

Université de Montréal

**Étude des voies de signalisation impliquées lors de la prolifération et l'apoptose des
cellules du cancer du sein en réponse aux acides gras**

Par
Serge Hardy

Département de Biochimie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade doctorat ès Sciences (Ph.D.)
en Biochimie

mai, 2005

© Serge Hardy, 2005



W

4

U58

2005

V. 091

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:
**Étude des voies de signalisation impliquées lors de la prolifération et l'apoptose des
cellules du cancer du sein en réponse aux acides gras**

Présenté par:

Serge Hardy

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Tony Antakly-Président du jury
Dr Marc Prentki-Directeur de recherche
Dr Yves Langelier-Codirecteur de recherche
Dr Edward Bradley-Membre du jury
Dr Vincent Poitout-Examineur externe
Dr. Isabelle Royal-Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ:

La prolifération des cellules cancéreuses mammaires implique une interaction complexe entre les gènes, les facteurs de croissance, les hormones et les nutriments calorigéniques. L'obésité, qui est associée à un niveau plasmatique élevé d'acides gras, contribue à l'augmentation de l'incidence de plusieurs types de cancer incluant le cancer du sein. De plus, certaines études épidémiologiques ainsi que des expériences utilisant les modèles animaux ont permis de postuler qu'une consommation élevée en acide gras peut influencer le risque de cancer du sein. Par contre, il existe peu d'information concernant le mécanisme d'action des acides gras dans la carcinogenèse mammaire.

L'effet de deux des acides gras les plus abondants en circulation, oléate et palmitate, a été étudié sur des lignées de cellules du cancer du sein après une courte période de carence en sérum. Nos résultats démontrent que l'oléate, un acide gras monoinsaturé (C:18:1), stimule la prolifération cellulaire tandis que le palmitate, un acide gras saturé (C:16:0), provoque une diminution de la prolifération cellulaire. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est impliquée dans la transduction de signaux intracellulaire induit par ces acides gras. Aussi, les cellules incubées en présence de palmitate montrent des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Enfin, comme règle générale, nous observons que les acides gras insaturés stimulent la prolifération cellulaire tandis que les acides gras saturés sont proapoptotiques chez les cellules MDA-MB-231.

Le palmitate diminue le potentiel membranaire de la mitochondrie et provoque le relâchement du cytochrome c. De plus, le 2-bromopalmitate, un analogue du palmitate non métabolisable, n'a pas d'effet cytotoxique suggérant que le palmitate doit être métabolisé pour exercer son effet apoptotique. Les études pharmacologiques démontrent que l'effet proapoptotique du palmitate n'est pas médié via les ceramides et les espèces réactives à l'oxygène. Le palmitate provoque une augmentation du turnover et une diminution de la synthèse de la cardiolipine, un phospholipide responsable de la rétention du cytochrome c à la mitochondrie. Au contraire, l'oléate protège les cellules de l'apoptose induite par le palmitate en restaurant les niveaux de cardiolipine. En

effet, l'oléate, qui est préférentiellement métabolisé en triglycérides, redirige le palmitate vers un processus d'estérification en triglycérides rétablissant ainsi la synthèse de cardioline ainsi qu'une diminution de son turnover. Aussi, l'effet prolifératif de l'oléate est diminué par des inhibiteurs pharmacologiques des protéines Gi/o, la phospholipase C, *src* et la mitogenic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MEK 1/2). De plus, l'oléate provoque une augmentation rapide et transitoire du Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de la protéine kinase B. La surexpression dans les cellules MDA-MB-231 du récepteur couplé aux protéines G GPR40, un récepteur aux acides gras, amplifie la prolifération induite par l'oléate tandis que la diminution de l'expression de GPR40 par l'utilisation de l'interférence d'ARN diminue cet effet prolifératif. Enfin, la surexpression de GPR40 dans les cellules du cancer du sein T47D et MCF-7 qui répondent peu à l'oléate, permet une réponse accrue face à l'action proliférative de l'oléate.

L'ensemble des résultats démontre que les acides gras influencent considérablement leur action sur la prolifération ou l'apoptose des cellules cancéreuses du sein. En effet, l'effet proapoptotique du palmitate semble impliquer une diminution du niveau de la cardioline ainsi qu'une altération des fonctions mitochondriales. L'effet prolifératif de l'oléate implique plusieurs voies de signalisation, dont la PI3K, et est médié en partie via le récepteur aux acides gras GPR40. Nos résultats combinés avec ceux obtenus à partir des études épidémiologiques et avec des animaux, devraient contribuer à la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques et des recommandations nutritionnelles pour prévenir le cancer du sein.

Mots-clés : Cancer, Acides Gras, Prolifération, Apoptose, Cardioline, GPR40

ABSTRACT:

Human breast cancer cell proliferation involves a complex interaction between genes, growth factors, hormones and calorogenic nutrients. The emerging evidence indicates that obesity, which is characterized by hyperlipidemia and elevated circulating free-fatty acids (FFA), is associated with enhanced cancer risk including breast cancer. Also, epidemiologic studies and experiments using animal models have suggested that high intake of dietary fat could increase breast cancer risk. However, relative little information exists on the mechanisms by which exogenous FFAs influence breast cancer cell growth.

The present study was designed to investigate the effects of the two most abundant circulating FFA, oleate and palmitate, on established human breast cancer cell lines after a short period of serum starvation. The unsaturated FFA oleate (C:18:1) stimulated cell proliferation whereas the saturated FFA palmitate (C:16) dose dependently inhibited cell growth. Oleate and palmitate respectively increased and decreased phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity and the actions of the two FFA on the enzyme were antagonistic. The growth inhibitory effect of palmitate was related to the induction of apoptosis as indicated by morphological and biochemical criteria. Also, we found as a general principle that saturated FFAs are proapoptotic, whereas unsaturated FFAs increase proliferation of breast cancer cells.

Palmitate decreased the mitochondrial membrane potential and caused cytochrome c release. The non-metabolizable analog 2-bromopalmitate was not cytotoxic indicating that palmitate must be metabolized to exert its toxic effect. Pharmacological studies showed that the action of palmitate is not mediated via ceramides and reactive oxygen species. Palmitate caused an early enhancement of cardiolipin turnover and decreased the levels of this mitochondrial phospholipid which is necessary for cytochrome c retention. The unsaturated FFA oleate protected cells against the proapoptotic action of palmitate. Cosupplementation of oleate restored cardiolipin levels and blocked palmitate-induced apoptosis. Oleate was preferentially metabolized to triglycerides, and oleate cosupplementation channeled palmitate esterification processes to triglycerides.

Also, the proliferative effect of oleate in breast cancer cell was decrease by pharmacological inhibitors of the GTP binding proteins Gi/o, phospholipase C, *src* and mitogenic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MEK 1/2). In addition, oleate caused a rapid and transient rise in cytosolic Ca²⁺ and an increase in protein kinase B activity. Overexpressing in MDA-MB-231 breast cancer cells the G-protein-coupled receptor GPR40, a fatty acid receptor, amplified oleate-induced proliferation, whereas silencing the GPR40 gene using RNA interference decreased it. Overexpressing GPR40 in T47D and MCF-7 breast cancer cells that are poorly responsive to oleate allowed a robust proliferative action of oleate.

The results support the concept that various types of fatty acids are not equivalent with respect to their actions on breast cancer cell growth and apoptosis. Palmitate-induced breast cancer cell death appear to involve a decrease in cardiolipin levels and altered mitochondrial function. The data also indicate that multiple signaling pathways are implicated in the proliferative signal induced by oleate and that these effects are mediated at least in part via GPR40. Overall, these results combined with epidemiological and animal studies should contribute to the design of new strategies and dietary recommendations to prevent breast cancer.

Keywords: Cancer, Fatty Acids, Proliferation, Apoptosis, Cardiolipin, GPR40

TABLE DES MATIÈRES:

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des Tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xv
Chapitre 1: Introduction	1
1 Cancer du sein	1
1.1 Statistiques	1
1.2 Facteurs de risque	2
2 Les acides gras	3
2.1 Digestion et absorption des acides gras	5
2.2 Mobilisation des triglycérides de réserve	6
3 Études épidémiologiques	6
3.1 Acides gras et cancer du sein	6
3.2 Obésité et cancer du sein	9
4 Études expérimentales	10
4.1 Études chez l'animal	10
4.2 Études sur des modèles cellulaires	12
5 Cancer et métabolisme des acides gras	13
5.1 Rôle de l'acide gras synthétase	15

6	Acides gras et apoptose	16
6.1	La voie intrinsèque mitochondriale	17
6.2	Céramides	19
6.3	Stress oxydatif	21
6.4	Cardiolipine	22
7	Récepteurs activés par les acides gras	24
7.1	Récepteurs couplés aux protéines G	25
7.2	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	28
7.3	Récepteur à l'EGF	29
8	Transduction de signaux et molécules de signalisation activées par les acides gras	30
8.1	Voie Raf/MEK/ERK	32
8.2	La phosphatidylinositol 3-kinase	32
8.3	La protéine kinase B	33
8.4	Les protéines kinases C	34
8.5	Le calcium	35
8.6	Autres voies modulées par les acides gras	37
9	Thématique et but du travail	38
Chapitre 2 : Résultats		39

Article 1: Oleate activates Phosphatidylinositol 3-kinase, promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells whereas palmitate has opposite effects.

Cancer Res. 2000 Nov 15; 60(22):6353-8..... 39

Article 2: Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells: A role for cardiolipin.

J. Biol. Chem. 2003; 278 (34): 31861-70..... 65

Article 3: Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G
protein-coupled receptor GPR40.

J. Biol. Chem. 2005; 280 (14): 13285-91..... 105

Chapitre 3: Discussion 131

Chapitre 4: Perspectives du Projet 144

Bibliographie 149

Liste des figures:

Chapitre 1: Introduction

Figure 1: Corrélation entre le pourcentage des calories provenant des graisses et la mortalité attribuable au cancer du sein de différentes populations mondiales..	7
Figure 2: Étude de migration et incidence du cancer du sein.....	9
Figure 3: Voies métaboliques impliquées dans l'oxydation et la synthèse des acides gras.....	14
Figure 4: Voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose impliquée dans la libération du cytochrome C.....	18
Figure 5: Voie de synthèse <i>de novo</i> des céramides.....	20
Figure 6: Voie de synthèse <i>de novo</i> de la cardiolipine.....	24
Figure 7: Activation des différentes protéines G en réponse à la liaison d'un ligand à son GPCR.....	26
Figure 8: Voies de signalisation menant à la prolifération et la survie cellulaire....	31

Chapitre 2: Résultats

Article 1: Oleate activates Phosphatidylinositol 3-kinase, promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells whereas palmitate has opposite effects.

Figure 1: Effects of oleate and palmitate on the incorporation of [3H]thymidine in various breast cancer cell lines.....	58
Figure 2: Dose-dependence of the effects of oleate and palmitate on the incorporation of [3H]-thymidine in MDA-MB-231 cells.....	59
Figure 3: Effects of oleate and FBS on MDA-MB-231 cell growth.....	60
Figure 4: Oleate counteracts apoptosis induced by serum starvation and palmitate treatment.....	61
Figure 5: The protection by oleate of MDA-MB-231 cells against palmitate-induced apoptosis is dose dependent.....	62
Figure 6: Effect of PI3-K inhibitors on MDA-MB-231 cell proliferation induced by	

oleate.....	63
Figure 7: Effect of oleate and palmitate on PI3-K activity.....	64
Article 2: Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells: A role for cardiolipin	
Figure 1: Effects of various fatty acids on the proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells.....	90
Figure 2: Time course of the effects of palmitate on various parameters of the apoptotic process in MDA-MB-231 cells.....	92
Figure 3: Alterations of lipid partitioning affect palmitate-induced apoptosis.....	94
Figure 4: Inhibition of <i>de novo</i> ceramide synthesis does not block palmitate-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells.....	96
Figure 5: Oleate alters the fate of palmitate into neutral lipids.....	98
Figure 6: Effect of palmitate and oleate on the cellular anionic phospholipid composition and cardiolipin half-life.....	99
Figure 7: Oleate supplementation or AICAR treatment restore CL levels in palmitate-treated MDA-MB-231 cells.....	101
Figure 8: Antiapoptotic Bcl-2 family members decrease palmitate-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells.....	103
Figure 9: PI3-K is not implicated in the protective effect of oleate against palmitate-induced apoptosis.....	104
Article 3: Oleate promotes the proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40.	
Figure 1: Effects of various pharmacological inhibitors on oleate-induced proliferation of MDA-MB-231 cells.....	125
Figure 2: EGFR is not activated by oleate in MDA-MB-231 cells.....	126
Figure 3: Oleate stimulates AKT phosphorylation.....	127
Figure 4: Oleate increases the intracellular concentration of calcium in both the presence and absence of BSA.....	128
Figure 5: GPR40 is implicated in oleate-induced cell proliferation.....	129

Liste des Tableaux:

Chapitre 1: Introduction

Tableau I: Liste des acides gras les plus communs..... 4

Chapitre 2: Résultats

Article 3: Oleate promotes the proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40.

Table I: GPR40 expression in transfected breast cancer cells..... 130

Liste des abréviations:

ACC:	acétyl-CoA carboxylase
AMPK:	AMP-activated protein kinase
CPT-1:	carnitine-palmitoyl transférase-1
DAG:	Diacylglycérol
EGF:	epidermal growth factor
ER:	réticulum endoplasmique
ERK:	extra-cellular signal related kinase
FABP:	fatty acid binding protein
FAS:	fatty acid synthase
FATP:	fatty acid transport protein
GFP:	green fluorescent protein
GPCR:	récepteur couplé aux protéines G
GSK3:	glycogène synthase kinase 3
iNOS:	NO synthase inductible
IP3:	inositol 1,4,5-triphosphate
LPA:	acide lysophosphatidique
LPL:	lipoprotéine lipase
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MEK:	mitogenic-extracellular signal-regulated kinase
mTOR	mamalian target of rapamycin
PDK:	phosphoinositol-dependant protein kinase
PI:	phosphatidylinositol
PI3K:	phosphatidylinositol-3 kinase
PKA:	protein kinase A
PKB:	protein kinase B
PKC:	protein kinase C
PLC:	phospholipase C
PPAR:	peroxisome proliferator-activated receptor
PTP:	pore de transition de perméabilité

RNAi:	interférence de l'ARN
ROS:	espèce réactive de l'oxygène
RyR:	récepteur-canal à la ryanodine
S1P:	sphingosine 1-phosphate
SAPK/JNK	stress-activated protein kinase/ c-Jun N-terminal kinase
SPT:	sérine palmitoyltransférase
VLDL:	very low density lipoprotein

Remerciements:

J'aimerais avant tout exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche Marc Prentki pour m'avoir donné la chance d'effectuer mes études graduées dans un environnement riche et stimulant. Je tiens à le remercier pour avoir veillé à la qualité de ma formation scientifique, pour ses judicieux conseils et pour la confiance qu'il a su me témoigner durant mon passage dans son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent également à mon codirecteur de recherche Yves Langelier pour sa disponibilité et pour l'appui qu'il m'a accordé tout au long de mes études graduées.

Je remercie mes collègues du laboratoire qui par leur camaraderie et leur discussion ont collaboré à ce projet de recherche.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis pour leur support. Plus particulièrement, je tiens à remercier ma mère qui m'a toujours encouragée durant mes années d'études.

INTRODUCTION :

1 Cancer du sein

La prolifération des cellules cancéreuses mammaires implique une interaction complexe entre les gènes, les facteurs de croissance, les hormones et les nutriments calorigéniques. Certaines études épidémiologiques ainsi que des expériences utilisant les modèles animaux ont permis de postuler qu'une consommation élevée en acide gras peut influencer le risque de cancer du sein. De plus, l'obésité, qui est associée à un niveau plasmatique élevé d'acides gras, contribue à l'augmentation de l'incidence de plusieurs types de cancer incluant le cancer du sein. Les acides gras sont des composés essentiels qui sont utilisés par la cellule comme source et stockage d'énergie, pour la formation des membranes et pour la synthèse de molécules impliquées dans la signalisation. Aussi, les acides gras jouent un rôle important dans le contrôle de l'expression génique, permettant de modifier le métabolisme, la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose.

1.1 Statistiques

Le cancer du sein est le type de cancer le plus commun chez les femmes dans le monde et le plus mortel après le cancer du poumon. Il est estimé qu'une femme sur neuf développera un cancer du sein au cours de son existence. En 2004, 1.2 millions de nouveaux cas d'incidence seront rapportés dans le monde (WHO, 2004). De plus, environ 50% des cas d'incidence du cancer du sein se situent dans les pays les plus développés. En 2000, la mortalité attribuable au cancer du sein dans le monde a été estimée à environ 376611 c'est-à-dire 5,2% de tous les cancers (WHO, 2004). Seulement au Canada, il y aura 70700 nouveaux cas d'incidence du cancer en 2004 chez la femme (NCIC, 2004). De ce nombre, 21200 sont des cancers du sein et il est estimé que 5200 femmes vont mourir de ce type de cancer. Par contre, la mortalité tend à diminuer légèrement depuis une décennie due principalement à un diagnostic plus précoce de la

maladie. Il est donc important d'identifier les facteurs menant au développement de la carcinogénèse mammaire et de comprendre leurs mécanismes d'action.

1.2 Facteurs de risque

Le cancer du sein est plus répandu en Amérique du Nord et en Europe et il est relativement peu courant en Asie et en Amérique latine (WHO, 2004), le taux d'incidence dans les régions à risque élevé étant de trois à cinq fois supérieur à celui des régions à faible risque. Les événements et les facteurs précis responsables de l'initiation et la transformation des cellules épithéliales mammaires ne sont pas clairs. Par contre, certains facteurs de risque pouvant contribuer à la progression du cancer du sein ont été identifiés. Le cancer du sein est plus fréquent chez les personnes plus âgées (NCIC, 2004). Pour le groupe d'âge 35-39 ans, le risque est de 0.5 nouveaux cas par 1000 femmes par année. Ce risque est 2 fois plus élevé pour le groupe d'âge 40-44 ans, plus de 2,5 fois plus élevé pour les groupes d'âge 45-49 ans et 49-54 ans et jusqu'à près de 3 fois plus élevé pour les groupes d'âge suivants. Il existe des évidences que certains agents chimiques comme la fumée de tabac (Coyle, 2004; Morabia et al., 1996) et des composés aromatiques aminés comme la xenylamine, le 4-nitrobiphényl ainsi que la benzidine (Wogan et al., 2004), seraient des facteurs importants. A ce jour, les facteurs de risque les plus établis sont ceux associés aux facteurs hormonaux (Coyle, 2004; Kampert et al., 1988). En effet, des observations ont montré que certaines hormones, particulièrement les œstrogènes, sont impliquées dans l'incidence du cancer du sein (Pike et al., 2004). Chez les femmes préménopausées, l'oestrogène est produit à 60% par les ovaires (sous forme d'estradiol) et à 40% par les glandes surrénales (sous forme d'estrone). Après la ménopause et l'atrophie des ovaires, l'oestrogène continue à être produit au niveau du tissu graisseux sous l'action des glandes surrénales. Par contre, le mécanisme d'action de ces facteurs hormonaux dans la carcinogénèse mammaire n'est pas clair. Aussi, l'obésité augmente le risque du cancer du sein après la ménopause d'environ 1,5 fois (Calle and Thun, 2004). Une augmentation de poids d'environ 5 kg par rapport au poids idéal est associée à un risque accru de cancer du sein

après la ménopause. Certaines études ont montré qu'un gain de poids même avant la ménopause augmente aussi le risque du cancer du sein (Cho et al., 2003). Une explication possible est qu'après la ménopause et la cessation de la fonction des ovaires, la seule source endogène d'oestrogènes se situe au niveau du tissu graisseux du corps qui transforme l'androstènedione en estradiol (Calle and Thun, 2004). Enfin, certaines études épidémiologiques ainsi que des expériences utilisant les modèles animaux ont permis de postuler qu'une consommation élevée en acide gras peut influencer le risque de cancer du sein.

Il devient aussi de plus en plus évident que certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs sont impliqués dans la progression du cancer du sein. Il est estimé que 20 à 40% des tumeurs mammaires possèdent une mutation du gène *p53* (Gasco et al., 2002). De plus, le gène *HER-2/neu* est amplifié dans 25-30 % des cancers du sein (Zhou and Hung, 2003). Il existe aussi d'autres oncogènes comme *ras* et *myc* qui sont souvent mutés dans les cellules tumorales mammaires (Malaney and Daly, 2001; Popescu and Zimonjic, 2002). Des «gènes du cancer du sein» héréditaires que l'on nomme *BRCA-1* et *BRCA-2* qui sont mutés dans environ 20 % des cancers mammaires ont également été identifiés (Moynahan, 2002).

2 Les Acides Gras

Un acide gras est constitué d'une chaîne alkylée qui se termine par un groupement carboxyle. Le plus souvent, les acides gras ont un nombre de carbone pair. Si un acide gras contient une seule double liaison entre deux atomes de carbone de la chaîne alkylée, on dit qu'il est monoinsaturé. S'il contient plus d'une double liaison, alors c'est un polyinsaturé. Lorsqu'il ne contient aucune double liaison, il est saturé. Une liste des acides gras les plus communs est présentée dans le Tableau I. En général, dans les aliments, on retrouve les acides gras sous forme de triglycérides. Les triglycérides sont composés de trois acides gras réunis par une molécule de glycérol. Les trois acides

gras ainsi réunis peuvent être de longueur et de type (saturé, monoinsaturé, polyinsaturé) différents. Les acides gras sont transportés dans le sang sous forme de triglycérides dans les lipoprotéines et sous forme « libres » associés à l'albumine. Après libération par l'albumine et suite à l'intervention de la lipoprotéine lipase, les acides gras diffusent et/ou sont transportés dans les cellules pour y être métabolisés.

Tableau I: Liste des acides gras les plus communs

Nom commun	Nombre de carbone	Nom systématique	Famille ω
Myristique	C14 :0	Tétradécanoïc	-----
Palmitique	C16 :0	Hexadécanoïc	-----
Stéarique	C18 :0	Octadécanoïc	-----
Arachidique	C20 :0	Eicosanoïc	-----
Palmitoléique	C16 :1	cis-9-hexadécanoïc	-----
Oléique	C18 :1	cis-9-octadécenoïc	ω -9
Linoléique	C18 :2	cis-9,12-octadécenoïc	ω -6
Linoléinique	C18 :3	cis-9,12,15-octadécenoïc	ω -3
γ -Linoléinique	C18 :3	cis-6,9,12-octadécenoïc	ω -6
Arachidonique	C20 :4	cis-5,8,11,14-eicosatétraenoïc	ω -6
ETYA	C20 :4	5,8,11,14-eicosatétraynoïc	ω -6
EPA	C20 :5	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoïc	ω -3
DHA	C22 :6	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoïc	ω -3

2.1 Digestion et absorption des acides gras

Les principaux lipides de l'alimentation sont constitués essentiellement de triglycérides (environ 90 %), d'acides gras libres, de phospholipides et de stérols. La digestion de ces lipides est sous la dépendance des enzymes pancréatiques et des sels biliaires au niveau de l'intestin (Carriere et al., 1993). En effet, la bile et la lipase pancréatique qui se déversent dans le duodénum permettent la digestion de la majorité des lipides alimentaires. L'action détergente des sels biliaires permet la transformation des amas lipidiques en émulsion, rendant ainsi les triglycérides accessibles pour hydrolyse par la lipase pancréatique. La phospholipase A2 pancréatique assure l'hydrolyse des phospholipides alimentaires en acide gras et acide phosphatidique tandis que la cholestérol ester hydrolase pancréatique permet le clivage entre l'acide gras estérifié et la molécule de cholestérol. Ainsi, les produits d'hydrolyse des lipides alimentaires, acides gras et monoglycérides, les sels biliaires, les vitamines liposolubles et le cholestérol forment des micelles (Carey et al., 1983).

La structure micellaire permet l'absorption des acides gras par les entérocytes au niveau de l'intestin grêle soit par diffusion passive (Hamilton and Kamp, 1999) soit grâce à l'action de transporteurs membranaires comme la "fatty acid transport protein" (FATP) et CD36 (Hajri and Abumrad, 2002). Une fois entrés dans l'entérocyte, les acides gras sont pris en charge par un transporteur spécifique, la "fatty acid binding protein" (FABP), qui les achemine dans le réticulum endoplasmique (Shi and Burn, 2004). Les acides gras sont ré-estérifiés en triglycérides par les enzymes du réticulum endoplasmique (Coleman and Lee, 2004). Les phospholipides sont également resynthétisés à partir d'acide gras et d'acide phosphatidique tandis que le cholestérol absorbé est majoritairement réestérifié. Les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol sont ensuite assemblés au niveau microsomal avec de l'apolipoprotéine B48, formant ainsi des lipoprotéines appelées chylomicrons qui sont sécrétés par les entérocytes (Bakillah and El Abbouyi, 2003). Les chylomicrons entrent dans la circulation sanguine et leurs triglycérides sont hydrolysés au niveau de la surface des capillaires sanguins par la lipoprotéine lipase (LPL), libérant ainsi des acides gras captés

par les tissus sous-jacents. Les chylomicrons sont ensuite captés par le foie et dégradés dans l'hépatocyte. Ainsi, l'approvisionnement en acides gras des organes périphériques, notamment hors de la période post-prandiale, est assuré par les "very low density lipoproteins" (VLDL) (Bakillah and El Abbouyi, 2003). Synthétisées au niveau hépatique à partir de lipides stockés ou synthétisés par le foie et de l'apolipoprotéine B100, les VLDL sont, comme les chylomicrons, hydrolysés par la LPL, fournissant aux tissus les acides gras nécessaires à leur métabolisme.

2.2 Mobilisation des triglycérides de réserve

Lorsque les apports en acides gras excèdent les dépenses on assiste à une mise en réserve des graisses essentiellement sous forme de triglycérides dans les adipocytes. En effet, les acides gras provenant de l'hydrolyse des chylomicrons et VLDL sont captés par ces cellules et réassemblés sous forme de triglycérides pour y être stockés. Ces triglycérides constituent une source d'énergie utilisable par toutes les cellules (Hii et al., 2001). Le jeûne prolongé, les exercices physiques et le stress favorisent leur mobilisation. En effet, les triglycérides sont hydrolysés par une lipase sensible aux hormones comme l'adrénaline, le glucagon, la noradrénaline, les corticostéroïdes et les hormones hypophysaires (Haemmerle et al., 2003). Les adipocytes sécrètent alors ces acides gras qui sont transportés par l'albumine plasmatique vers les tissus pour y être métabolisés.

3 Études épidémiologiques

3.1 Acides gras et cancer du sein

Des études épidémiologiques ont indiqué que des femmes provenant de pays ayant une diète riche en graisse possèdent un risque d'incidence du cancer du sein qui peut-être jusqu'à cinq fois plus élevé que celles provenant de pays ayant une diète faible en graisse (Fig. 1) (Pariza, 1987; Rose, 1997b; Welsch,

1992). Par exemple, dans un pays comme les États-Unis où le taux d'incidence du cancer du sein est élevé, environ 35-45 % des calories totales proviennent des acides gras. Par contre, en Chine qui possède un faible taux d'incidence du cancer du sein, les acides gras constituent 15-20 % des calories totales.

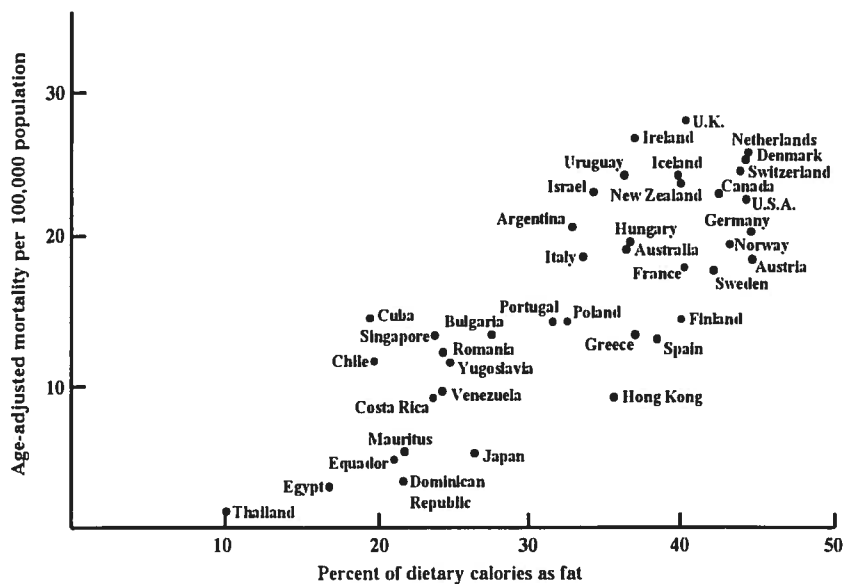


Figure 1: Corrélation entre le pourcentage des calories provenant des graisses et la mortalité attribuable au cancer du sein de différentes populations mondiales (Pariza M.W., 1987)

À partir de ces observations, il a été postulé qu'une consommation élevée en gras augmente le risque du cancer du sein (Pariza, 1987). De plus, des études ont montré que les femmes qui migrent d'un pays où le risque du cancer du sein et la consommation de gras alimentaire sont bas vers un pays où le risque et la consommation de gras est élevé, possèdent un risque accru d'être atteintes d'un cancer du sein et ce, dans la génération suivant celle qui aura migrée (fig. 2) (LeMarchand et al., 1985). L'hypothèse qu'une diète riche en acides gras favorise l'augmentation de l'incidence du cancer mammaire est supportée par des méta-analyses d'études épidémiologiques ainsi que par un grand nombre

d'études utilisant des modèles animaux et des cellules du cancer du sein en cultures (Cohen et al., 1993; Fay et al., 1997; Lee and Lin, 2000; Rose, 1997a; Wirfalt et al., 2002). Une récente étude européenne a démontré qu'une consommation élevée en acides gras, comparativement à une consommation faible en acides gras, double l'incidence du cancer du sein (Bingham et al., 2003). De plus, il existe une corrélation positive entre le gras animal consommé lorsque les personnes sont au début de l'âge adulte et le risque du cancer mammaire (Cho et al., 2003). En revanche, certaines études épidémiologiques n'ont pas démontré de relation entre les acides gras et l'incidence du cancer du sein (Byrne et al., 2002; Holmes et al., 1999; Kushi and Giovannucci, 2002; McCullough and Giovannucci, 2004; Smith-Warner et al., 2001).

La question de savoir pourquoi il existe une divergence entre les diverses études épidémiologiques comparativement aux études avec les animaux relativement à la consommation en acides gras et le risque du cancer du sein est très complexe. Un problème majeur avec les études épidémiologiques nutritionnelles est que ces dernières souffrent d'une grande imprécision au niveau de la mesure de l'exposition à un nutriment. Cette imprécision peut mener à sous-estimer l'association entre le nutriment en question et la maladie. L'utilisation de biomarqueurs de la diète comparativement aux questionnaires pourrait aider à corriger cette situation (McCullough and Giovannucci, 2004). Il est aussi difficile d'étudier la relation entre un nutriment spécifique comme les acides gras et le cancer du sein car la nourriture ingérée est constituée de plusieurs types de nutriments différents. Il y a aussi le fait que les études mesurent la consommation en acides gras chez les adultes mais il est possible que les acides gras puissent avoir une influence pendant l'adolescence au moment du développement de la glande mammaire (Cho et al., 2003; Stoll, 2002b). Enfin, il est possible que la carcinogenèse mammaire soient influencée par le type d'acides gras (saturé, monoinsaturé, polyinsaturé) plutôt que le gras total (Terry et al., 2003).

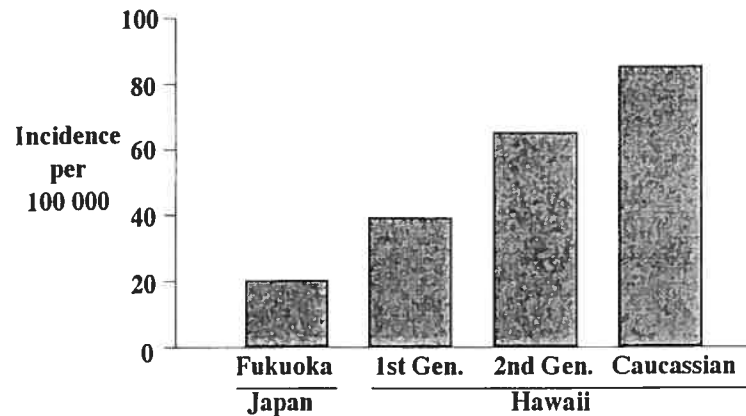


Figure 2: Étude de migration et incidence du cancer du sein (Lemarchand L. et al, 1985)

3.2 Obésité et cancer du sein

Tout comme le cancer du sein, la prévalence de l'obésité dans les pays développés a augmenté de façon constante ces deux dernières décennies (Seidell and Visscher, 2003). Environ deux américains sur trois ont un surplus de poids ou sont obèses et environ 300 millions de personnes sont atteints d'obésité au niveau mondial (Flegal et al., 2002). L'accumulation des graisses augmente principalement lorsque la prise de calories surpasse la capacité de l'organisme à brûler ces calories. Certains facteurs environnementaux comme l'urbanisation, la consommation excessive de nourriture ainsi qu'une diminution de l'activité physique, vont dérégler la balance énergétique et augmenter la prévalence d'adiposité excessive dans la population (Calle and Thun, 2004). Bien que l'obésité soit reconnue comme étant une cause du diabète et des maladies cardiovasculaire, la relation entre l'obésité et le cancer n'est pas clairement établie. Ceci s'explique principalement par le manque d'études approfondies sur ce sujet.

Par contre, des études épidémiologiques ont démontrés que l'obésité contribue à l'augmentation de l'incidence de plusieurs types de cancer incluant le cancer du sein (Calle and Kaaks, 2004). En effet, il est estimé que 15-20 % des cancers aux États-unis

peuvent être associés à un surplus de poids ou à l'obésité (Calle and Thun, 2004). Dans plusieurs études, il a été observé que l'obésité augmente de 30-40% l'incidence du cancer du sein chez les femmes postménopausées (Ballard-Barbash and Swanson, 1996; Galanis et al., 1998; Hunter and Willett, 1993; Trentham-Dietz et al., 1997). De plus, les femmes obèses ont un taux de mortalité due au cancer du sein qui est trois fois plus élevé que les femmes minces (Petrelli et al., 2002). Une hypothèse concernant le mécanisme liant le cancer du sein et l'obésité implique une altération du métabolisme induisant la surproduction de certaines hormones et des facteurs de croissance (Calle and Thun, 2004). Par exemple, les personnes obèses ont un niveau d'insuline plus élevé que les personnes minces et cette hyperinsulinémie est associée à une augmentation de l'incidence du cancer mammaire (Stoll, 2002b). Comme l'obésité est également associée à un niveau plasmatique élevé de triglycéride et d'acides gras (Felber and Golay, 2002), il est possible que ces derniers puissent également contribuer à la progression du cancer mammaire.

