté de Médecine, IFR100, F21000 Dijon, France.

⁶Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Alberta, Edmonton, AB, T6G 2N8, Canada.

⁷Department of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114 USA.

⁸Visiting postdoctoral fellow from Medical School, Ningbo University, Fenghua Road 818, Ningbo, 315211 Zhejiang, China.

Corresponding author: Jérôme BELLENGER,
UMR 866 « Lipides Nutrition Cancer »
Faculté des Sciences Gabriel, Université de Bourgogne,
6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France
Tel: +33 3 80 39 38 57 – Fax: + 33 3 80 39 63 30
E-mail: jerome.bellenger@u-bourgogne.fr

Abstract

Breast cancer (BC) remains one of the most threatening mortality factors throughout the world. Overexpression of the tyrosine kinase receptor ErbB2/HER2/Neu, often expressed together with HER3, occurs in 25% to 30% of invasive BCs with poor patient prognosis. Due to confounding factors, inconsistencies exist regarding protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) on BC. We therefore evaluated whether fat-1 transgenic mice, endogenously synthesizing n-3 PUFA from n-6 PUFA, were protected against BC development and we then aimed to elucidate the *in vivo* response.

E0771 BC cells were implanted into fat-1 and wild-type (WT) mice and tumorigenesis was examined. To validate that HER2/HER3 signaling pathway plays a crucial role in the antitumor effect of decreased n-6/n-3 PUFA ratio, we analyzed the expression of proteins involved in this pathway in tumor tissues. Lipidomic analyses were performed in tumor tissues and plasma.

The results showed that tumors totally disappeared at day 15 in fat-1 mice when they grew up to a large size in the WT. This tumorigenesis prevention was associated with higher levels of n-3 PUFAs and their metabolites (particularly 15-HEPE, 17-HDHA and PGE₃) in the tumor of fat-1 mice than in WT. The tumor HER2/HER3/ β -catenin signaling pathway was significantly downregulated in the fat-1 mice. Moreover, *in vitro* experiments showed that docosahexaenoic acid inhibited growth of BC cells and β -catenin signaling as well.

These data demonstrate an anti-BC effect of n-3 PUFAs through, at least in part, HER2 signaling pathway downregulation, and highlight the importance of gene-diet interactions in BC.

Introduction

Breast cancer (BC) remains one of the most threatening mortality factors throughout the world despite significant advancements in early detection and therapy. With a current mortality rate of 40%, over one million women world-wide will fall victim to BC. Four closely related transmembrane tyrosine kinase receptors (HER1, 2, 3, and 4) have been implicated in the pathogenesis of cancer including BC. Binding of small peptide ligand molecules to HER receptors triggers homo- or heterodimerization and autophosphorylation, which results in enhanced cell proliferation, migration and invasion (1,2) via PI3K/AKT/-catenin downstream signaling pathway (3). The HER2/HER3 heterodimer is considered to be the most active HER dimer and is crucial for signaling in tumors containing amplification of HER2 (4,5). HER2 has no defined ligand but possesses an active tyrosine kinase domain (6) whilst, in contrast, HER3 has several ligands, including the neuregulins (NRG) 1–4, but lacks intrinsic tyrosine kinase activity. HER2 overexpression occurs in 25% to 30% of invasive BCs and is associated with a more aggressive phenotype and a poor patient prognosis with intrinsic resistance to endocrine and conventional chemotherapy (7,8). HER3 is often expressed together with HER2 in this disease (9). While both receptors are considered promising targets for therapy, the overemphasis on HER2 has shadowed the important role of HER3 in resistance to HER2-targeted therapies (10,11). In recent years, an increased understanding of the role of HER3 which has fueled the development of HER3-targeting agents (12). As tumors overexpressing HER2 are generally resistant to therapeutic agents, nutrition intervention may be a promising therapeutic strategy in preventing and treating this aggressive subtype of cancer. This can be accomplished by ablating HER2/HER3 expression and/or interfering with the interaction of HER2/HER3 heterodimers.

Epidemiological and preclinical studies suggest a protective effect of fish oil in the prevention of BC (13). In addition, *in vitro* and *in vivo* evidence demonstrates that n-3 fatty acids or their metabolites are able to reduce cellular proliferation and increase apoptosis in BC models (14). Studies have shown inhibitory effects of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids - the two main n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) found in fish oils - on HER family members (15, 16). However, these studies did not investigate the effects of n-3 PUFAs on HER3 expression in BC. Therefore, whether HER3 expression is associated with n-3 PUFAs-mediated antitumor effect in BC remains largely unknown. Despite research

providing evidence that dietary or exogenously derived fatty acids may play an important role in the etiology, evolution and/or progression of BC, many inconsistencies and discrepancies preclude definitive conclusions (17). For example, Holmes MD et al., (18) found an increased risk of BC associated with higher dietary marine n-3 PUFAs in a cohort study with 88,795 women. Such conflicting results reflect many confounding dietary elements. Indeed, marine oil, generally used in nutritional studies, contains EPA and DHA but also other fatty acids and is particularly rich in vitamin D. Thus, it has been shown that oleic acid (18:1n-9) activates phosphatidylinositol 3-kinase, promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 BC cells (19) and Chatterjee M and colleagues (20) showed, in a multitargeted approach, that the combination of vitamin D with Max-epa (a fish oil supplement) was twice as effective as the individual treatments in reducing tumor incidence and multiplicity. Consequently, it is still very difficult to understand the specific roles of n-3 PUFAs on BC prevention regarding many variables arising from the diets.

In the present study, we evaluated the role of high n-3 PUFA content in the pathogenesis of BC in the transgenic *fat-1* mice model. These mice carry the *fat-1* gene from the roundworm *Caenorhabditis elegans*, encoding a n-3 PUFA desaturase, absent in mammals, that catalyzes conversion of n-6 into n-3 PUFA (21). Therefore, these mice have endogenously elevated n-3 PUFA tissue content and exhibit lower n-6/n-3 PUFA ratio compared to their wild-type (WT) littermates when maintained on a high n-6 PUFA diet. This contrasts feeding procedures using fish oil supplementation, which may bring confounding factors attributed in differences in the dietary composition. Hence, the *fat-1* transgenic mouse model is a useful *in vivo* system for giving new insights of the role of n-6/n-3 fatty acid ratio in BC tumorigenesis.

We examined the impact of enhanced n-3 PUFA production toward the development of BC and the regulation of HER2/HER3/ β -catenin/c-Myc signaling pathway. Thus, we implanted these cells in the *fat-1* transgenic and wild-type mice in order to evaluate their tumorigenicities. Our data indicate that modulation of BC development by n-3 PUFA might be mediated in part through HER2 signaling pathway downregulation.

Materials and Methods

Materials

RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), glutamine, antibiotics were purchased from PAA Laboratories. The antibodies raised against phospho-HER2 (Tyr1248), HER2, phospho-HER3 (Tyr1289), HER3, phospho-Akt (Ser473), phospho-GSK-3 β (Ser9), E-cadherin, β -catenin were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). c-Myc antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The horseradish peroxidase-linked secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Heregulin β -1 was purchased from Sigma company.

Animals and diet

Transgenic fat-1 mice were generated as described previously (16) and backcrossed onto a C57BL/6 J background. The presence of the *fat-1* gene in each mouse was confirmed both by genotyping and tail tissue fatty acid analysis profile. Transgenic and WT animals were maintained on a 10% safflower oil diet (SAFE, Augy, France) *ad libitum* and kept under pathogen-free conditions in standard cages in temperature- and humidity-controlled conditions with a 12-h light/dark cycle. We used 10- to 12-weeks old female fat-1 transgenic mice and nontransgenic littermate controls for this experiment. The diet contained (g/100 g diet) 4.5 sucrose, 18.6 casein, 8.6 cellulose, 50 wheat starch, 0.3 DL-methionine, 7.0 mineral mix, 1 vitamin mix, and 10 safflower oil. Safflower oil is high in linoleic acid (18:2n-6) with very little n-3 fatty acids (less than 0.1% of the total fat supplied). Under the 10% safflower oil regimen, all the transgenic animals presented a total n-6-to-n-3 PUFAs ratio greater than (but close to) 1 in their tail tissue ($n-6/n-3 = 1.6 \pm 0.2$ in fat-1 mice vs 39.5 ± 3.2 in WT control animals; $n = 10$ per group). All procedures were carried out according to institutional guidelines for the use and care of laboratory animals and approved by the Ethical Committee of the University of Burgundy (#A1408).