4 Études expérimentales

4.1 Études chez l'animal

Les études portant sur l'effet du gras alimentaire sur la carcinogénèse mammaire chez les modèles de rongeurs semblent plus concluantes que les études épidémiologiques. En effet, il a été démontré que les rats possédant des tumeurs mammaires induites et qui reçoivent une diète riche en gras alimentaire ont des masses tumorales plus grosses que le groupe contrôle qui reçoit une diète normale (Carroll, 1991). Une autre étude a démontré que les rats nourris avec une diète riche en acides gras polyinsaturés (huile de maïs) possèdent plus de tumeurs que ceux nourris avec une diète riche en acides gras saturés (huile de coco) (Rose, 1997b). De plus, l'administration d'un supplément d'acides gras polyinsaturés à la diète riche en acides gras saturés a comme conséquence d'augmenter le nombre de tumeurs produites. Chez les rats possédant des

tumeurs mammaires induites qui ont été nourris avec une diète riche en huile de maïs, il a été démontré à l'aide de la technique du "cDNA microarrays" que plusieurs gènes reliés à la prolifération cellulaire, comme l' α 2-globuline et la protéine H19, sont surexprimés (Escrich et al., 2004). Diverses études ont aussi démontré que l'huile de poisson qui est riche en acide linoléique, un acide gras polyinsaturé de type oméga-3, inhibe la promotion et le développement des tumeurs mammaires chez le rat (Rose and Connolly, 1999). De plus, il semble que les acides gras oméga-3 docohexaenoate et eicosapentaenoate ont un effet protecteur sur la progression du cancer du sein chez les modèles animaux (Larsson et al., 2004). Une hypothèse émise est que les acides gras omega-3 inhibent de façon compétitive les désaturases nécessaires à la production de précurseurs des produits mitogéniques que sont les prostaglandines, les leukotriènes et les tromboxanes (Rose and Connolly, 1999).

Par contre, il existe aussi des résultats inconsistants en ce qui concerne les études sur le rôle des acides gras sur la carcinogenèse mammaire chez les animaux. Généralement, de hauts niveaux d'acides gras saturés à longue chaîne diminuent le développement de tumeurs mammaires comparativement aux acides gras insaturés chez les modèles de rongeurs possédant des tumeurs mammaires induites par un carcinogène chimique (Bartsch et al., 1999; Gabriel et al., 1987; Rose, 1997b; Rose and Connolly, 2000; Sundram et al., 1989). Par contre, cette corrélation n'est pas retrouvée dans toutes les études (Kohlmeier and Mendez, 1997; Welsch, 1992). En effet, le type et la quantité d'acides gras administrés aux animaux peuvent influencer de différentes façons le développement des tumeurs mammaires. Ainsi, ces résultats inconsistants peuvent être expliqués en partie par le fait que la diète riche en acides gras est généralement administrée sous forme de mélanges d'acides gras (différentes huiles) et non sous forme individuelle (Dwyer, 1997; Hardy et al., 1997). De plus, certaines huiles contiennent des antioxydants (vitamines, flavanoides, composés phénoliques) qui ont un effet protecteur sur le développement du cancer du sein.

4.2 Études sur des modèles cellulaires

Différents effets des acides gras saturés et insaturés sur la prolifération cellulaire ont aussi été documentés sur des lignées épithéliales mammaires tumorales en culture (Buckman et al., 1990; Buckman et al., 1991; Sundram et al., 1989; Wickramasinghe et al., 1996). Les expériences *in vitro* permettent d'étudier l'effet de différents acides gras et leurs métabolites sur la croissance des cellules cancéreuses en culture. Rose et Connelly ont observé que l'acide oléique stimule la prolifération de la lignées tumorales mammaires MDA-MB-231 mais il semble qu'à plus forte dose il y ait une diminution de la croissance (Rose and Connolly, 1990). De plus, ils ont observé une diminution de la prolifération lorsque les cellules sont incubées en présence de stéarate et de palmitate. Un autre groupe a aussi montré cette diminution avec différents acides gras saturés chez les MCF-7 (Hardy et al., 1997). En effet, ils ont observé une inhibition progressive de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires lorsqu'il y a une augmentation de la longueur de la chaîne de l'acide gras saturé. Par contre, un autre groupe a montré que le palmitate n'a pas d'effet sur la croissance cellulaire dans cette même lignée cellulaire (Abdi-Dezfuli et al., 1997). Une autre étude a montré que l'oléate n'avait pas d'effet sur certaines lignées cellulaires estrogènes dépendantes mais qu'il y avait une augmentation de la prolifération chez les lignées oestrogènes indépendantes (Chajes et al., 1995). Généralement, les acides gras polyinsaturés comme le linoléate stimulent la prolifération cellulaire en étant métabolisés en prostaglandines et en leukotriènes par un mécanisme inconnu (Rose, 1997b). De plus, chez la lignée cellulaire cancéreuse mammaire T47D le linoléate stimule la prolifération et induit plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire et les voies de signalisation intracellulaire (Reyes et al., 2004). En effet, les gènes codant entre autres pour la p38mapk, MEK1, PKA et CDK6, sont surexprimés. Par contre, tout comme dans les études chez les animaux, les acides gras omega-3 inhibent la croissance des cellules tumorales mammaires en induisant l'apoptose (Stoll, 2002a; Wang et al., 2000).

Il existe également des inconsistances dans les études *in vitro*. Ces inconsistances peuvent être expliquées en partie par la différence des conditions de cultures des cellules et par l'utilisation ou non d'acides gras liés à l'albumine (Begin et al., 1986; Hardy et al., 1997; Rose and Connolly, 1990). En effet, certaines études sur des lignées cellulaires ont testé l'action des acides gras non liés à l'albumine à des doses excédant leurs concentrations physiologiques. L'albumine est connue comme étant un important véhicule physiologique *in vivo* pour transporter les acides gras aux cellules. Il est donc nécessaire de lier les acides gras à l'albumine pour ne pas exposer la cellule à des concentrations élevées d'acides gras libres ce qui peut avoir des conséquences néfastes pour celles-ci et représenter une situation non-physiologique. Ceci soulève donc des doutes quant à la validité de certains résultats obtenus.

5 Cancer et métabolisme des acides gras

Il existe peu d'études concernant le métabolisme des acides gras dans les cellules cancéreuses comparativement au métabolisme du glucose. En effet, on s'intéresse au métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses depuis les premières études de Warburg il y a déjà plus d'un demi-siècle (Warburg, 1956). Par contre, le métabolisme des lipides et son implication au niveau de la carcinogénèse sont encore à un stade peu avancé. La synthèse et le métabolisme des lipides sont des processus coordonnés qui sont influencés par différents enzymes du métabolisme (Hii et al., 2001) (Fig. 3). Ainsi, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'acide gras synthétase et la carnitine palmitoyl transférase sont les trois principaux enzymes du métabolisme lipidique qui régulent la synthèse du malonyl-CoA (Kuhajda, 2000). Celui-ci est le principal inhibiteur de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie pour leur β -oxydation. La stéaroyl-CoA desaturase-1 régule l'oxydation des lipides en convertissant entre autre le stéarate (18:0) en oléate (18:1). Les acyl-CoAs saturés sont connus pour inhiber de façon allostérique l'ACC tandis que

les acyl-CoAs insaturés sont les substrats préférés pour la synthèse des triglycérides au niveau du réticulum endoplasmique (Coleman and Lee, 2004). L'acide lysophosphatidique et l'acide phosphatidique sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique mais ils sont aussi synthétisés au niveau de la mitochondrie et transportés au réticulum endoplasmique où les enzymes pour la synthèse des triglycérides sont localisées. Enfin, l'acide gras synthétase mitochondriale et l' « acyl-carrier protein » sont impliqués dans la synthèse des acides gras mais leurs rôles dans le métabolisme lipidique demeurent obscurs (Miinalainen et al., 2003). Ces enzymes du métabolisme des lipides peuvent être régulées par des stimuli nutritionnels et hormonaux en réponse à un état de jeûne, d'exercice et d'excès d'énergie.

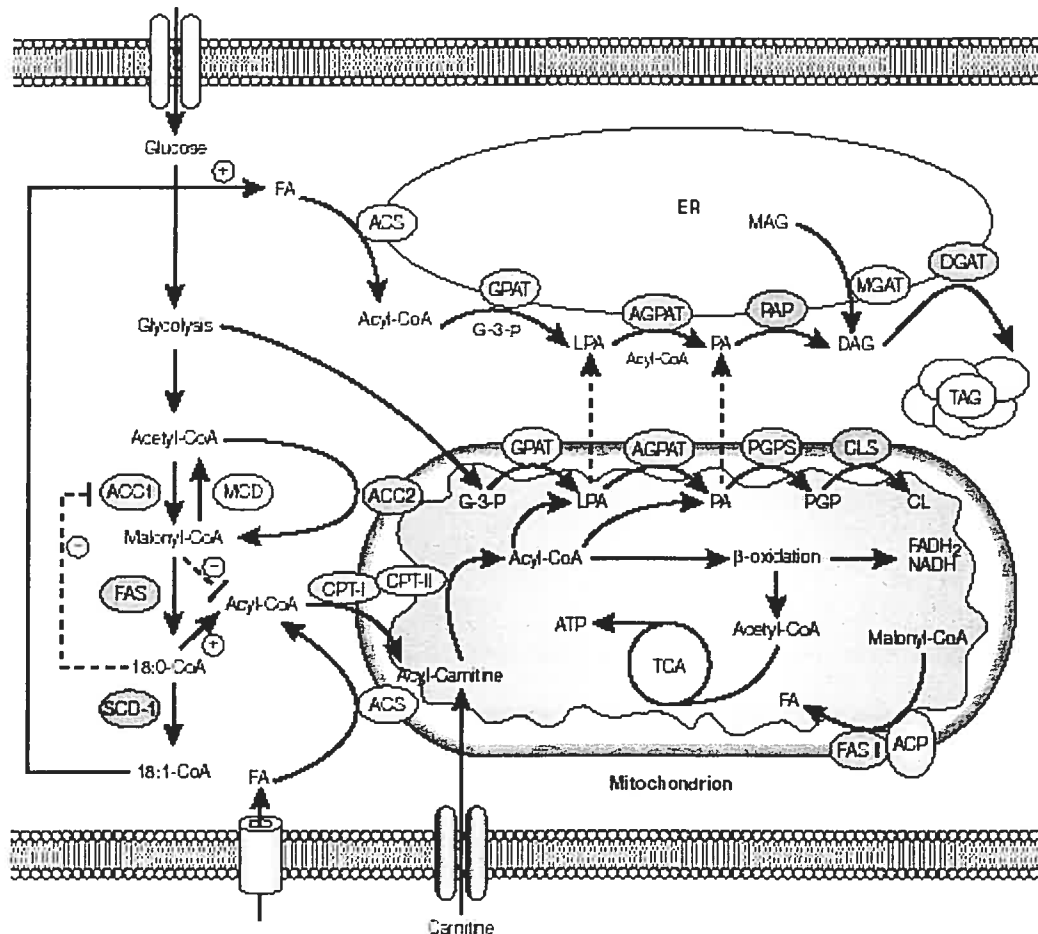


Figure 3: Voies métaboliques impliquées dans l'oxydation et la synthèse des acides gras. Voir le texte pour une description. ACC, acétyl-CoA carboxylase; ACS, acyl-CoA synthase; AGPAT, acylglycerol-3-phosphate

acyltransférase; CLS, cardiolipin (CL) synthase; CPT, carnitine palmitoyl transférase; DGAT, diacylglycerol (DAG) acyltransférase; FAS, acide gras synthétase; GPAT, glycerol-3-phosphate (G-3-P) acyltransférase; MCD, malonyl-CoA décarboxylase; MGAT, monoacylglycerol (MAG) acyltransférase; PAP, phosphatidic-acid phosphohydrolase; PGPS, phosphatidylglycerophosphate (PGP) synthase; SCD1, stéaroyl-CoA désaturase-1; TAG, triglycérides; TCA, Cycle de Krebs. (Shi Y. et Burn P., 2004)

5.1 Rôle de l'acide gras synthétase

L'acide gras synthétase est une enzyme clé de la synthèse des acides gras. Il catalyse la condensation du malonyl-CoA et de l'acétyl-CoA à l'aide du NADPH pour produire principalement un acide gras saturé à 16 carbones, le palmitate (Wakil, 1989). L'acide gras synthétase est une enzyme qui a été montré comme étant surexprimée dans le cancer du sein (Alo et al., 1996; Kuhajda, 2000; Milgraum et al., 1997) ainsi que d'autres cancers (Baron et al., 2004; Pizer et al., 1998). Sa surexpression a aussi été observée *in situ* dans des carcinomes mammaires lobulaires et intraductaux qui sont des lésions associées à une augmentation du risque de développer un cancer infiltrant (Milgraum et al., 1997). Contrairement aux cellules normales, l'activité de l'acide gras synthétase dans les cellules cancéreuses est régulée indépendamment des facteurs nutritionnels et hormonaux (Kuhajda, 2000). Des mesures *ex vivo* dans des tissus tumoraux ont révélé des hauts niveaux d'acide gras synthétase et de synthèse d'acides gras comparativement aux tissus normaux (Pizer et al., 1998). Ceci suggère une implication du métabolisme des acides gras dans la carcinogénèse.

Dans les cellules du cancer du sein en culture, lorsque celles-ci sont traitées avec la cerulenine ou le composé C75, des inhibiteurs de l'acide gras synthétase, une forte diminution de la synthèse d'acides gras est observée ainsi qu'un arrêt de synthèse d'ADN et du cycle cellulaire résultant en une induction

de l'apoptose (Pizer et al., 1998) (Kuhajda et al., 2000) (Li et al., 2001) . De plus, l'utilisation de la technologie d'interférence de l'ARN (RNAi) contre l'ARNm de l'acide gras synthétase dans les cellules cancéreuses de la prostate, résulte également en une induction de l'apoptose (De Schrijver et al., 2003). Une hypothèse envisagée est qu'une accumulation du malonyl-CoA suite à l'inhibition de l'acide gras synthétase serait responsable de la mort cellulaire (Pizer et al., 2000). Aussi, l'inhibition de l'acide gras synthétase avec le composé C75 dans les cellules du cancer du sein provoque la diminution de l'expression de l'oncogène *HER-2/neu* (Menendez et al., 2004). Ce dernier est également impliqué dans la régulation de l'expression de l'acide gras synthétase via l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), une enzyme impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire (Kumar-Sinha et al., 2003). Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle biochimique vital entre la synthèse d'acides gras et la croissance des cellules tumorales.

6 Acides gras et apoptose

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Les cellules qui sont endommagées par des mutations peuvent se produire à tout moment dans la vie d'un organisme multicellulaire ce qui peut résulter en un cancer. L'organisme doit donc se débarrasser de ces cellules et ceci est effectué par un mécanisme intrinsèque à la cellule résultant en un suicide cellulaire que l'on nomme apoptose. Il est essentiel que ce processus soit régulé de façon contrôlée car une mort cellulaire excessive ou insuffisante va changer l'intégrité des tissus ce qui peut mener à des conséquences fatales pour l'organisme. Il existe plusieurs voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose (Reed, 2002). La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. Une autre voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. Ces deux voies de signalisation aboutissent toutes deux à l'activation des caspases, famille de

protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose (Degterev et al., 2003). Il existe aussi d'autres voies de signalisation apoptotique qui sont indépendantes des caspases (Lockshin and Zakeri, 2004). De plus, outre la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le lysosome apparaissent comme des compartiments cellulaires déclencheur de l'apoptose en cas de stress (Breckenridge et al., 2003; Guicciardi et al., 2004).

6.1 La voie intrinsèque mitochondriale

Les cellules qui entrent en apoptose sont caractérisées par des changements morphologiques distincts et plusieurs protéines régulant ce processus ont été identifiées (Reed, 2002). La mitochondrie joue un rôle central dans le processus apoptotique (Fig. 4) (Kroemer et al., 1998). Suite à la phase d'initiation au cours de laquelle les signaux inducteurs d'apoptose convergent vers la mitochondrie, la phase de décision, qui est contrôlée par les membres de la famille de protéines Bcl-2, entraîne la perméabilisation des membranes mitochondriales et la libération de facteurs apoptogènes. Enfin, une phase de dégradation mettant en jeu les caspases et DNases spécifiques qui dégraderont de nombreux constituants cellulaires.

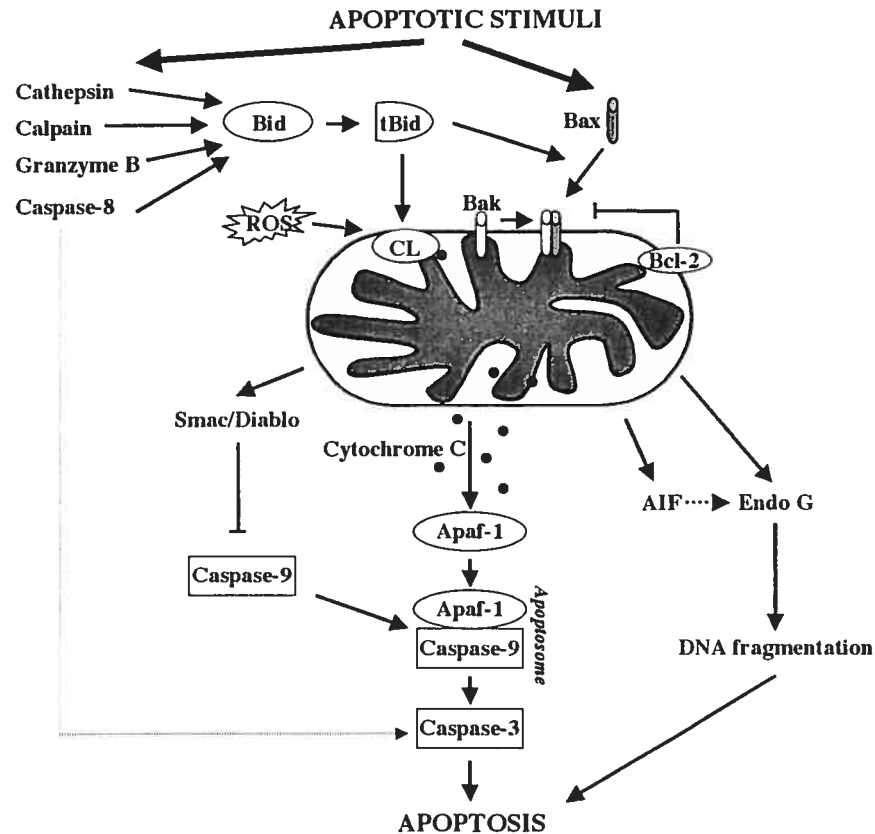


Figure 4: Voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose impliquée dans la libération du cytochrome C. Voir le texte pour une description. AIF, Apoptosis inducing factor; CL, Cardiolipine.

La première perturbation cellulaire détectable est une dépolarisation de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$), qui se produit bien avant l'exposition des phosphatidylserines au niveau de la membrane cytoplasmique cellulaire, l'activation de la cascade des caspases, l'activation des endonucléases et la fragmentation de l'ADN (Goldenthal and Marin-Garcia, 2004). Suite à la $\Delta\Psi_m$, la mitochondrie libère des protéines apoptogènes séquestrées dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Plus précisément, la majorité des stimuli apoptotiques provoquent la libération de protéines mitochondriales dans le cytosol comme le cytochrome c, la protéine Smac/Diablo et la protéine AIF (Daugas et al., 2000; Du et al., 2000; Zou et al., 1999). Cette libération du cytochrome c dans le cytosol va provoquer

l'activation des caspases et la mort cellulaire (Zou et al., 1999). En effet, le cytochrome c au niveau du cytosol va former l'apoptosome en se liant à la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9 menant ainsi à l'activation des caspases-3 et -7. Le mécanisme qui provoque le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie n'est pas clair. Une possibilité est que la libération du cytochrome c soit causée par la perméabilisation transitoire de la membrane mitochondriale externe suite à la formation de pores de transition de perméabilité (PTP) (Green and Kroemer, 1998). Aussi, le relâchement du cytochrome c pourrait survenir via la formation non-spécifique de "trous" dans la membrane externe de la mitochondrie (Goldstein et al., 2000). Peu importe le processus par lequel le cytochrome c est relâché dans le cytosol, ce mécanisme est contrôlé par la famille des protéines Bcl-2. En effet, certains membres de la famille vont inhiber la libération du cytochrome c et promouvoir la survie cellulaire (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) tandis que d'autres vont favoriser la libération du cytochrome c pour ainsi promouvoir l'apoptose (Bax, Bad, Bid) (Cory and Adams, 2002). Aussi, le programme de l'apoptose utilise les membranes cellulaires comme transducteurs afin de générer des signaux opérationnels (Cui and Houweling, 2002; Ravichandran, 2003). Les lipides sont d'importants constituants des membranes cellulaires et ont le potentiel de régler l'efficacité du signal en dirigeant celui-ci au bon endroit, en étant la source de nouveaux signaux ou en étant des intermédiaires de la réponse (Wright et al., 2004).

6.2 Céramides

Il a été démontré que les acides gras saturés, tels le palmitate et le stéarate, sont des précurseurs importants de la synthèse *de novo* des sphingolipides comme les céramides (Fig. 5) (Paumen et al., 1997b). En effet, la synthèse *de novo* des céramides est initiée par la condensation par la sérine palmitoyltransférase d'une sérine et du palmitoyl-CoA pour produire le 3-kétodihydrosphingosine qui sera par la suite réduit en dihydrosphingosine. Le dihydrocéramide est ensuite formé par la liaison d'un groupement acylé sur la

fonction amide du dihydrosphingosine par la céramide synthétase. Le céramide est ensuite formé par l'introduction d'une double liaison. Celui-ci peut servir de précurseur à différents sphingolipides complexes (Futerman and Hannun, 2004). Les céramides peuvent également être produits par l'hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase suite à l'activation de récepteur de mort cellulaire (Gulbins, 2003).

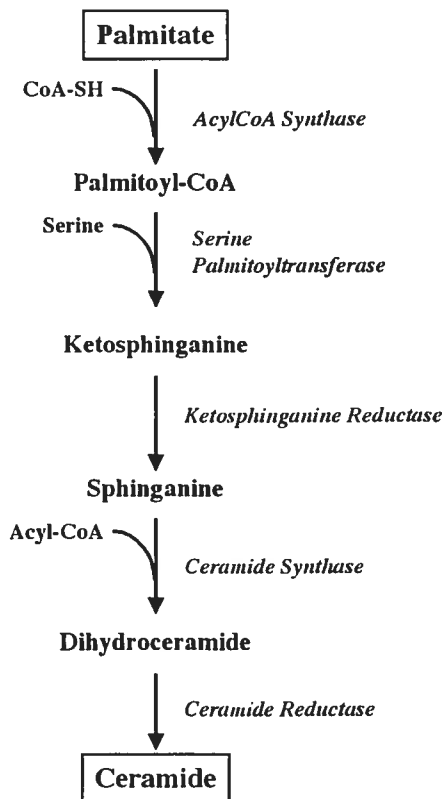


Figure 5: Voie de synthèse *de novo* des céramides

Les céramides sont des seconds messagers qui exercent une variété de réponses biologiques, dépendant du modèle cellulaire, incluant des effets mitogéniques, la survie des cellules, l'inhibition de la croissance et l'apoptose (Ohanian and Ohanian, 2001). Les multiples activités des céramides suggèrent qu'ils doivent posséder plusieurs cibles pouvant mener à différentes voies de signaux de transduction. Par exemple, les céramides sont capable d'activer la

«stress-activated protein kinase/ c-Jun N-terminal kinase» (SAPK/JNK) pour induire l'apoptose (Verheij et al., 1996). De plus, il a été démontré que les céramides étaient capables de diminuer la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB), ce qui a pour effet d'inhiber l'effet antiapoptotique de cette dernière (Schubert et al., 2000) (Powell et al., 2003). Un groupe a aussi démontré que le palmitate et le stéarate induisent l'apoptose dans des lignées hématopoïétiques de souris (Paumen et al., 1997b) ainsi que les cardiomyocytes (Hickson-Bick et al., 2000) via la synthèse de céramides. Par contre, les acides gras insaturés n'ont aucun effet apoptotique sur ces cellules. Dans les îlots de rat, les acides gras saturés causent l'apoptose des cellules β via une augmentation de la synthèse des céramides (Maedler et al., 2001; Unger and Orci, 2002) alors que les acides gras insaturés augmenteraient plutôt la prolifération à de faibles concentrations de glucose (Maedler et al., 2001)(El-Assaad et al., 2003). En plus de leur action proliférative, les acides gras insaturés protègent les cellules β de l'apoptose induite par le palmitate via une augmentation de Bcl-2 (Maedler et al., 2003). Une autre étude effectuée sur des îlots humains a confirmé l'implication des céramides dans l'effet apoptotique des acides gras en plus de démontrer une réduction de Bcl-2 (Lupi et al., 2002).

6.3 Stress oxydatif

La phosphorylation oxydative est la principale source de génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (anion superoxide $\cdot\text{O}_2^-$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , radical hydroxyl $\cdot\text{OH}$) qui sont responsables du stress oxydatif chez les cellules eucaryotes (Fernandez-Checa et al., 1998). Les ROS peuvent également être générés par la NADPH oxydase (Geiszt and Leto, 2004). Ils sont capables de participer à l'ouverture du PTP à la mitochondrie et de diminuer le $\Delta\Psi_m$ provoquant ainsi le relargage du cytochrome C (Boya et al., 2003). De plus, les ROS peuvent également affectés l'interaction entre la cardiolipine (voir section 5.4) et le cytochrome C (Nomura et al., 2000).

Des études ont démontré que certains acides gras polyinsaturés peuvent provoquer l'apoptose chez des cellules cancéreuses en culture (Chajes et al., 1995; Das, 1999; Hawkins et al., 1998; Hong et al., 2002). Par contre, le mécanisme par lequel ces acides gras induisent l'apoptose n'est pas clair. Des études sur des cellules cancéreuses du foie et du sein démontrent que la peroxydation des lipides insaturés suite à la formation de radicaux libres serait responsable de ce phénomène (Chajes et al., 1995; Hawkins et al., 1998). De plus, il semble que l'utilisation d'antioxydants protège contre l'apoptose induite par ces acides gras polyinsaturés. La surexpression de Bcl-2 diminue aussi l'apoptose induite par ces acides gras polyinsaturés (Das, 1999). La peroxydation de ces acides gras mène aussi à la formation de H_2O_2 qui est connu comme un agent pouvant induire l'apoptose (Bauer, 2002; Mates and Sanchez-Jimenez, 2000). Dans les cellules HL-60, les acides gras polyinsaturés augmentent la formation de ROS provoquant ainsi la chute du $\Delta\Psi_m$ et l'apoptose (Arita et al., 2001). Aussi, le palmitate induit l'apoptose chez les cellules CHO en provoquant la formation de ROS et cette mort cellulaire peut être inhibée par l'utilisation d'antioxydant (Listenberger et al., 2001). Dans les cellules β des îlots de Langerhans de rats diabétiques, le palmitate, via la production de céramides, stimule l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) qui catalyse la formation du radical cytotoxique NO provoquant ainsi l'apoptose (Shimabukuro et al., 1998). Par contre, les acides gras ne stimulent pas la iNOS dans la lignée cellulaire β -pancréatique INS-1 (Maestre et al., 2003)

6.4 Cardiolipine

La cardiolipine est un phospholipide anionique constituée de quatre acides gras insaturés qui se retrouve presque exclusivement située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et particulièrement aux sites de contact entre la membrane interne et externe (Schlame et al., 2000). La synthèse *de novo* de la cardiolipine à partir des acides gras est décrite en figure 6. Due à sa distribution mitochondriale presque exclusive, la cardiolipine est considérée

comme un élément essentiel au bon fonctionnement de la mitochondrie (Grijalba et al., 1999). En effet, plusieurs protéines associées à la chaîne respiratoire dépendent de la présence de cardiolipine pour leur bon fonctionnement comme la cytochrome c oxydase et le cytochrome c (Zhang et al., 2002). Le cytochrome c est situé à la membrane interne de la mitochondrie en association avec la cardiolipine par des liaisons électrostatiques et hydrophobiques (Schlame et al., 2000). Cette association facilite le transport d'électron entre le complexe III et IV de la chaîne respiratoire (Zhang et al., 2002). Des modifications du métabolisme de la cardiolipine ont été détectées au cours des premières étapes du processus apoptotique (Iverson and Orrenius, 2004). En effet, une diminution de cardiolipine va provoquer la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol, ce qui va mener à l'activation de la cascade menant à l'apoptose. Dans les cardiomyocytes, le palmitate induit l'apoptose en provoquant une diminution de la synthèse de la cardiolipine qui est suivie par la libération du cytochrome c dans le cytosol (Ostrander et al., 2001). Par contre, l'oléate n'induit pas la mort cellulaire et n'affecte pas les niveaux intracellulaires de cardiolipine. Aussi, il a été postulé que la cardiolipine est un intermédiaire dans le recrutement des protéines pro-apoptotiques à la surface des mitochondries (Lutter et al., 2000). Les protéines Bid et Bax en réponse à un stimulus apoptotique vont s'associer à la mitochondrie en se liant à la cardiolipine pour ainsi déstabiliser l'intégrité de la membrane mitochondriale provoquant la libération de protéines apoptotiques (Kuwana et al., 2002).

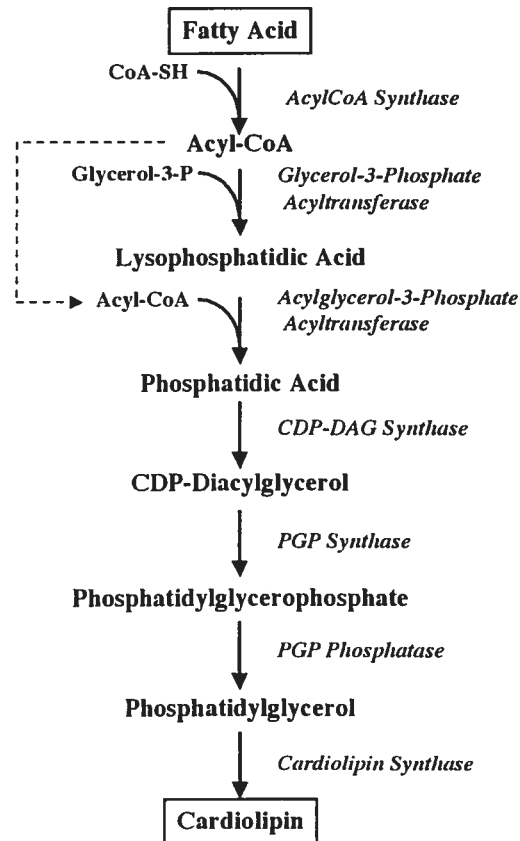


Figure 6: Voie de synthèse *de novo* de la cardiolipine

7 Récepteurs activés par les acides gras

Les cellules possèdent à leur surface des récepteurs membranaires qui permettent de recevoir une multitude de signaux extracellulaire. L'interaction entre le ligand et son récepteur crée une modification du récepteur qui conduit, par exemple, à l'ouverture d'un canal ionique ainsi qu'à la transmission d'un signal à un effecteur distant du récepteur par l'intermédiaire de réactions enzymatiques. Ainsi, l'activation de récepteurs membranaires déclenche des modifications qui peuvent rester localisées à la membrane, s'étendre à l'ensemble du cytoplasme ou atteindre le noyau. Ce phénomène permet la régulation de diverses fonctions biologiques comme la prolifération cellulaire, la survie et l'angiogénèse.

7.1 Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont des récepteurs membranaires qui sont activés par une grande variété de ligand incluant entre autres des peptides, des hormones, des acides aminés, des nucléotides, des facteurs de croissance et des lipides (Wise et al., 2004). Ces récepteurs sont caractérisés par la présence de sept hélices- α qui traversent la membrane plasmique séparés par des boucles intracellulaires et extracellulaires. L'extrémité NH₂ terminal est exposée à l'environnement extracellulaire tandis que la portion COOH terminal est située à l'intérieur de la cellule.

En général, la liaison du ligand à son GPCR provoque un changement conformationnel de ce dernier, ce qui va entraîner l'activation des protéines G hétérotrimériques (Cabrera-Vera et al., 2003). L'activation de ces protéines G va provoquer une cascade de réponses intracellulaires régulant le fonctionnement de la cellule comme la différenciation et la prolifération (Fig. 7) (Marinissen and Gutkind, 2001; Radeff-Huang et al., 2004). Ces protéines G sont composées d'une sous unités α ($G\alpha$) qui interagit avec un complexe $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). L'activation du GPCR provoque l'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP au site actif de $G\alpha$, ce qui entraîne une dissociation du complexe $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Ainsi, ces deux complexes peuvent interagir avec différents effecteurs intracellulaires comme des enzymes et des canaux ioniques (Hermans, 2003). La complexité et la spécificité de la signalisation par les GPCRs provient principalement du fait qu'il existe environ 23 types de sous unités α , au moins 6 sous unités β et 12 sous unités γ (Cabrera-Vera et al., 2003). Les différents types de sous unités α ont été classifiés en quatre familles: $G\alpha_i/o$, $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$. En général, $G\alpha_s$ va stimuler l'activité de l'adénylate cyclase, l'enzyme responsable de la production de cAMP, ce qui va provoquer l'activation de la protéine kinase dépendante du cAMP (PKA). En revanche, $G\alpha_i/o$ va inhiber l'activité de l'adénylate cyclase entraînant une diminution des niveaux de cAMP. Un récepteur couplé à $G\alpha_q$ va stimuler

l'activité de la phospholipase C (PLC) ce qui va provoquer l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate pour former du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Ainsi, l'IP3 formé va stimuler la libération du calcium des compartiments intracellulaires en se liant au récepteur IP3 présent à la surface du réticulum endoplasmique. Aucun effecteur pour $G\alpha_{12/13}$ n'a été identifié à ce jour. En ce qui concerne $G\beta\gamma$, il peut également moduler l'activité de plusieurs enzymes et canaux ioniques (Cabrera-Vera et al., 2003).

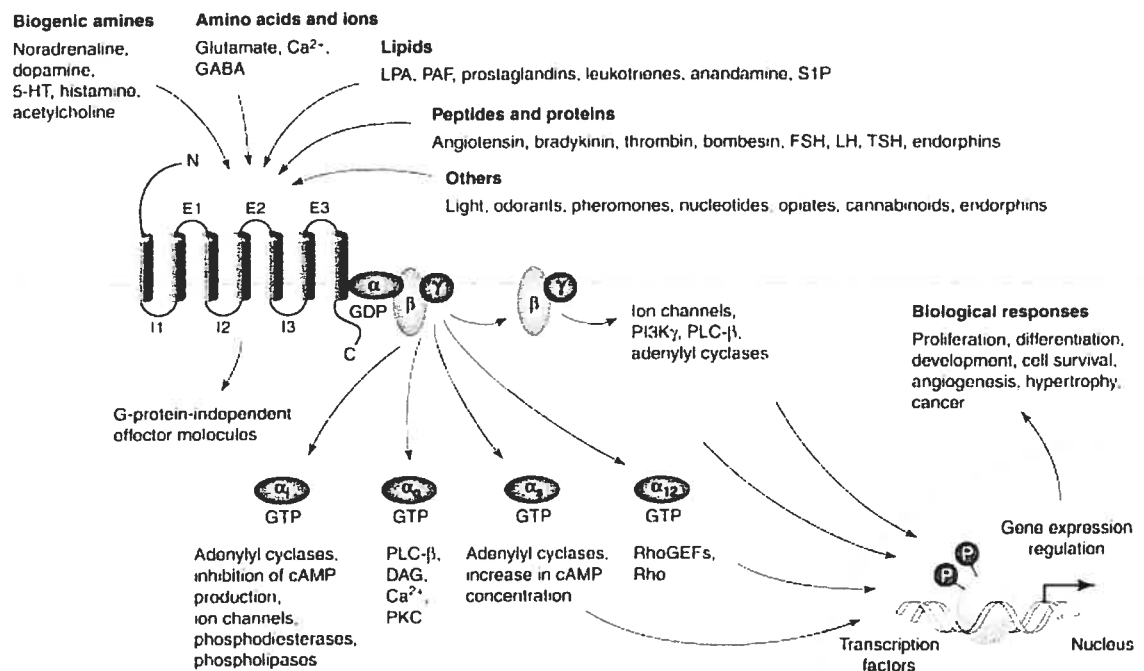


Figure 7: Activation des différentes protéines G en réponse à la liaison d'un ligand à son GPCR. Une grande variété de ligands utilisent les GPCRs pour stimuler des cibles cytoplasmiques et nucléaires via les protéines G. Cette signalisation régule diverses fonctions biologiques comme la prolifération cellulaire, la survie et l'angiogénèse. DAG, diacylglycérol; FSH, follicle-stimulating hormone; GEF, guanine nucleotide exchange factor; LH, leuteinizing hormone; LPA, acide lysophosphatidique; PAF, platelet activating factor; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; S1P, sphingosine-1-phosphate; TSH, thyroid-stimulating hormone. (Marinissen M.J. et Gutkind J.S., 2002)

Plusieurs dérivés des acides gras comme les prostaglandines (Coleman et al., 1994), les leukotriènes (Sarau et al., 1999), l'acide eicosatétraénoïque (Hosoi et al., 2002), l'acide lysophosphatidique (LPA) (Mills and Moolenaar, 2003) et la sphingosine 1-phosphate (S1P) (Radeff-Huang et al., 2004), sont des ligands pour des GPCRs. La stimulation de ces GPCRs par leur agoniste respectif induit une variété de réponses cellulaires incluant la prolifération (Radeff-Huang et al., 2004). Ainsi, l'activation d'un GPCR menant à la prolifération cellulaire implique la modulation de plusieurs enzymes des voies de signaux de transduction intracellulaire comme l'adénylate cyclase, les phospholipases, les canaux ioniques et les protéines kinases (Schulte and Fredholm, 2003). Par exemple, le LPA et la S1P sont des lysophospholipides qui initient et régulent la prolifération cellulaire par un mécanisme semblable aux facteurs de croissance (Mills and Moolenaar, 2003; Moolenaar et al., 2004; Spiegel and Milstien, 2003). En effet, ils activent diverses voies de signalisation comme par exemple la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et celle des "mitogen activated protein kinases" (MAPK) (Grey et al., 2002; Yart et al., 2002). De plus, le LPA et le S1P augmentent la prolifération des cellules du cancer du sein (Goetzl et al., 1999).

GPR40 : Récepteur aux acides gras

Récemment, trois groupes ont indépendamment identifié GPR40 comme étant un GPCR capable d'être activé par les acides gras à moyenne et longue chaîne (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003; Kotarsky et al., 2003). GPR40 est une protéine de 300 acides aminés possédant sept domaines transmembranaires caractéristiques des GPCRs. Le gène codant pour GPR40 ne possède pas d'introns et est situé sur le locus chromosomal 19q13.1 tout comme les gènes codant pour GPR41 ainsi que GPR43 (Sawzdargo et al., 1997), qui sont des GPCRs pouvant être activés par les acides gras à courtes chaînes (Brown et al., 2003). Les acides gras augmentent rapidement le calcium intracellulaire via GPR40. Ce dernier est fortement exprimé dans les cellules β pancréatiques et il est impliqué dans l'amplification par les acides gras de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Itoh et al., 2003; Poitout, 2003). Ce récepteur est également présent dans

divers tissus (Kotarsky et al., 2003) et dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire MCF-7 (Yonezawa et al., 2004). De plus, les acides gras insaturés, contrairement aux acides gras saturés, augmentent le calcium intracellulaire chez les MCF-7 ce qui suggère l'implication de GPR40 dans ce phénomène (Yonezawa et al., 2004). Par contre, aucune étude n'a démontré de façon directe que les acides gras peuvent lier GPR40.

7.2 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

Tout comme les différents récepteurs nucléaires, les “peroxisome proliferator-activated receptors” (PPARs) sont des facteurs de transcription activés par des ligands qui contrôlent l'expression de plusieurs gènes en interagissant avec une séquence spécifique de l'ADN situé dans le promoteur de certains gènes cibles (Desvergne and Wahli, 1999). Il a été démontré que ces récepteurs nucléaires sont capables de lier les acides gras et d'être activés par ceux-ci (Ferre, 2004). Il existe trois types de PPAR qui sont catégorisés en sous-types: PPAR α , PPAR β et PPAR γ . PPAR α est fortement exprimé dans le foie, le cœur, le rein et le muscle squelettique. PPAR β est exprimé de façon ubiquitaire tandis que PPAR γ est exprimé surtout dans le tissu adipeux et le système immunitaire. La différence au niveau de la distribution des différents sous-types suggère un rôle biologique différent. En effet, PPAR α semble jouer un rôle important dans le métabolisme hépatique des lipides et son expression corrèle avec un niveau élevé d'oxydation des acides gras. Par contre, PPAR γ serait important dans la différenciation des adipocytes, l'entreposage des lipides et la réponse immunitaire. Le rôle de PPAR β n'est pas encore très bien connu mais il semble qu'il aurait un rôle important dans l'oxydation des acides gras.

Il existe plusieurs gènes régulés par les PPARs dont certains gènes du métabolisme des lipides et du glucose (Ferre, 2004). De plus, les nombreux gènes régulés par les acides gras via les PPARs ont des rôles importants dans la différenciation cellulaire et la carcinogenèse mammaire (Michalik et al., 2004). En effet, il existe des évidences indiquant que PPAR γ aurait un rôle à jouer dans

la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires (Kilgore et al., 1997; Lapillonne et al., 2003; Mueller et al., 1998). Par contre, plusieurs effets biologiques induits par les acides gras ne dépendent pas de l'activation des PPARs (Louet et al., 2001; Sauer et al., 2000).

7.3 Récepteur à l'EGF

Les acides gras insaturés, contrairement aux acides gras saturés, peuvent induire la phosphorylation des résidus tyrosines sur le récepteur à l'EGF dans les cellules endothéliales (Duval et al., 2002; Vacaresse et al., 1999). Le récepteur à l'EGF (aussi appelé erbB-1 et HER) fait partie de la famille erb qui comprend quatre membres (erbB-1, -2, -3, -4) ayant chacun des caractéristiques signalétiques qui lui sont propres (Rowinsky, 2004). Le récepteur à l'EGF est une protéine transmembranaire associée à la membrane plasmique qui, lorsque activé, est impliqué dans la transduction de signaux menant généralement à la prolifération cellulaire (Holbro and Hynes, 2004). En effet, une surexpression de ce récepteur est associée à la carcinogenèse mammaire et est également impliqué dans divers types de cancer (Rowinsky, 2004). La liaison du ligand au récepteur à l'EGF induit sa dimérisation et l'autophosphorylation de ses résidus tyrosines ce qui va entraîner le recrutement de protéines adaptatrices et des enzymes incluant entre autres la PLC γ et la sous unités p85 de la PI3K (Holbro and Hynes, 2004). De plus, le recrutement des protéines adaptatrices va mener à l'activation de la voie MAPK. Ainsi, les acides gras insaturés activent la voie MAPK dans les cellules endothéliales via l'activation du récepteur à l'EGF et le recrutement des protéines adaptatrices SHP2, SHC et GRB2 (Vacaresse et al., 1999). Le même phénomène est aussi observé dans les cellules de rein avec l'arachidonate (Dulin et al., 1998).

Le récepteur à l'EGF peut également être activé via l'activation d'un autre type de récepteur, soit le GPCR (Fig. 8). Ce phénomène de transactivation

a été démontré dans plusieurs types cellulaires avec différents ligands (Buteau et al., 2003; Daub et al., 1997; Gao et al., 2001; Maudsley et al., 2000). Dans certains cas, il implique la protéine tyrosine kinase *src* qui, suite à l'activation d'un GPCR, va phosphoryler directement certains résidus tyrosines du récepteur à l'EGF (Gao et al., 2001). Dans d'autres cas, cette transactivation requiert la maturation protéolytique de ligands transmembranaires pour le récepteur à l'EGF afin de libérer les fragments solubles et actifs des ligands (Daub et al., 1997; Prenzel et al., 1999). Ce système implique donc l'activation de métalloprotéinases transmembranaires via un second messenger intracellulaire en réponse à l'activation du GPCR. Comme second messenger, différentes études ont proposé un rôle pour la phospholipase C, le calcium intracellulaire, le complexe G $\beta\gamma$ et *src* (Gschwind et al., 2001). Par exemple, le "glucagon-like peptide-1", après la liaison à son GPCR, induit la prolifération de la lignée cellulaire β -pancréatique INS832/13 via la transactivation du récepteur à l'EGF par un mécanisme dépendant de *src* et du clivage de la betacelluline, un ligand du récepteur à l'EGF (Buteau et al., 2003). Donc, la possibilité que les acides gras puissent provoquer la transactivation du récepteur à l'EGF via la liaison à un GPCR comme GPR40 n'est pas écartée.

8 Transduction de signaux et molécules de signalisation activées par les acides gras

En réponse aux signaux extracellulaires, la cellule augmente ou diminue l'expression de gènes spécifiques menant à l'altération du métabolisme, la prolifération, la survie, la différenciation, ou l'apoptose. De plus, des évidences suggèrent que les acides gras, en plus de leur rôle de composants des membranes lipidiques et de source d'énergie, peuvent agir comme second messenger ou réguler des molécules impliquées dans les voies de transduction de signaux (Hwang and Rhee, 1999). Il existe différentes voies de signalisation dans les cellules. En effet, la liaison d'un ligand à son récepteur active différentes cascades de protéines kinases menant à une réponse de la cellule à ce stimulus (Fig. 8). De plus, il existe une interconnection entre les différentes voies de

signalisation qui permet de moduler cette réponse cellulaire. Enfin, un dérèglement au niveau des signaux de transduction intracellulaires peut entraîner une activation constitutive de voies de signalisation et mener au développement ou à la promotion du cancer.

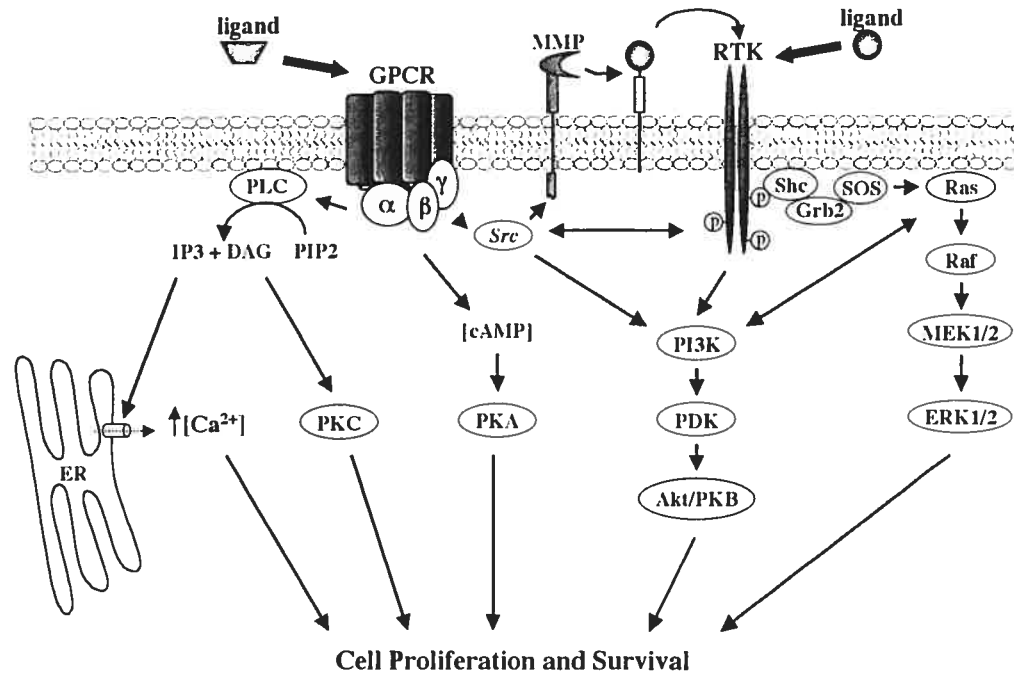


Figure 8: Voies de signalisation menant à la prolifération et la survie cellulaire. La liaison d'un ligand à son récepteur entraîne l'activation de différentes cascades de signalisation suite au relargage, recrutement et/ou phosphorylation de diverses protéines. DAG, diacylglycérol; ER, réticulum endoplasmique; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; MMP, métalloprotéinase; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-biphosphate; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKA, protéine kinase A; PKB, protéine kinase B; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; RTK, récepteur tyrosine kinase

8.1 Voie Raf/MEK/ERK

L'activation de la voie de signalisation impliquant Raf/MEK/ERK est une des voies les plus connues au niveau de l'étude de la transduction de signaux suite à la liaison d'un ligand à son récepteur. L'activation de l'«extra-cellular signal related kinase» (ERK) nécessite sa phosphorylation sur des résidues tyrosines et thréonines par la «mitogenic-extracellular signal-regulated kinase» (MEK), qui lui est phosphorylé par la serine/thréonine kinase, Raf (Chong et al., 2003). Ainsi, lorsque ERK1/2 est activé, il peut phosphoryler d'autres protéines kinases et stimuler divers facteurs de transcription menant généralement à la prolifération cellulaire (Zhang and Liu, 2002). L'arachidonate et le linoléate ont été montrés pour activer la voie *ras*-ERK1/2 dans des cellules de rein (Jiao et al., 1998). Aussi, les acides gras insaturés augmentent l'activité de ERK1/2 dans les cellules cancéreuses mammaires résultant en une augmentation de l'adhésion des cellules qui est un phénomène important lors du processus métastatique (Paine et al., 2000). De plus, l'intégrine $\beta 1$ est impliquée dans cette adhésion via l'activation de la PKC ϵ (Palmantier et al., 2001). Dans les cellules endothéliales et les cellules de rein, une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 est également observée en réponse aux acides gras insaturés via le récepteur à l'EGF (Dulin et al., 1998; Vacaresse et al., 1999). Aussi, l'expression de GPR40 favorise l'activation de ERK1/2 en réponse aux acides gras mais aucune réponse cellulaire a été attribuée à cette activation via ce GPCR (Itoh et al., 2003).

8.2 La phosphatidylinositol 3-kinase

La PI3K produit du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ainsi que le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate. La PI3K active une variété de voies de signalisation distinctes qui participent à diverses actions biologiques. Parmi les effecteurs de la PI3K, on retrouve les «phosphatidylinositol-dependent kinases» (PDKs) qui à leur tour activent PKB (Anderson et al., 1998), la PKC ζ (Le Good et al., 1998) et plusieurs autres voies de signalisation impliquées dans la survie ainsi que la prolifération cellulaire (Brazil et al., 2004). La p70S6Kinase et la «mammalian target

of rapamycin» (mTOR), qui augmentent la synthèse protéique, sont aussi des cibles de la PI3K (Thomas and Hall, 1997). Enfin, la PI3K peut également activer la voie Raf/MEK/ERK, ce qui mène subséquemment à la phosphorylation de facteurs de transcription modulant l'expression des gènes (Chong et al., 2003). Ainsi, l'activation de la PI3K est associée à la prolifération, la survie cellulaire, la synthèse du glycogène, la lipogenèse, la synthèse protéique et la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la surface des cellules (Leopold, 2004; Sul et al., 2000).

L'activité de la PI3K peut être régulée par les acides gras. En effet, les acides gras insaturés arachidonate, docohexanoate et oléate, contrairement aux acides gras saturés, augmentent l'activité de la PI3K dans les cellules endothéliales et myéloïdes (Hii et al., 2001). L'arachidonate augmentent également rapidement l'activité de la PI3K dans les neutrophiles (Chang and Wang, 2001; Liu et al., 2003). De plus, l'effet antiapoptotique du docohexanoate implique la voie PI3K dans les cellules neuronales (Akbar and Kim, 2002).

8.3 La protéine kinase B

Les produits de la PI3K sont capables de lier le domaine d'homologie aux pleckstrines de PKB. Cette liaison permet la phosphorylation des résidus thréonine-308 et sérine-473 par PDK pour son activation (Franke et al., 1997). La PKB peut aussi être activée indépendamment de la PI3K par la voie cAMP/PKA (Filippa et al., 1999). La PKB exerce son action sur plusieurs cibles impliquées dans l'apoptose, le métabolisme, la prolifération et la survie cellulaire (Brazil et al., 2004). Une fois activée, PKB est transloquée de la membrane cellulaire vers différents compartiments cellulaires où elle va phosphoryler ses différents substrats. Ainsi, PKB phosphoryle des effecteurs cytoplasmiques, des protéines associées à la mitochondrie et entre dans le noyau pour phosphoryler différents facteurs de transcription. En effet, cette enzyme est connue pour activer la synthèse du glycogène via la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) (Cross et al., 1995) et est impliquée dans le contrôle du métabolisme du glucose en stimulant d'une part la translocation de microvésicules contenant le transporteur du glucose

GLUT4 (Cong et al., 1997) et d'autre part en contrôlant l'activité de la 6-phosphofructo-2-kinase (Deprez et al., 1997). De plus, l'activation de PKB bloque l'apoptose en induisant la phosphorylation de la protéine apoptotique BAD provoquant ainsi sa liaison à la protéine 14-3-3 (del Peso et al., 1997), en phosphorylant la caspase-9 résultant en une inactivation de cette dernière (Suhara et al., 2001) et par la phosphorylation des facteurs de transcription de type forkhead (Rena et al., 1999). PKB exerce son effet prolifératif en partie via l'augmentation des niveaux de cycline D1 (Muisse-Helmericks et al., 1998) et l'activation de mTOR et la P70S6Kinase (Cross et al., 2000) (Sekulic et al., 2000).

Tout comme la PI3K, l'activité de la PKB est également régulée par les acides gras. En effet, l'arachidonate augmente la phosphorylation de PKB dans les cellules endothéliales (Hii et al., 2001). Aussi, l'oléate induit une accumulation de lipides dans les adipocytes via l'augmentation de la phosphorylation de PKB et l'activation de la voie PI3K (Whitehead et al., 2004). Au contraire, le palmitate diminue l'activité de PKB via la production de céramides dans les cellules musculaires (Schmitz-Peiffer et al., 1999). Enfin, il a été démontré que la surexpression d'un mutant PKB constitutivement actif supprimait l'effet apoptotique des acides gras (Wrede et al., 2002).

8.4 Les protéines kinases C

La famille des PKCs comprend 12 protéines kinases différentes qui sont divisées en trois sous-familles ayant des profils d'activation distincts (Metzger and Kapfhammer, 2003). On retrouve les PKCs classiques (cPKC : α , β , γ) qui sont activées par le calcium, le DAG et les esters de phorbol. Il y a aussi les PKCs novels (nPKC : δ , ϵ , η , θ) qui sont activées par le DAG et les esters de phorbol. Enfin, il existe les PKC atypiques (aPKC : λ , ζ) qui sont insensibles au calcium et au DAG/esters de phorbol mais seraient plutôt phosphorylées par PDK en réponse aux signaux mitogéniques (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998).

L'activation des diverses isoformes des aPKCs ainsi que des nPKCs par le diacylglycerol est connue pour être impliquée dans diverses réponses cellulaires incluant la prolifération et l'apoptose (Cross et al., 2000; Greco et al., 2003). Les acides gras peuvent aussi activer les cPKCs indépendamment du diacylglycérol. En effet, les acides gras insaturés incluant l'oléate, le linoléate, le linoléate et l'arachidonate, augmentent l'activité de certaines isoformes des cPKCs (Diaz-Guerra et al., 1991; Hug and Sarre, 1993). D'ailleurs les cPKC semble impliquée dans la prolifération cellulaire induite par le linoléate dans les cellules du cancer du sein (Park et al., 2000). Au contraire, le palmitate induit l'apoptose via l'activation de la PKC δ dans les cellules β du pancréas (Eitel et al., 2003). Dans ces mêmes cellules, les aPKCs sont impliqués dans la stimulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras (Yaney et al., 2000).

8.5 Le calcium

Les variations de la concentration de calcium intracellulaire interviennent dans l'initiation de divers phénomènes incluant la dépolarisation membranaire ainsi que l'activation d'enzymes et de diverses protéases (Sato and Kawashima, 2001). Le calcium joue également un rôle déterminant dans les sécrétions et les phénomènes d'exocytose (Bergsten, 2002). Il est donc indispensable au bon fonctionnement de la cellule et à sa réplication mais son excès peut avoir des effets néfastes pouvant mener à l'apoptose (Carafoli, 2004). La concentration de calcium dans le cytoplasme est extrêmement faible parce que, outre les mécanismes de régulation de ses échanges avec le milieu extracellulaire, il existe dans la cellule des organites susceptibles de le capter. Ces organites sont principalement le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau cellulaire. La concentration de calcium intracellulaire basale dépend de pompes membranaires, et après un signal inducteur, dépend de l'ouverture de canaux calciques transmembranaires et de la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique. L'augmentation brutale de la concentration de calcium intracellulaire est en général un signal régulateur pour la cellule. En effet, dès que le calcium est libéré dans le cytosol, il peut moduler des protéines kinases, des phosphatases et des adénylates cyclases (Kuhl,

2004). En effet, le calcium peut réguler entre autres la protéine kinase C, la calmoduline, la calpaïne et la phospholipase A2.

La pénétration de calcium dans la cellule s'effectue via l'échangeur sodium/calcium, les canaux voltage-dépendants et les canaux messenger-dépendants (canaux voltage-indépendant) (Zylinska and Soszynski, 2000). Le calcium sort de la cellule grâce essentiellement à la pompe calcium-ATPase et l'échangeur sodium/calcium (Zylinska and Soszynski, 2000). Au niveau du réticulum endoplasmique, l'entrée de calcium en provenance du cytoplasme s'effectue par la pompe calcium-ATPase, SERCA (Moller et al., 1996). Au contraire, la libération du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme s'effectue par l'intermédiaire du récepteur-canal dont l'ouverture est stimulée par l'IP3 (Prentki et al., 1984) et du récepteur-canal à la ryanodine (RyR) (Zucchi and Ronca-Testoni, 1997). Ainsi, le calcium peut être mobilisé du réticulum endoplasmique par la génération de l'IP3 en réponse à l'activation de récepteurs qui sont couplés à l'activation de la PLC (Hermans, 2003). Le RyR est régulé par le calcium car en réponse à l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique, le RyR va provoquer la libération de calcium en provenance du réticulum endoplasmique (Graves and Hinkle, 2003). Ce processus identifié «calcium-induced calcium-release», est particulièrement important dans les myocytes et pour les cellules β pancréatiques (Islam, 2002; Nabauer et al., 1989).

Le mécanisme menant à la mobilisation de calcium intracellulaire par les acides gras est très varié. Les acides gras insaturés, contrairement aux acides gras saturés, régulent de façon négative des canaux calciques voltage-indépendants (Perez et al., 1997) et les canaux calciques voltage-dépendants (Shimada and Somlyo, 1992) dans les cellules musculaires lisses. Au contraire, l'oléate provoque l'augmentation de calcium intracellulaire par le canal calcique voltage-dépendant (type L) qui est responsable de la sécrétion de l'hormone sécrétine (Chang et al., 2000). Les acides gras augmentent aussi l'activité des canaux calciques voltage-dépendant dans les cardiomyocytes (Huang et al., 1992). L'oléate et l'arachidonate stimulent la mobilisation de calcium cytoplasmique

en provenance du réticulum endoplasmique indépendamment de la phospholipase C et de la protéine Gi dans les cellules Jurkat (Gamberucci et al., 1997). Plus récemment, il a été démontré que les acides gras augmentent rapidement le calcium intracellulaire via GPR40 et que ce dernier est impliqué dans la sécrétion d'insuline induit par les acides gras à haut glucose (Itoh et al., 2003). Enfin, chez les cellules MCF-7, qui expriment GPR40, les acides gras insaturés, contrairement aux acides gras saturés, augmentent le calcium intracellulaire (Yonezawa et al., 2004). Par contre, aucun effet physiologique n'a été attribué à cette augmentation de calcium par les acides gras dans cette lignée cellulaire du cancer du sein.

8.6 Autres voies modulées par les acides gras

Les acides gras peuvent aussi activer d'autres protéines mais les conséquences physiologiques de l'activation de ces protéines ne sont pas clairement établies. En effet, les acides gras régulent directement l'activité de la phospholipase A2 (Raghupathi and Franson, 1992) et de la phospholipase D2 (Kim et al., 1999). Aussi, la protéine kinase *src* est impliquée dans la phosphorylation de la connexine 43 en réponse à l'oléate dans les cardiomyocytes (Huang et al., 2004). La PLC, qui peut aussi être régulée via certaines protéines G, est également activée en réponse aux acides gras insaturés (Hwang et al., 1996). De plus, la PLC pourrait être impliquée dans la prolifération cellulaire induite par le linoléate dans les cellules du cancer du sein (Park et al., 2000).

Les acides gras ont longtemps été considéré comme étant uniquement des composés essentiels qui sont utilisés par la cellule comme source et stockage d'énergie, pour la formation des membranes et pour la synthèse de molécules impliquées dans la signalisation. Il est maintenant de plus en plus évident qu'ils jouent aussi un rôle direct dans le contrôle de l'expression génique via l'activation de différentes voies de signalisation, permettant ainsi de modifier le métabolisme, la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose.

9 Thématique et but du travail

Certaines études épidémiologiques ainsi que des expériences utilisant les modèles animaux ont permis de postuler qu'une consommation élevée en acide gras peut influencer le risque de cancer du sein. De plus, l'obésité, qui est associée à un niveau plasmatique élevé d'acides gras, contribue à l'augmentation de l'incidence de plusieurs types de cancer incluant le cancer du sein. Par contre, il existe peu d'information concernant le mécanisme d'action des acides gras dans la carcinogenèse mammaire. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des acides gras sur la promotion du cancer du sein, nous avons étudié les effets de deux des acides gras les plus abondants de la circulation, l'oléate (C18:1) et le palmitate (C:16), sur la prolifération cellulaire et l'apoptose en utilisant principalement la lignée cellulaire humaine du cancer du sein MDA-MB-231.

Notre hypothèse implique que certains acides gras, lorsque présent en excès en circulation, activent différentes voies de signaux de transduction des cellules cancéreuses qui vont mener à une modification de la régulation de la prolifération cellulaire. Ainsi, les acides gras vont influencer la promotion de la carcinogenèse mammaire en favorisant la croissance et/ou en diminuant la mort des cellules qui possèdent des mutations aux niveaux des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur.

RÉSULTATS :**Oleate Activates Phosphatidylinositol 3-kinase, Promotes Proliferation and Reduces Apoptosis of Breast Cancer Cells whereas Palmitate has opposite effects¹****Serge Hardy, Yves Langelier, and Marc Prentki²**

Molecular Nutrition Unit, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal and Institut du cancer de Montréal [S. H., Y. L., M. P.], and Departments of Microbiology and Immunology [Y. L.] and Nutrition and Biochemistry [M. P.], Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: FATTY ACIDS AND BREAST CANCER CELL GROWTH

Au cours de cette étude nous avons observé les effets de deux des acides gras les plus abondants de la circulation, l'oléate et le palmitate, sur la croissance de lignées cellulaires humaines du cancer du sein. Nos résultats démontrent que l'oléate, un acide gras monoinsaturé, stimule la prolifération cellulaire tandis que le palmitate, un acide gras saturé, provoque une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, les cellules incubées en présence de palmitate montrent des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose, un clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase et une fragmentation de l'ADN. La diminution de la prolifération est donc associée à une mort des cellules par apoptose. En revanche, l'oléate protège les cellules contre l'apoptose induite par le palmitate. Enfin, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) semble impliquée dans le mode d'action de ces acides gras. Ainsi, l'ensemble des résultats démontrent que le type d'acides gras influence la carcinogenèse mammaire. La PI3K semble impliquée dans la transduction de signaux intracellulaire induit par les acides gras et cette enzyme pourrait établir un lien entre le mode d'action des acides gras et la carcinogenèse mammaire.

ABSTRACT

Epidemiologic studies and experiments using animal models and cultured breast cancer cells have suggested that high intake of dietary fat could increase breast cancer risk. Little is known about the biochemical pathways by which various free fatty acids (FFA) influence breast cancer cell proliferation and apoptosis. The present study was designed to investigate the effects of the two most abundant circulating FFA, oleate and palmitate, on established human breast cancer cell lines after a short period of serum starvation. The unsaturated FFA oleate (C:18:1) stimulated cell proliferation whereas the saturated FFA palmitate (C:16) dose dependently inhibited cell growth. The half maximal effective concentrations of oleate and palmitate in the presence of albumin were 5 and 25 μ M, respectively. The growth inhibitory effect of palmitate in MDA-MB-231 cell was related to the induction of apoptosis as indicated by morphological and biochemical criteria. Moreover, oleate protected cells against the proapoptotic action of palmitate. Oleate and palmitate respectively increased and decreased phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) activity and the actions of the two FFA on the enzyme were antagonistic. The PI3-K inhibitors wortmannin and LY294002 completely blocked the proliferative action of oleate. 2-bromopalmitate, a non-metabolizable analog, did not affect MDA-MB-231 cell growth suggesting that palmitate has to be metabolized to exert its effect. Thus, various types of fatty acids are not equivalent with respect to their actions on breast cancer cell growth and apoptosis. The results support the concept that PI3-K is implicated in the control of breast cancer cell growth by FFA and that PI3-K may provide a link between fat and cancer. The data are also consistent with the view that the type of FFA and their ratios in the diet in addition to the total amount of fat influence mammary carcinogenesis.

INTRODUCTION

Breast cancer affects a growing number of women around the world. Unfortunately, almost all is known with certainty about its causes, are factors over which no preventive action can be easily taken, like genetics and the age at which a woman has a child. Epidemiologic studies indicate that women in countries with high fat diets have risk of breast cancer that can be 5-fold higher than those in countries with low fat consumption (1-3). From these observations, it has been postulated that high intake of dietary fat could increase breast cancer risk (3). The dietary fat hypothesis has been supported by a meta-analysis of case control studies and by a large number of studies using animal models and cultured breast cancer cells (4). In contrast, recent prospective epidemiologic studies failed to confirm the hypothesis (5) and, moreover, a recent large study showed a small but significant inverse correlation (6). In addition, the latter study failed to uncover any positive association with specific major types of fat.

The question why epidemiologic studies have not been as consistent as animal studies in relating fat intake and breast cancer risk is a complex one. On the one hand, nutritional epidemiology suffers from profound imprecision of exposure measurements. It has been argued that this imprecision leads to substantial underestimation of disease-exposure associations, such as relative risk and dose response. Also, all cohort studies focused on fat consumption during adulthood whereas it is possible that fat intake during adolescence may be of greater importance for subsequent breast cancer development. On the other hand, inconsistencies also exist in experimental studies. A recent meta-analysis of about one hundred rodent studies indicated that n-6 polyunsaturated fatty acids have a strong tumor-enhancing effect whereas saturated fatty acids have a weaker effect (7). Monounsaturated fatty acids and n-3 polyunsaturated fatty acids had no statistically significant effects (7-10). However, as review by Hardy (11), many studies reported contradictory conclusions with respect to the respective actions of the different types of fatty acids, particularly for oleic acid, in the animal mammary tumor models. As the ratio, type and amount of fatty acids may influence in different ways tumor development in animals, conflicting results may be explained in part by the fact that fat is generally administered as a mixture of several different fatty acids and not as individual fatty acids (11, 12). Different effects of saturated and unsaturated fatty acids

on cell proliferation and promotion has also been documented in breast cancer cell culture studies (13-17). These inconsistencies could be related to differences in culture conditions or the use or not of albumin-bound fatty acids (18, 19). Thus, several *in vitro* studies tested the action of fatty acids unbound to BSA at concentrations far above their critical micellar concentrations. This raises doubts about the results obtained with such unphysiological conditions.

In an effort to clarify these problems, we based our works on the premise that assessing the effects of individual major dietary fatty acids on cell proliferation will help to understand the mechanisms by which fatty acids may influence tumor cells and, thereby, be helpful in the design of future epidemiologic studies and eventually dietary counseling. Relatively little information exists on the biochemical pathways by which fatty acids influence tumor cell proliferation. The discovery that fatty acid synthase (FAS), an enzyme essential to fatty acid metabolism, is a prognostic indicator of breast cancer progression strengthens the hypothesis that fatty acids are involved in the regulation of tumor cell growth (20-23). Also, consistent with this view is the observation that troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptors γ , a nuclear receptor which also binds various fatty acids, markedly influences the growth and apoptosis of various cancer cells (24-28). We recently proposed that fatty acids could influence insulinoma cell growth through the induction of proto-oncogenes like *c-fos* via Ca^{2+} and protein kinase C signaling (29). Thus, much remains to be learned about the primary target of fatty acids in relation to oncogenesis. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) phosphorylates inositol lipids that act as second messengers for several pathways related to cell proliferation and apoptosis (30-33). Whether long chain fatty acids influence cell proliferation via PI3-K is unknown.

In the present study, the actions of the two most abundant circulating fatty acids, oleate and palmitate, were investigated in established human breast cancer cell lines after a short period of serum starvation. We found that oleate (C:18:1, unsaturated fatty acid) stimulates cell proliferation whereas palmitate (C:16, saturated fatty acid) promotes apoptosis. Moreover, oleate protects cells against palmitate-induced apoptosis. Evidence that PI3-K may be implicated in the mode of action of these fatty acids is also provided.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Culture Conditions. The human breast cancer cell lines MCF-7, ZR-75-1, T-47-D and MDA-MB-231 were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in phenol red-free MEM medium with non-essential amino acids supplemented with 2mM glutamine, 10 µg/ml insulin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Albumin-bound fatty acids were prepared by stirring fatty acid sodium salts (≥99% purity, Sigma) at 37°C with 5% fraction V bovine serum albumin (BSA) essentially fatty acid free (Sigma) as described before (29). After being adjusted to pH 7.4, the solution was filtered through a 0.22-µm filter, and the fatty acid concentration was measured using a NEFAC kit (Wako Chemicals GmbH). When BSA-bound fatty acids were added to serum free culture medium, the final concentration of BSA was always adjusted to 0.5%.

[³H]-thymidine Incorporation. Cells were seeded at 5000 cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h in standard medium. After a 24 h starvation period in media without insulin and serum but with 0.5% BSA-fatty acid free, cells were incubated without or with BSA-bound fatty acids for 24 h. DNA synthesis was then assayed with a pulse of [³H]-thymidine (1µCi/well; specific activity, 71 Ci/mmol) during the last 4 h of incubation. Cells were harvested with a PHD cell harvester from Cambridge Technology (Watertown, MA) and the radioactivity retained on the dried glass fiber filters was counted with a Packard scintillation spectrophotometer (34).

Apoptosis Assay. Cells were seeded in 100 mm Petri dishes at 1x10⁶ cells/dish and treated as described in the figure legends. To determine the percentage of apoptotic cells, the detached cells present in the culture medium and in a 5 ml PBS washing of the dish were centrifuged at 1,000 × g for 5 min, resuspended in PBS and counted with a hemacytometer. The attached cells were trypsinized and counted. The percentage of apoptotic cells in triplicate dishes was evaluated by dividing the number of detached cells by the total number of cells (detached + attached). This method for quantification of apoptotic cells (cell rounding and blebbing) gave results that were similar within 5% to direct counting of cells with apoptotic morphology (cell rounding and blebbing) in random-selected fields using a Nikon Diaphot inverted photomicroscope (200 X).

Analysis of DNA Laddering by Agarose Gel Electrophoresis. Cellular DNA was extracted from detached cells by the salting out procedure described by Miller and al. (35). Electrophoresis was done in 1.5% agarose gels in Tris-borate buffer (pH 8.0). DNA was visualized under UV illumination after staining with ethidium bromide.