Cancer Cell lines

E0771 medullary breast adenocarcinoma cells were obtained from Dr Enrico Mihich at Roswell Park Cancer Institute, New York, NY, USA. E0771 were originally isolated from a spontaneous cancer in C57Bl6 mice. These C57BL/6 adenocarcinoma-derived BC cell line E0771 are, to our knowledge, the only cell model that can be

grown to form breast tumors in immunocompetent fat-1 transgenic mice. The human BC cell lines SK-BR-3 and BT-474 were kindly provided by Dr Sarab Lizard (Centre Georges François Leclerc, Dijon, France). E0771 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS with iron, 2mmol/L L-glutamine, and 100 units/ml penicillin/streptomycin. SK-BR-3 and BT-474 cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2mmol/L L-glutamine, and penicillin/streptomycin. All these cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂-95% air at 37 °C. In DHA-treated cells, the experiments were conducted in medium containing 0.5% FBS.

Cell injections and tumor measurement

Cultured E0771 cells were collected with trypsin digestion (0.05% trypsin-EDTA, 3 minutes), washed twice with RPMI 1640 medium and counted. Each female mouse was injected subcutaneously in the lower abdomen of each mouse in or near the no. 4 mammary fat pad with 5×10^5 viable mycoplasma free cells diluted in 200 µl of RPMI 1640 medium. Day of the injection of E0771 cells was designated day 0. Tumor volume was measured with a caliper every 2 or 3 days, and calculated according to the following formula: tumor volume = length $\times$ width² $\times$ 0.5.

Lipidomic analysis.

The fatty acid composition in tails (to perform phenotyping), tumors and plasma was determined by gas chromatography as described previously (22).

Lipid mediators were analysed using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) following the methodology developed by Masoodi *et al.*, (23, 24). In brief, each tumour sample was homogenised in ice-cold methanol (4ml of 15% v/v solution). Internal standards PGB₂-d₄ and 12 HETE-d₈ (40 ng per sample each) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) were added in each sample and the homogenate was centrifuged for 5min at 5000 rpm, at 4°C. The clear supernatant was acidified to pH 3.0 using 0.1M HCL and further purified by solid phase extraction cartridge (C18-E, Phenomenex, Macclesfield, UK) using methyl formate to elute the lipid mediators. Chromatographic analysis of prostanoids was performed on a C18 Luna column (5µm, 150 x 2.0 mm, Phenomenex) whilst all hydroxy fatty acids were analysed using a C18 Kinetex column (2.6µm, 100 x 2.1 mm, Phenomenex). The analysis was performed using a Waters Alliance 2695 pump coupled to triple quadrupole mass

spectrometer (Quatro Ultima, Waters, Elstree, Hertfordshire, UK). The following multiple reaction monitoring (MRM) transitions were used : prostaglandin (PG) E_2 m/z 351>271, PGD_2 m/z 351>271, PGE_3 m/z 349>269, thromboxane (TX) B_3 m/z 367>167, TXB_2 m/z 369>169, PGB_2-d_4 m/z 337>179, 5-hydroxyeicosapentaenoic acid (HEPE) m/z 317 >115, 18-HEPE m/z 317> 133, 15-HEPE m/z 317>175, 12-HEPE m/z 317>179, 10-hydroxydocosahexaenoic acid (HDHA) m/z 343>153, 14-HDHA m/z 343>161, 13-HDHA m/z 343>193, 17-HDHA m/z 343>201 and 12-HETE- d_8 m/z 327>184. Protein content was estimated by the BioRad protein assay using BSA as reference standard (Bio-Rad laboratories Ltd, Hemel Hempstead, UK). Results are expressed as pg/mg protein.

Cell viability

The numbers of viable cells exposed to DHA were evaluated by the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Cell Proliferation Assay, according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich). Briefly, BT-474, SK-BR-3 and E0771 cells were seeded and cultured in 96-well flat bottom plates at a density of 3×10^3 per 100 μ l in medium containing 10% FBS, allowed to attach overnight, and then treated with DHA complexes to BSA in a 4:1 (DHA/BSA) molar ratio at 20, 40, 60, 80 and 100mM or vehicle for 72 hours in medium containing 05% FBS. MTT reagent (20 μ l) was added to each well (final concentration 0.5 mg/ml) and the plate incubated at 37°C. After four hours, supernatant was carefully removed and 100 μ l of dimethyl sulfoxide was added to each well and the plate incubated for two hours. The absorbance was read at 450 nm on a Microplate Reader (Bio-Rad, France). Data are represented as mean percent vehicle treated cell proliferation $\pm$ SE of triplicate experiments with internal triplicates.

Western blot analysis

Cells were harvested in Triton protein lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 200 mM EDTA, 200 mM EGTA, 1% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Proteins (50 g) were separated by 10% SDS-PAGE and electroblotted to Protan nitrocellulose membranes (Whatman, Dassel, Germany). After blocking nonspecific binding sites with 5% BSA in Tris buffered saline (TBS) (0.1% Tween-20 in TBS), blots were probed overnight at 4°C with primary antibody against phospho-HER2 (Tyr1248),

HER2, phospho-HER3 (Tyr1289), HER3, phospho-Akt (Ser473), phospho-GSK-3 β (Ser9), E-cadherin, β -catenin (Cell Signaling, Ozyme), c-Myc (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and -actin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a concentration of 1/2,000, washed in T-TBS, incubated 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG for all the antibodies except -actin incubated with goat anti mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Detection was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting analysis procedure (ECL Plus, Amersham, Freiburg, Germany).

p-HER3 immuno-labelling

Tumors were dehydrated and included in paraffin. Paraffin blocks were sectioned (5 μ m-thick section, two different levels per block), and slices of tumors were deposited onto Superfrost Plus slides.

pHER3 (2 slides per blocks at two different levels) immunohistofluorescence was performed using an automated Leica Bond Max. Briefly, after dewax, antigen retrieval with EDTA pH9 buffer and inhibition of endogenous peroxidases with H₂O₂ 3%, slides were saturated in BSA 3% in PBS for 20 minutes, then incubated with avidin blockage kit and biotin blockage kit (Vector Labs kit - ref SP2001) for 15 minutes for twice. Then sections were incubated with primary antibody (anti-phospho HER3, Cell Signaling - ref 4791, 1/100) for 1 hour. The sections were then washed and incubated with secondary antibody linked to biotin (Southern biotech - ref 6440-08, 1/500) for 45 minutes. After three washes, sections were incubated in streptavidin peroxidase (Invitrogen - ref T20934, 1/100) and revealed in tyramide-AlexaFluor 568 (Invitrogen - ref T20934, 1/100). Sections were counterstained with DAPI (Sigma - ref D9542, 2 μ g/ml) for 10 minutes and rinsed. Negative controls (primary antibody omission) were included.

After processing, the sections were imaged by the Cell Observer station (Zeiss). This station is composed of an inverted motorized microscope, a mercury lamp for the fluorescence, a CCD camera Zeiss HRm, a computer and the AxioVision software which control all the station. Images were acquired using 10x objective; each image represent about 0.6 mm². About 3 images by level were made (6 images by tumor). Image analysis was carried out using Visilog software. For p-HER3 surface, images were threshold, binarized and surface measurement of the binarized images were

done. These surfaces were divided by the number of nuclei present in each image. This number was found by determining the mean area of a nucleus.

Statistical analysis.

Results were expressed as the arithmetical mean and SE (mean $\pm$ SE) for each group. Statistical significance in the tumor growth curves, tumor and plasma major fatty acid composition, total n-6, total n-3, and the n-6-to-n-3 ratio and different lipid mediators in tumor samples between WT and fat-1 transgenic mice was determined using a Student *t* test (**P*<0.05; ***P*<0.01). The statistical study of the tumour p-HER3 immunohistofluorescence quantification was performed using Mann-Whitney U-test by Tanagra software (***P*<0.01).