Protein Extraction and Analysis. Total protein extracts were prepared by lysing cells in protein extraction buffer [65 mM Tris (pH 6.8), 6 M urea and 2% SDS] followed by sonication to shear the DNA. After determination of protein concentration using the Bio-Rad DC (Detergent Compatible) colorimetric assay with BSA as a standard, DTT was added to a concentration of 5% (V/V) and the samples were boiled 5 min before performing SDS-PAGE and Western blotting. Following incubation with PARP/Ab-2, a mouse monoclonal antibody (Calbiochem) directed against poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP), the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Amersham Corp.) and the bound peroxidase was revealed with the SuperSignal (Pierce) detection kit.

PI3-K Activity Measurements. MDA-MB-231 cells were grown in 150 mm Petri dishes. Following a 5-min incubation period in the presence of various test substances, PI3-K was assayed as described (36). In brief, PI3-K was immunoprecipitated from 5 mg of total protein extracts with an anti p85PI3-K antibody (Santa Cruz, CA) and resuspended in 50 μ l of a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 100 mM EGTA. After incubation for 10 min with 10 μ g of L- α -phosphatidylinositol, 10 μ Ci of [γ ³²P]-ATP were added with 10 mM MgCl₂. The reaction was stopped after 4 min at room temperature with a mixture of CHCl₃-MeOH-HCl (100:200:2) and the lipids were extracted and separated by thin layer chromatography on silica gel plates. PI3-K activity was quantified through PIP formation.

RESULTS

Opposite Effects of Oleate and Palmitate on the Proliferation of Various Breast Cancer Cell Lines. The effects of oleate and palmitate on the proliferation of one hormone-independent (MDA-MB-231) and three hormone-dependent (MCF-7, ZR-75-1 and T-47-D) human breast cancer cell lines were studied. These fatty acids were chosen as they constitute the two most abundant fatty acids in the plasma (37). Oleate stimulated [³H]-thymidine incorporation in serum starved MDA-MB-231, MCF-7 and ZR-75-1 cells by 2-4 fold but had little effect in T-47-D cells (Fig. 1A). In contrast, palmitate had a drastically different effect since it decreased by 30-90 % the [³H]-thymidine incorporation in the four cell lines (Fig. 1B). The T-47-D cells, which were insensitive to oleate, exhibited sensitivity to palmitate by an extent similar to MCF-7 and ZR-75-1 cells. Interestingly, the opposite effects of both fatty acids were most pronounced in hormone-independent MDA-MB-231 cells. The results indicate that, whereas DNA replication was stimulated by oleate in the majority of the tested breast cancer cells, it was inhibited by palmitate in all of them.

Due to the profound effectiveness of both fatty acids in MDA-MB-231 cells, this cell line was used for most of the subsequent experiments. As shown in Fig. 2, the effects of oleate and palmitate on [³H]-thymidine incorporation were dose dependent. The stimulation of DNA synthesis by oleate, which was detectable at a concentration of 1 μ M, reached a plateau at 10 μ M that was sustained up to 400 μ M, the highest tested concentration (Fig. 2 A). The cell growth inhibitory effects of palmitate occurred in the 10-100 μ M range. The microscopic observation of palmitate-treated cells revealed that this fatty acid caused a dose dependent rise in the percentage of cells exhibiting morphological signs of apoptosis (cell blebbing, rounding and detachment) that paralleled the decreased [³H]-thymidine incorporation (Fig. 2 B). Similar results were obtained with oleate and palmitate purchased from two other companies (data not shown). It should be noted that on the basis of recent estimates of the free concentrations of fatty acids in the blood (38) and at different albumin to fatty acid ratios (39), the free concentrations of both palmitate and oleate in the cell culture medium should be in the nanomolar range”.

To better assess the growth stimulatory effect of oleate, MDA-MB-231 cells were incubated after a 1-day period of serum starvation in media containing either BSA alone, BSA-bound oleate or FBS and the attached cells were counted over a 6 day period (Fig. 3). The growth of control cells stopped after 1 day of culture and, at 3 days post serum starvation, the number of attached cells had dropped considerably. Microscopic observations revealed that most cells that detached from the dishes exhibited apoptotic morphological changes (not shown). In sharp contrast, the number of oleate-treated cells increased 2-fold during the same 3 day period and remained constant over the next 2 days. However, the proliferation of these cells was less rapid than that of serum-treated cells and a plateau was attained at a much lower density. Even if the majority of oleate-treated cells did not exhibit morphological signs of apoptosis, they somewhat differed from serum-treated cells by exhibiting a higher content of dark inclusions in their cytoplasm (Fig. 4 *A*). Altogether the data indicate that the death process induced in MDA-MB-231 cells by serum starvation is counteracted by oleate. Conversely, palmitate considerably promotes the death of serum starved cells.

Oleate Is Antiapoptotic and Impairs the Proapoptotic Action of Palmitate.

The morphological changes seen in serum-starved MDA-MB-231 cells that were dramatically amplified by palmitate treatment were typical of apoptosis. To obtain direct evidence that palmitate promotes an apoptotic process, we examined whether the proteolysis of PARP and the cleavage of DNA into nucleosomal fragments, two hallmark features of apoptosis, were also occurring in these cells. In order to minimize apoptosis in the control BSA-treated dishes, the period of serum starvation before adding fatty acids was shortened to 12 h. Under these conditions where about 10 % of the control cells exhibited morphological signs of apoptosis (Fig. 4 *A*), a small amount of the 89 kDa PARP degradation product was detected (Fig. 4 *B*). Oleate nearly completely prevented PARP cleavage whereas palmitate increased it. When DNA degradation was analyzed on the entire cell populations the typical DNA laddering was barely visible (not shown). However, when the DNA was extracted only from cells floating in the medium, laddering which was faintly visible in the control situation was apparent in the palmitate condition. Thus, oleate nearly completely prevented DNA degradation (Fig. 4 *C*). The actions of oleate and palmitate, singly or combined, were

also tested in the estrogen dependent cell line T-47-D. Fig. 4 *D* shows that both fatty acids induced qualitatively similar changes in PARP cleavage in T-47-D cells as in the estrogen independent cell line MDA-MB-231. The morphological changes caused by fatty acids were also similar in both cell lines (not shown). These results establish that oleate exerts an antiapoptotic effect on serum-starved MDA-MB-231 cells whereas palmitate is proapoptotic.

To determine whether oleate may protect cells against death triggered by palmitate, the level of apoptosis induced by palmitate (100 μ M) in the presence of increasing concentration of oleate was evaluated (Fig. 5). Half protection was already attained at the lowest tested concentration of oleate (1 μ M). At 10 μ M, the percentage of apoptosis was similar to that of controls (9%). Thus, a 1/10 molar ratio of oleate versus palmitate was sufficient for full protection. The cells protected by oleate against palmitate had a morphological appearance similar to that of cells treated with oleate alone (Fig. 4 *A*). Moreover, cells incubated in presence of palmitate (0.1 mM) plus oleate (0.03 mM) exhibited as little PARP cleavage and DNA fragmentation as control cells (Fig. 4 *B* and *C*).

Effect of Fatty Acids on PI3-K Activity. To assess a possible role of PI3-K in the action of oleate, the effect of two PI3-K inhibitors was tested. Wortmannin and LY294002 completely blocked the proliferative action of oleate (Fig. 6). As PI3-K inhibitors had only a weak effect (\approx 20 % decrease) on the proliferation of control cells (data not shown), these results suggested that PI3-K plays an important role in the proliferative effect of oleate. To confirm that PI3-K is involved in the action of oleate, PI3-K activity was measured in extracts of cells incubated for 5 min with the fatty acid (Fig. 7). In each of six separate experiments, oleate stimulated PI3-K activity by a factor that averaged 2-fold. For comparison, 5 % FBS also activated PI3-K by two fold ($n = 2$, not shown). In contrast, palmitate caused a 60 % reduction of PI3-K activity whereas the mixture of the two fatty acids had no effect. These results provide supporting evidence that PI3-K is implicated in the mode of action of oleate and palmitate on breast cancer cell proliferation and apoptosis, respectively.

DISCUSSION

Human breast cancer cell proliferation involves a complex interaction between genes, growth factors, hormones and calorogenic nutrients. Numerous studies have documented both *in vivo* and *in vitro* that long chain free fatty acids influence the proliferation of these cells. However, little is known about the mechanism of such effects. When the action of selected fatty acids bound to albumin on the growth of four different human breast cancer cell lines was assessed in a defined serum-free medium, oleate stimulated growth whereas palmitate inhibited it. The growth inhibition of palmitate was related to the induction of apoptosis. The pro-apoptotic effect of palmitate is counteracted by oleate. Thus, surprisingly, two fatty acids present in the diet and which are the major circulating fatty acids, have opposite effect on breast cancer cell proliferation. Moreover, as the non-metabolizable analog 2-bromopalmitate (200 μ M), had no effect on MDA-MB-231 cell growth (data not shown, n=3), we conclude that palmitate must be metabolized to exert its pro-apoptotic action.

Stimulation of MDA-MB-231 cell proliferation by oleate has also been observed by others in the presence of 5 % FBS (40) or in serum-free medium (18). Provided that these observations may be extended to the *in vivo* situation, it can be postulated that a diet rich in oleate may favor mammary tumor progression. Thus, obesity is characterized by elevated circulating free fatty acids, as well as insulin resistance (41) and an increase in the risk of breast (42) and colorectal cancer (43). Furthermore, a positive correlation exists between these pathological diseases (43-46).

In contrast, palmitate decreased the proliferation of MDA-MB-231 cells. Other groups have also observed that saturated fatty acids diminish the proliferation rate of human breast cancer cells (17, 18) but, to our knowledge, it is the first time it is shown to be associated with the induction of apoptosis. Palmitate induces apoptosis also in isolated pancreatic islets (47), hematopoietic precursor cell line LyD9 (48) and neonatal rat cardiomyocytes (49). The mechanism of the pro-apoptotic action of palmitate is uncertain. Palmitate is a precursor of ceramide whereas oleate is not (50). Evidence has been provided that palmitate might induce apoptosis via ceramide production in isolated pancreatic islets (47) and hematopoietic precursor cell line LyD9 (48). Whether *de novo* synthesis of ceramide is causally linked to the pro-apoptotic action of palmitate in

MDA-MB-231 cells remains to be evaluated. Another possibility is the inhibition of FAS, the enzyme responsible for the endogenous synthesis of fatty acids. Thus, palmitate inhibits FAS activity and gene expression in various cell types (51) and the inhibition of this enzyme by cerulenin has been reported to induce apoptosis in breast cancer cells (20).

The effect of palmitate on MDA-MB-231 apoptotic cell death is reversed by oleate. Moreover, the combination of the two fatty acids at 0.1 mM resulted in an increased proliferation MDA-MB-231 cell (not shown). An antiapoptotic action of oleate against palmitate has also been observed in neonatal rat cardiomyocytes where equimolar amounts of both fatty acids were necessary for full protection (49). The opposite action of different fatty acids on breast cancer cell growth may explain why epidemiological and animal studies using different diets are often conflicting. Thus, in vivo animal studies always used oils rich in particular fatty acids but also contain other fatty acids that may influence tumor promotion markedly differently.

PI3-K activation following growth factor stimulation is closely associated with increased proliferation and survival (30, 31). Oleate appears to act like a growth factor since it stimulates cell proliferation at very low concentration and activates PI3-K in MDA-MB-231. By contrast, palmitate reduced basal PI3-K activity in this cell line. To our knowledge, this provides the first evidence of changes in PI3-K activity by various fatty acids for any cell type. The very rapid response to treatment renders unlikely an effect involving changes in protein synthesis. It rather suggests signaling via membrane receptors such as receptor tyrosine kinases or G protein-coupled receptors, which are known to act via PI3-K activation(52, 53). Interestingly, it has recently been shown that oleate, but not palmitate, can in endothelial cells activate epithelial growth factor receptor (54). PI3-K activation could also occurs via CD36, a cell surface protein that can interact with fatty acids (55) and activate members of the *src* protein tyrosine kinase family (56).

Altogether our results support the view that the type of fatty acid (saturated, monounsaturated and polyunsaturated) and their ratios in the diet in addition to the total amount of fat influences mammary carcinogenesis. It will be of interest to determine the detailed mechanisms of palmitate and oleate action on breast cancer cell growth,

particularly upstream and downstream of PI3-K. Since the activity of PI3-K, a key signal transduction protein implicated in cell growth control, is modulated by exogenous fatty acids (present study) and glucose (34), the possibility should be considered that PI3-K provides a link between excessive calorigenic nutrient intake and cancer. The results may also explain the contradictions in the literature by pointing out that different fatty acids are not equivalent as far as cell growth and tumor promotion are concerned.

REFERENCES

1. Welsch, C.W. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.*, 52: 2040s-2048s, 1992.
2. Rose, D.P. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am.J.Clin.Nutr.*, 66: 1513S-1522S, 1997.
3. Pariza, M.W. Dietary fat, calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer risk. *Nutr.Rev.*, 45: 1-7, 1987.
4. Cohen, L.A., Rose, D.P., and Wynder, E.L. A rationale for dietary intervention in postmenopausal breast cancer patients: an update. *Nutr.Cancer*, 19: 1-10, 1993.
5. Hunter, D.J., Spiegelman, D., Adami, H.O., Beeson, L., van den Brandt PA, Folsom, A.R., Fraser, G.E., Goldbohm, R.A., Graham, S., Howe, G.R., Kushi, L.H., Marshall, J.R., McDermott, A., Miller, A.B., Speizer, F.E., Wolk, A., Yaun, S.-S., and Willet, W. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N.Engl.J.Med.*, 334: 356-361, 1996.
6. Holmes, M.D., Hunter, D.J., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Hankinson, S.E., Speizer, F.E., Rosner, B., and Willett, W.C. Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *JAMA*, 281: 914-920, 1999.
7. Fay, M.P., Freedman, L.S., Clifford, C.K., and Midthune, D.N. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res.*, 57: 3979-3988, 1997.
8. Cohen, L.A., Thompson, D.O., Maeura, Y., Choi, K., Blank, M.E., and Rose, D.P. Dietary fat and mammary cancer. I. Promoting effects of different dietary fats on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. *J.Natl.Cancer Inst.*, 77: 33-42, 1986.

9. Sundram, K., Khor, H.T., Ong, A.S., and Pathmanathan, R. Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res.*, 49: 1447-1451, 1989.
10. Gabriel, H.F., Melhem, M.F., and Rao, K.N. Enhancement of DMBA-induced mammary cancer in Wistar rats by unsaturated fat and cholestyramine. *In Vivo.*, 1: 303-307, 1987.
11. Hardy, R.W., Wickramasinghe, N.S., Ke, S.C., and Wells, A. Fatty acids and breast cancer cell proliferation. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 422:57-69: 57-69, 1997.
12. Dwyer, J.T. Human studies on the effects of fatty acids on cancer: summary, gaps, and future research. *Am.J.Clin.Nutr.*, 66: 1581S-1586S, 1997.
13. Wickramasinghe, N.S., Jo, H., McDonald, J.M., and Hardy, R.W. Stearate inhibition of breast cancer cell proliferation. A mechanism involving epidermal growth factor receptor and G-proteins. *Am.J.Pathol.*, 148: 987-995, 1996.
14. Buckman, D.K., Hubbard, N.E., and Erickson, K.L. Eicosanoids and linoleate-enhanced growth of mouse mammary tumor cells. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.*, 44: 177-184, 1991.
15. Buckman, D.K. and Erickson, K.L. Relationship of the uptake and beta-oxidation of 18-carbon fatty acids with stimulation of murine mammary tumor cell growth. *Cancer Lett.*, 59: 257-265, 1991.
16. Buckman, D.K., Chapkin, R.S., and Erickson, K.L. Modulation of mouse mammary tumor growth and linoleate enhanced metastasis by oleate. *J.Nutr.*, 120: 148-157, 1990.
17. Singh, R.K., Hardy, R.W., Wang, M.H., Williford, J., Gladson, C.L., McDonald, J.M., and Siegal, G.P. Stearate inhibits human tumor cell invasion. *Invasion Metastasis*, 15: 144-155, 1995.

18. Rose, D.P. and Connolly, J.M. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.*, *50*: 7139-7144, 1990.
19. Begin, M.E., Ells, G., Das, U.N., and Horrobin, D.F. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J.Natl.Cancer Inst.*, *77*: 1053-1062, 1986.
20. Pizer, E.S., Jackisch, C., Wood, F.D., Pasternack, G.R., Davidson, N.E., and Kuhajda, F.P. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, *56*: 2745-2747, 1996.
21. Pizer, E.S., Wood, F.D., Heine, H.S., Romantsev, F.E., Pasternack, G.R., and Kuhajda, F.P. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res.*, *56*: 1189-1193, 1996.
22. Pizer, E.S., Wood, F.D., Pasternack, G.R., and Kuhajda, F.P. Fatty acid synthase (FAS): a target for cytotoxic antimetabolites in HL60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res.*, *56*: 745-751, 1996.
23. Kuhajda, F.P., Jenner, K., Wood, F.D., Hennigar, R.A., Jacobs, L.B., Dick, J.D., and Pasternack, G.R. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *91*: 6379-6383, 1994.
24. Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M., and Singer, S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *96*: 3951-3956, 1999.
25. Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat.Med.*, *4*: 1058-1061, 1998.
26. Lefebvre, A.M., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J.C., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R., and Auwerx, J. Activation of the peroxisome proliferator-

- activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat.Med.*, 4: 1053-1057, 1998.
27. Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F.J., DeAngelo, D.J., Partridge, J.B., Holden, S.A., Chen, L.B., Singer, S., Fletcher, C., and Spiegelman, B.M. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat.Med.*, 4: 1046-1052, 1998.
 28. Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J.W., Heber, D., and Koeffler, H.P. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXH mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 8806-8811, 1998.
 29. Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J.A., Soria, B., and Prentki, M. Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes*, 48: 2007-2014, 1999.
 30. Yao, R. and Cooper, G.M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, 267: 2003-2006, 1995.
 31. Kaplan, D.R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Pallas, D.C., White, M., Cantley, L., and Roberts, T.M. Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. *Cell*, 50: 1021-1029, 1987.
 32. Varticovski, L., Druker, B., Morrison, D., Cantley, L., and Roberts, T. The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol-3 kinase. *Nature*, 342: 699-702, 1989.
 33. Parker, P.J. and Waterfield, M.D. Phosphatidylinositol 3-kinase: a novel effector. *Cell Growth Differ.*, 3: 747-752, 1992.
 34. Buteau, J., Rduit, R., Susini, S., and Prentki, M. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases

transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*, 42: 856-864, 1999.

35. Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic.Acids.Res.*, 16: 1215-1988.
36. Choudhury, G.G., Biswas, P., Grandaliano, G., Fouqueray, B., Harvey, S.A., and Abboud, H.E. PDGF-mediated activation of phosphatidylinositol 3 kinase in human mesangial cells. *Kidney Int.*, 46: 37-47, 1994.
37. van der Vusse GJ, Roemen, T.H., Flameng, W., and Reneman, R.S. Serum-myocardium gradients of non-esterified fatty acids in dog, rat and man. *Biochim.Biophys.Acta*, 752: 361-370, 1983.
38. Richieri, G.V. and Kleinfeld, A.M. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J.Lipid Res.*, 36: 229-240, 1995.
39. Richieri, G.V., Anel, A., and Kleinfeld, A.M. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry*, 32: 7574-7580, 1993.
40. Chajes, V., Sattler, W., Stranzl, A., and Kostner, G.M. Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: relationship to peroxides and vitamin-E. *Breast Cancer Res.Treat.*, 34: 199-212, 1995.
41. Jensen, M.D. Diet effects on fatty acid metabolism in lean and obese humans. *Am.J.Clin.Nutr.*, 67: 531S-534S, 1998.
42. Carroll, K.K. Obesity as a risk factor for certain types of cancer. *Lipids*, 33: 1055-1059, 1998.
43. Giovannucci, E. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes.Control.*, 6: 164-179, 1995.

44. Stoll, B.A. Association between breast and colorectal cancers. *Br.J.Surg.*, 85: 1468-1472, 1998.
45. Tran, T.T., Medline, A., and Bruce, W.R. Insulin promotion of colon tumors in rats. *Cancer Epidemiol.Biomarkers.Prev.*, 5: 1013-1015, 1996.
46. Stoll, B.A. Nutrition and breast cancer risk: can an effect via insulin resistance be demonstrated? *Breast Cancer Res.Treat.*, 38: 239-246, 1996.
47. Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M., and Unger, R.H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95: 2498-2502, 1998.
48. Paumen, M.B., Ishida, Y., Muramatsu, M., Yamamoto, M., and Honjo, T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 272: 3324-3329, 1997.
49. de Vries JE, Vork, M.M., Roemen, T.H., de, J.Y., Cleutjens, J.P., van der Vusse GJ, and van, B.M. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J.Lipid Res.*, 38: 1384-1394, 1997.
50. Merrill, A.H.J. and Jones, D.D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim.Biophys.Acta*, 1044: 1-12, 1990.
51. Desvergne, B. and Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr.Rev.*, 20: 649-688, 1999.
52. Daulhac, L., Kowalski-Chauvel, A., Pradayrol, L., Vaysse, N., and Seva, C. Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors. *J.Biol.Chem.*, 274: 20657-20663, 1999.
53. Thelen, M. and Didichenko, S.A. G-protein coupled receptor-mediated activation of PI 3-kinase in neutrophils. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 832:368-82: 368-382, 1997.

54. Vacaresse, N., Lajoie-Mazenc, I., Auge, N., Suc, I., Frisach, M.F., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ.Res.*, 85: 892-899, 1999.
55. Harmon, C.M. and Abumrad, N.A. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J.Membr.Biol.*, 133: 43-49, 1993.
56. Huang, M.M., Bolen, J.B., Barnwell, J.W., Shattil, S.J., and Brugge, J.S. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88: 7844-7848, 1991.

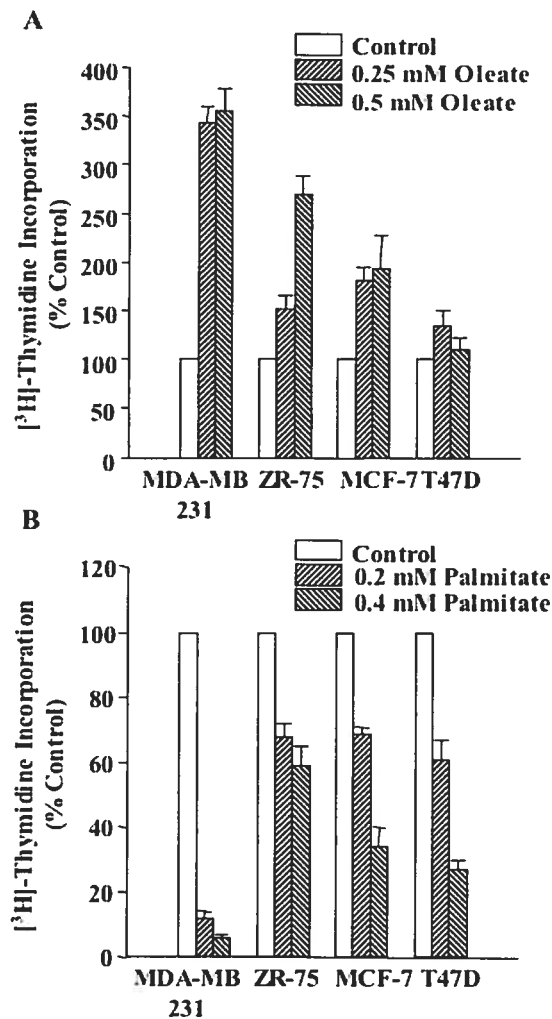


Fig. 1. Effects of oleate and palmitate on the incorporation of [^3H]-thymidine in various breast cancer cell lines. After 24 h of serum-starvation in the presence of 0.5% BSA in MEM without insulin, cells were incubated for 24 h with 0.5% BSA (*Control*) or BSA-bound oleate (*A*) and palmitate (*B*). During the last 4 h of incubation, cells were labeled with [^3H]-thymidine as described in “Material and Methods”. The results represent the means \pm SE of three independent experiments performed in triplicates. All values with oleate or palmitate are significant ($P < 0.01$) versus their respective control situations, except for the action of oleate on the tritiated thymidine incorporation in T47D cells (not significant).

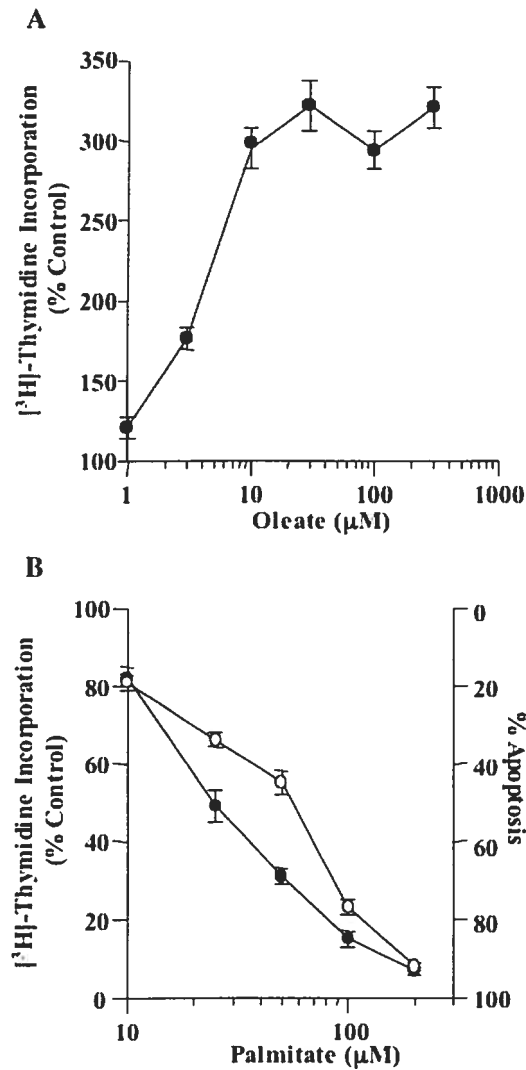


Fig. 2. Dose-dependence of the effects of oleate and palmitate on the incorporation of $[^3\text{H}]$ -thymidine in MDA-MB-231 cells. Cells were cultured for 24 h as described in Fig. 1 with 0.5 % BSA (*Control*) or various concentrations of BSA-bound oleate (*A*) and palmitate (*B*). $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation values (●) are expressed as a percentage of control. The percentage of apoptosis (○) was assessed as described in “Material and Methods”. The results represent the means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. All test values are significant ($P < 0.01$) versus their respective control situations.

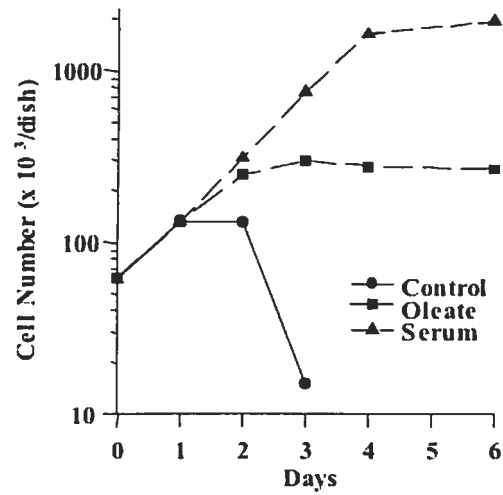


Fig. 3. Effects of oleate and FBS on MDA-MB-231 cell growth. Cells were plated in 60 mm dishes in MEM with 5 % FCS at 4×10^4 cells/dish. After 24 h of incubation (time zero), they were serum starved as described in Fig. 1. On day one, cells were refed with MEM containing 0.5 % BSA alone (*Control*), BSA-bound oleate (0.1 mM) or 5 % FCS. At the indicated times, attached cells were trypsinized and counted. Values are means of two separate experiments.

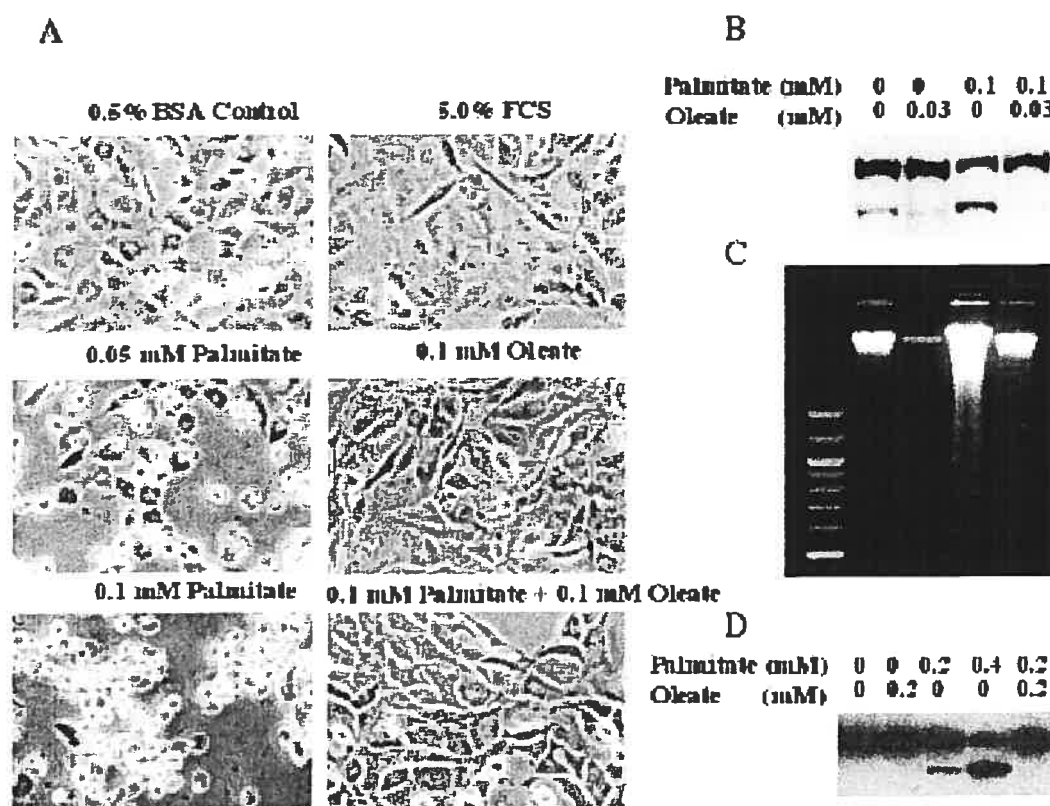


Fig. 4. Oleate contracts apoptosis induced by serum starvation and palmitate treatment. After a 12 h period of serum-starvation, MDA-MB-231 (*A*, *B* and *C*) or T-47-D (*D*) cells were refed with the same medium with 0.5 % BSA alone (*Control*), the indicated concentrations of BSA-bound oleate or palmitate, or a combination of the two fatty acids. The effects of these treatments were evaluated 24 h later by phase-contrast microscopy (*A*), the analysis of PARP cleavage in extracts (10 μ g proteins) of the whole cell populations (*B* and *D*) or through DNA laddering analysis of detached cells (*C*). The figure shows representative experiments which have been repeated at least three times.

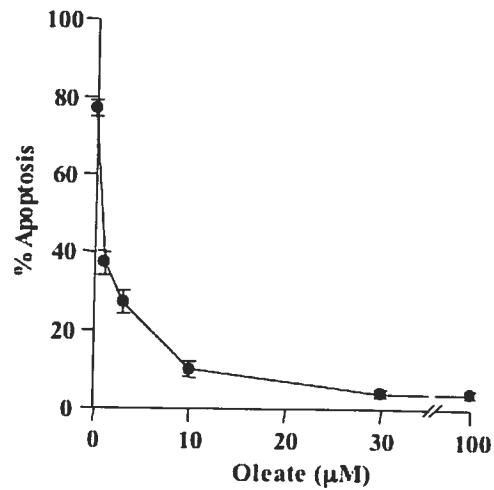


Fig. 5. The protection by oleate of MDA-MB-231 cells against palmitate-induced apoptosis is dose dependent. Cells were serum-starved for 24 h as described in Fig. 1 and subsequently incubated for 24 h with 0.1 mM palmitate and various concentrations of oleate in the presence of 0.5 % BSA. The percentage of apoptosis was evaluated as described in Fig. 2. Means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. All test values are significant ($P < 0.01$) versus the control situation (no oleate).

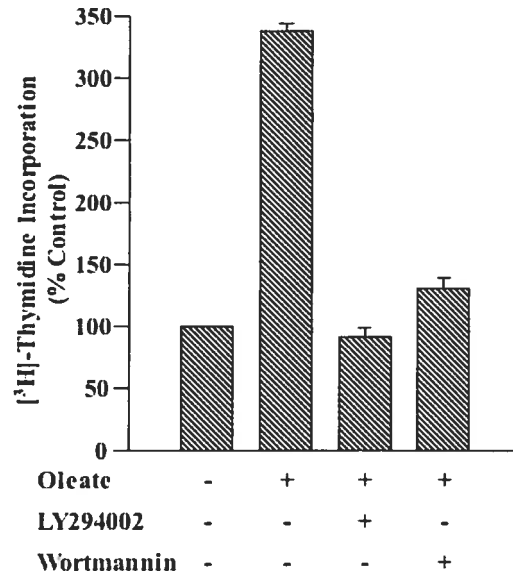


Fig. 6. Effect of PI3-K inhibitors on MDA-MB-231 cell proliferation induced by oleate. Cells were serum-starved for 24 h as described in Fig. 1 and subsequently incubated for 24 h with 0.5 % BSA (*Control*) or BSA-bound oleate (0.1 mM) in the absence or presence of 50 nM wortmannin or 50 μ M LY294002. Proliferation was evaluated by [³H]-thymidine incorporation. Means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.01$ versus control.

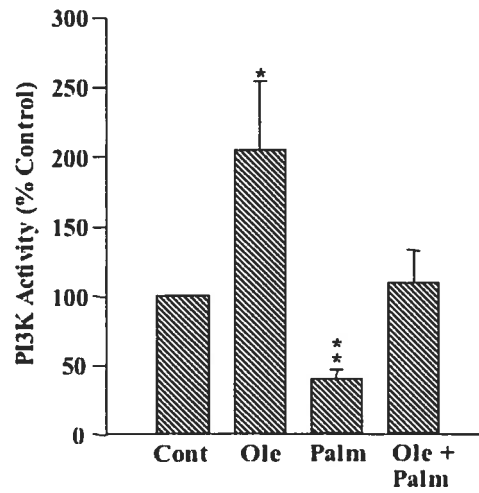


Fig. 7. Effect of oleate and palmitate on PI3-K activity. After 24 h of serum-starvation, cells were treated for 5 min with the same medium containing 0.5 % BSA alone (*Control*), BSA-bound oleate (0.1 mM) or palmitate (0.1 mM). The results represent the means \pm SE of 6 independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control.

Saturated Fatty Acids Induced Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells: A Role for Cardiolipin*

Serge Hardy‡, Wissal El-Assaad‡, Ewa Przybytkowski‡, Erik Joly‡, Marc Prentki ‡¶||, and Yves Langelier‡**‡‡

From the ‡Molecular Nutrition Unit, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, and the ‡Institut du cancer de Montréal, and the ¶Departments of Nutrition and Biochemistry, and the **Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

Running title: *Palmitate-Induced Breast Cancer Cell Death*

Cette étude nous a permis d'établir les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par le palmitate dans les cellules du cancer du sein. Ainsi, le palmitate diminue le potentiel membranaire de la mitochondrie et provoque le relâchement du cytochrome c. De plus, le 2-bromopalmitate, un analogue du palmitate non métabolisable, n'a pas d'effet cytotoxique suggérant ainsi que le palmitate doit être métabolisé pour exercer son effet apoptotique. Le palmitate provoque une augmentation du turnover et une diminution de la synthèse de la cardiolipine, un phospholipide responsable de la rétention du cytochrome c à la mitochondrie. Au contraire, l'oléate protège les cellules de l'apoptose induite par le palmitate en restaurant les niveaux de cardiolipine. En effet, l'oléate, qui est préférentiellement métabolisé en triglycérides, redirige le palmitate vers un processus d'estérification en triglycérides rétablissant ainsi la synthèse de cardiolipine ainsi qu'une diminution de son turnover. Ainsi, cette étude démontre que le métabolisme des acides gras est important pour l'action proapoptotique du palmitate et l'effet antiapoptotique de l'oléate.