Results

n-3 PUFAs inhibit the growth of BC xenografts in fat-1 transgenic mice

To test the hypothesis that balanced ratio of n-6/n-3 fatty acid is able to decrease the risk of BC, we implanted E0771 mouse BC cells into the fat-1 and WT mice and examined the tumorigenicity of inoculated tumor cells. As shown in Fig.1, there was a dramatic difference in the tumor volume between fat-1 transgenic (n=10) and WT mice (n=6). Over an observation period of 25 days, all mice initially developed a palpable tumor by day 7 but, importantly, all the tumors in fat-1 mice never grew up more and all palpable tumors disappeared at day 18. By contrast, all the tumors in wild-type mice continued to grow up until host sacrifice. These findings clearly show that expression of *fat-1* inhibits the growth of BC cells *in vivo* and results in mammary tumor regression.

Inhibition of HER2 signaling pathway by n-3 PUFAs in fat-1 transgenic mice

In order to define the regulation of HER2 and HER3 expression by a decreased ratio in n-6/n-3 fatty acids in fat-1 mice, tumor tissues were analyzed for the expression of HER2 and HER3 by western blotting. Results presented in Figure 2A demonstrated that HER2 and HER3 expressions were markedly downregulated in the tumor tissues of fat-1 mice ten days after cell injection. Moreover, p-HER3 immunohistofluorescence is significantly ($P < 0.01$) decreased in the fat-1 tumor tissues compared to the wild-type (Fig. 2B). β -catenin not only plays a crucial role in morphogenesis and human cancer as a transcriptional regulator in canonical and noncanonical Wnt signaling pathways, it also takes part in cell-cell adhesion with the adhesion molecule E-cadherin which is a potent invasion/tumor suppressor in BC (25). To investigate whether the decrease of HER2 and HER3 will affect cell-cell adhesion and β -catenin signaling, western blotting was used to check the expression of E-cadherin and β -catenin. As shown in Figure 2A, E-cadherin was markedly up-regulated in the tumors of fat-1 mice compared to those in wild-type mice. We observed a change in β -catenin expression pattern. Indeed, two protein bands were obtained for β -catenin expression in the fat-1 tumor tissues. We hypothesize that β -catenin is sequestered in the plasma membrane by E-cadherin blocking its nucleus translocation to regulate target gene activity. Then, we checked the protein expression of the known transcriptional target gene *c-Myc* of β -catenin. As shown in

Figure 2A, c-Myc expression was hugely inhibited in tumors of fat-1 mice, suggesting that E-cadherin might be involved in modulating β -catenin signaling.

Tumor n-3 fatty acid enrichment and formation of PUFA-derived mediators

As shown in Fig. 3A, fatty acid composition of tumor total lipids revealed higher levels of EPA (20:5n-3) and docosapentaenoic acid (DPA, 22:5n-3) in fat-1 transgenic mice compared with WT animals, whereas AA (20:4n-6) was decreased by 70%. Interestingly, the n-6/n-3 PUFA ratio (Figure 3B) was significantly reduced in tumors from fat-1 mice (8.92 ± 2.63) compared to WT animals (30.51 ± 6.99) despite the animals were fed the same diet. These results indicate expression of *fat-1* enriches the transgenic animals in n-3 PUFA at the expense of n-6, giving a lower n-6/n-3 ratio.

We then assessed n-6 and n-3 PUFA-derived metabolites from tumors (specifically n-6 AA (20:4n-6), n-3 EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) metabolites) by LC/ESI-MS/MS analysis to determine whether differences in tumor growth between WT and fat-1 mice were associated with these pathways. As shown in figure 3C, the EPA- (5-, 18-, 15- and 12-HEPE) and DHA- (10-, 13-, 14- and 17-HDHA) derived metabolites were identified at physiologically active levels within tumors from fat-1 mice. These metabolites were not found in tumors from WT. In addition to HEPE and HDHA lipid metabolites, significant amounts of n-3-derived prostaglandin E3 (PGE3) and thromboxane B3 were formed in tumors of fat-1 mice. There was no significant difference in the level of PGE2 between the two genotypes but the levels of PGD2 and TXB2 were significantly lower in the fat-1 transgenic mice compared to WT (-72 and -70% respectively).

Plasma n-3 fatty acid enrichment and total lipid level

Analysis of total lipid extracts from plasma showed distinctly different profiles between fat-1 and WT mice (Figure 4A). There are significantly higher levels of n-3 PUFA [20:5n-3 (EPA) and 22:6n-3 (DHA)] and much lower concentration of n-6 PUFA (AA, 20:4n-6) in the plasma from fat-1 transgenic mice compared to WT animals. As such, the n-6/n-3 PUFA ratio was significantly reduced in the transgenic mice (WT: 20.4:1 and fat-1: 6.8:1). These data confirm that plasma was enriched in n-3 PUFAs at the expense of n-6 PUFAs, giving a lower n-6 to n-3 ratio, when plasma total lipid level was not statistically changed in both groups (Figure 4C).

DHA inhibits *in vitro* the proliferation of BC cells

Given the significant growth inhibition of E0771 cells in fat-1 transgenic mice, we next assessed whether n-3 PUFAs can affect BC cells proliferation *in vitro*. Mouse E0771 cells and two human HER2-amplified BC cells SK-BR-3 and BT-474 were examined for their response to DHA treatment. As shown Figure 5, DHA induced a concentration-dependent reduction of cell viability in all BC cell lines at 72 h. DHA treatment exhibited more robust growth inhibition in E0771 cells than in SK-BR-3 and BT-474 cells, exhibiting 50% of mortality with only 20 μ M of DHA (IC50) and inducing over 98% reduction of viable E0771 cells with DHA (40 μ M) treatment.

DHA inhibits HER2/HER3 expression and subsequent signaling

In order to assess the mechanism by which n-3 PUFAs might induce growth inhibition of BC cells, western blotting was used to examine protein expressions in the HER2/HER3/ β -catenin signaling pathway in DHA-treated cells *in vitro*. As shown in Figure 6, DHA treatment decreases HER2 and HER3 protein levels in E0771, SK-BR-3 and BT-474 cell lines; this effect was observed in a time and dose-dependent manner (observed 24, 48 and 72 h after treatment). Importantly, treatment of DHA in SK-BR-3 and BT-474 cells for 48 h slightly downregulated HER2 and HER3, but dramatically inhibited phospho-HER2 and phospho-HER3 induced by heregulin stimulation. Similar effect on the phospho-HER3 and HER3 protein level was observed in E0771 cells treated with DHA for 24 h. These results suggest that DHA treatment impact on HER2 and HER3 expression, but also on the formation of HER2/HER3 heterodimers. Given the critical role of β -catenin signaling in the mammary tumorigenesis, the potential effect of n-3 PUFAs on the β -catenin signaling was examined. As shown in Figure 6, treatment with DHA reduced β -catenin protein level in a time and dose-dependent manner in cultured cells. Cytoplasmic β -catenin is controlled by a glycogen synthase-3 β (GSK-3 β) containing destruction complex, in which GSK-3 β is phosphorylated and inactivated leading to cytoplasmic accumulation of β -catenin. To determine whether DHA treatment-induced degradation of β -catenin could be through inhibition of the phosphorylation of GSK-3 β and its upstream kinase Akt, phospho-GSK-3 β and phospho-Akt protein expressions were examined. We observe that DHA treatment downregulated GSK-3 β and Akt phosphorylation in cultured cells. Moreover, this downregulation was more obvious in E0771 cells than in SK-BR3 and BT-474 cells. To further validate whether DHA treatment-mediated degradation of β -catenin will repress the

expression of target gene *c-Myc*, we examined *c-Myc* protein level in cultured cells treated with DHA. Our results show that *c-Myc* expression was markedly downregulated in three BC cell lines treated with DHA for 48 h. We also examined the potential effect of DHA treatment on E-cadherin expression in cultured cells. Our results regarding E-cadherin protein expression indicate that E-cadherin is downregulated when E0771, BT-474 and SK-BR-3 cell lines are treated with DHA for at least 48h. Together, our results provide evidence for the antitumor mechanism of n-3 PUFAs through inhibiting the HER2/HER3/ β -catenin signaling pathway in BC cells.