Contribution des coauteurs:

Wissal El-Assaad: Mesure des céramides

Ewa Przybytkowski: Mesure de l'oxydation des acides gras

Erik Joly: Aide à la Supervision du travail

SUMMARY

Little is known about the biochemical basis of the action of free fatty acids (FFA) on breast cancer cell proliferation and apoptosis. Here we report that unsaturated FFAs stimulated the proliferation of human MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas saturated FFAs inhibited it and caused apoptosis. Saturated FFA palmitate decreased the mitochondrial membrane potential and caused cytochrome c release. Palmitate-induced apoptosis was enhanced by fat oxidation inhibitor etomoxir, whereas it was reduced by fatty-acyl CoA synthase inhibitor triacsin C. The non-metabolizable analog 2-bromopalmitate was not cytotoxic. This indicates that palmitate must be metabolized to exert its toxic effect, but that its action does not involve fat oxidation. Pharmacological studies showed that the action of palmitate is not mediated via ceramides, reactive oxygen species, or changes in phosphatidylinositol 3-kinase activity. Palmitate caused early enhancement of cardiolipin turnover and decreased the levels of this mitochondrial phospholipid which is necessary for cytochrome c retention. Cosupplementation of oleate, or increasing β -oxidation with the AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose, both restored cardiolipin levels and blocked palmitate-induced apoptosis. Oleate was preferentially metabolized to triglycerides, and oleate cosupplementation channeled palmitate esterification processes to triglycerides. Overexpression of Bcl-2 family members blocked palmitate-induced apoptosis. The results provide evidence that a decrease in cardiolipin levels and altered mitochondrial function are involved in palmitate-induced breast cancer cell death. They also suggest that the antiapoptotic action of oleate on palmitate-induced cell death involves both restoration of cardiolipin levels and redirection of palmitate esterification processes to triglycerides.

INTRODUCTION

Epidemiological studies and experiments using animals have suggested that dietary fatty acids contribute to the risk of breast cancer (1-3). However, there is a debate whether this is attributable to particular types of fatty acids and their ratio in the diet. Free fatty acids (FFAs)¹ play an important role in numerous biological functions. They serve as a source of energy and as precursors of many signaling and structural molecules (4). Little information exists on the biochemical pathways by which different types of fatty acids influence breast cancer cell growth and death. The observation in breast cancer cells that overexpression of enzymes involved in fatty acid synthesis (fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase) correlates with poor prognosis strengthens the hypothesis that fatty acids are involved in the regulation of tumor cell growth (5,6). Also, consistent with this view is the recent observation documenting an interaction of the tumor suppressor gene BRCA1 with acetyl CoA carboxylase, the rate limiting enzyme in fatty acids biosynthesis (7). Moreover, we reported that various types of FFAs are not equivalent with respect to their actions on breast cancer cell proliferation and apoptosis: the monounsaturated FFA oleate (C18:1) stimulated the proliferation of breast cancer cells, whereas the saturated palmitate (C16:0) induced apoptosis (8). A possible explanation for the differential effect of these two FFAs came from the surprising observation that oleate and palmitate increased and decreased, respectively, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) activity. The antagonistic action of saturated versus unsaturated FFAs on breast cancer cell growth control may explain the contradiction reported in the epidemiological literature with respect to fatty acids and cancer by pointing out that different FFAs are not equivalent as for as cell growth and tumor promotion are concerned (8).

Induction of apoptosis by palmitate has also been observed in other cell types including cardiomyocytes (9), hematopoietic cells (10), pancreatic β -cells (11) and astrocytes (12) but, for most of these cell types, the mechanism by which palmitate induces cell death remains elusive. It has been proposed that excess palmitate could induce cell death through increased intracellular concentration of ceramide (10,11), a metabolite exclusively produced from saturated FFAs. However, this hypothesis has been challenged by work suggesting that apoptosis induced by palmitate could occur

through the generation of reactive oxygen species (ROS) and not through ceramide synthesis (13). Alternatively, palmitate-induced apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes has been attributed to an important diminution of cardiolipin (CL) synthesis, correlating well with the extent of cytochrome c release into the cytosol (14). CL is an anionic phospholipid containing four unsaturated fatty acids responsible for insertion and retention of cytochrome c in the mitochondrial membrane (15,16). It is located exclusively in the inner membrane of the mitochondrion and particularly at intermembrane contact sites (17). Whether palmitate influences CL level in breast cancer cells remains unknown.

The central role of mitochondria, the main intracellular source of energy, in palmitate metabolism raises the possibility that palmitate-induced changes in mitochondria could impact the process of breast cancer cell death. Mitochondria play a crucial role in several processes linked to apoptosis (18). Apoptotic stimuli produces the release of mitochondrial proapoptotic proteins into the cytosol like cytochrome c, Smac/Diablo and apoptosis-inducing factor (19-21). Release of cytochrome c in the cytosol subsequently triggers the activation of caspases, substrate cleavage and cell death (19). The mechanism that mediates the release of cytochrome c from the mitochondria is unclear. In one view, the release occurs following mitochondrial permeability transition as a consequence of the opening of a large pore called the permeability transition pore (22). Alternatively, cytochrome c release has been attributed to the formation of nonspecific holes in the mitochondria that does not involve mitochondrial permeability transition (23). By whatever mechanism cytochrome c is released, members of the Bcl-2 family of proteins control this key step in the apoptotic process. Some members inhibit cytochrome c release and promote cell survival (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) whereas others, by mediating cytochrome c release, promote apoptosis (Bax, Bak, Bid) (24).

In the present study, the mechanism by which the saturated fatty acid, palmitate, induces apoptosis in the breast cancer cell line MDA-MB-231 was investigated. The results suggest that mitochondria and CL play a critical role in palmitate-induced apoptosis in breast cancer cells. In addition, they allow us to propose a model explaining the lipotoxic action of palmitate and other saturated fatty acids.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—The caspase-3 substrate Ac-DEVD-AFC, triacsin C, fumonisin B1, LY294002 were from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Fatty acids sodium salts were purchased from Nu-Check Prep (Elysian, MN). Fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) (fraction V), etomoxir and AICAR were obtained from Sigma (St Louis, MO). DiOC₆(3) was from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). [³H]-thymidine (specific activity, 71 Ci/mmol) and [¹⁴C]palmitate (specific activity, 55 mCi/mmol) were obtained from Perkin Elmer Life Sciences Inc. (Boston, MA), and [¹⁴C]oleate (specific activity, 60 mCi/mmol) and [³²P]H₃PO₄ from Amersham Biosciences, Inc. (Baie d'Urfé, QC).

Cell Lines and Culture Conditions—The human breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in phenol red-free minimal essential medium (MEM) containing non-essential amino acids, 2 mM glutamine and 5% heat-inactivated fetal bovine serum (standard medium). Albumin-bound fatty acids were prepared by stirring fatty acid sodium salts (≥99% purity) at 37 °C with 5% BSA essentially fatty acid-free as described before (25). After being adjusted to pH 7.4, the solution was filtered through a 0.22-μm filter, and the fatty acid concentration was measured using a NEFA C kit (Wako Chemicals, GmbH). When BSA-bound fatty acids were added to serum free culture medium, the final concentration of BSA was always adjusted to 0.5%.

[³H]-thymidine Incorporation—For cell growth experiments, a protocol similar to the one already detailed was used (8). Cells were seeded at 5000 cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h in standard medium. After a 24 h starvation period in medium without serum but with 0.5% BSA, cells were incubated without or with BSA-bound fatty acids for 24 h. DNA synthesis was then assayed with a pulse of [³H]-thymidine (1 μCi/well) during the last 4 h of incubation. Cells were harvested with a PHD cell harvester from Cambridge Technology (Watertown, MA) and the radioactivity retained on the dried glass fiber filters was measured by liquid scintillation.

Caspase-3 Activity Assay—Cells were seeded in 60 mm Petri dishes at 5×10⁵ cells/dish and incubated for 24 h in standard medium. After a 12 h of serum starvation in medium containing 0.5% BSA, cells were incubated in serum-free medium without or with BSA-bound fatty acids. Caspase activity was determined using the ApoAlert

Caspase Assay Kit (Clontech, Palo Alto, CA). Briefly, cells were washed twice with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and harvested in lysis buffer. After determination of protein concentration using the BCA colorimetric assay (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) with BSA as a standard, 50 μg of protein was incubated with the fluorogenic peptide substrate Ac-DEVD-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (AFC). The initial rate of release of free AFC was measured using a FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtechnologies, Inc., Durham, NC) at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 505 nm.

Mitochondrial Membrane Potential—Cells were cultured and incubated as described above. After treatment, cells were trypsinized, washed two times with PBS and resuspended in PBS containing 0.1% BSA (PBS-BSA) and 0.2 μM DiOC₆(3) (26). After 20 min of incubation at 37°C, cells were washed, resuspended in PBS-BSA and incubated for 30 min at 37°C. Cells were collected and resuspended in PBS-BSA containing 1 μM propidium iodide. DiOC₆(3) fluorescence was measured by flow cytometry using an Epics XL flowcytometer from Coulter (Miami, FL) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 500 nm. The percentage of cells with low mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) represents the percentage of gated cells displaying decreased DiOC₆(3) fluorescence.

Cytochrome C Release Analysis—Cells were seeded in 100 mm Petri dishes at 1×10^6 cells/dish, cultured and incubated as described above. At different times, cells were collected and resuspended in extraction buffer containing 220 mM mannitol, 68 mM sucrose, 50 mM PIPES-KOH (pH 7.4), 50 mM KCl, 5 mM EGTA and protease inhibitors. After 10 min of incubation on ice, cells were homogenized with a syringe needle (25G) and centrifuged at 14,000 x g for 10 min. Supernatants were removed and centrifuged at 100,000 g for 1 h. The supernatant containing the cytosolic fraction was removed and stored at -80°C, until analysis by immunoblot as described (27).

Measurement of Ceramide Levels—Cells were seeded in 60 mm Petri dishes at 5×10^5 cells/dish and incubated as described above. Lipids were collected according to the method of Bligh and Dyer (28). Ceramide levels were determined using the diacylglycerol kinase assay as described (29).

Incorporation of Palmitate and Oleate into Various Complex Lipids—Cells seeded in 60 mm Petri dishes at 5×10^5 cells/dish were incubated for 24 h in standard medium. After 12 h of serum starvation in medium containing 0.5% BSA, they were incubated for 1 h in serum-free medium supplemented with BSA-bound palmitate and/or oleate (0.1 mM) in the presence of 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ of [^{14}C]palmitate or [^{14}C]oleate. Then, total lipids were extracted and separated by thin layer chromatography as described (30). Spots corresponding to triacylglycerol, diacylglycerol, cholesterol ester and phospholipids were individually scraped and counted by liquid scintillation. Incorporation in neutral lipids and phospholipids was normalized for lipid recovery.

Measurement of Phospholipid Levels—Phospholipid measurements were performed essentially as described previously (28). Cells were seeded in 60 mm Petri dishes at 5×10^5 cells/dish and incubated for 24 h in standard medium. Cells were labeled for 24 h with [^{32}P]Pi (20 $\mu\text{Ci/ml}$), after which cells were incubated in serum-free medium without or with BSA-bound fatty acids in the presence of [^{32}P]Pi (20 $\mu\text{Ci/ml}$). For cardiolipin (CL) turnover experiments, cells were labeled as described above for 24 h, washed twice in PBS and incubated in serum-free medium lacking [^{32}P]Pi without or with BSA-bound fatty acids. After treatment, cells were washed and lipids were extracted using a solution of $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/0.1 \text{ M HCl}$ (10:5:4). Lipids were then isolated by acid organic extraction (half volumes each of CHCl_3 and 0.1 M HCl, 0.5 M NaCl), dried, and resuspended in an appropriate volume of CHCl_3 . Phospholipids were separated by thin layer chromatography using silica gel plates (31), and individual species were identified by co-migration of standards (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). The spots corresponding to CL and to PA+phosphatidylglycerol (PG) were individually scraped, counted by liquid scintillation and normalized to the total amount of label present in each sample.

Adenovirus infection—The adenovirus recombinants AdTREx-Flag-Bcl-xL, AdTREx-Flag-Bcl-w and AdTREx-GFP expressing respectively the antiapoptotic mouse Bcl-xL and human Bcl-w proteins and the green fluorescent protein (GFP) were provided by Gordon Shore. Cells were seeded in 6-well plates at 1.5×10^5 cells/well 24 h prior infection with the adenovirus recombinants at a multiplicity of infection of 5 plaque-forming units per cell. After 12 h of adsorption in MEM without serum in the

presence of 0.5% BSA, cells were incubated in serum-free medium without or with BSA-bound palmitate for 24 h prior harvesting.

RESULTS

Opposite Effects of Unsaturated and Saturated Fatty Acids on the Proliferation and Apoptosis of MDA-MB-231 Cells—We showed previously that the monounsaturated fatty acid oleate stimulated the proliferation of three different breast cancer cell lines (8). In contrast, the saturated fatty acid palmitate induced apoptosis in these cells. Here, the effects of different unsaturated and saturated FFAs on the proliferation of serum-starved MDA-MB-231 cells were studied. All the tested unsaturated FFAs stimulated [³H]-thymidine incorporation (Fig. 1A). The extent of stimulation ranged from 250% for oleate (C18:1) and linoleate (C18:2) to 170% for arachidonate (C20:4) and docohexanoate (C22:6). In contrast, the saturated FFAs myristate (C14:0), palmitate (C16:0), and stearate (C18:0) decreased [³H]-thymidine incorporation by 50-95 % when compared to control. Interestingly, 2-bromopalmitate, a non-metabolizable analog of palmitate, did not affect [³H]-thymidine incorporation suggesting that palmitate has to be metabolized to exert its effect. The results indicate that, whereas unsaturated FFAs stimulate DNA replication in breast cancer cells, saturated FFAs inhibit it.

The saturated fatty acid palmitate has been shown to be proapoptotic in MDA-MB-231 cells since it induced the proteolysis of polyADP ribose polymerase and the cleavage of DNA into nucleosomal fragments, two hallmark features of apoptosis (8). To determine if the cell proliferation-inhibitory effect of the other saturated FFAs was related to apoptosis, we examined the activation of caspase-3 in serum-starved cells. Saturated FFAs increased caspase-3 activity by 2-7 fold and this increase was correlated with their chain length (Fig. 1B). In contrast, the unsaturated FFA oleate decreased caspase-3 activity by 80%. Moreover, oleate protected cells against apoptosis triggered by saturated FFA since the activity of caspase-3 was blocked when oleate was mixed in equimolar ratio with saturated FFAs. The results establish that saturated FFAs induce apoptosis in MDA-MB-231 cells, an effect that can be counteracted by oleate.

Mitochondria Play a Central Role in Palmitate-Induced Apoptosis—To examine the mechanism by which saturated FFAs induced apoptosis in MDA-MB-231 cells, we chose palmitate as it is the most abundant saturated FFA in the plasma. An examination of the time course of caspase-3 activation induced by palmitate revealed that the

activation first seen at 6 h became significant at 8 h and thereafter continued to increase (Fig. 2A).

In certain types of cells, loss of $\Delta\Psi_m$ is one of the steps preceding caspase activation during apoptosis (32). The effect of palmitate on $\Delta\Psi_m$ was analyzed by flow cytometry in intact cells with the strong cationic dye DiOC₆(3). Damaged mitochondria lose membrane integrity and as a consequence are no longer able to maintain their transmembrane potential, resulting in a decreased binding of DiOC₆(3). Palmitate induced within 6 h a significant increase in the percentage of cells with low $\Delta\Psi_m$, whereas no change occurred after 10 h of treatment with the unsaturated FFA oleate (Fig. 2B). Palmitate-induced depolarization of the membrane potential preceded the activation of caspase-3, suggesting that alteration of the mitochondria could be among the first steps in the apoptotic process induced by the fatty acid.

The time dependence of cytochrome c release in the cytoplasm was examined by immunoblotting analysis. Basal amounts of cytochrome c were detected in cytosolic fraction until 4 h following palmitate treatment (Fig. 2C). A more than 3-fold increase in cytochrome c release was seen 6 h post-treatment, and, thereafter, cytochrome c levels remained elevated in the cytoplasm. Moreover, as for the depolarization of the mitochondrial membrane potential, palmitate-induced cytochrome c release preceded caspase-3 activation, suggesting that the mitochondrion is involved in the mechanism underlying palmitate-induced cell death.

Alterations of Lipid Partitioning Affects Palmitate-Induced Apoptosis—To provide further evidence that palmitate must be metabolized to exert its proapoptotic effect, we used the acyl-CoA synthetase specific inhibitor, triacsin C. Acyl-CoA synthetase activates fatty acids to fatty acyl-CoA, which are then channeled to different metabolic pathways (33). To minimize the long-term cytotoxic effect of triacsin C, caspase-3 activity was measured after a 12 h treatment. Under these conditions, triacsin C, which slightly increased apoptosis in control cells, reduced by 50 % the proapoptotic effect of palmitate (Fig. 3A). Taken together, the results obtained with 2-bromopalmitate and triacsin C demonstrate that palmitate must be metabolized at least to the CoA derivative step (fatty acyl-CoA) to promote apoptosis in MDA-MB-231 cells.

Excess palmitate may also lead to increased cycling through mitochondrial β -oxidation pathways generating ROS (34). Hence, using pharmacological tools to alter fatty acid oxidation, we investigated the importance of mitochondrial β -oxidation for the proapoptotic action of palmitate in MDA-MB-231 cells. Increasing mitochondrial fatty acid oxidation with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose (AICAR), an AMP-activated protein kinase (AMPK) activator (35), blocked palmitate-induced apoptosis (Fig. 3B). In contrast, inhibiting with etomoxir (36) carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I), the rate-limiting enzyme of fatty acids β -oxidation, increased by 2-fold the proapoptotic effect of palmitate. Control experiments revealed that AICAR produced a 2-fold increase in the rate of fatty acid oxidation, whereas etomoxir produced a 70 % decrease (data not shown). These results indicate that changes in lipid partitioning through alterations in fatty acid oxidation affects the proapoptotic action of palmitate, and that enhanced fat oxidation is not involved in this process.

De Novo Ceramide Synthesis Is Not Required for Palmitate-Induced Apoptosis— Ceramide are metabolites exclusively produced from saturated FFAs (37). They have been implicated in the proapoptotic action of palmitate in some tissues, in particular the pancreatic β -cell (11). Treatment of MDA-MB-231 cells with palmitate, increased the level of ceramides by 3-fold (Fig. 4A). As expected, the unsaturated fatty acid oleate and the non-metabolizable analog 2-bromopalmitate did not change the cellular ceramide content. The increase in ceramide induced by palmitate was blocked by fumonisin B1, a specific inhibitor of ceramide synthase (38), suggesting that the elevation in ceramide production was attributable to *de novo* synthesis from palmitate. To determine whether the increase in *de novo* ceramide synthesis is critical for palmitate-induced apoptosis, caspase-3 activity was measured in palmitate-treated cells in the presence of fumonisin B1. Inhibition of *de novo* ceramide synthesis by fumonisin B1 did not prevent the increase in caspase-3 activity caused by palmitate (Fig. 4B). Similar results were obtained with myriocin, another chemically unrelated inhibitor of *de novo* ceramide synthesis acting on serine palmitoyltransferase (39) (data not shown). These results establish that *de novo* ceramide synthesis is not required for palmitate-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells.

Oleate Increases Palmitate-Channeling toward Triglyceride Synthesis—The dichotomy between the action of palmitate and oleate on MDA-MB-231 cells growth and apoptosis might possibly due to different fates and actions of the two fatty acids on lipid metabolism. Therefore, the metabolic fate of palmitate and oleate in MDA-MB-231 cells was examined by assessing the rate of incorporation over a 1 h incubation period of [^{14}C]palmitate or [^{14}C]oleate into phospholipids and neutral lipids (DAG and TG). There was no difference between [^{14}C]palmitate and [^{14}C]oleate uptake in these cells (7.3 ± 0.2 vs 7.1 ± 0.2 nmol/h/mg protein respectively, means \pm S.E., $n=6$). The rates of incorporation of palmitate and oleate into phospholipids differed by less than 8 % (Fig. 5A). When [^{14}C]palmitate and [^{14}C]oleate incorporations into DAG were compared, a 2.5 fold higher rate was observed with the saturated FA (Fig. 5B). In contrast, [^{14}C]palmitate incorporation into TG was 2.5-fold lower than that of [^{14}C]oleate (Fig. 5C). These results demonstrate that the fate of oleate and palmitate is quantitatively different in MDA-MB-231 cells.

To test whether oleate cosupplementation affects the metabolic fate of palmitate, the incorporation of [^{14}C]palmitate was determined in presence of equimolar concentrations of palmitate and oleate. Oleate cosupplementation increased the incorporation of [^{14}C]palmitate into TG by 2-fold (Fig. 5C) and this was accompanied by a slight decrease in the channeling of palmitate into DAG (Fig. 5B). There was no difference in the incorporation of [^{14}C]oleate in the different lipid pools when both fatty acids were added together (Fig. 5A, B and C). The results show that palmitate is channeled toward the TG synthesis pathway in the presence of exogenous oleate. This may contribute to the protective effect of oleate from palmitate-induced apoptosis as it has recently been proposed (40).

Palmitate-Induced Apoptosis is Associated with Pronounced Changes in Phospholipid Pools—In cardiomyocytes, the levels of phospholipid species, in particular CL, have been shown to differ between oleate and palmitate-treated cells (14). After steady state labeling of MDA-MB-231 cells with ^{32}P , the levels of the anionic phospholipids were determined at different times after treatment with palmitate or oleate. The levels of PA+PG, the precursors of CL, increased sharply in palmitate-treated cells and reached a maximum after only 2 h of treatment (Fig. 6A). In contrast,

in oleate-treated cells, the levels of these phospholipids decreased. The increased levels of PA+PG in palmitate-treated cells suggest a problem converting these saturated species to CL (14). CL levels in palmitate-treated cells decreased significantly by 20% after only 4 h (Fig. 6B). By 6 h, the CL levels were decreased by 50%. In contrast, the CL levels did not change in control and oleate-treated cells over the 12 h experimental period. Interestingly, the initial decrease in CL levels seen in palmitate-treated cells (4 h) shortly preceded the release of cytochrome c into the cytosol (6 h) (Fig. 2C).

As cardiolipin is known to be a rather stable fatty acid (41), a decrease in its synthesis could not be sufficient to account for its rapid diminution in palmitate-treated cells. To determine whether palmitate could influence CL degradation, CL turnover was measured following palmitate or oleate treatment. Fig. 6C shows that palmitate increased CL turnover whereas oleate decreased it. The increase of the CL turnover (Fig. 6C) observed in palmitate-treated cells paralleled the decrease seen in CL levels (Fig. 6B), suggesting that it contributes significantly to the diminution of CL. As CL was more stable in oleate-treated cells than in controls and that the steady state levels were similar in both conditions, it may be hypothesized that in oleate-treated cells a reduced *de novo* synthesis compensates the reduced turnover.

Blocking palmitate-induced apoptosis by increasing fatty acid oxidation with AICAR decreased the accumulation of PA+PG (Fig. 7A) and restored CL levels in palmitate-treated cells (Fig. 7B). Since oleate protected cells against death triggered by palmitate (Fig. 1B), its effect on phospholipid levels was tested. Co-treatment with equimolar concentration of palmitate and oleate blocked accumulation of PA+PG, and completely restored CL levels. Taken together, these data provide suggestive evidence that the diminution in CL levels in palmitate-treated cells is responsible for the release of cytochrome c and the initiation of the caspase cascade leading to apoptotic cell death.

Antiapoptotic Proteins Block Palmitate-induced Apoptosis—Most of the prosurvival proteins of the Bcl-2 family are targeted primarily to the mitochondrial outer membrane and stabilize it by preventing the release of proapoptotic molecules, such as cytochrome c (42). To determine whether the prosurvival proteins of the Bcl-2 family protect cells against palmitate-induced apoptosis, caspase-3 activity was evaluated following overexpression of genes encoding Bcl-xL or Bcl-w with recombinant adenovirus (Fig.

8). Both proteins impaired caspase-3 activation induced by palmitate, whereas the GFP used as a control was without effect. This provides additional evidence for a role of the mitochondrial arm of apoptosis in the process of palmitate-induced MDA-MB-231 cell death.

PI3-K Is Not Implicated in the Protective Effect of Oleate against Palmitate-Induced Apoptosis—In our previous work, the unsaturated FFA oleate increased PI3-K activity whereas the saturated FFA palmitate decreased it (8). Moreover, the combination of both FFAs restored the basal level of PI3-K activity. To determine whether PI3-K is implicated in the protective effect of oleate against palmitate-induced apoptosis, we used the PI3-K inhibitor LY294002 and measured caspase-3 activity. LY294002 did not alter caspase-3 activity in the presence of both FFAs (Fig. 9). Moreover, the PI3-K inhibitor curtailed the protective effect of oleate against serum-starvation (control situation, not shown) and, surprisingly, also markedly reduced palmitate-induced apoptosis. These results indicate that PI3-K signaling is not implicated in the protective effect of oleate against palmitate-induced cell death and, moreover, that the decrease in PI3-K activity is not responsible of palmitate-induced apoptosis.

DISCUSSION

Studying the effects of FFAs on MDA-MB-231 breast cancer cells, we found as a general principle that saturated FFAs were proapoptotic and unsaturated FFAs stimulated proliferation. Investigation on the mechanism by which saturated FFAs induce apoptosis suggests that CL synthesis and its turnover play a key role in the opposite effects of the two types of FFA. The saturated FFA palmitate induced a decrease in the mitochondrial membrane potential and caused a release of cytochrome c in the cytosol, both preceding caspase-3 activation. The release of cytochrome c in palmitate-treated cells correlated in time with a prominent decrease in the levels of the mitochondrial phospholipid CL. In contrast, the monounsaturated FFA oleate and the polyunsaturated FFA linoleate (not shown), which stimulated cell proliferation, did not affect CL levels. Moreover, adding oleate or the AMPK-activator AICAR to palmitate treated cells, which prevented palmitate-induced apoptosis, restored CL levels. Thus, it is suggested that cell survival critically depends of an adequate pool of unsaturated phospholipids that are necessary for CL synthesis.

The saturated FFA palmitate must be metabolized to exert its proapoptotic effect as evidenced from the fact that the non-metabolizable analog 2-bromopalmitate had no effect and the acyl-CoA synthesis inhibitor triacsin C curtailed palmitate action on apoptosis. However, the results do not support the suggestion that one of these metabolites could be ceramide (10,11,43). Thus, an increase in ceramide levels in palmitate-treated MDA-MB-231 cells was observed and inhibitors of *de novo* ceramide pathway blocked this rise. However, since these inhibitors did not block apoptosis, we conclude that ceramide accumulation is not involved in palmitate-induced apoptosis. Recent data obtained with CHO cells and cardiomyocytes also support a nonessential role for *de novo* ceramide synthesis in palmitate-induced apoptosis (13,44). Excess palmitate may also lead to increased mitochondrial β -oxidation pathway generating ROS in excess of endogenous antioxidant. Increased production of ROS has been implicated in palmitate-induced apoptosis of CHO cells (13). Blocking β -oxidation with etomoxir increased apoptosis in palmitate-treated cells whereas promoting fatty acid oxidation with AICAR blocked palmitate-induced apoptosis. Moreover, the antioxidants (N-acetyl-cysteine, ebselen and aminoguanidine) did not affect death triggered by palmitate

(data not shown). Thus, it appears that the β -oxidation pathway and the generation of ROS are not implicated in the cell death process caused by palmitate in MDA-MB-231 cells. ROS were also shown not to be implicated in palmitate induced-apoptosis in cardiomyocytes (45).

The temporal correlation between the initial decrease in mitochondrial CL levels and the subsequent cytochrome c release in the cytoplasm and loss of the mitochondrial membrane potential provides suggestive evidence for a role of CL in the proapoptotic action of palmitate. Thus, as cytochrome c is bound to the inner mitochondrial membrane by anionic phospholipids, primarily CL (16), the decrease in CL levels could directly facilitate cytochrome c release into the cytosol. Support for this hypothesis has been provided in palmitate-induced apoptosis of rat neonatal cardiomyocytes by the observation that decreased CL synthesis directly correlated with the release of cytochrome c (14). Large increases in the levels of PA and PG were also seen in these cardiomyocytes where these two phospholipids were nearly all dipalmitoyl (C16:0, C16:0) PA and dipalmitoyl (C16:0, C16:0) PG. As CL synthase activity was unaffected in palmitate-treated cardiomyocytes, it was concluded that although the myocyte has PG available to increase CL levels, new CL is not synthesized because of the low affinity of CL synthase for dipalmitoyl PG. Interestingly, we show that CL turnover is increased by palmitate whereas it is decreased by oleate. Since the increase of CL turnover observed in palmitate-treated cells paralleled the decrease seen in CL levels, this suggests that it contributes concomitantly with decreased CL synthesis to the diminution of CL levels and apoptosis. In contrast, the stabilization of CL seen in oleate-treated cells could contribute to the antiapoptotic effect of oleate against palmitate-induced cell death. The mechanism by which palmitate increases CL degradation is unknown. It may involve activation of mitochondrial phospholipase A₂ induced by the elevation in PalCoA and/or its derivatives (46).

Increasing fatty acid oxidation with the AMPK activator AICAR restored CL levels and blocked palmitate-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells. The increase in fatty acid oxidation induced by AICAR has been shown to result from a stimulation in the activities of both CPT-1 (47) and malonyl-CoA decarboxylase (35), the enzyme which degrades malonyl-CoA, the allosteric inhibitor of CPT-I. In several systems, CPT-1 can

protect from palmitate-triggered cell death (10,48,49). The protection from palmitate-induced apoptosis afforded by CPT-1 is most likely to be the consequence of palmitoyl-CoA clearance from the cytoplasm because the CPT enzyme complex effectively transfers long-chain fatty acyl-CoA into the mitochondrial matrix, where they serve as fuel for β -oxidation. Thus, CPT-1 may limit synthesis of saturated phospholipids, like the saturated forms of PA and PG. Palmitate caused a very early and pronounced rise in PA and PG in MDA-MB-231 cells. PA is the precursor of many phospholipidic structural and signaling molecules to which has been ascribed many biological activities, including protein kinase activation (50). Hence, the possibility should also be considered that PA or one of its derivatives such as DAG contribute to palmitate-induced apoptosis.

In the present study, we correlate the channeling of palmitate and oleate to distinct metabolic fates with their ability to induce apoptosis. The accumulation of DAG observed in palmitate-treated cells may participate to the induction of apoptosis by acting on DAG responsive enzymes like protein kinases C (PKC) (51), as shown recently in β -cells for palmitate-induced PKC δ activation (52). In contrast, the channeling of palmitate into TG stores induced by oleate cosupplementation may contribute to rescue cells from palmitate-induced apoptosis by redirecting palmitate away from pathways leading to apoptosis. Direct evidence that accumulation of excess saturated fatty acids in cellular TG stores protects from apoptosis was provided by studies with acyl CoA:diacylglycerol transferase 1 null cells showing that the ability to synthesize triglycerides was critical for protection from lipotoxicity (40). Also, as CHO cells overexpressing stearoyl-CoA desaturase (SCD), the enzyme that converts saturated fatty acid to monounsaturated fatty acid, were protected from palmitate-induced apoptosis, it was proposed that the endogenous pools of unsaturated fatty acids produced by SCD may also rescue cells from palmitate-induced apoptosis (40). Interestingly, the activity of SCD has been shown to be lower in MDA-MB-231 cells than in MCF-7 cells (53). Since MCF-7 cells are more resistant to palmitate-induced apoptosis (8), it is tempting to speculate that the difference in SCD activity may explain the difference in sensitivity to palmitate-induced cell death. The fact that palmitate did not alter the incorporation of oleate into phospholipids renders unlikely that in palmitate-treated cells,

the fatty acyl-CoA pool is so deficient in unsaturated species as to preclude assimilation into phospholipids.

Another important difference observed in our previous works between unsaturated and saturated FFAs was their antagonistic effect on PI3-K, a key signal transduction protein that inhibit apoptosis by activating the protein kinase Akt/PKB (8). The unsaturated FFA oleate increased PI3-K activity whereas the saturated FFA palmitate decreased it. Others have reported that the activity of Akt/PKB, the downstream target of PI3-K, was reduced by palmitate treatment (54,55). As downstream targets of the PI3-K/Akt signaling pathway that have been identified include the inhibition of proapoptotic proteins Bad and Bax (56,57), we initially hypothesized that palmitate-induced apoptosis might involve an activation of the proapoptotic Bcl-2 family proteins, resulting from the inactivation of the PI3-K/Akt pathway. However, the present results with the PI3-K inhibitor LY294002, that in fact curtailed palmitate-induced cell death, rule out a role for a decrease signaling through PI3-K in the proapoptotic effect of palmitate. Moreover, the protection from palmitate-induced cell death afforded by oleate was not decreased by LY294002, indicating that PI3-K signaling is not implicated in the protective effect of oleate. The observation that overexpression of the antiapoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-w decreased palmitate-induced apoptosis is an indication that activation of proapoptotic Bcl-2 proteins is important for the death process caused by palmitate as it has been shown that antiapoptotic Bcl-2 family members protect cells from proapoptotic members by preventing their oligomerization at the mitochondrial membrane (58). To our knowledge, this is the first evidence that antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family protect cell death triggered by saturated fatty acids.

Taken together, the results suggest that fatty acid metabolism, unrelated to β -oxidation, ceramide synthesis, ROS production and changes in PI3-K activity, has an important role in the action of palmitate on cell growth and apoptosis. This study allows the proposition of the following model to explain the lipotoxic action of saturated FFAs on breast cancer cells. A deficiency in mitochondrial CL brought about by both inadequate supply of unsaturated fatty acids for CL synthesis and an increase in CL turnover generates a soluble pool of cytochrome c in the mitochondria. The activation of the proapoptotic proteins belonging to the Bcl-2 family that form lipidic pores in

mitochondrial membranes by which soluble cytochrome c can escape may also contribute to the cell death process. In contrast, oleate by channeling palmitate to inert triglyceride stores and by permitting sustained CL synthesis, and decreasing its turnover, not only blocks apoptosis but also permits cell proliferation.