Discussion

The role of PUFAs in BC development, progression and prevention is not very well understood. PUFAs can mediate cancer development and progression through multiple mechanisms. For example, it has been shown that n-3 PUFAs, but not n-6 PUFAs, induced cell death in a mouse model of prostate cancer (26). Among important regulators of growth, survival and apoptosis, n-3 PUFAs have been shown to induce growth inhibition of MDA-MB-231 cells by AKT phosphorylation and reduced DNA-binding activity of nuclear factor-kappaB - NF- κ B - (27). Similarly, treatment of BT-474 and SK-BR-3 BC cells with n-3 PUFAs suppress the expression of HER2 oncoprotein *via* regulation of *HER2/neu* gene transcription (28).

Our study clearly demonstrates that the increase of endogenously synthesized n-3 PUFAs prevents BC development. Furthermore, the prevention of tumor growth is correlated with the formation of anti-tumor derivatives of n-3 PUFAs and with a downregulation of the HER2 signaling pathway.

Our results clearly demonstrate that more than decreasing the growth rate of the tumor, endogenous production of n-3 PUFA in fat-1 mice induced mammary tumor regression (Fig. 1) whereas the xenografts in WT mice kept sustained growing. Evidence in the literature suggest n-3 PUFA reduce the risk of BC, however these studies show that n-3 feeding was unable to mimic the phenotype observed in fat-1 mice (29,30). Expression of the *fat-1* gene is a much more effective approach to modify fatty acid composition. By ubiquitously converting n-6 PUFAs to n-3 PUFAs it significantly increases the absolute level of n-3 PUFAs as well decreases the level of n-6 PUFAs leading to a decreased ratio of n-6/n-3 PUFAs in mouse tissues, which cannot be achieved by conventional dietary intervention. Then, plasma and tumor tissue exhibited a reduced ratio of n-6 to n-3 PUFAs (Fig. 3A, 3B, 4A, and B).

One of the notable changes we observed was the downregulation of HER2 oncoprotein and HER2/HER3/-catenin signaling pathway in tumor tissues. *HER2/neu*, one of the most commonly analyzed oncogenes in BC studies, is a frequent target of mammary oncogenesis (31). This orphan tyrosine kinase receptor regulates biological functions as diverse as cellular proliferation, transformation, differentiation, motility and apoptosis (32). Recent studies have shown that fish oil and alpha-linolenic (18:3n-3) acid also downregulate HER2 expression (28,30). Similarly, BC cells injected into nude mice fed fish, flaxseed or canola oil (rich in n-3

PUFAs) formed smaller tumors with lower cell proliferation (33) and lower HER2 expression. HER2 heterodimerizes with HER3 to form an oncogenic unit where HER3 activates the PI3K/Akt pathway (5). Indeed, the inactivation of HER2 in BC cell lines (using Trastuzumab) leads to decreased HER3 tyrosine phosphorylation and PI3K signaling (5,34). In agreement with these data, we found here that HER3 protein expression was dramatically decreased in tumor tissues of the fat-1 transgenic mice (Fig. 2). This latter finding is noteworthy, as high expression of HER3 has been shown to predict early escape from HER-targeted therapies such as the use of the anti-HER2 monoclonal antibody Trastuzumab (35) and is consistent with a recent report showing that genetic ablation of HER3, or its knocking-down by EZN-3920, decreased PI3K signaling and tumor growth in the *MMTV-PyVmT* model of BC (36). Regarding the impact of n-3 PUFAs on HER2 and HER3 signaling, our studies were then extended to cultured cell lines exhibiting moderate expression of HER2 (E0771) and overexpressing HER2 (BT-474 and SK-BR-3), in which we investigated whether DHA could modulate cell proliferation and HER2 signaling pathway. Interestingly, DHA treatment hugely inhibits proliferation/viability of the three cell lines (Fig. 5) and beside this inhibition we also observed a downregulation of HER2 and HER3 and most importantly a DHA-dramatic decrease of phospho-HER2 and phospho-HER3 in the cell lines stimulated by the HER3 specific ligand heregulin (Fig 6). This last result suggests that the formation of HER2/HER3 heterodimer might probably be hindered by DHA treatment.

In addition to the tumor regression observed in the transgenic animals, tumors of the fat-1 mice exhibit higher level of cleaved PARP and lower level of NF- κ B protein expressions compared to the WT. Moreover, treatment of the three BC cell lines with DHA for 72h resulted in a concentration- and time-dependent inhibition of cell growth (Fig. 5). In regards to both *in vivo* and *in vitro* results, the n-3 PUFA mediated effects involved apoptosis. One of the mechanisms of action attributed to the apoptosis augment in DHA/EPA-treated MDA-MB-231 cells was impairment of Akt phosphorylation and NF- κ B activity (27). In fact, Akt directly promotes cell survival by phosphorylating and inactivating components of the apoptotic machinery. Akt also can activate transcription factors such as NF- κ B, critical in tumourigenesis (37). In this sense, our *in vitro* results confirm our *in vivo* results as we also observe a decrease of phospho-Akt in our DHA-treated cell lines (Fig. 6). In line of this, a recent *in vivo* study showed an increased apoptotic index of MCF-7 cells injected into flaxseed oil-fed nude mice (33), suggesting that it was probably

due to the downregulation of tyrosine kinase receptors such as HER2, and the subsequent downregulation of Akt.

In addition, our results reveal a difference in β -catenin expression pattern in tumors of fat-1 transgenic mice, compared to the WT, in which E-cadherin is significantly up-regulated. Moreover, we found reduced protein expression of β -catenin, phospho-GSK3 and c-myc (a pro-oncogene of breast tumors) in all DHA-treated cell lines. β -catenin plays a crucial role in morphogenesis and human cancer, through its dual function in cell-cell interactions and as a transcriptional regulator in numerous signaling pathways (25). Besides the regulation of β -catenin signaling by Wnt, a number of adhesion molecules and other signaling pathways are involved in the control of β -catenin signaling (38). E-cadherin is a potent invasion/tumor suppressor. β -catenin can form a complex with E-cadherin through binding to cytoplasmic tail of E-cadherin, which sequesters it at the plasma membrane and hinders its nucleus translocation (39). We hypothesize that the up-regulation of E-cadherin observed in the tumors of fat-1 transgenics could play at least two potential roles : one, it may inhibits tumor cell growth because E-cadherin has been established as both a tumor suppressor and an invasive suppressor in BCs (40); or, two, the change in β -catenin expression profil in the fat-1 tumor tissues and the huge decrease expression of its target gene *c-Myc*, suggest that increased expression of E-cadherin reduces the availability of cytoplasmic β -catenin by holding it in the plasma membrane, and thereby blocking its signaling to the nucleus. This would prevent, in the nucleus, the binding of β -catenin to the transcription factor TCF/LEF that induces transcription of important downstream target genes implicated in cell proliferation, differentiation and apoptosis such as *c-Myc* e.g. (41,42). Results from Bonvini *et al.* (43), showing that inactivation of HER2 increases binding of β -catenin to E-cadherin leading to a decrease in β -catenin-mediated gene transcription, strengthens our results regarding E-cadherin up-regulation in tumors of fat-1 mice and its potential roles played in these tissues. With regard to what we observe in the tumors of the transgenic mice, we failed to observe the up-regulation of E-cadherin in cells treated with DHA (Fig. 6). It might be due to the fact that DHA-treated cell lines exhibit shrinkage and membrane rupture (data not shown) leading to decreased junctions of adhesion, which is responsible of the decrease of E-cadherin protein expression. Indeed, it has been shown that E-cadherin expression is triggered upon cell contacts being established and E-cadherin interaction will increase E-cadherin level (44).

Another significant finding of the current study is large differences in the levels of EPA metabolites (notably 15-, 12- and 18-HEPE) and DHA-derived mediators (particularly 17-HDHA) in the tumors of fat-1 mice compared with controls (Fig. 3C). 15-HEPE and 17-HDHA have already been linked to antitumorigenic properties (45,46) *via* 15-lipoxygenase activity. These observations can be related to the marked difference in n-6-to-n-3 PUFA ratio between the fat-1 and WT mice (Fig. 3A and B). As 17-HDHA is the precursor of the neuroprotectin D1, which has been reported to promote cell apoptosis (47), it is possible that the high levels of 17-HDHA in the tumors of the fat-1 mice could be an indicator of increased formation of the instable intermediate peroxy-metabolite 17-HpDHA, which was shown to be directly cytotoxic to fast-growing tumor cells (45), contributing to the antitumor effect beyond the mechanisms described in the above paragraph. Moreover, the tumor PUFA-derived metabolite analysis reveals an increased level of PGE₃, derived from the n-3 fatty acid EPA, in the fat-1 mice compared to the WT, when the level of PGE₂ is unchanged (Fig. 3C). When PGE₂ has been shown to promote cancer development (48, 49) PGE₃ has been found to have anticancer effects (50). Our results suggest that PGE₃ and 17-HDHA might be anticancer metabolites, and these generated metabolites from EPA and DHA respectively may underlie the antitumor effect observed in the fat-1 transgenic mice. However, the concentration of PGE₃ in the tumors of the fat-1 animals did not reach that of PGE₂ suggesting that there is a role for AA-derived lipid mediators that cannot be totally replaced by EPA-derived lipid metabolites, EPA competing with AA acid as substrate for metabolite production.

Taken together, our results provide the first evidence that expression of the *fat-1* gene, leading to tissue enrichment of n-3 PUFAs, prevents mammary tumor development. This prevention might occurs by downregulating HER2/HER3/Akt/ -catenin signaling pathway and promoting synthesis of antitumor n-3 PUFA-derived lipid mediators in the tumors of fat-1 mice versus wild-type. These results provide encouraging preclinical evidence and molecular mechanisms by which n-3 PUFAs may regulate the malignant behavior of BC cells. In combination with conventional treatments, supplementing the diet with n-3 PUFAs may be a nontoxic means to synergistically improve cancer treatment outcomes for BC in which *HER2/neu* is overexpressed and may slow or prevent recurrence of cancer. Moreover, our study shows that used alone, an n-3-supplement may be a useful dietary alternative therapy for patients who are not candidates for standard toxic cancer therapies.

Acknowledgments

JB acknowledges support from the French Ministry of Education and Research, INSERM and from the Région Bourgogne. This work was also partially supported by a grant from La Ligue contre le cancer and the Groupe Lipides et Nutrition (GLN). No potential conflict of interest relevant to this article is reported.

JB thanks Joseph Gresti (UMR Physiopathologie des Dyslipidémies, Dijon, France) for his experience in chromatography and his help in lipid analysis, Amandine Bataille, Amandine Chlémaire and André Bouchot for their great expertise in histology.

JB greatly thanks Laurence Decocq and Raymond Berges for taking care of the animals.

AN and KAM thank Andrew Healey (Analytical Centre, University of Bradford) for excellent technical assistance.

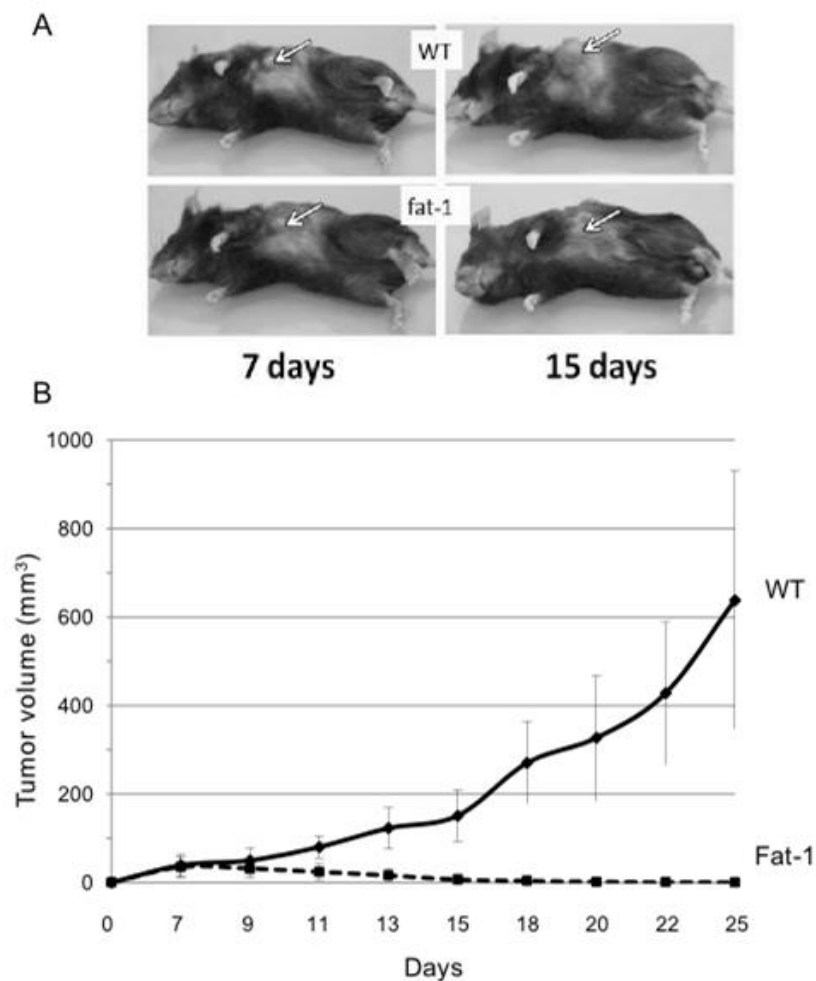
Figure legends

Figure 1. Tumorigenicity of E0771 BC cells in fat-1 transgenic and wild-type (WT) mice.

Cells (5×10^5 diluted in 200 μ l of serum-free RPMI1640 medium) were injected subcutaneously into each of 10 transgenic and 6 WT mice (10 week-old female). (A) representative photographs showing tumor formation at two different time points after cell implantation. (B) Growth rates of melanomas in WT and transgenic mice. Tumor growth was monitored at the indicated time points with a caliper and tumor volume was calculated on the basis of the following formula: Tumor volume = (length $\times$ width²) $\times$ 0.5. The points represent mean tumor volume $\pm$ SE obtained from 6 WT mice or from 10 fat-1 transgenic mice. These observations have been done on four independent experiments.