REFERENCES

1. Fay, M. P., Freedman, L. S., Clifford, C. K., and Midthune, D. N. (1997) *Cancer Res* 57, 3979-3988
2. Lee, M. M., and Lin, S. S. (2000) *Annu Rev Nutr* 20, 221-248
3. Rose, D. P. (1997) *Am J Clin Nutr* 66, 1513S-1522S
4. McArthur, M. J., Atshaves, B. P., Frolov, A., Foxworth, W. D., Kier, A. B., and Schroeder, F. (1999) *J Lipid Res* 40, 1371-1383
5. Witters, L. A., Widmer, J., King, A. N., Fassihi, K., and Kuhajda, F. (1994) *Int J Biochem* 26, 589-594
6. Pizer, E. S., Jackisch, C., Wood, F. D., Pasternack, G. R., Davidson, N. E., and Kuhajda, F. P. (1996) *Cancer Res* 56, 2745-2747
7. Magnard, C., Bachelier, R., Vincent, A., Jaquinod, M., Kieffer, S., Lenoir, G. M., and Venezia, N. D. (2002) *Oncogene* 21, 6729-6739
8. Hardy, S., Langelier, Y., and Prentki, M. (2000) *Cancer Res* 60, 6353-6358
9. Sparagna, G. C., Hickson-Bick, D. L., Buja, L. M., and McMillin, J. B. (2001) *Antioxid Redox Signal* 3, 71-79
10. Paumen, M. B., Ishida, Y., Muramatsu, M., Yamamoto, M., and Honjo, T. (1997) *J Biol Chem* 272, 3324-3329
11. Shimabukuro, M., Zhou, Y. T., Levi, M., and Unger, R. H. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2498-2502
12. Blazquez, C., Galve-Roperh, I., and Guzman, M. (2000) *Faseb J* 14, 2315-2322
13. Listenberger, L. L., Ory, D. S., and Schaffer, J. E. (2001) *J Biol Chem* 276, 14890-14895
14. Ostrander, D. B., Sparagna, G. C., Amoscato, A. A., McMillin, J. B., and Dowhan, W. (2001) *J Biol Chem* 276, 38061-38067
15. Choi, S., and Swanson, J. M. (1995) *Biophys Chem* 54, 271-278
16. Rytomaa, M., and Kinnunen, P. K. (1994) *J Biol Chem* 269, 1770-1774
17. Schlame, M., Rua, D., and Greenberg, M. L. (2000) *Prog Lipid Res* 39, 257-288
18. Thress, K., Kornbluth, S., and Smith, J. J. (1999) *J Bioenerg Biomembr* 31, 321-326

19. Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999) *J Biol Chem* 274, 11549-11556
20. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000) *Cell* 102, 33-42
21. Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2000) *FEBS Lett* 476, 118-123
22. Green, D., and Kroemer, G. (1998) *Trends Cell Biol* 8, 267-271
23. Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., and Green, D. R. (2000) *Nat Cell Biol* 2, 156-162
24. Cory, S., and Adams, J. M. (2002) *Nat Rev Cancer* 2, 647-656
25. Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J. A., Soria, B., and Prentki, M. (1999) *Diabetes* 48, 2007-2014
26. Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M. R., and Darzynkiewicz, Z. (1999) *Cytometry* 35, 181-195
27. Bossy-Wetzell, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (1998) *Embo J* 17, 37-49
28. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917
29. Perry, D. K., Carton, J., Shah, A. K., Meredith, F., Uhlinger, D. J., and Hannun, Y. A. (2000) *J Biol Chem* 275, 9078-9084
30. Segall, L., Lameloise, N., Assimacopoulos-Jeannet, F., Roche, E., Corkey, P., Thumelin, S., Corkey, B. E., and Prentki, M. (1999) *Am J Physiol* 277, E521-528
31. Esko, J. D., and Raetz, C. R. (1980) *J Biol Chem* 255, 4474-4480
32. Krippner, A., Matsuno-Yagi, A., Gottlieb, R. A., and Babior, B. M. (1996) *J Biol Chem* 271, 21629-21636
33. Tomoda, H., Igarashi, K., and Omura, S. (1987) *Biochim Biophys Acta* 921, 595-598
34. Kadenbach, B., Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I., and Bender, E. (2000) *Free Radic Biol Med* 29, 211-221
35. Saha, A. K., Schwarsin, A. J., Roduit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., Prentki, M., and Ruderman, N. B. (2000) *J Biol Chem* 275, 24279-24283
36. Weis, B. C., Cowan, A. T., Brown, N., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1994) *J Biol Chem* 269, 26443-26448
37. Merrill, A. H., Jr., and Jones, D. D. (1990) *Biochim Biophys Acta* 1044, 1-12

38. Merrill, A. H., Jr., van Echten, G., Wang, E., and Sandhoff, K. (1993) *J Biol Chem* 268, 27299-27306
39. Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., and Kawasaki, T. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 211, 396-403
40. Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr., Ory, D. S., and Schaffer, J. E. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3077-3082
41. McMillin, J. B., and Dowhan, W. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1585, 97-107
42. Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997) *Science* 275, 1132-1136
43. Yamagishi, S., Okamoto, T., Amano, S., Inagaki, Y., Koga, K., Koga, M., Choei, H., Sasaki, N., Kikuchi, S., Takeuchi, M., and Makita, Z. (2002) *Mol Med* 8, 179-184
44. Sparagna, G. C., Hickson-Bick, D. L., Buja, L. M., and McMillin, J. B. (2000) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2124-2132
45. Hickson-Bick, D. L., Sparagna, G. C., Buja, L. M., and McMillin, J. B. (2002) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H656-664
46. Furuno, T., Kanno, T., Arita, K., Asami, M., Utsumi, T., Doi, Y., Inoue, M., and Utsumi, K. (2001) *Biochem Pharmacol* 62, 1037-1046
47. Velasco, G., Gomez del Pulgar, T., Carling, D., and Guzman, M. (1998) *FEBS Lett* 439, 317-320
48. Revoltella, R. P., Dal Canto, B., Caracciolo, L., and D'Urso, C. M. (1994) *Biochim Biophys Acta* 1224, 333-341
49. Cifone, M. G., Alesse, E., Di Marzio, L., Ruggeri, B., Zazzeroni, F., Moretti, S., Famularo, G., Steinberg, S. M., Vullo, E., and De Simone, C. (1997) *Proc Assoc Am Physicians* 109, 146-153
50. Andresen, B. T., Rizzo, M. A., Shome, K., and Romero, G. (2002) *FEBS Lett* 531, 65-68
51. Wright, M. M., and McMaster, C. R. (2002) *Biol Res* 35, 223-229
52. Eitel, K., Staiger, H., Rieger, J., Mischak, H., Brandhorst, H., Brendel, M. D., Bretzel, R. G., Haring, H. U., and Kellerer, M. (2003) *Diabetes* 52, 991-997
53. Choi, Y., Park, Y., Storkson, J. M., Pariza, M. W., and Ntambi, J. M. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 294, 785-790

54. Cazzolli, R., Carpenter, L., Biden, T. J., and Schmitz-Peiffer, C. (2001) *Diabetes* 50, 2210-2218
55. Soltys, C. L., Buchholz, L., Gandhi, M., Clanachan, A. S., Walsh, K., and Dyck, J. R. (2002) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H1056-1064
56. Khwaja, A. (1999) *Nature* 401, 33-34
57. Yamaguchi, H., and Wang, H. G. (2001) *Oncogene* 20, 7779-7786
58. Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2002) *Cell* 111, 331-342

Footnotes

¹The abbreviations used are: FFA, free fatty acids; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; ROS, reactive oxygen species; CL, cardiolipin; MEM, minimal essential medium; BSA, bovine serum albumin; PBS, phosphate-buffered saline; AFC, 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin; PA, phosphatidic acid; $\Delta\Psi_m$, mitochondrial membrane potential; PG, phosphatidylglycerol; GFP, green fluorescent protein; AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribo nucleoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; CPT-I, carnitine palmitoyl transferase I; SCD, stearoyl-CoA desaturase; PKC, protein kinase C.

Acknowledgements

We thank Richard Marcellus and Gordon Shore for their generous gift of adenovirus recombinants.

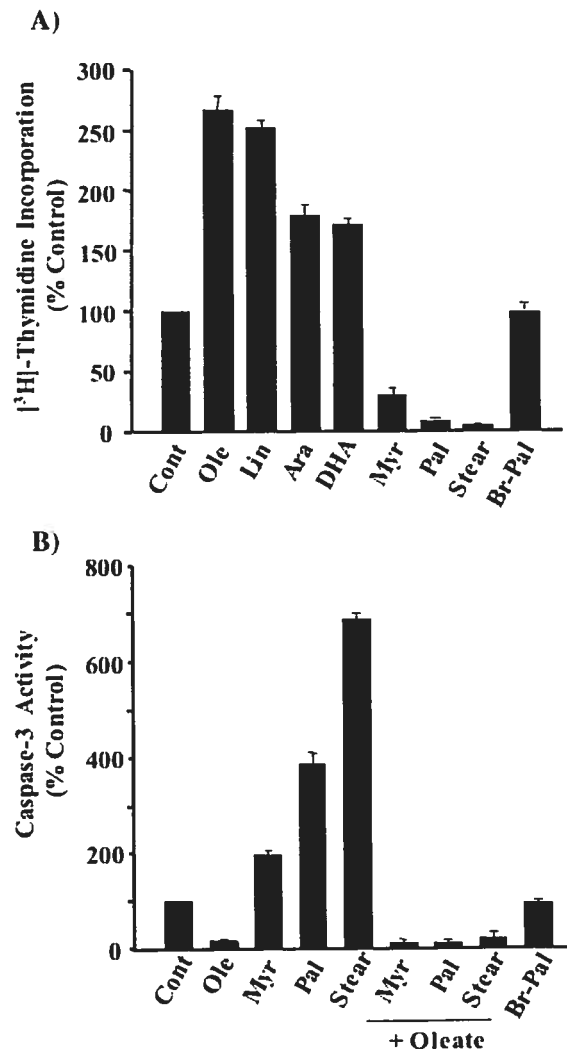


FIG. 1. Effects of various fatty acids on the proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *A*, After 24 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, cells were incubated for 24 h in serum-free medium supplemented with BSA alone (*Cont*) or 0.1 mM fatty acids bound to BSA (0.5%); *Ole*, oleate; *Lin*, linoleate; *Ara*, arachidonate; *DHA*, docohexanoate; *Myr*, myristate; *Pal*, palmitate; *Stear*, stearate; *Br-Pal*, 2-bromopalmitate. During the last 4 h of incubation, cells were labeled with $[^3\text{H}]$ -thymidine. *B*, After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, cells were incubated for 24 h in serum-free medium supplemented with 0.1 mM fatty acids bound to BSA (0.5%) or BSA alone (*Cont*). Caspase-3 activity in lysates

from cells incubated with fatty acids or BSA alone was measured as described in «Experimental Procedures». Values represent means \pm SE of two independent experiments performed in triplicate. All values are significant ($P < 0.01$) versus their respective control, except for Br-palmitate (not significant).

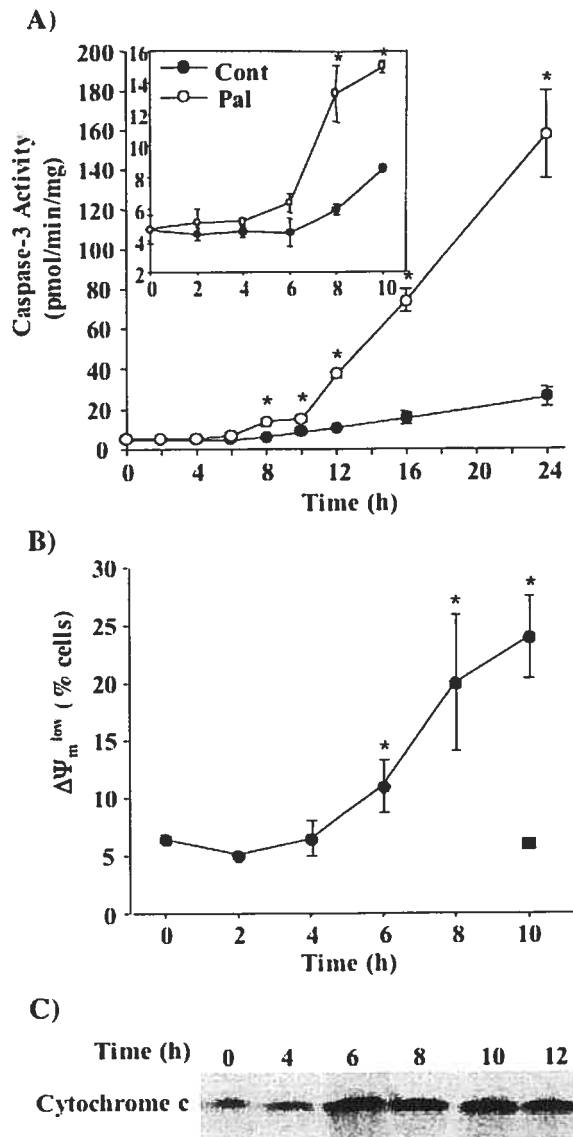


FIG. 2. Time course of the effects of palmitate on various parameters of the apoptotic process in MDA-MB-231 cells. After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, MDA-MB-231 cells were incubated in serum-free medium supplemented with 0.1 mM palmitate bound to BSA for the indicated times. *A*, Caspase-3 activity in lysates from cells incubated with palmitate bound to BSA (0.5%) (*Pal*) or BSA alone (*Cont*) was assessed as described in «Experimental Procedures». The results represent the means \pm SE of two independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.01$ vs. control. *B*, $\Delta\Psi_m$ was quantified as described in «Experimental Procedures».

“ $\Delta\Psi_m^{\text{low}}$ ” represents the percentage of cells with decreased mitochondrial membrane potential in the presence of palmitate (●) or oleate (0.1 mM) alone (■). Values represent means \pm SE of three separate experiments. *, $P < 0.01$ vs. control. C, Release of cytochrome c in the cytosol was studied using immunoblot analysis as described in «Experimental Procedures». The figure shows a representative experiment that has been repeated two times.

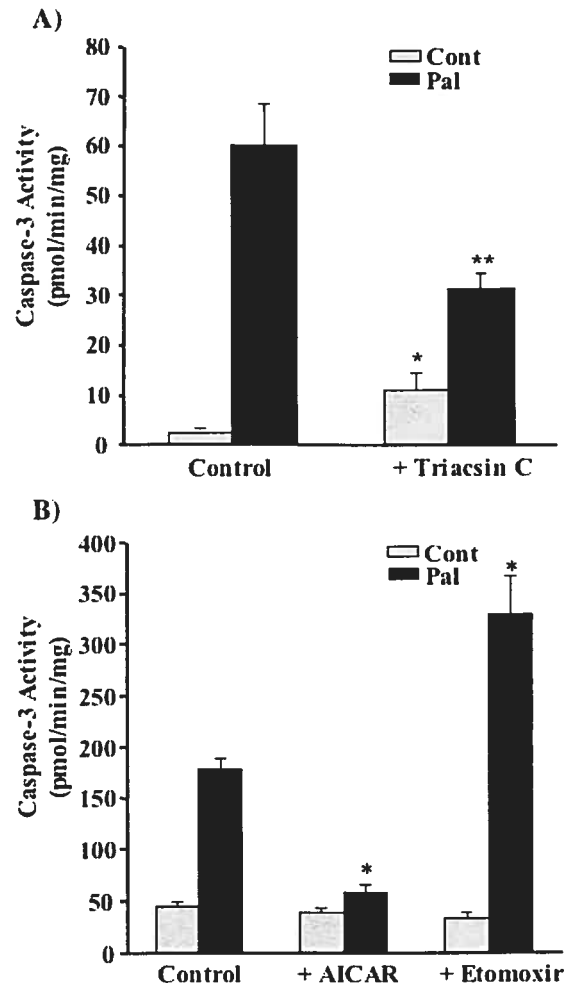


FIG. 3. Alterations of lipid partitioning affect palmitate-induced apoptosis. *A*, After 12 h of serum starvation in the presence of 0.5% BSA in MEM, cells were incubated for 12 h in serum-free medium supplemented with 0.1 mM palmitate bound to BSA (0.5%) (*Pal*) or BSA alone (*Cont*) in the absence or presence of 5 μ M triacsin C. Apoptosis was evaluated by measuring caspase-3 activity as described in «Experimental Procedures». Values represent means \pm SE of two independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.01$ vs. control; **, $P < 0.01$ vs. palmitate. *B*, After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, cells were incubated for 24 h in serum-free medium supplemented with 0.1 mM palmitate bound to BSA (0.5%) (*Pal*) or BSA alone (*Cont*) in the absence or presence of 0.5 mM AICAR or 0.2 mM etomoxir. Values

of caspase-3 activity represent the means \pm SE of two (AICAR) or three (etomoxir) independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.01$ vs. palmitate alone

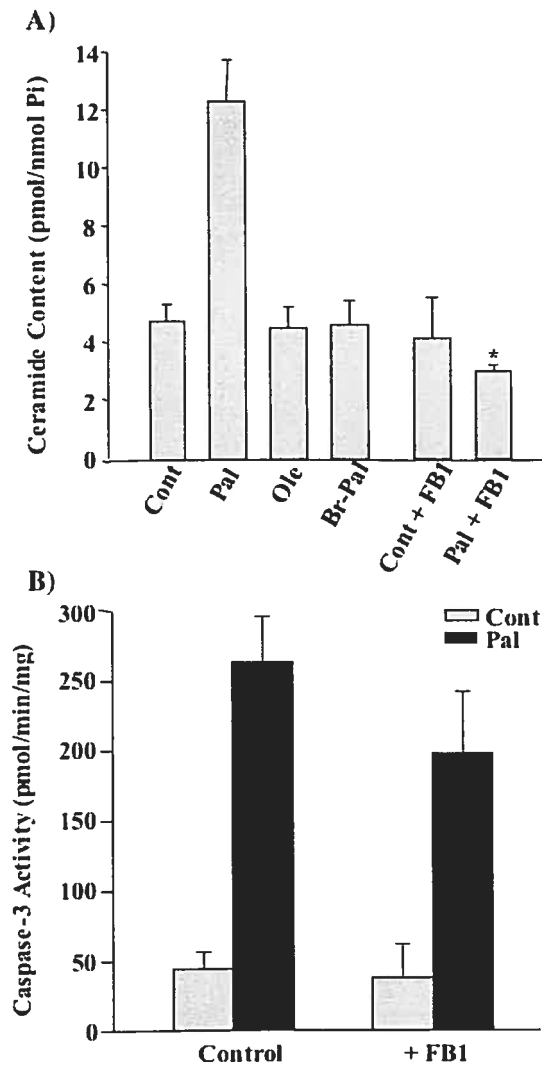


FIG. 4. Inhibition of *de novo* ceramide synthesis does not block palmitate-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells. After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, cells were incubated for 18 h in serum-free medium supplemented with 0.1 mM fatty acids bound to BSA (0.5%) (*Pal*, palmitate; *Ole*, oleate; *Br-Pal*, 2-bromopalmitate) or BSA alone (*Cont*) in the absence or presence of 50 μ M fumonisin B1 (*FBI*). *A*, Ceramide levels were quantified using the diglyceride kinase assay and normalized to total lipid phosphate. Values are means \pm SE of three independent experiments performed in duplicate. *, $P < 0.01$ vs. palmitate. *B*, Apoptosis was evaluated by measuring caspase-3 activity as described in «Experimental

Procedures». Values represent means \pm SE of two independent experiments performed in triplicate.

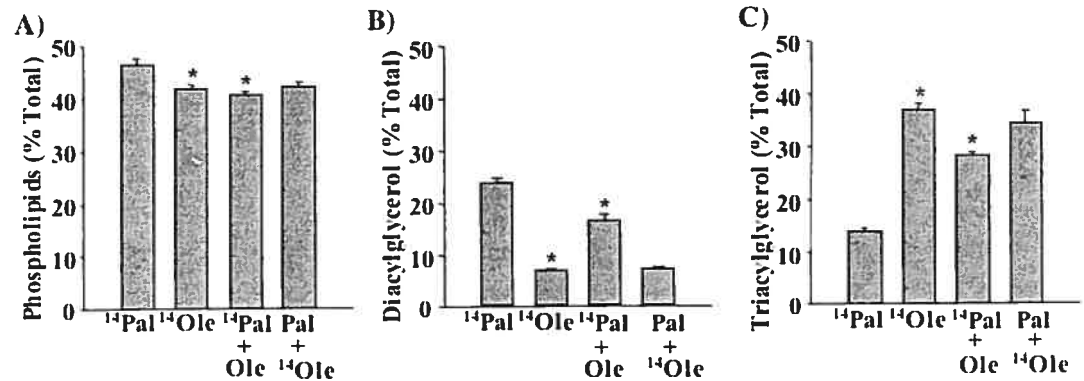


FIG. 5. Oleate alters the fate of palmitate into neutral lipids. After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, cells were incubated for 1 h in serum-free medium supplemented with 0.1mM palmitate (*Pal*) or/and oleate (*Ole*) bound to BSA (0.5%) in the presence of trace amounts of [^{14}C]palmitate (^{14}Pal) or [^{14}C]oleate (^{14}Ole). Lipid levels were analyzed as described in «Experimental Procedures» and expressed as % of counts (labeled palmitate or oleate) incorporated into total lipids. Values represent means \pm SE of two independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.01$ vs. palmitate.

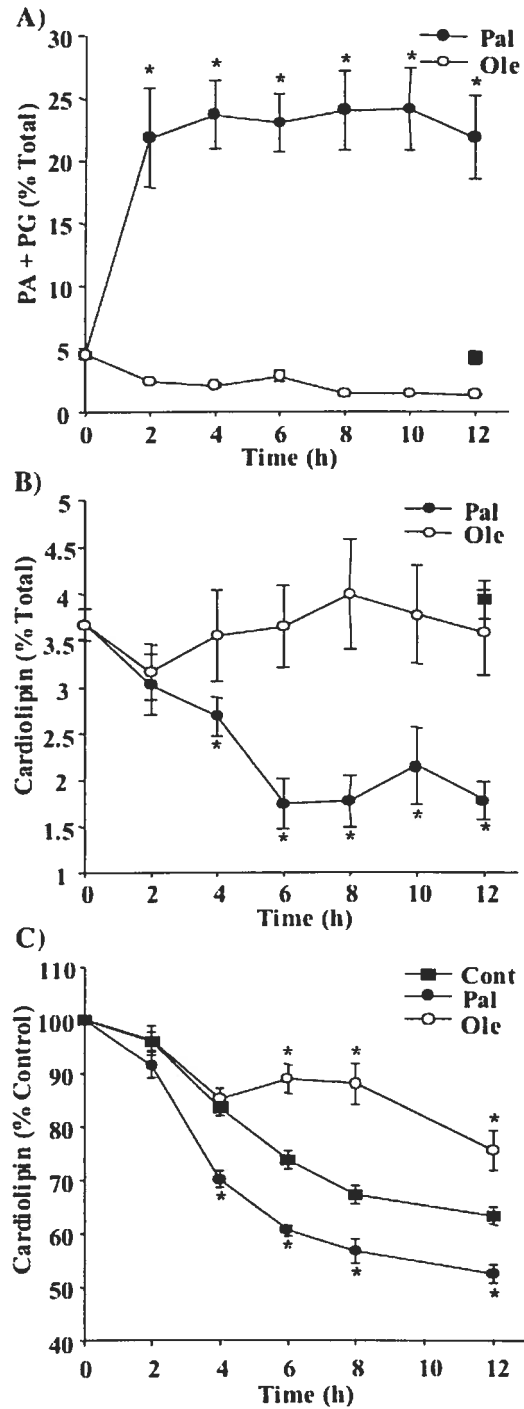


FIG. 6. Effect of palmitate and oleate on the cellular anionic phospholipid composition and cardiolipin half-life. After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of [32 P]Pi and 0.5% BSA, cells were incubated in medium supplemented with

0.5% BSA (■), 0.1 mM palmitate (●) or oleate (○) bound to BSA (0.5%) for the indicated times in the presence (*A* and *B*) or absence (*C*) of [³²P]Pi. Phospholipid levels were analyzed as described in «Experimental Procedures» and quantified as a percentage of radiolabel in the region of chromatograms encompassing phosphatidic acid and phosphatidylglycerol (PA+PG) (*A*) or cardiolipin CL (*B*). *C*, Cardiolipin turnover was assessed by measuring labeled CL in cells overtime in the absence and presence of exogenous palmitate or oleate (time 0 = 100%). Values represent means ± SE of three independent experiments performed in duplicate. *, *P* < 0.01 vs. oleate (*A* and *B*) or control (*C*).

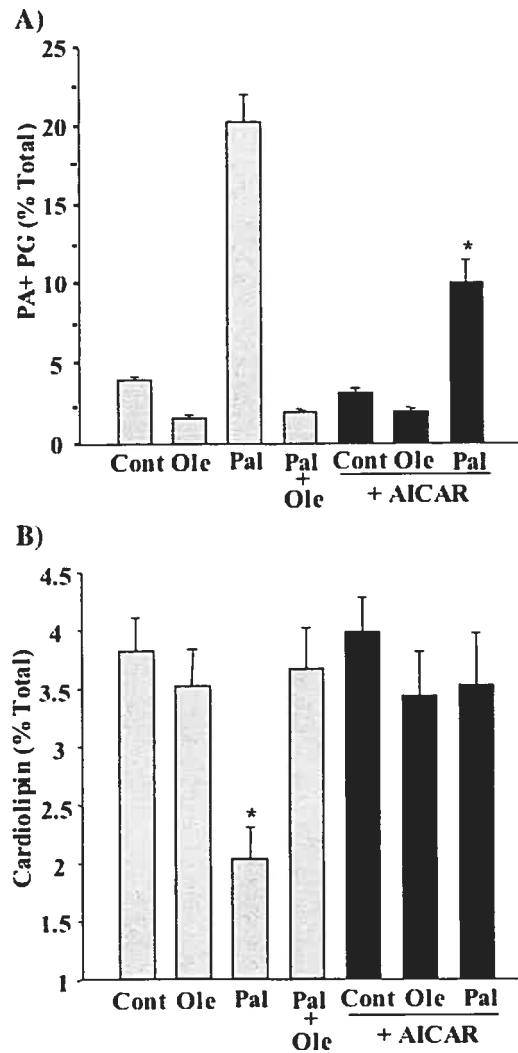


FIG. 7. Oleate supplementation or AICAR treatment restore CL levels in palmitate-treated MDA-MB-231 cells. After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of [32 P]Pi and 0.5% BSA, cells were incubated for 8 h in medium supplemented with 0.1mM palmitate (*Pal*) or/and oleate (*Ole*) bound to BSA (0.5%) or BSA alone (*Cont*) in the absence or presence of 0.5 mM AICAR. PA+PG (*A*) and CL (*B*) levels were analyzed as described in «Experimental Procedures» and quantified as a percentage of radiolabel incorporated into total phospholipids. Values represent means \pm SE of three independent experiments performed in duplicate. *, $P < 0.01$ vs. palmitate alone (*A*) or control (*B*).

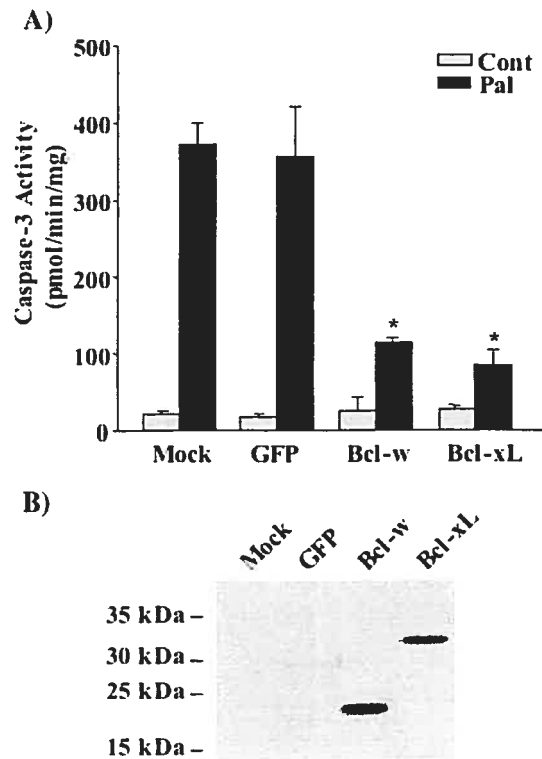


FIG. 8. Antiapoptotic Bcl-2 family members decrease palmitate-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells. After 12 h of serum starvation in the absence (*Mock*) or presence of recombinant adenoviruses AdTREx-GFP (*GFP*), AdTREx-Flag-Bcl-w (*Bcl-w*) or AdTREx-Flag-Bcl-xL (*Bcl-xL*), cells were incubated for 24 h in serum-free medium supplemented with 0.1 mM palmitate bound to BSA (0.5%) (*Pal*) or BSA alone (*Cont*). *A*, Apoptosis was evaluated by measuring caspase-3 activity as described in «Experimental Procedures». Values represent means \pm SE of two independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.01$ vs. palmitate. *B*, Protein extracts of infected cells were analyzed for recombinant protein expression (FLAG-Bcl-w and FLAG-Bcl-xL) by immunoblotting with an anti-FLAG antibody.

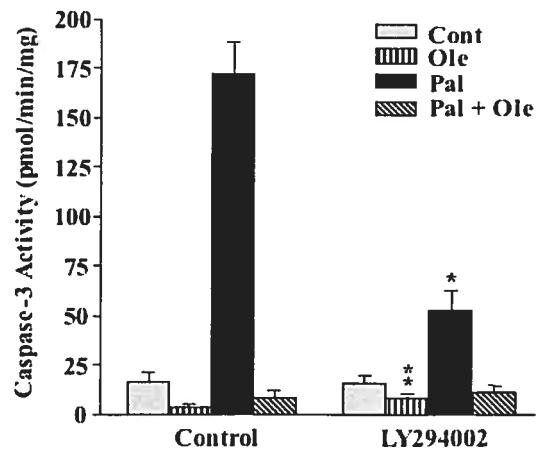


FIG. 9. **PI3-K is not implicated in the protective effect of oleate against palmitate-induced apoptosis.** After 12 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, cells were incubated for 24 h in serum-free medium supplemented with 0.1mM palmitate (*Pal*) and/or oleate (*Ole*) bound to BSA (0.5%) or BSA alone (*Cont*) in the absence or presence of 25 μ M of the PI3-K inhibitor LY294002. Apoptosis was evaluated by measuring caspase-3 activity. Means \pm SE of three independent experiments performed in duplicate. *, $P < 0.01$ vs. palmitate alone; **, $P < 0.01$ vs oleate alone.

Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40*

Serge Hardy‡§, Geneviève G. St-Onge‡§, Érik Joly‡§, Yves Langelier‡§¶ and Marc Prentki‡§**

From the ‡Molecular Nutrition Unit, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, and the §Institut du cancer de Montréal, and the ¶Department of Medicine, and the **Department of Nutrition and the Montreal Diabetes Research Center, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

Running title: *GPR40 and Breast Cancer Cell Proliferation*

Cette étude nous a permis de déterminer les voies de signalisation impliquées dans la prolifération induite par l'oléate dans les cellules du cancer du sein. Ainsi, l'effet prolifératif de l'oléate est diminué par des inhibiteurs pharmacologiques des protéines Gi/o, la phospholipase C, src et la mitogenic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MEK 1/2). De plus, l'oléate provoque une augmentation rapide et transitoire du Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de la protéine kinase B. La surexpression dans les cellules MDA-MB-231 du récepteur couplé aux protéines G GPR40, un récepteur aux acides gras, amplifie la prolifération induite par l'oléate tandis que la diminution de l'expression de GPR40 par l'utilisation de l'interférence d'ARN diminue cet effet prolifératif. Enfin, la surexpression de GPR40 dans les cellules du cancer du sein T47D et MCF-7 qui répondent peu à l'oléate, permet une réponse accrue face à l'action proliférative de l'oléate. Ainsi, l'effet prolifératif de l'oléate implique plusieurs voies de signalisation et est médié en partie via GPR40.

Contribution des coauteurs:

Geneviève G. St-Onge: Mesure de la phosphorylation de AKT

Erik Joly: Aide à la supervision du travail

ABSTRACT

Evidence from epidemiological studies and animal models suggests a link between high levels of dietary fat intake and risk of breast cancer. In addition, obesity, in which circulating lipids are elevated, is associated with increased risk of various cancers. Relative to this point, we previously showed that oleate stimulates the proliferation of breast cancer cells and that phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) plays a role in this process. Nonetheless, questions remain regarding the precise mechanism(s) by which oleate promotes breast cancer cell growth. Pharmacological inhibitors of the GTP binding proteins *Gi/o*, phospholipase C, *src* and mitogenic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MEK 1/2) decreased oleate-induced [³H]-thymidine incorporation in the breast cancer cell line MDA-MB-231. In addition, oleate caused a rapid and transient rise in cytosolic Ca²⁺ and an increase in protein kinase B (AKT) phosphorylation. Overexpressing in these cells the G-protein-coupled receptor (GPCR) GPR40, a fatty acid receptor, amplified oleate-induced proliferation, whereas silencing the GPR40 gene using RNA interference decreased it. Overexpressing GPR40 in T47D and MCF-7 breast cancer cells that are poorly responsive to oleate allowed a robust proliferative action of oleate. The data indicate that the phospholipase C, MEK 1/2, *src* and PI3-K/AKT signaling pathways are implicated in the proliferative signal induced by oleate and that these effects are mediated at least in part via the GPCR GPR40. The results suggest that GPR40 is implicated in the control of breast cancer cell growth by fatty acids and that GPR40 may provide a link between fat and cancer.

INTRODUCTION

Epidemiological and animal studies have revealed an association between dietary fatty acids and the incidence of breast cancer (1-3). In addition, emerging evidence indicates that obesity, which is characterized by hyperlipidemia and elevated circulating free-fatty acids (FFA)¹ (4), is associated with enhanced cancer risk (5). However, relative little information exists on the mechanisms by which exogenous FFAs influence breast cancer cell growth. FFAs play pivotal roles in many biological processes. They serve as an abundant source of energy and as precursors of many cellular signaling and structural molecules (6). As natural ligands for the nuclear receptors peroxisomal proliferated-activated receptors (PPARs), they also control the transcription of several genes involved in lipid and glucose metabolisms (7). However, several biological effects appear to be PPAR independent (8,9).

We have previously reported that the monounsaturated FFA oleate (C18:1) and the saturated FFA palmitate (C16:0), the two most abundant fatty acids in the plasma, are not equivalent with respect to their actions on breast cancer cell proliferation and apoptosis (10). Oleate stimulates the proliferation of breast cancer cells, whereas palmitate induces apoptosis. Moreover, we found as a general principle that saturated FFAs (palmitic, myristic and stearic) are proapoptotic, whereas unsaturated FFAs (oleic, linoleic, arachidonic and eicosapentaenoic) increase proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells (11). Also, a 1:10 molar ratio of oleate versus palmitate was sufficient to annihilate the proapoptotic action of palmitate (10). Important differences in the metabolism of these two FFAs in MDA-MB-231 cells contribute to their opposite effects on cell fate. An early enhancement of cardiolipin turnover and a decrease in the level of this mitochondrial phospholipid necessary for cytochrome c retention are involved in the proapoptotic effect of palmitate. By contrast oleate, by channeling palmitate to inert triglyceride stores and by permitting sustained cardiolipin synthesis, not only blocks palmitate-induced apoptosis but also permits cell proliferation (11). In addition, oleate but not palmitate appears to act like a growth factor since it stimulates cell proliferation at very low concentrations and rapidly activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) in these cells (10). These findings suggest the existence of signaling pathway via membrane receptors such as receptor tyrosine kinases or G protein-coupled

receptors (GPCR), which are known to activate PI3-K (12,13).

Unsaturated FFAs including oleate but not saturated FFAs have been shown to trigger tyrosine phosphorylation and epidermal growth factor receptor (EGFR) activation in an endothelial cell line (14). GPCRs for fatty acid derivatives such as prostaglandins (15), leukotrienes (16), lysophosphatidic acid (LPA) (17), sphingosine 1-phosphate (18) and eicosatetraenoic acid (19) are well characterized. Agonist stimulation of these GPCRs induces a variety of cellular responses including cell proliferation (18). These effects implicate the activation of a wide variety of signaling pathways, including the modulation of adenylyl cyclases, phospholipases, ion channels, and mitogen activated protein kinases (20). Recently, three independent groups found that the orphan receptor GPR40 is activated by medium and long chain FFAs (21-23). Using a ligand-fishing strategy based on measurement of intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$), they showed that FFAs in the absence of bovine serum albumin (BSA) increased $[Ca^{2+}]_i$ in GPR40-overexpressing cells. GPR40 is highly expressed in pancreatic β -cells (21,22), but it is also present in other tissues (23). Interestingly, GPR40 is expressed in the human breast cancer cell line MCF-7 in which unsaturated, but not saturated FFAs bound to BSA, increase $[Ca^{2+}]_i$ (24).