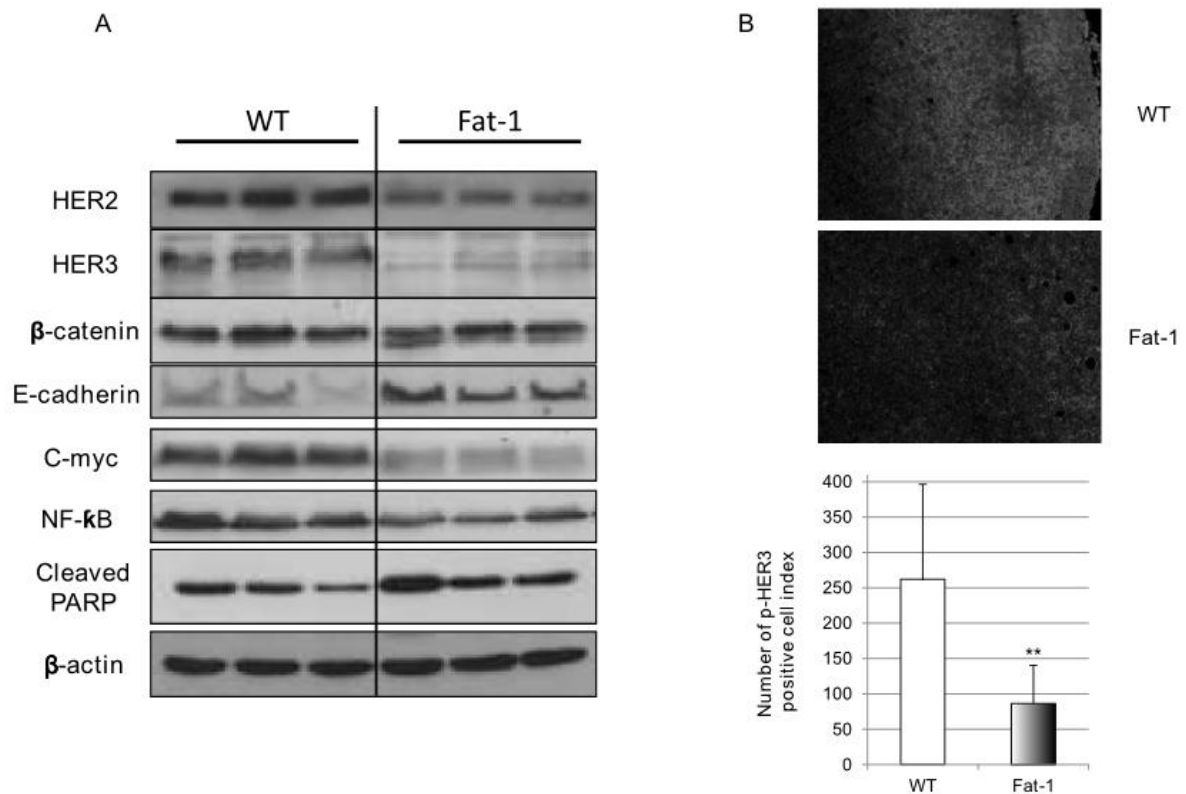


Fig.2. Downregulation of HER2/HER3/β-catenin/c-Myc signaling pathway in fat-1 transgenic mice tumors exhibiting enhanced n-3 PUFA tissue level. (A): Western blotting of HER2, HER3, β-catenin, E-cadherin, c-Myc, NF- B and cleaved PARP in BC xenografts tumors from three WT (lanes 1–3) and three fat-1 transgenic (lanes 4–6) mice. (B): Representative immunohistofluorescence for p-HER3 in the tumors of the WT (top) and fat-1 transgenic (bottom) mice (n=5 and 4 respectively). P-HER3 quantification of WT and fat-1 mice is presented as number of p-HER3 positive cell index. Results are presented as mean±SE and differences were analyzed using Mann-Whitney U-test by Tanagra software.

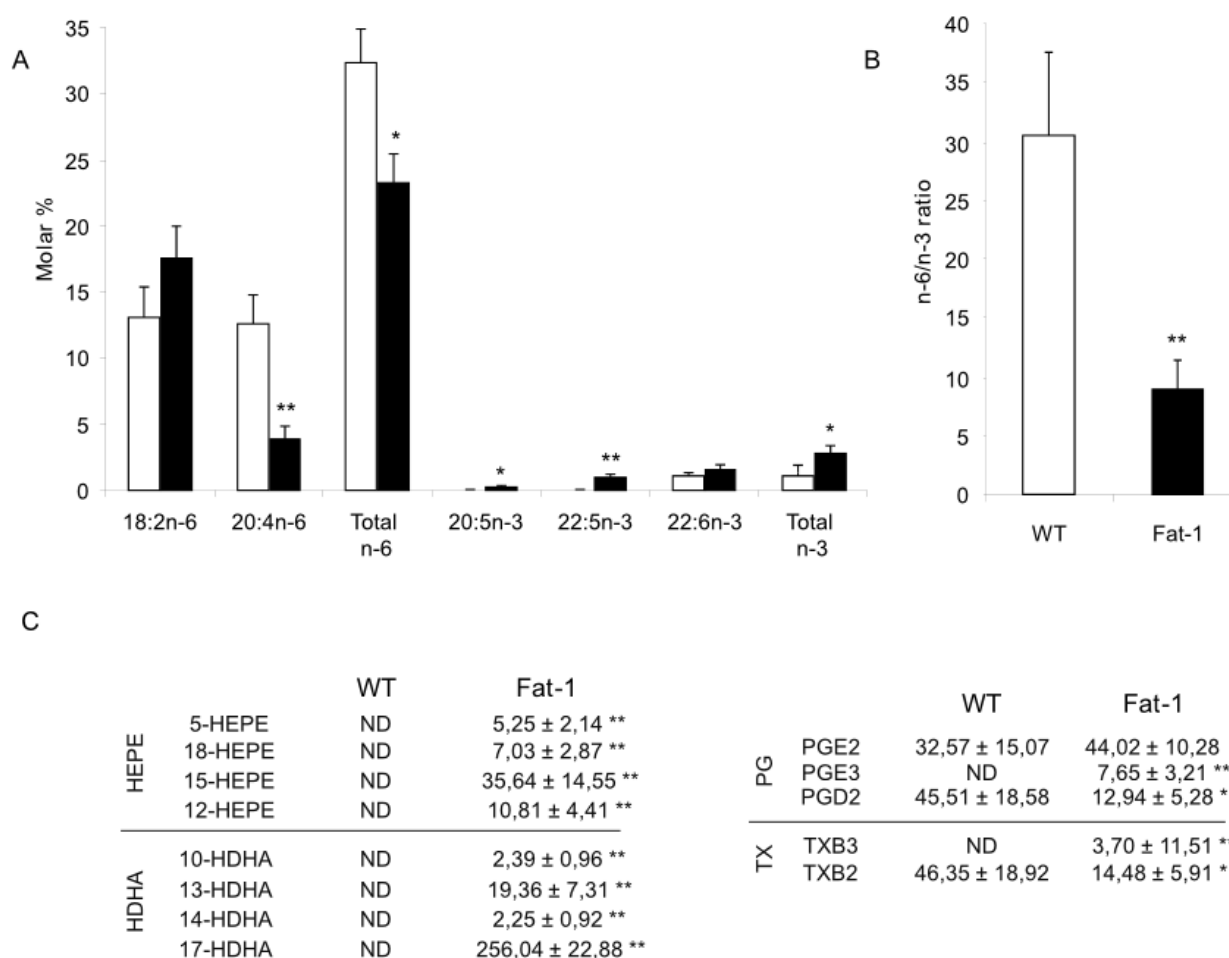


Figure 3. Tumor n-3 fatty acid enrichment and formation of n-6 and n-3 PUFA-derived mediators.

(A): Tumor major fatty acids composition, total n-6, total n-3 and (B): n-6/n3 ratio, are indicated for WT and fat-1 transgenic mice as white and black bars respectively (mean $\pm$ SE, * P <0.05; ** P <0.01 (Student t test), n =8 per group). The n-6-to-n-3 ratio is given by (18:2n-6+22:4n-6+22:5n-6)/(18:3n-3+20:5n-3+22:5n-3+22:6n-3). C: Quantification (ng/mg of tumor) of different n-6- and n-3-derived lipid mediators in tumors of WT (n =4) and fat-1 transgenic mice (n =4). * P <0.05; ** P <0.01 (Student t test).