In the present study, we investigated the mechanisms by which oleate increases the proliferation of the breast cancer cell line MDA-MB-231. The results suggest that multiple pathways are involved in the proliferative action of oleate in these cells and that the oleate effect implicates a GPCR. In addition, evidence is provided that the oleate-induced proliferation of breast cancer cells is mediated at least in part through GPR40.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Sodium salts of fatty acids were purchased from Nu-Check Prep (Elysian, MN). Fatty acid-free BSA (fraction V) was obtained from Sigma (St Louis, MO). Fura-2/AM was from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). [³H]-thymidine (specific activity, 71 Ci/mmol) was obtained from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA). Lipofectamine 2000 and FuGENE 6 were purchased from Invitrogen life technologies (Bethesda, MD) and from Roche Applied Sciences (Indianapolis, IN) respectively. U73122, PD98059, PP1, LPA, H-89, wortmannin, protein kinase C ζ (PKC ζ) peptide inhibitor were from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Pertussis toxin and AG1478 were from Calbiochem (La Jolla, CA).

Cell Culture—The human breast cancer cell lines MDA-MB-231, T47D and MCF-7 were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ in phenol red-free minimal essential medium (MEM) containing non-essential amino acids, 2 mM glutamine, 10 mM Hepes (pH 7.4) and 5% heat-inactivated fetal bovine serum (standard medium). BSA-bound fatty acids were prepared by stirring fatty acid sodium salts ($\geq 99\%$ purity) at 37°C with 5% fatty acid-free BSA as described before (25). After being adjusted to pH 7.4, the solution was filtered through a 0.22- μ m filter, and the fatty acid concentration was measured using a NEFA C kit (Wako Chemicals, GmbH). When BSA-bound fatty acids were added to serum free culture medium, the final concentration of BSA was adjusted to 0.5%.

Cell Proliferation—For cell growth assay, 5000 cells/well were seeded in 96-well plates and incubated for 24 h in standard medium (10). After a 24 h starvation period in medium without serum, cells were incubated without or with BSA-bound fatty acids for 24 h. DNA synthesis was then assayed with a pulse of [³H]-thymidine (1 μ Ci/well) during the last 4 h of the incubation. Cells were harvested with a PHD cell harvester from Cambridge Technology (Watertown, MA) and the radioactivity retained on the dried glass fiber filters was measured by liquid scintillation.

Immunoprecipitation and Immunoblotting Analyses—For measuring EGFR activation, immunoprecipitation and immunoblotting were performed as previously described (26). For extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and protein kinase B (AKT) phosphorylation analyses, cells were seeded in 60 mm Petri dishes at

2×10^5 cells/dish and incubated for 24 h in standard medium. After a 24 h period of serum starvation in medium containing 0.5% BSA, cells were incubated in Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) containing 5 mM glucose and 0.5% BSA for 2 h and stimulated with oleate or epidermal growth factor (EGF) for the indicated time. This incubation in D-PBS was used to reduce basal levels of ERK1/2 and AKT phosphorylation. After stimulation, cells were washed and lysed in protein extraction buffer containing 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM NaPi, 1mM Na_3VO_4 , 10 mg/ml leupeptin and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Lysates were cleared by centrifugation and protein concentrations of the supernatants were determined using the Bio-Rad DC colorimetric assay. Equal amounts of protein (25 μg) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Then, immunoblotting was performed according to the manufacturer's instructions using phospho(Thr202/Tyr204)-ERK1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, phospho(Ser473)-AKT (p-AKT) or AKT specific antibodies (Cell Signaling Technology).

Cytosolic Calcium Determination—Cells grown in 150 mm Petri dishes (70 % confluent) were trypsinized, centrifuged and resuspended at 2×10^6 cells/ml in D-PBS containing 5 mM glucose, 20 mM Hepes (pH 7.4), 2.5 mM probenecid and 3 mM fura-2/AM. After 30 min of fura-2/AM loading at 25°C, cells were washed and resuspended as above but without fura-2/AM, and were dispensed at 2×10^5 cells/well into 96-well plates. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured at 37°C by the ratiometric method (emission fluorescence at 500 nm and excitation wavelengths at 340 and 380 nm) using a FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtechnologies Inc., Durham, NC). Calcium concentrations were calculated as described by Grynkiewicz *et al.* (27).

Cell Transfection—Cells seeded in 6-well plates at 4×10^5 cells/well were incubated for 24 h in standard medium. Cells were transiently transfected with 5 μg of the plasmid pIRESpuro-GPR40 expressing the human GPR40 (provided by Bjorn Olde, Wallenberg Neuroscience Center Lund, Sweden) or a control plasmid expressing renilla luciferase (CMV-RLuc) using Lipofectamine 2000 (MDA-MB-231) and FuGENE 6 (T47D and MCF-7) according to the manufacturer's instructions. Five hours post-transfection, cells

were seeded into 96-well plates at 5000 cells/well and assayed for cell growth as described above.

RNA Interference—Vector that express hairpin small interfering RNAs (siRNA) under the control of the human H1 promoter were constructed by inserting pairs of annealed DNA oligonucleotides into pSilencer H1 3.0 vector (Ambion, Austin, TX) between *Bam*H1 and *Hind*III restriction sites according to the manufacturer's instructions. The target sequence for human GPR40 was 5'-AAGGGCATATTGCTTCAGTTC-3'. Cells were cotransfected with plasmid encoding the green fluorescent protein (GFP) and siRNA targeting GPR40 gene or a scrambled siRNA control (Ambion, Austin, TX). Cells expressing the GFP were enriched by selection on a fluorescent activated cell sorter (FACS) (FAC-Star Plus, BD Biosciences, Mountain View, CA). Cells were then seeded into 96-well plates at 5000 cells/well and assayed for cell growth as described above.

Quantitative Real-Time RT-PCR—Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen life technologies, Bethesda, MD). RNA (5 μ g) was reverse-transcribed using the Omniscript reverse transcriptase kit (QIAGEN Inc. Valencia, CA). Quantitative real-time PCR was performed on a Rotor-Gene (Corbett Research, Sidney, Australia) using QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN Inc. Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The primers used were as follows: GPR40 5'-AGCTCTCCTTCGGCCTCTATG-3' (forward) and 5'-CAGAGAGACTGTCAGCAGCAG-3' (reverse), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5'-GACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (forward) and 5'-AGGTCCACCACTGACACGTTG-3' (reverse).

Statistics—Data are presented as mean \pm SE. Differences between two conditions were assessed with a Student's *t* test for related samples. A *p* value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Oleate-induced cell proliferation does not involve EGFR activation—We previously showed that the monounsaturated fatty acid oleate stimulates the proliferation of three different breast cancer cell lines and that PI3-K is implicated in this effect (10). Fig. 1A confirms this observation since the PI3-K inhibitor wortmannin (28) markedly curtailed oleate-induced proliferation of MDA-MB-231 cells. Also, we showed that PI3-K is rapidly activated by oleate suggesting signaling through a receptor (10). Since the EGFR has been reported to be activated by oleate in endothelial cells (14), we first examined whether the activation of the EGFR could be involved in oleate-induced proliferation of MDA-MB-231 cells. AG1478, a pharmacological inhibitor of EGFR activity (29), did not significantly affect oleate-induced [³H]-thymidine incorporation (Fig. 1B). However, AG1478 efficiently prevented the phosphorylation of EGFR induced by EGF (Fig. 2A). Also, an examination of the time course of EGFR phosphorylation induced by oleate revealed no activation of EGFR over 240 min of treatment (Fig. 2B). However, EGF induced a strong activation of the EGFR at 2 min that became maximal at 15 min and decreased thereafter. Interestingly, LPA transiently produced a modest increase in EGFR phosphorylation resulting probably from transactivation of the EGFR following LPA binding to its receptor (30). These results establish that the EGFR is not implicated in oleate-induced proliferation of MDA-MB-231 cells.

Oleate-induced MDA-MB-231 cell proliferation is decreased by specific inhibitors of Gi/o, phospholipase C, src, MEK1/2 and PKC ζ —Several fatty acid derivatives such as LPA are known to act via GPCRs and to activate PI3-K via G-proteins (13). We first studied the effect of pertussis toxin, an inhibitor of Gi/o proteins (31), on oleate-induced cell proliferation. As shown in Fig. 1C, pertussis toxin decreased oleate-induced [³H]-thymidine incorporation by 70 %. The same extent of inhibition was observed with LPA that has been shown to increase cell proliferation through GPCR activation via Gi/o proteins (32). This provides strong support that the effect of oleate on breast cancer cell proliferation is mediated at least in part by GPCR(s), since the action of pertussis toxin to inhibit Gi/o is considered highly specific (31).

Agonist stimulation of GPCR caused the activation of a wide variety of signaling pathways including modulation of phospholipases and protein kinases (20). To assess a

possible role of these different signal transduction pathways in the action of oleate on breast cancer cell proliferation, we tested the effect of different classes of specific inhibitors. Treating cells with the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 (33) resulted in an 80 % reduction of oleate- or LPA-induced proliferation (Fig. 1D). PP1 and PD98059, which are pharmacological inhibitors of the *src*-like family (34) and of mitogenic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MEK1/2) (35), respectively, reduced the proliferative effect of oleate by about 40 % (Fig. 1E and F). Moreover, PKC ζ a downstream effector of PI3-K, appears also to be implicated in the proliferative effect of oleate since a specific membrane permeant peptide inhibitor of PKC ζ (36) blocked the oleate-induced proliferation (Fig. 1G). However, this peptide inhibitor also decreased the proliferation in the control situation suggesting that PKC ζ is important for the growth of MDA-MB-231 cells. Blocking protein kinase A (PKA), another downstream effector of GPCR, with H-89 (37) did not affect oleate-induced DNA synthesis (Fig. 1H). Taken together, the results are consistent with the view that oleate signals at least in part via GPCR(s) and that many downstream signal transduction pathways, including PLC, *src*, MEK1/2 and PKC ζ may participate in its proliferative effect.

Oleate induces a rapid increase in AKT phosphorylation—The extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and AKT, the direct downstream effectors of MEK1/2 and PI3-K, respectively, are major regulators of cell proliferation (38). We therefore examined the role of ERK1/2 and AKT in oleate-induced cell proliferation by using antibodies recognizing the activated/phosphorylated forms of Thr202/Tyr204-ERK1/2 and Ser473-AKT. Since basal ERK1/2 activity is very high in MDA-MB-231 cells as previously described (39), we were unable to detect significant increase in ERK1/2 phosphorylation in response to neither oleate nor the usual positive control EGF (data not shown). In sharp contrast, both oleate and EGF stimulated AKT phosphorylation (Fig. 3A and B). Oleate-induced AKT phosphorylation, which increased more than 2-fold during the first 5 min of treatment, peaked at 30 min and, thereafter, slowly declined. The same extent of AKT activation was observed with five different preparations of oleate-BSA. In agreement with our previous data showing that oleate but not palmitate activates PI3-K (10), AKT phosphorylation was not induced by two

different preparations of palmitate-BSA that had been shown to be active in inducing apoptosis (data not shown). Considering the PI3-K inhibitor data described in Fig. 1A, the results indicate that the proliferative signal induced by oleate is mediated at least in part via PI3-K/AKT activation.

Oleate increases $[Ca^{2+}]_i$ in the presence and absence of BSA—GPR40 was first recognized to be activated by medium and long chain FFA (not bound to BSA) by assays measuring $[Ca^{2+}]_i$ in GPR40-overexpressing cells (21-23). Since GPR40 is expressed in MDA-MB-231 breast cancer cells at approximately 12,000 copies/ μ g of total RNA as we evaluated by real-time PCR, we measured changes of $[Ca^{2+}]_i$ in fura-2/AM loaded cells following oleate or palmitate treatments. In the absence of BSA, oleate and palmitate caused a rapid increase in $[Ca^{2+}]_i$ by 2 and 1.5 fold, respectively (Fig. 4A). Interestingly, in the presence of BSA, a more physiological condition, oleate still caused a rapid increase in $[Ca^{2+}]_i$ by 2 fold (Fig. 4B). In contrast, palmitate did not affect $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of BSA.

GPR40 is involved in oleate-induced cell proliferation—To determine whether GPR40 is implicated in the proliferative action of oleate in MDA-MB-231 cells, we first attempted to reduce the expression level of GPR40 in MDA-MB-231 cells using RNA interference. Since the efficiency of transfection is about 60% in this cell line (data not shown), cells were co-transfected with a plasmid encoding GFP together with a plasmid encoding a siRNA against GPR40 or with a control scramble siRNA, followed by selection of cells expressing GFP with a FACS. At the end of the selection, GPR40 mRNA expression was reduced by 80% in siRNA-transfected cells as determined by real-time PCR (Table I). Using a standard protocol to evaluate cell proliferation, FACS selected cells were serum-starved for 24 h and then incubated for an additional 24 h in serum-free medium supplemented with 0.5% BSA (control) or various concentrations of BSA-bound oleate. The increase in $[^3H]$ -thymidine incorporation following oleate stimulation was significantly reduced at all tested concentrations of the FFA in GFP-positive cells expressing the GPR40-specific siRNA (Fig. 5B). The decreased expression of GPR40 was particularly efficient in reducing the stimulation of DNA synthesis caused by low concentration (1-5 μ M) of the FFA.

We next performed experiments to evaluate [^3H]-thymidine incorporation following overexpression of GPR40 (Table I) in the presence of increasing concentrations of oleate (Fig. 5A). The stimulation of DNA synthesis by oleate was increased about 1.3 fold in MDA-MB-231 cells overexpressing GPR40 at concentrations of 10 μM and above when compared to the RLuc control situation. To obtain strong additional evidence in favor of a role for GPR40, we attempted to identify breast cancer cell lines that would express GPR40 at lower level. Unfortunately, among the four cell lines tested, GPR40 was expressed at levels relatively similar to the one measured in MDA-MB-231 cells (data not shown). To circumvent this problem, we examined the effect of GPR40 overexpression in the breast cancer cell lines T47D and MCF-7, which respectively does not or only slightly proliferate in the presence of oleate (10). Interestingly, in these two cell lines the effect of oleate on [^3H]-thymidine incorporation was increased by nearly two fold when GPR40 was overexpressed (Fig. 5). The reason why oleate, in the absence of GPR40 overexpression, promotes a strong proliferative signal in MDA-MB-231 cells but a poor response in T47D and MCF-7 cells that expressed GPR40 mRNA at approximately the same level is unclear. It may be that GPR40 is coupled more tightly to its associated G-proteins in MDA-MB-231 cells than in the two other cell lines. Alternatively, the expression level of the GPR40 protein may be lower in T47D and MCF7 cells despite that the three cell lines expressed the GPR40 transcript at similar level. Altogether, the siRNA and overexpression results indicate that oleate-induced proliferation of MDA-MB-231 cells is mediated at least in part through GPR40.

DISCUSSION

This study was prompted by the intriguing link between the incidence of breast cancer and obesity noted in both animal and human studies (1-3). The mechanism for this potential link, however, is enigmatic. To address this issue, we focused a series of studies on the abundant fatty acid, oleate, because it has been shown to stimulate the proliferation of breast cancer cells (10). Inhibition of individual signaling cascades, at the level of Gi/o proteins, *src*, MEK1/2, PI3-K or PLC resulted in a substantial reduction of oleate-induced DNA synthesis, suggesting that integration or cooperation of signals from multiple pathways is necessary to drive cells to enter S-phase in response to oleate. We also found that a GPCR is implicated in the proliferative signal transduction induced by this monounsaturated FFA. Thus, pertussis toxin, a very specific inhibitor of some G proteins (31), attenuated both LPA and oleate-induced proliferation suggesting the implication of Gi/o proteins in this process. LPA has previously been shown to induce the proliferation of fibroblasts via GPCRs coupled to Gi/o (32). In addition, the fact that we provide evidence (see below), that the GPCR GPR40 is implicated in the proliferative action of oleate is in itself a strong evidence for a role of a GPCR in oleate action.

Noteworthy, except for a possible role in insulin secretion, no other physiological action has been attributed to the GPCR GPR40 (21). Several lines of evidence demonstrate that GPR40 is implicated in oleate-induced proliferation of breast cancer cells. Firstly, $[Ca^{2+}]_i$ is increased in response to oleate treatment in GPR40-expressing MDA-MB-231 cells. Secondly, overexpression of GPR40 amplified the oleate-induced cell proliferation in three breast cancer cell lines suggesting that oleate acts via this FFA receptor in these cells. Thirdly, treatment of MDA-MB-231 cells with a siRNA-targeting GPR40 reduced the proliferative effect of oleate. Activation of GPCR signaling leading to cell growth has previously been documented for different GPCR agonists, including lysophospholipids and thrombin (18). Since only a partial inhibition of the proliferative effect of oleate with siRNA-targeting GPR40 was observed here, we could on one hand speculate that additional receptors for oleate or other signaling pathways participate in oleate-induced cell proliferation. For instance, LPA interacts with several GPCRs to mediate its biological actions (40) and it may also act via a receptor-independent

pathway to cause cell growth (41). Interestingly, another FFA-activated GPCR, GPR120, was recently identified (42) and its contribution to oleate-induced proliferation of breast cancer cells remained to be studied. On the other hand, the importance of GPR40 in oleate-induced proliferation is likely to be underestimated since the siRNA did not completely block its expression. Moreover, as we do not have information on GPR40 protein level and stability in these cells, it is difficult to draw quantitative conclusions.

The marked decrease in oleate-induced proliferation with the PLC inhibitor suggests a significant role of this phospholipase in this process. PLC is a major contributor of GPCR signaling (43). One might speculate that oleate binding to the receptor activates PLC-mediated hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into diacylglycerol and inositol trisphosphate, which respectively activates PKC and mobilizes calcium from the endoplasmic reticulum (44). Both PKC and calcium are effectors that have been reported to modulate processes required for breast cancer cell proliferation (45). Moreover, several studies have shown that unsaturated FFAs, including oleate, stimulated PLC γ activity (46). Also, our results show that oleate and palmitate, caused a rapid and transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ in MDA-MB-231 cells in the absence of BSA. However, in the presence of BSA, palmitate did not increase $[Ca^{2+}]_i$ in contrast to oleate that still elicited a robust Ca^{2+} response. Similar results have been observed in MCF-7 breast cancer cells (24). The difference observed between these two fatty acids might be explained in part by a better availability of unbound oleate for GPR40. In comparison to palmitate, oleate has a slightly lower affinity for BSA (47) and lower partition coefficient into cellular membranes (48). Thus, oleate may promote breast cancer cell proliferation by binding more efficiently to GPR40 than palmitate. In addition, as shown in our previous studies (10,11), differences in the metabolism of these two fatty acids are involved in their opposite effects on cell fate: the saturated fatty acid palmitate induces apoptosis of breast cancer cells via a mechanism that possibly implicates enhanced cardiolipin turnover and a reduction of this mitochondrial phospholipid whereas the unsaturated fatty acid oleate, by sustaining cardiolipin synthesis, permits cell proliferation.

The rapid and transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by oleate suggests calcium mobilization from intracellular stores that implicates Gq protein activation in response to many receptor agonists (18). Thus, these results favor the view that oleate stimulates, in part, MDA-MB-231 cell proliferation via GPR40 coupled to a Gq protein and via the PLC/ Ca^{2+} pathway. GPR40 is mainly coupled to Gq in MIN6 cells and CHO cells over-expressing GPR40 (21,22). However, GPR40 is also coupled to Gi/o and Gq in MCF-7 cells (24). Hence, in addition to Gq, oleate-induced proliferation of MDA-MB-231 cells via GPR40 are likely to implicate Gi/o, since pertussis toxin reduced but did not abolish the proliferative effect of oleate in these cells. An orphan GPCR coupled to Gi/o proteins has been shown to be activated by the unsaturated FFA arachidonate and to cause a decrease in cAMP levels (19). The subunits of several Gi/o proteins are able to inhibit adenylyl cyclases resulting in a decrease in cAMP levels (49). However, cAMP levels were not affected by oleate in MDA-MB-231 cells when compared to LPA, which elicited a reduction in the cellular cAMP content (data not shown). This is consistent with the observation that H-89, a PKA inhibitor, did not impair oleate-induced DNA synthesis. It is well established that many of the diverse biological effects resulting from the activation of Gi/o proteins are not mediated via the cAMP transduction system (50). For example, members of the Gi/o protein family directly affect *src* (50) and Ca^{2+} channels (51).

The increase in DNA synthesis induced by oleate appears to be mediated in part by the *src* and MEK1/2 pathway as supported by the experiments using pharmacological inhibitors. The activity of *src* and ERK1/2, the direct downstream effector of MEK1/2, are critical for cell survival and proliferation mediated by diverse growth factors (52,53). Consistent with this view, a previous study reported that oleate induces ERK1/2 activation via GPR40 in the MIN6 pancreatic β -cell line (21). AKT is rapidly activated by oleate in MDA-MB-231 cells but not by palmitate. AKT controls cell-cycle progression and is well known to participate in cell proliferation and survival (38). Agonist-induced stimulation of GPCRs may lead to the transactivation of the EGFR via *src* and subsequently the activation of a wide variety of signaling pathways including AKT and ERK1/2 (26,30). However, oleate did not induce EGFR activation in the cellular model we used and blocking EGFR activity with AG1478 did not affect oleate-

induced proliferation. Oleate can activate the EGFR in endothelial cells (14) but had no effect on EGFR tyrosine phosphorylation in Hs578T breast cancer cells (54). Whether stimulation of GPR40 by oleate leads to the transactivation of other growth factor receptors linked to tyrosine kinases and the activation of AKT is currently under investigation. Alternatively, a G $\beta\gamma$ subunit coupled to GPR40 might directly activate PI3-K as frequently described (rev. in 55).

In summary, the molecular, biochemical and pharmacological results in this study suggest the following cascade of events in response to oleate in MDA-MD-231 cells. The unsaturated FFA binds to GPR40 and possibly other FFA receptor(s) coupled to Gi/o and Gq, resulting in the activation of src proteins, PI3-K, AKT and Ca²⁺ signaling, thus promoting cell growth. It cannot be discounted that other non-GPCR receptors are also implicated in oleate-induced activation of the PLC, *src*, PI3-K/AKT, MEK1/2 and PKC ζ pathways that may participate in the proliferative effect. Taken together, these data provide a novel mechanism for the action of oleate in breast cancer cells, in relation to cell growth by showing that this monounsaturated FFA acts as an extracellular signaling molecule to regulate breast cancer cell proliferation via the FFA receptor GPR40. Thus, GPR40 is not only a receptor that may participate in the control of insulin secretion by FFA but it might play an important role in the control of cell growth/apoptosis by some FFA. Hence, the possibility should be considered that GPR40 provides a link between fat and/or obesity and cancer. In this respect, the emerging evidence suggest an important association between insulin resistance, obesity, type 2 diabetes and several cancers in particular colon, prostate and breast cancer (5). Finally, it could be hypothesized that overexpression of GPR40 in a subset of tumors could render them more susceptible to progression in patients eating a diet rich in unsaturated fatty acids.

REFERENCES

1. Fay, M. P., Freedman, L. S., Clifford, C. K., and Midthune, D. N. (1997) *Cancer Res* **57**(18), 3979-3988
2. Lee, M. M., and Lin, S. S. (2000) *Annu Rev Nutr* **20**, 221-248
3. Rose, D. P. (1997) *Am J Clin Nutr* **66**(6 Suppl), 1513S-1522S
4. Felber, J. P., and Golay, A. (2002) *Int J Obes Relat Metab Disord* **26 Suppl 2**, S39-45
5. Calle, E. E., and Kaaks, R. (2004) *Nat Rev Cancer* **4**(8), 579-591
6. McArthur, M. J., Atshaves, B. P., Frolov, A., Foxworth, W. D., Kier, A. B., and Schroeder, F. (1999) *J Lipid Res* **40**(8), 1371-1383
7. Ferre, P. (2004) *Diabetes* **53 Suppl 1**, S43-50
8. Sauer, L. A., Dauchy, R. T., and Blask, D. E. (2000) *Cancer Res* **60**(18), 5289-5295
9. Louet, J. F., Chatelain, F., Decaux, J. F., Park, E. A., Kohl, C., Pineau, T., Girard, J., and Pegorier, J. P. (2001) *Biochem J* **354**(Pt 1), 189-197
10. Hardy, S., Langelier, Y., and Prentki, M. (2000) *Cancer Res* **60**(22), 6353-6358
11. Hardy, S., El-Assaad, W., Przybytkowski, E., Joly, E., Prentki, M., and Langelier, Y. (2003) *J Biol Chem* **278**(34), 31861-31870
12. Grant, S., Qiao, L., and Dent, P. (2002) *Front Biosci* **7**, d376-389
13. Yart, A., Chap, H., and Raynal, P. (2002) *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3), 107-111
14. Vacaresse, N., Lajoie-Mazenc, I., Auge, N., Suc, I., Frisach, M. F., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1999) *Circ Res* **85**(10), 892-899
15. Coleman, R. A., Smith, W. L., and Narumiya, S. (1994) *Pharmacol Rev* **46**(2), 205-229
16. Sarau, H. M., Ames, R. S., Chambers, J., Ellis, C., Elshourbagy, N., Foley, J. J., Schmidt, D. B., Muccitelli, R. M., Jenkins, O., Murdock, P. R., Herrity, N. C., Halsey, W., Sathe, G., Muir, A. I., Nuthulaganti, P., Dytko, G. M., Buckley, P. T., Wilson, S., Bergsma, D. J., and Hay, D. W. (1999) *Mol Pharmacol* **56**(3), 657-663
17. Mills, G. B., and Moolenaar, W. H. (2003) *Nat Rev Cancer* **3**(8), 582-591

18. Radeff-Huang, J., Seasholtz, T. M., Matteo, R. G., and Brown, J. H. (2004) *J Cell Biochem* **92**(5), 949-966
19. Hosoi, T., Koguchi, Y., Sugikawa, E., Chikada, A., Ogawa, K., Tsuda, N., Suto, N., Tsunoda, S., Taniguchi, T., and Ohnuki, T. (2002) *J Biol Chem* **277**(35), 31459-31465
20. Schulte, G., and Fredholm, B. B. (2003) *Cell Signal* **15**(9), 813-827
21. Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y., and Fujino, M. (2003) *Nature* **422**(6928), 173-176
22. Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., Ellis, C., Elshourbagy, N. A., Goetz, A. S., Minnick, D. T., Murdock, P. R., Sauls, H. R., Jr., Shabon, U., Spinage, L. D., Strum, J. C., Szekeres, P. G., Tan, K. B., Way, J. M., Ignar, D. M., Wilson, S., and Muir, A. I. (2003) *J Biol Chem* **278**(13), 11303-11311
23. Kotarsky, K., Nilsson, N. E., Flodgren, E., Owman, C., and Olde, B. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **301**(2), 406-410
24. Yonezawa, T., Kato, K., and Obara, Y. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **314**(3), 805-809
25. Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J. A., Soria, B., and Prentki, M. (1999) *Diabetes* **48**(10), 2007-2014
26. Buteau, J., Foisy, S., Joly, E., and Prentki, M. (2003) *Diabetes* **52**(1), 124-132
27. Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J Biol Chem* **260**(6), 3440-3450
28. Arcaro, A., and Wymann, M. P. (1993) *Biochem J* **296** (Pt 2), 297-301
29. Levitzki, A., and Gazit, A. (1995) *Science* **267**(5205), 1782-1788
30. Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., and Ullrich, A. (1997) *Embo J* **16**(23), 7032-7044
31. Moss, J., and Vaughan, M. (1988) *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **61**, 303-379

32. Fang, X., Yu, S., LaPushin, R., Lu, Y., Furui, T., Penn, L. Z., Stokoe, D., Erickson, J. R., Bast, R. C., Jr., and Mills, G. B. (2000) *Biochem J* **352** Pt 1, 135-143
33. Smith, R. J., Sam, L. M., Justen, J. M., Bundy, G. L., Bala, G. A., and Bleasdale, J. E. (1990) *J Pharmacol Exp Ther* **253**(2), 688-697
34. Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., and Connelly, P. A. (1996) *J Biol Chem* **271**(2), 695-701
35. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., and Saltiel, A. R. (1995) *J Biol Chem* **270**(46), 27489-27494
36. Zhou, G., Seibenhener, M. L., and Wooten, M. W. (1997) *J Biol Chem* **272**(49), 31130-31137
37. Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., and Hidaka, H. (1990) *J Biol Chem* **265**(9), 5267-5272
38. Brazil, D. P., Yang, Z. Z., and Hemmings, B. A. (2004) *Trends Biochem Sci* **29**(5), 233-242
39. Price, J. T., Tiganis, T., Agarwal, A., Djakiew, D., and Thompson, E. W. (1999) *Cancer Res* **59**(21), 5475-5478
40. Fang, X., Schummer, M., Mao, M., Yu, S., Tabassam, F. H., Swaby, R., Hasegawa, Y., Tanyi, J. L., LaPushin, R., Eder, A., Jaffe, R., Erickson, J., and Mills, G. B. (2002) *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3), 257-264
41. Hooks, S. B., Santos, W. L., Im, D. S., Heise, C. E., Macdonald, T. L., and Lynch, K. R. (2001) *J Biol Chem* **276**(7), 4611-4621
42. Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2005) *Nat Med* **11**(1), 90-94
43. Tobin, A. B. (1997) *Pharmacol Ther* **75**(2), 135-151
44. Prentki, M., Biden, T. J., Janjic, D., Irvine, R. F., Berridge, M. J., and Wollheim, C. B. (1984) *Nature* **309**(5968), 562-564
45. Greco, S., Muscella, A., Elia, M. G., Salvatore, P., Storelli, C., Mazzotta, A., Manca, C., and Marsigliante, S. (2003) *J Cell Physiol* **196**(2), 370-377

46. Hwang, S. C., Jhon, D. Y., Bae, Y. S., Kim, J. H., and Rhee, S. G. (1996) *J Biol Chem* **271**(31), 18342-18349
47. Richieri, G. V., Anel, A., and Kleinfeld, A. M. (1993) *Biochemistry* **32**(29), 7574-7580
48. Anel, A., Richieri, G. V., and Kleinfeld, A. M. (1993) *Biochemistry* **32**(2), 530-536
49. Taussig, R., Iniguez-Lluhi, J. A., and Gilman, A. G. (1993) *Science* **261**(5118), 218-221
50. Ma, Y. C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., and Huang, X. Y. (2000) *Cell* **102**(5), 635-646
51. Kinoshita, M., Nukada, T., Asano, T., Mori, Y., Akaike, A., Satoh, M., and Kaneko, S. (2001) *J Biol Chem* **276**(31), 28731-28738
52. Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., and Auricchio, F. (1998) *Embo J* **17**(7), 2008-2018
53. Boney, C. M., Sekimoto, H., Gruppuso, P. A., and Frackelton, A. R., Jr. (2001) *Cell Growth Differ* **12**(7), 379-386
54. Hardy, R. W., Wickramasinghe, N. S., Ke, S. C., and Wells, A. (1997) *Adv Exp Med Biol* **422**, 57-69
55. Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9), 639-650

FOOTNOTES

*We thank Bjorn Olde for the generous gift of the plasmid pIRESpuro-GPR40. This work was supported by a Studentships from the Fonds québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (to S. H.) and by Research Grants from the Canadian Cancer Etiology Research Network, the Montreal Breast Cancer Foundation and the Fondation René Malo/Institut du cancer de Montréal (to Y. L., E. J. and M. P.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹The abbreviations used are: FFA, free fatty acid; PPAR, peroxisomal proliferated-activated receptor; PI3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; GPCR, G protein-coupled receptor; LPA, lysophosphatidic acid; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium concentration; BSA, bovine serum albumin; EGFR, epidermal growth factor receptor; PKC ζ , protein kinase C ζ ; MEM, minimal essential medium; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; AKT, protein kinase B; D-PBS, Dulbecco’s phosphate-buffered saline; EGF, epidermal growth factor; p-AKT, phosphorylated-AKT; RLuc, renilla luciferase; siRNA, small interfering RNA; GFP, green fluorescent protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; FACS, fluorescent activated cell sorter; PLC, phospholipase C; MEK1/2, mitogenic-extracellular signal-regulated kinase 1/2; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C.

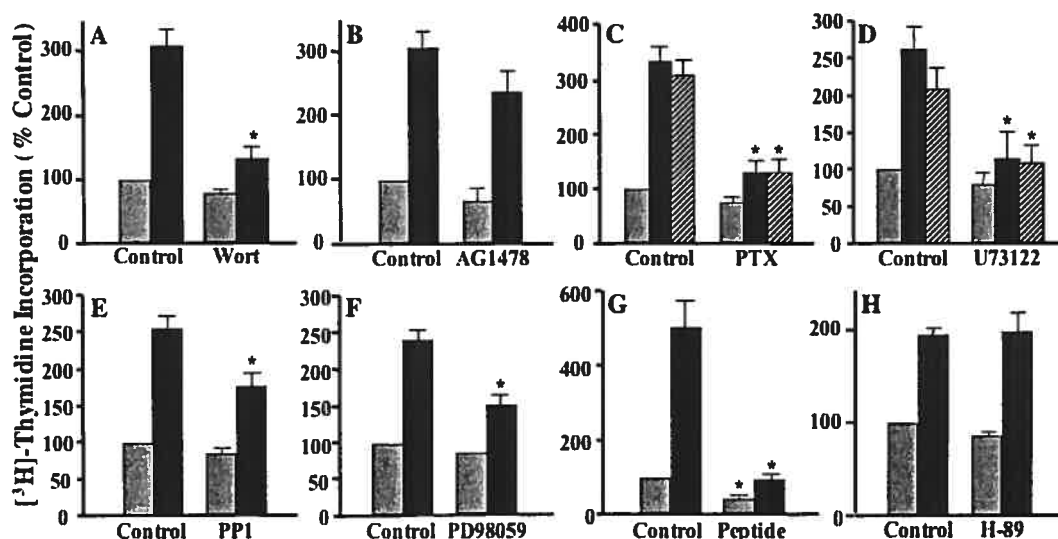


FIG. 1. Effects of various pharmacological inhibitors on oleate-induced proliferation of MDA-MB-231 cells. After 24 h of serum starvation in MEM, cells were incubated for 24 h in serum-free medium supplemented with 0.1 mM oleate (black bars) or 10 μ M LPA (stippled bars) both bound to BSA (0.5%), or BSA alone (gray bars) in the absence or presence of 50 nM wortmannin (Wort) for PI3-K (A), 250 nM AG1478 for EGFR (B), 100 ng/ml pertussis toxin (PTX) for Gi/o (C), 5 μ M U73122 for PLC (D), 10 μ M PP1 for *src* (E), 10 μ M PD98059 for MEK1/2 (F), 25 μ M specific membrane permeant peptide inhibitor of PKC ζ (G) or 2 μ M H-89 for PKA (H). During the last 4 h of incubation, cells were labeled with [³H]-thymidine. Means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.01$ vs. respective control.