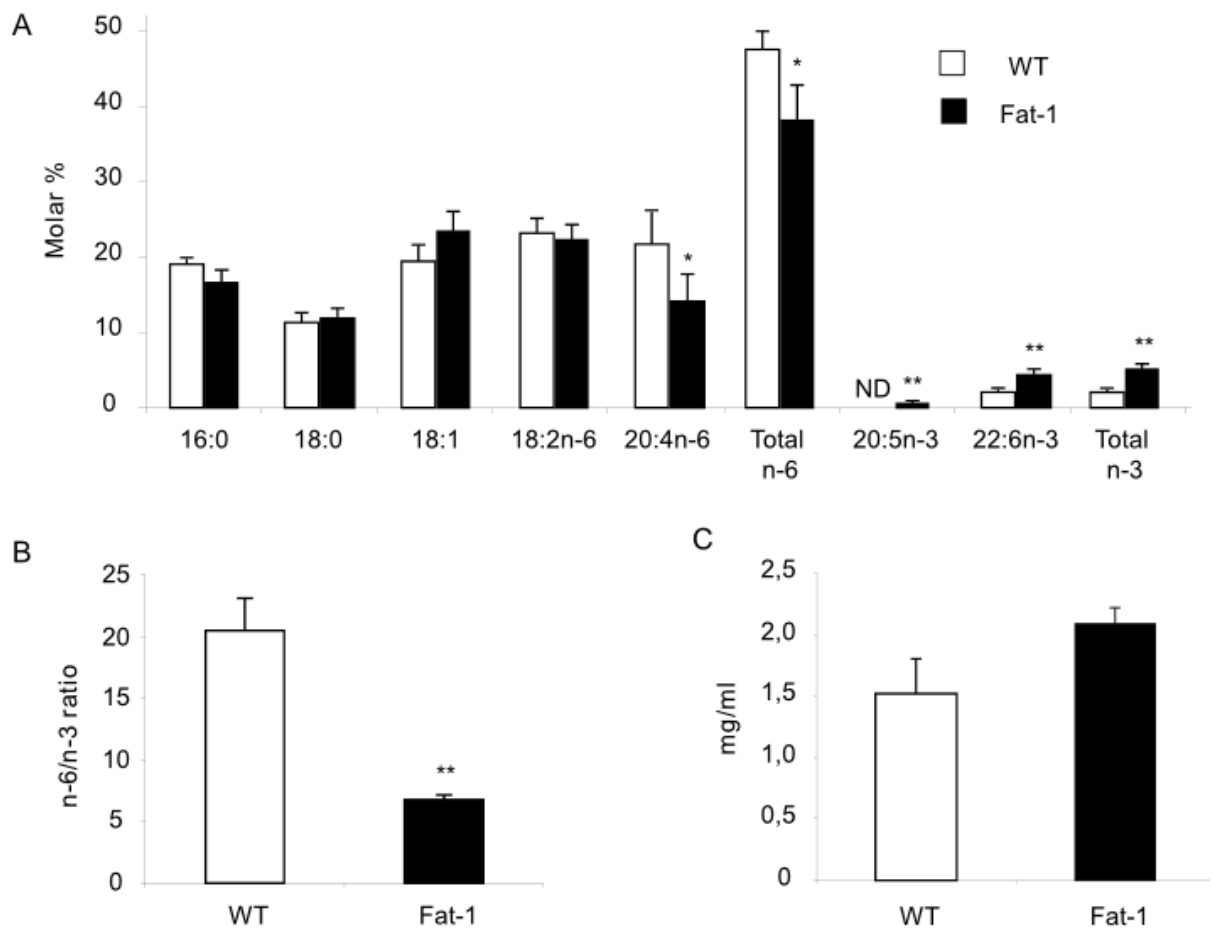


Figure 4. Plasma n-3 fatty acid enrichment and total lipid level. A: Plasma major fatty acids composition, total n-6, total n-3, and n-6-to-n-3 ratio are indicated for WT and fat-1 transgenic mice as white and gray bars, respectively (mean $\pm$ SE). ND, not detected. B: Plasma fatty acids ratios in WT and fat-1 mice. C: Plasma total lipid level in WT and fat-1 animals. Results are presented as a mean $\pm$ SE. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student *t* test); $n = 5$ per group. The n-6-to-n-3 ratio is given by $(18:2n-6 + 20:4n-6 + 22:4n-6 + 22:5n-6) / (18:3n-3 + 20:5n-3 + 22:5n-3 + 22:6n-3)$.

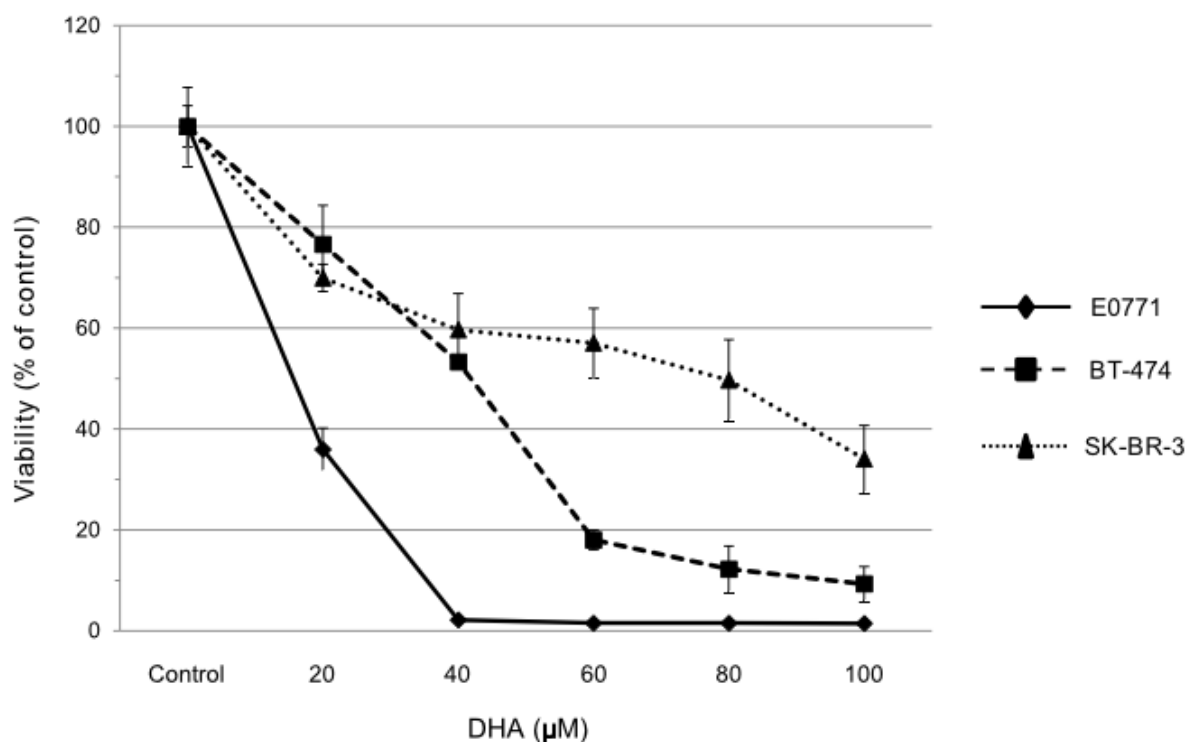


Figure 5. Effects of DHA on viability of BC cells

The effect on cell viability of DHA in BT-474, SK-BR-3 and E0771 cells is assessed and quantified by MTT assay. Cells are treated with various concentrations of DHA. BT-474, SK-BR-3 and E0771 cells are seeded and cultured for 24h in 96-well plates at a density 3×10^3 cells per well and cultured in medium supplemented with 10% FBS. After this period, the cells were washed twice with PBS and the medium is replaced with fresh medium with 0.5% FBS containing DHA at increasing concentration (20-100 μM) for further 72 h. The number of viable cells exposed to DHA is evaluated by a colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data represent the mean of eight values and results are expressed as viability in comparison with controls (100%). $**P < 0.01$ compared to control cells.

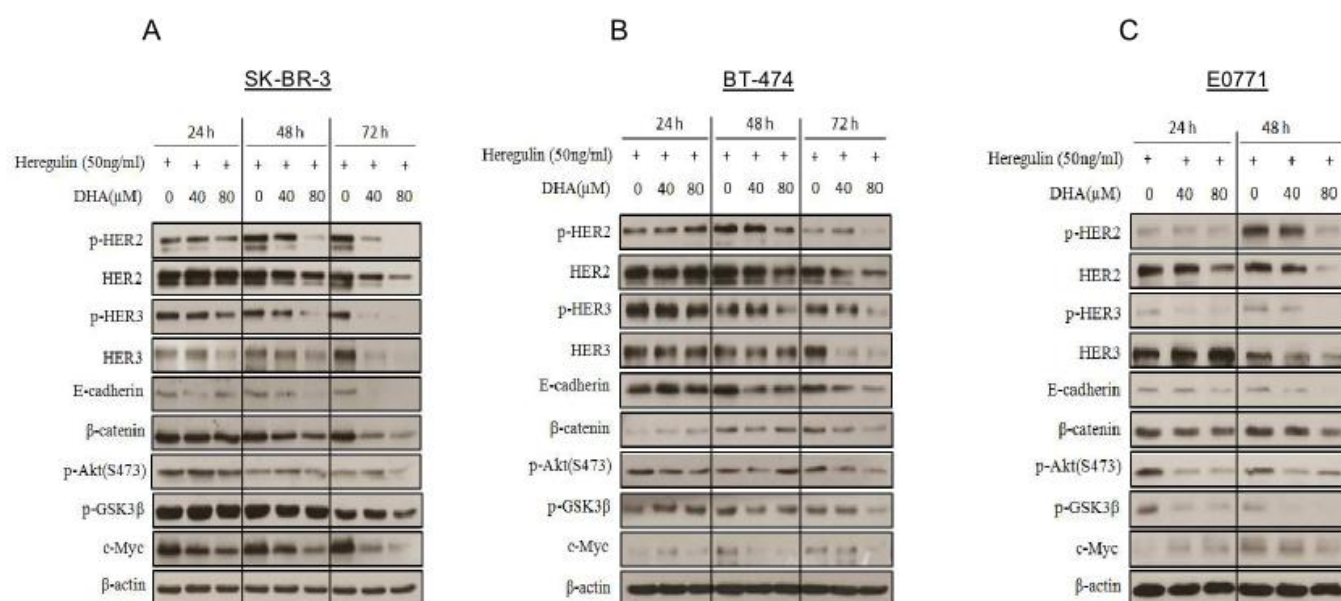


Fig.6. DHA inhibits HER2/HER3 expression and subsequent signaling pathway in SK-BR-3, BT-474 and E0771 cell lines.

SK-BR-3 (A) and BT-474 (B) cells were treated with DHA at 40 and 80 M in medium supplemented with 0.5% FBS for 24, 48 and 72 h. E0771 (C) cells were treated with DHA at 40 and 80 M in medium supplemented with 0.5% FBS for 24 and 48 h. Heregulin β -1 (50ng/ml) was added 1 h before harvest and lysates were immunoblotted as indicated for HER2, p-HER2, HER3, p-HER3, E-cadherin, β -catenin, p-Akt, p-GSK3 β , c-myc and β -actin protein expression.

References

1. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL 3rd. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994; 269(20):14661-5.
2. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(5):361-70.
3. Sithanandam G, Fornwald LW, Fields J, Anderson LM. Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncogene* 2005;24(11):1847-59.
4. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996; 15(10):2452-67.
5. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF 3rd, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(15):8933-8.
6. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003; 12(3):541-52.
7. Yu D, Hung MC. Role of erbB2 in BC chemosensitivity. *Bioessays* 2000; 22(7): 673-80.
8. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(19):10869-74.
9. Travis A, Pinder SE, Robertson JF, Bell JA, Wencyk P, Gullick WJ, Nicholson RI, Poller DN, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO. C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br J Cancer* 1996; 74(2):229-33.
10. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, Staroslawska E, de la Haba-Rodriguez J, Im SA, Pedrini JL, Poirier B, Morandi P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi G, Szado T, Ratnayake J, Ross G, Valagussa P Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive BC (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(1):25-32.
11. Schoeberl B, Faber AC, Li D, Liang MC, Crosby K, Onsum M, Burenkova O,

Pace E, Walton Z, Nie L, Fulgham A, Song Y, Nielsen UB, Engelman JA, Wong KK. An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation. *Cancer Res* 2010; 70(6):2485-94.

12. Campbell MR, Amin D, Moasser MM. HER3 comes of age: new insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16(5):1373-83.

13. MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA, Khanna P, Issa AM, Suttorp MJ, Lim YW, Traina SB, Hilton L, Garland R, Morton SC. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA* 2006; 295(4):403-15.

14. Sun H, Hu Y, Gu Z, Owens RT, Chen YQ, Edwards IJ. Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human BC cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway. *Carcinogenesis* 2011; 32(10):1518-24.

15. Schley PD, Brindley DN, Field CJ. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human BC cells. *J Nutr* 2007; 137(3):548-53.

16. Menendez JA, Ropero S, Lupu R, Colomer R. Dietary fatty acids regulate the activation status of Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene in BC cells. *Ann Oncol* 2004; 15(11):1719-21.

17. Terry PD, Rohan TE, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(3):532-43.

18. Holmes MD, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Hankinson SE, Speizer FE, Rosner B, Willett WC. Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of BC. *JAMA* 1999; 281(10):914-20.

19. Hardy S, Langelier Y, Prentki M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 BC cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res.* 2000; 60(22):6353-8.

20. Chatterjee M, Janarthan M, Manivannan R, Rana A, Chatterjee M. Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *Chem Biol Interact* 2010; 188(1):102-10.

21. Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 2004; 427(6974):504.

22. Bellenger J, Bellenger S, Clément L, Mandard S, Diot C, Poisson JP, Narce M. A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J* 2004; 18(6):773-5.

23. Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20(20):3023-9.

24. Masoodi M, Mir AA, Petasis NA, Serhan CN, Nicolaou A. Simultaneous

lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxy-fatty acids by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22(2):75-83.

25. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004; 303(5663):1483-7.

26. Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu J, Perry D, Cline JM, Thomas MJ, Thornburg T, Kulik G, Smith A, Edwards IJ, D'Agostino R, Zhang H, Wu H, Kang JX, Chen YQ. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J Clin Invest*. 2007; 117(7):1866-75.

27. Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human BC cells. *BC Res Treat* 2005; 92(2):187-95.

28. Menéndez JA, Vázquez-Martín A, Ropero S, Colomer R, Lupu R. HER2 (erbB-2)-targeted effects of the omega-3 polyunsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid (ALA; 18:3n-3), in BC cells: the "fat features" of the "Mediterranean diet" as an "anti-HER2 cocktail". *Clin Transl Oncol* 2006; 8(11):812-20.

29. Rose DP, Connolly JM, Rayburn J, Coleman M. Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of BC cells in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(8):587-92.

30. Yee LD, Young DC, Rosol TJ, Vanbuskirk AM, Clinton SK. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids inhibit HER-2/neu-induced BC in mice independently of the PPARgamma ligand rosiglitazone. *J Nutr*. 2005; 135(5):983-8.

31. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, McGuire WL. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive BC. *Hum Pathol*. 1992; 23(9):974-9.

32. Daly RJ. Take your partners, please--signal diversification by the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Growth Factors*. 1999;16(4):255-63.

33. Truan JS, Chen JM, Thompson LU. Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(10):1414-21.

34. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res*. 2002; 62(11):3151-8.

35. Smith BL, Chin D, Maltzman W, Crosby K, Hortobagyi GN, Bacus SS. The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins. *Br J Cancer* 2004; 91(6):1190-4.

36. Cook RS, Garrett JT, Sánchez V, Stanford JC, Young C, Chakrabarty A, Rinehart C, Zhang Y, Wu Y, Greenberger L, Horak ID, Arteaga CL. ErbB3 ablation

- impairs PI3K/Akt-dependent mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2011; 71(11):3941-51.
37. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; 14(5):381-95.
38. Polakis P. Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol* 2002; 12(14):R499-R501.
39. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 8):1237-45.
40. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular BCs. *EMBO J*. 1995; 14(24):6107-15.
41. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006; 127(3):469-80.
42. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*. 2006; 281(32):22429-33.
43. Bonvini P, An WG, Rosolen A, Nguyen P, Trepel J, Garcia de Herreros A, Dunach M, Neckers LM. Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription. *Cancer Res* 2001; 61(4):1671-7.
44. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 2003; 163(4):847-57.
45. Gleissman H, Yang R, Martinod K, Lindskog M, Serhan CN, Johnsen JI, Kogner P. Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates. *FASEB J* 2010; 24(3):906-15.
46. Weylandt KH, Krause LF, Gomolka B, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX. Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α . *Carcinogenesis* 2011; 32(6):897-903.
47. Ariel A, Li PL, Wang W, Tang WX, Fredman G, Hong S, Gotlinger KH, Serhan CN. The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *J Biol Chem* 2005; 280(52):43079-86.
48. Rose DP, Connolly JM. Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr Cancer* 2000; 37(2):119-27.
49. Wu T. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin signaling in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755(2):135-50.
50. Xia S, Lu Y, Wang J, He C, Hong S, Serhan CN, Kang JX. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids.

Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(33):12499-504.