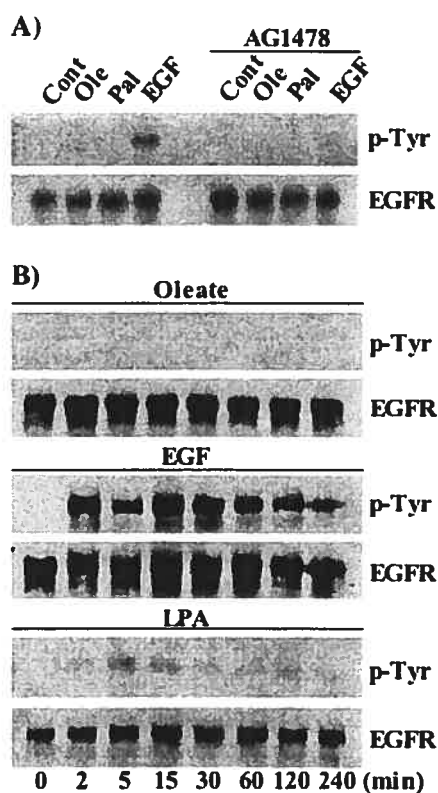


FIG. 2. EGFR is not activated by oleate in MDA-MB-231 cells. *A*, Cells were stimulated with BSA alone (*Cont*), 0.1 mM oleate (*Ole*) or palmitate (*Pal*) bound to BSA (0.5%), or 100 ng/ml EGF for 10 min in the absence or presence of 250 nM AG1478. *B*, Cells were stimulated with 0.1 mM oleate or 10 μ M LPA bound to BSA, or 100 ng/ml EGF for the indicated times. Cells were then lysed and EGFR was immunoprecipitated from total protein extracts to perform immunoblot analysis with an anti-phospho-tyrosine (p-Tyr) specific antibody. Membranes were stripped and re probed with an EGFR specific antibody. The figure shows representative experiments that have been repeated twice.

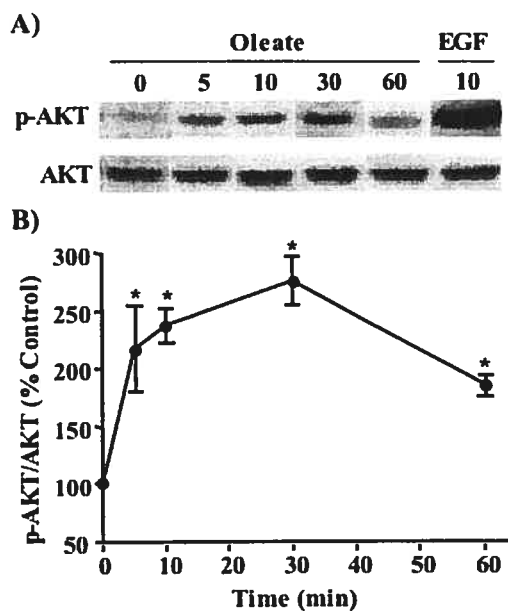


FIG. 3. Oleate stimulates AKT phosphorylation. After 24 h of serum starvation in MEM in the presence of 0.5% BSA, cells were incubated for 2 h in D-PBS containing 5 mM glucose and stimulated with 0.1 mM BSA-bound oleate or 100 ng/ml EGF for the indicated times. *A*, Cell lysates were analyzed by immunoblotting using an AKT phospho-specific antibody that recognizes AKT phosphorylated at Ser-473 (p-AKT). The membrane was stripped and reprobed with an antibody recognizing total AKT. The figure shows a representative experiment that has been repeated three times in triplicate or quadruplicate. *B*, p-AKT and AKT were quantified by densitometry and the data expressed as p-AKT/AKT ratios (percent of the starting time control). Means \pm SE of three independent experiments performed in triplicate or quadruplicate.

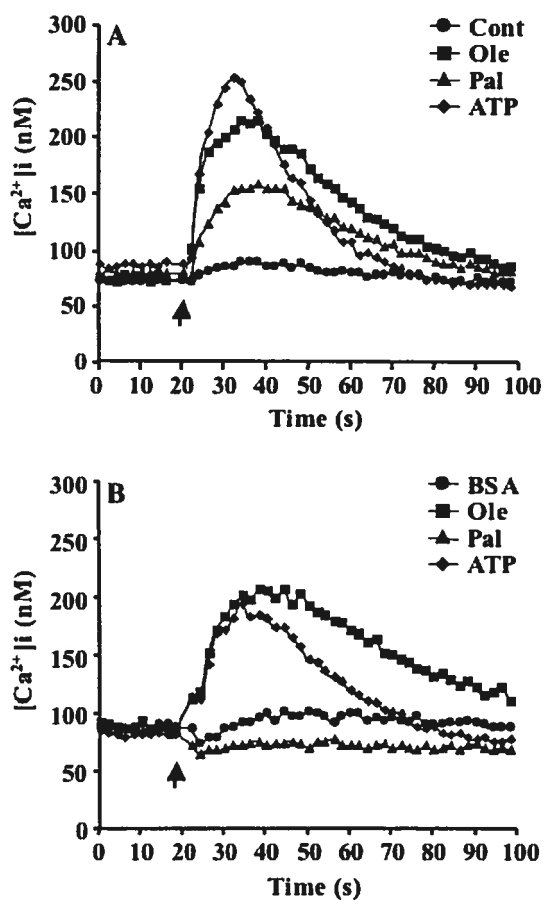


FIG. 4. Oleate increases the intracellular concentration of calcium in both the presence and absence of BSA. MDA-MB-231 cells were loaded with 3 μ M of the fluorescent calcium probe fura-2/AM. *A*, Cells were stimulated in the absence of BSA with 10 μ M oleate (*Ole*) or palmitate (*Pal*) or PBS alone (*Cont*). *B*, Cells were stimulated with 0.1 mM oleate (*Ole*) or palmitate (*Pal*) bound to BSA (0.5%) or BSA alone. The arrows indicate the onset of stimulation. ATP (50 μ M) was used as a positive control. The figure shows a representative experiment that has been repeated three times in duplicate.

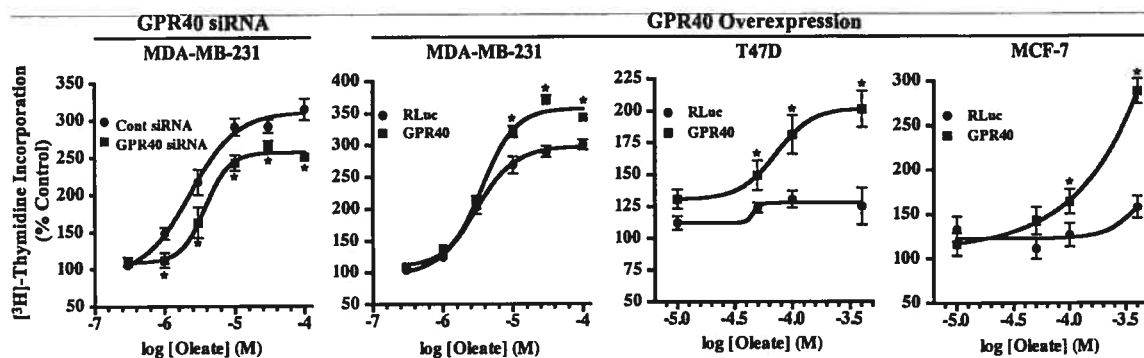


FIG. 5. GPR40 is implicated in oleate-induced cell proliferation. MDA-MB-231 cells were transiently co-transfected for 24 h with plasmid encoding GFP and with a plasmid encoding a siRNA against GPR40 (*GPR40 siRNA*) or a scrambled siRNA (*Cont siRNA*) for 24 h followed by selection on a fluorescent cell sorter of cells expressing GFP (A), or transfected for 24 h with a plasmid encoding either GPR40, or renilla luciferase (*RLuc*) (B). T47D cells and MCF-7 cells were transiently transfected for 24 h with a plasmid encoding GPR40 or renilla luciferase (*RLuc*) (C and D). After 24 h of serum-starvation in MEM, cells were incubated for an additional 24 h in serum-free medium supplemented with 0.5% BSA (control) or various concentrations of BSA-bound oleate. During the last 4 h of incubation, cells were labeled with [³H]-thymidine. Means \pm SE of two to three independent experiments performed in triplicate or quadruplicate. *, $P < 0.01$ vs. control (A) or *RLuc*. (B, C and D).

Table I. GPR40 expression in transfected breast cancer cells

Transfection	MDA-MB-231	T47D	MCF-7
Mock	1.00	1.00	1.00
R. Luc	0.85 ± 0.12	0.75 ± 0.20	0.99 ± 0.26
GPR40	14,300 ± 1,700*	238,100 ± 52,900*	153,400 ± 23,100*
siRNA control	1.11 ± 0.07	N/A	N/A
siRNA GPR40	0.22 ± 0.06**	N/A	N/A

GPR40 expression was assessed using real time RT-PCR. Results are expressed as fold change over mock and have been normalized with respect to GAPDH expression. Means ± SE of two to three independent experiments. N/A, not applicable. *, $P < 0.01$ vs. R. Luc; **, $P < 0.01$ vs. siRNA control

DISCUSSION :

Nous avons démontré que l'oléate et le palmitate, deux des acides gras les plus abondants de la circulation, ont des effets opposés sur la prolifération des cellules du cancer du sein. En effet, l'oléate, un acide gras monoinsaturé, stimule la prolifération cellulaire tandis que le palmitate, un acide gras saturé, provoque une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, cette diminution de la prolifération est associée à la mort des cellules par apoptose. La PI3K est impliquée dans la transduction de signaux intracellulaires induites par ces acides gras. Comme règle générale, nous avons observé que les acides gras insaturés stimulent la prolifération cellulaire tandis que les acides gras saturés sont proapoptotiques. Le mécanisme par lequel le palmitate induit l'apoptose semble impliquer principalement une diminution du niveau de la cardiolipine, un phospholipide responsable de la rétention du cytochrome c dans la mitochondrie. Enfin, le mécanisme par lequel l'oléate augmente la prolifération cellulaire implique, tout au moins en partie, GPR40, un récepteur pour les acides gras.

Il est donc évident que *in vitro* les effets de différents acides gras ne sont pas équivalents en ce qui concerne la croissance cellulaire et l'apoptose. En supposant que ces observations puissent être extrapolées à la situation *in vivo*, il est possible de postuler qu'une diète riche en oléate favorise la progression du cancer du sein contrairement au palmitate qui aurait un effet bénéfique en induisant la mort cellulaire des cellules cancéreuses mammaires. Par contre, l'effet proapoptotique des acides gras saturés, comme le palmitate, est bloqué par l'oléate à de faibles concentrations. Comme les acides gras sont normalement accessibles aux cellules sous formes d'un mélange d'acides gras, l'effet prolifératif des acides gras insaturés serait plus important que l'effet proapoptotique des acides gras saturés sur la promotion du cancer du sein. De plus, comme l'obésité est également associée à un niveau plasmatique élevé d'acides gras (Felber and Golay, 2002), il est possible que ces acides gras puissent également contribuer chez les personnes obèses à la progression du cancer mammaire. L'obésité est non seulement associée au développement du diabète de type II (Felber and Golay, 2002), mais de plus, est considérée comme un facteur de risque dans l'incidence du

cancer du sein (Calle and Thun, 2004). De façon intéressante, il existe aussi une corrélation positive entre la résistance à l'insuline, qui est une caractéristique du diabète de type II, et le cancer du sein (Calle and Thun, 2004; Stoll, 2002b). Il est donc important d'étudier les voies de signalisation et de comprendre le mécanisme d'action des acides gras comme l'oléate et le palmitate.

Le métabolisme du palmitate est impliqué dans son action proapoptotique

Nous avons étudié l'action du palmitate lié à l'albumine sur la croissance de la lignée humaine du cancer du sein MDA-MB-231 ainsi que trois autres lignées cellulaires dans un milieu défini sans sérum. Le palmitate provoque une diminution de la prolifération cellulaire et cette diminution est associée à une mort des cellules par apoptose. De plus, le myristate et le stéarate, deux acides gras saturés, induisent aussi l'apoptose chez les MDA-MB-231. D'autres groupes ont aussi observé que les acides gras saturés diminuent la prolifération des cellules du cancer du sein (Rose and Connolly, 1990; Singh et al., 1995) mais c'est la première fois que le palmitate est associé à l'induction de l'apoptose dans ces cellules. Pour exercer son effet proapoptotique, le palmitate doit être métabolisé. En effet, l'analogue non-métabolisable du palmitate, le 2-bromopalmitate, n'a pas d'effet apoptotique et la triacsin C, un inhibiteur de l'acyl-CoA synthase, inhibe l'apoptose induite par le palmitate. Le palmitate est un précurseur de la synthèse des céramides mais l'oléate ne l'est pas (Merrill and Jones, 1990). Il existe des évidences que le palmitate induit l'apoptose via la production de céramides dans divers types cellulaires (Paumen et al., 1997b; Shimabukuro et al., 1998; Yamagishi et al., 2002). Par contre, nos résultats ne supportent pas ce concept. Nous avons observé une augmentation des niveaux intracellulaires de céramides en présence de palmitate et des inhibiteurs de la synthèse *de novo* de céramides sont capables de bloquer cette augmentation. Par contre, comme ces inhibiteurs ne bloquent pas l'apoptose, nous pouvons conclure que l'accumulation de céramides n'est pas responsable de l'apoptose induite par le palmitate dans les cellules du cancer du sein.

Un autre point en faveur du rôle du métabolisme du palmitate dans son effet proapoptotique vient de l'observation que lorsque l'oxydation des acides gras est modifiée par des agents pharmacologiques, les propriétés apoptotiques du palmitate sont aussi modifiées. En effet, l'etomoxir, un inhibiteur de la β -oxydation, augmente l'apoptose induite par le palmitate tandis que lorsque l'oxydation du palmitate est stimulée avec le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribonucleoside (AICAR), un activateur de l'AMPK, l'apoptose diminue. Des études récentes ont également observé ce phénomène dans les cellules mésangiales microvasculaires (Mishra and Simonson, 2005) et dans les cellules β pancréatiques (El-Assaad et al., 2003). Cette augmentation de l'oxydation des acides gras induite par l'AICAR résulte d'une stimulation de l'activité de la CPT-1 (Velasco et al., 1998) et de la malonyl-CoA décarboxylase (Saha et al., 2000), l'enzyme responsable de la dégradation du malonyl-CoA qui est l'inhibiteur allostérique de la CPT-1. Les cardiomyocytes incubés en présence de palmitate montrent une augmentation des niveaux de malonyl-CoA et une diminution de la capacité des cellules à oxyder les acides gras, ce qui pourrait causer l'apoptose (Hickson-Bick et al., 2000). Aussi, le groupe de recherche de Kuhajda a suggéré que le malonyl-CoA pourrait être un médiateur potentiel de la cytotoxicité dans les cellules du cancer du sein (Pizer et al., 2000). Comment des niveaux de malonyl-CoA supraphysiologiques pourraient mener à l'apoptose n'est pas bien compris. Il a été montré que la CPT I qui est régulé par le malonyl-CoA peut interagir directement avec la protéine antiapoptotique mitochondriale Bcl-2 (Paumen et al., 1997a). Ceci suggère que les hauts niveaux de malonyl-CoA pourraient induire l'apoptose directement ou altérer le métabolisme mitochondrial en augmentant la susceptibilité à l'apoptose provenant d'autres signaux proapoptotiques. Il serait donc intéressant de mesurer les niveaux de malonyl-CoA ainsi que de surexprimer la malonyl-CoA décarboxylase en présence de palmitate pour mesurer l'implication du malonyl-CoA dans notre modèle de lipotoxicité.

Dans plusieurs systèmes, l'activation de la CPT-1 protège contre l'apoptose induite par le palmitate (Cifone et al., 1997; Paumen et al., 1997b; Revoltella et al.,

1994). Cette protection par la CPT-1 contre l'action proapoptotique du palmitate provient probablement du fait que cette enzyme participe à la clairance du palmitoyl-CoA dans le cytoplasme, car le complexe enzymatique CPT est responsable du transfert des acyls-CoA à longue chaîne vers la matrice mitochondriale où ils sont oxydés. Ainsi, la CPT-1 pourrait limiter la synthèse d'intermédiaires du métabolisme du palmitate comme les formes saturés de l'acide phosphatidique (PA) et du phosphatidylglycérol (PG). En effet, nous avons observé que le palmitate provoque une augmentation rapide du PA et du PG chez les cellules MDA-MB-231 et cette augmentation peut être bloquée par l'AICAR. Aussi, le PA est le précurseur de plusieurs molécules impliqués dans la signalisation intracellulaires qui possèdent diverses activités biologiques (Andresen et al., 2002). Il est donc possible que le PA ou un de ses dérivés comme le DAG puissent contribuer à l'apoptose induite par le palmitate. De façon intéressante, nous observons également une accumulation de DAG dans les cellules traitées avec du palmitate suggérant que ce dérivé pourrait également agir sur des enzymes activées par le DAG comme les PKCs (Wright and McMaster, 2002). Certaines évidences obtenues dans les cellules β du pancréas suggèrent que la palmitate induit l'apoptose via l'activation de la PKC δ (Eitel et al., 2003).

Nous observons une modification du métabolisme de la cardiolipine au cours des premières étapes du processus apoptotique induit par le palmitate. En effet, nous avons observé une corrélation temporelle entre la diminution de la cardiolipine et le relâchement du cytochrome c dans le cytosol ainsi qu'une perte du potentiel membranaire de la mitochondrie. Comme le cytochrome c est situé dans la membrane interne de la mitochondrie en association avec la cardiolipine (Schlame et al., 2000), une diminution de cardiolipine devrait provoquer la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol, ce qui induit l'activation de la cascade menant à l'apoptose. Cette hypothèse est supportée par une étude menée dans les cardiomyocytes qui démontre également une corrélation entre les niveaux de cardiolipine et le relâchement du cytochrome C lors de l'apoptose induite par le palmitate (Ostrander et al., 2001). Ces auteurs ont également observé une accumulation de PA et PG (sous formes dipalmitoyl)

qui sont des précurseurs de la cardiolipine et ils ont démontré que la cardiolipine synthase a moins d'affinité pour le PG composé d'acides gras saturés comparativement au PG composé d'acides gras insaturés. Ceci est en accord avec le fait que la cardiolipine est un phospholipide anionique généralement constituée de quatre acides gras insaturés (Schlame et al., 2000). Nous observons également une augmentation du turnover de la cardiolipine en présence de palmitate ainsi qu'une diminution de sa synthèse, ce qui suggère une synergie entre ces deux phénomènes dans le déclin du niveau de la cardiolipine intracellulaire induit par le palmitate. Le mécanisme pouvant expliquer cette augmentation de la dégradation de la cardiolipine en présence de palmitate est encore obscure. Il serait intéressant de mesurer l'activité de la phospholipase A2 mitochondriale en présence de différents types d'acides gras. La phospholipase A2 est une enzyme impliquée entre autres dans la dégradation de la cardiolipine et est importante pour son remodelage (Wright et al., 2004). Il a été démontré que le palmitoyl-CoA induit la perméabilisation transitoire de la membrane mitochondriale ainsi que le relâchement du cytochrome c de mitochondries isolées et que ceci peut-être bloqués par un inhibiteur de la phospholipase A2 (Furuno et al., 2001). De plus, les acides gras insaturés diminuent l'activité de la phospholipase A2 (Raghupathi and Franson, 1992) ce qui est en accord avec une diminution du turnover de la cardiolipine que l'on observe en présence d'oléate.

D'autres voies pourrait également contribuer à l'effet proapoptotique du palmitate. La voie lysosomale, qui résulte du relâchement de la cathepsine B, pourrait être impliquée dans l'apoptose induite par le palmitate dans les hépatocytes (Feldstein et al., 2004). Aussi, le stress au niveau du réticulum endoplasmique participe à l'action proapoptotique du palmitate chez les cellules β -pancréatiques (Kharroubi et al., 2004). De façon intéressante, ces voies participent à la translocation de Bax ainsi que de Bid vers la mitochondrie et la cardiolipine pourrait jouer un rôle important dans ce processus (Kuwana et al., 2002). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour mesurer

l'implication de ces voies dans l'effet proapoptotique du palmitate chez les cellules cancéreuses mammaires.

L'effet prolifératif de l'oléate implique plusieurs voies de signalisation et est médié en partie via GPR40.

Nous avons étudié l'action de l'oléate lié à l'albumine sur la croissance de la lignée humaine du cancer du sein MDA-MB-231 ainsi que trois autres lignées cellulaires dans un milieu défini sans sérum. Nos résultats démontrent que l'oléate stimule la prolifération de ces cellules et que l'effet proapoptotique des acides gras saturés est bloqué par l'oléate. De plus, l'oléate semble agir comme un facteur de croissance car il stimule la prolifération à des concentrations très faibles et cause l'activation de la PI3K. La stimulation de la prolifération de la lignée cellulaire MDA-MB-231 par l'oléate a aussi été observée par d'autres groupes en présence de sérum (Chajes et al., 1995) ou dans un milieu sans sérum (Rose and Connolly, 1990). L'effet prolifératif de l'oléate implique probablement une coopération entre son métabolisme et l'activation des signaux de transduction intracellulaire. Par contre, il est difficile de pouvoir discerner la contribution exacte de chacune de ces voies.

Nous observons une diminution de la prolifération cellulaire induite par l'oléate lorsque nous utilisons des inhibiteurs pharmacologiques des protéines Gi/o, src, MEK1/2, PI3K ou PLC, ce qui suggère que plusieurs voies de signaux de transduction contribuent à l'effet prolifératif de l'oléate. De façon intéressante, nos résultats démontrent qu'un GPCR est impliqué dans la transduction du signal prolifératif induit par cet acide gras insaturé. En effet, la toxine de pertussis, qui est un inhibiteur très spécifique de certaines protéines G, diminue la prolifération induite par l'oléate et le LPA. Comme pour le LPA qui augmente la prolifération des fibroblastes via un GPCR couplé à Gi/o (Fang et al., 2000), ceci suggère l'implication d'un GPCR dans l'effet prolifératif de l'oléate.

Une autre évidence suggérant l'implication d'un GPCR ayant pour ligand l'oléate dans les cellules du cancer du sein provient de la capacité de ce GPCR de recruter la β -arrestine (résultats non-publiés). En effet, l'oléate provoque le recrutement rapide à la membrane d'une protéine chimérique GFP- β -arrestine surexprimée dans les cellules MDA-MB-231. Ce phénomène permet l'internalisation du GPCR pour mettre fin au signal (Pierce et al., 2002) et permet aussi de recruter des partenaires impliqués dans différentes voies signalétiques comme *src* et MEK1/2 (Luttrell and Lefkowitz, 2002) qui sont aussi impliqués dans l'effet prolifératif de l'oléate..

Le fait que l'oléate augmente de façon rapide et transitoire le $[Ca^{2+}]_i$ est un autre indice en faveur d'un GPCR pour cet acide gras. En effet, il a été démontré que certains GPCRs, suite à la liaison d'un ligand, activent la PLC ce qui provoque l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate générant ainsi l'IP3 qui mobilise le calcium de façon transitoire en provenance du réticulum endoplasmique (Prentki et al., 1984). Aussi, la diminution de l'effet prolifératif de l'oléate que nous observons en présence de l'inhibiteur spécifique de la PLC est en accord avec ce concept. Le calcium est d'ailleurs un effecteur important pour la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Greco et al., 2003). De plus, certaines études ont démontrés que les acides gras insaturés, incluant l'oléate, stimulent l'activité de la PLC et cette enzyme pourrait être impliquée dans la prolifération cellulaire induite par ces acides gras dans les cellules du cancer du sein (Hwang et al., 1996; Park et al., 2000).

L'indication la plus probante impliquant un GPCR dans la prolifération induite par l'oléate dans les cellules cancéreuses mammaires est le rôle de GPR40 dans ce processus. En effet, en plus du fait que ce récepteur aux acides gras (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003; Kotarsky et al., 2003) est exprimé dans les cellules du cancer du sein, la surexpression de GPR40 dans trois lignées cellulaires du cancer du sein amplifie l'effet prolifératif de l'oléate. De plus, lorsque nous avons diminué l'expression de GPR40 à l'aide de la technique du RNAi, l'effet prolifératif de l'oléate a également été diminué. Par contre, comme la prolifération induite par l'oléate est seulement inhibée partiellement par le RNAi, ceci suggère que d'autres récepteurs ou mécanismes peuvent

être impliqués dans ce phénomène. Il a été démontré que le LPA interagit avec plusieurs GPCRs pour médier son action proliférative (Fang et al., 2002). De façon intéressante, un groupe a récemment identifié GPR120 comme étant un GPCR pouvant être activé par les acides gras (Hirasawa et al., 2005). Il sera donc intéressant de quantifier l'expression de GPR120 dans les cellules cancéreuses mammaires et de mesurer sa contribution à l'effet prolifératif de l'oléate comme nous l'avons fait pour GPR40. Un autre type de récepteur qui aurait pu être impliqué dans la prolifération induite par l'oléate est le récepteur à l'EGF (Vacaresse et al., 1999). En effet, son activation induit sa phosphorylation et il peut activer lui-même plusieurs voies de signalisation dont celle de la PI3K, de MEK1/2 et de *src* (Holbro and Hynes, 2004), qui pourraient être impliqués dans l'effet prolifératif de l'oléate. Mais, nous avons observé aucune activation du récepteur à l'EGF en réponse à l'oléate, ce qui exclut également la transactivation de ce récepteur via un GPCR (Daub et al., 1997). D'autres récepteurs avec une activité tyrosine kinase pourraient par contre être impliqués dans ce phénomène de transactivation (Gschwind et al., 2001).

L'inhibition partielle de la prolifération induite par l'oléate en utilisant le RNAi contre GPR40 pourrait également suggérer que cet acide gras pourrait en plus agir en coopération avec d'autres voies n'impliquant pas un récepteur. Le LPA, en plus de son effet prolifératif via ses récepteurs, peut aussi agir via une voie indépendante de ceux-ci (Hooks et al., 2001). Ainsi, le métabolisme de l'oléate pourrait aussi être impliqué dans son effet prolifératif. Par contre, nous n'avons pas d'évidence directe de l'implication d'un métabolite de l'oléate dans cet effet. Nous observons entre autre une accumulation de triglycérides en présence d'oléate dans nos cellules. Ce phénomène est également observé dans plusieurs types cellulaires (Cnop et al., 2001; Listenberger et al., 2003; Whitehead et al., 2004). De plus, il a aussi été démontré que l'oléate provoque une accumulation de triglycérides dépendante de la PI3K dans les adipocytes (Whitehead et al., 2004), établissant ainsi un lien entre le métabolisme de cet acide gras et une voie de signalisation impliquée dans la prolifération cellulaire (Yart et al., 2002). Nous observons également une activation de AKT, la protéine kinase en aval de la PI3K, lorsque les cellules MDA-MB-231 sont traitées à l'oléate. Cette dernière exerce aussi

son action sur plusieurs cibles impliquées dans le métabolisme et la prolifération cellulaire (Brazil et al., 2004). De façon intéressante, l'inosine-5' monophosphate déhydrogénase (IMPDH), une enzyme clé de la synthèse *de novo* de la guanine impliquée dans la prolifération cellulaire (Sintchak and Nimmesgern, 2000), est transloquée par l'oléate via la PI3K à la surface des corps lipidiques composés principalement de triglycérides (Whitehead et al., 2004). Par contre, le rôle exact de la translocation de cette enzyme vers les corps lipidiques et l'implication de ce phénomène dans la prolifération cellulaire ne sont pas bien compris.

L'oléate est antiapoptotique et protège contre l'action apoptotique du palmitate

Les résultats obtenus concernant l'effet de l'oléate sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 carencée en sérum suggèrent que cet acide gras a d'une part un effet antiapoptotique et d'autre part un effet prolifératif. En effet, la carence en sérum induit l'apoptose dans cette lignée cellulaire et l'ajout d'oléate empêche la mort cellulaire tout en augmentant la prolifération de ces cellules. Il est par contre difficile de pouvoir discerner la contribution de la voie antiapoptotique versus la voie proliférative car ces deux voies activent en général les mêmes signaux de transduction intracellulaire. Ainsi, la plupart des voies de signalisation impliquées dans l'effet prolifératif de l'oléate, incluant les protéines Gi/o, *src*, MEK1/2, PI3K, PLC ainsi que GPR40, devraient contribuer également à son effet antiapoptotique. Par exemple, lorsque l'on bloque l'activité de la PI3K dans ces cellules à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique en présence d'oléate, nous restaurons l'activité de la caspase-3 au même niveau que la situation de carence en sérum. Somme toute, en supposant que cet effet antiapoptotique peut être extrapolé à la situation *in vivo* et en sachant que les cellules situées au centre d'une tumeur cancéreuse meurent par apoptose du à un environnement pauvre en nutriment (Acker and Plate, 2002), il est possible de postuler que la présence d'oléate à de plus hautes concentrations pourrait favoriser la survie de ces cellules augmentant ainsi leur potentiel métastatique. Ainsi une diète riche en oléate et l'obésité pourrait favoriser ce processus par un tel mécanisme.

L'effet proapoptotique du palmitate dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 est contrecarré par l'oléate. De plus, la combinaison de ces deux acides gras en concentration équimolaire résulte en une augmentation de la prolifération de cette lignée cellulaire. L'action antiapoptotique de l'oléate contrecarant l'effet du palmitate a aussi été observée dans plusieurs types cellulaires (Cnop et al., 2001; Listenberger et al., 2003; Mishra and Simonson, 2005). Les effets opposés des différents acides gras sur la prolifération des cellules du cancer du sein peuvent expliquer pourquoi les études épidémiologiques et les études chez les animaux utilisant différentes diètes ont produit des résultats inconsistants. En effet, les études *in vivo* chez les animaux utilisent des huiles riches en un type d'acide gras particulier mais qui contiennent aussi d'autres acides gras qui pourraient influencer la croissance des tumeurs de façons différentes. Ainsi, comme les acides gras sont normalement accessibles aux cellules sous formes d'un mélange d'acides gras, l'effet prolifératif des acides gras insaturés serait plus important que l'action proapoptotique des acides gras saturés sur la promotion du cancer du sein. Aussi, en plus de son effet protecteur contre la carence en sérum et le palmitate, l'oléate protège de l'apoptose induite par les cytokines dans les cellules β -pancréatiques (Welters et al., 2004). Il serait intéressant de déterminer l'effet protecteur potentiel de l'oléate sur les agents thérapeutiques utilisés pour traiter le cancer du sein comme entre autre le tamoxifène, le taxol ou l'herceptine (trastuzumab). À plus long terme, selon les résultats obtenus, nous pourrions également comparer l'efficacité de ces agents chimiothérapeutiques chez les femmes non-obèses versus les femmes obèses atteint d'un cancer du sein.

Le mécanisme impliqué dans cette protection par l'oléate de l'effet proapoptotique du palmitate implique principalement le fait que l'oléate provoque l'estérification du palmitate en triglycérides, dirigeant ainsi le palmitate vers une voie métabolique autre que celle menant à l'apoptose. En effet, la présence d'oléate empêche le palmitate de provoquer une diminution du niveau de cardiolipine ainsi que l'accumulation de ces précurseurs. Il a été démontré dans des cellules ne possédant pas la diacylglycérol acyltransférase, l'enzyme responsable de la dernière étape de

l'estérification des acides gras en triglycéride, une sensibilité accrue à la lipotoxicité (Listenberger et al., 2003). De plus, les cellules CHO surexprimant la stéaroyl-CoA désaturase, l'enzyme responsable de la conversion des acides gras saturés en acides gras insaturés, sont protégées de l'apoptose induite par le palmitate, ce qui suggère que le pool d'acides gras insaturés produit par la stéaroyl-CoA désaturase à partir du palmitate est incorporé dans les triglycérides (Listenberger et al., 2003). Ainsi, il semble que l'effet antiapoptotique de l'oléate contre l'action apoptotique du palmitate implique principalement une modification du métabolisme du palmitate.

La contribution des voies de signalisations impliquées dans la prolifération cellulaire induite par l'oléate ne peut pas être écartée concernant l'effet antiapoptotique de l'oléate contre l'action apoptotique du palmitate. Par contre, la PI3K n'est pas impliquée dans cet effet antiapoptotique de l'oléate face au palmitate contrairement à la carence en sérum. Le même phénomène a également été observé dans la lignée cellulaire β -pancréatique de rat BRIN-BD11 (Welters et al., 2004). Par contre, dans une autre lignée cellulaire β -pancréatique de rat, les RINm5F, il a été observé que l'effet protecteur de l'oléate contre l'apoptose induite par le palmitate est dépendante de la PI3K (Beeharry et al., 2004). Aussi, de façon surprenante, nous observons que l'inhibiteur de la PI3K diminue l'effet apoptotique du palmitate ce qui suggère que la diminution de l'activité de la PI3K observé en présence de palmitate ne serait pas responsable de l'apoptose induite par cet acide gras saturé. Il serait intéressant d'utiliser un dominant négatif de la PI3K qui permettrait de confirmer les résultats obtenus avec les inhibiteurs pharmacologiques qui peuvent avoir des effets non-spécifiques. Nous pourrions également mesurer l'implication des protéines *Gi/o*, *src*, MEK1/2 et PLC dans l'effet protecteur de l'oléate en présence de palmitate comme nous l'avons fait pour la PI3K. De plus, avec le RNAi contre GPR40, nous pourrions étudier la contribution de GPR40 dans l'effet antiapoptotique de l'oléate ainsi que l'implication de ce récepteur dans l'action proapoptotique du palmitate. Par contre, comme le palmitate en présence d'albumine ne semble pas activer GPR40, il serait peu probable que son effet proapoptotique soit médié par ce récepteur comme nous l'avons montré avec des mesures de calcium cytosolique.

Conclusion

Cette étude nous a permis de proposer le modèle suivant en ce qui concerne l'action proapoptotique des acides gras saturés (Fig. 9). Une diminution du niveau de cardiolipine due à une diminution de sa synthèse et une augmentation de son turnover, génère un pool soluble de cytochrome c qui est relargué de la mitochondrie. Le cytochrome c au niveau du cytosol va former l'apoptosome en se liant à la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9 menant ainsi à l'activation des caspases et la mort cellulaire. Au contraire, l'oléate bloque l'apoptose car il redirige le palmitate vers les triglycérides rétablissant ainsi la synthèse de cardiolipine ainsi qu'une diminution de son turnover. De plus, les acides gras insaturés stimulent la prolifération cellulaire et cette étude a permis de suggérer une cascade d'évènements reliée à l'effet prolifératif de ce type d'acides gras. L'oléate lie GPR40 et possiblement d'autres récepteurs aux acides gras couplés aux protéines Gi et Gq résultant ainsi en une activation des protéines src, MEK1/2 ainsi que les voies de signalisation PI3K/AKT et PLC/Ca²⁺. L'intégration et la coopération de ces signaux de transduction vont mener à la prolifération cellulaire induite par l'oléate. Ainsi, en plus de son effet métabolique, cet acide gras insaturé agit comme une molécule de signalisation extracellulaire qui régule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires via un récepteur aux acides gras. Donc, GPR40 n'est pas uniquement important pour la sécrétion d'insuline mais semble aussi jouer un rôle dans la croissance des cellules tumorales. GPR40 pourrait ainsi établir un lien entre l'obésité et le cancer. D'ailleurs, plusieurs évidences suggèrent une association entre la résistance à l'insuline, l'obésité, le diabète de type 2 et le cancer du sein.

L'ensemble des résultats supporte l'idée que le type d'acide gras influence différemment la carcinogenèse mammaire ce qui devrait avoir des implications pour la compréhension du lien entre les acides gras et le cancer. Nos observations peuvent aussi expliquer les contradictions existant dans la littérature en démontrant que les effets de différents acides gras ne sont pas équivalents en ce qui concerne la croissance cellulaire

et la promotion des tumeurs mammaires. Enfin, nos résultats combinés avec ceux obtenus à partir des études épidémiologiques et avec des animaux, sont importants pour mieux définir des stratégies thérapeutiques et des recommandations nutritionnelles pour prévenir le cancer.

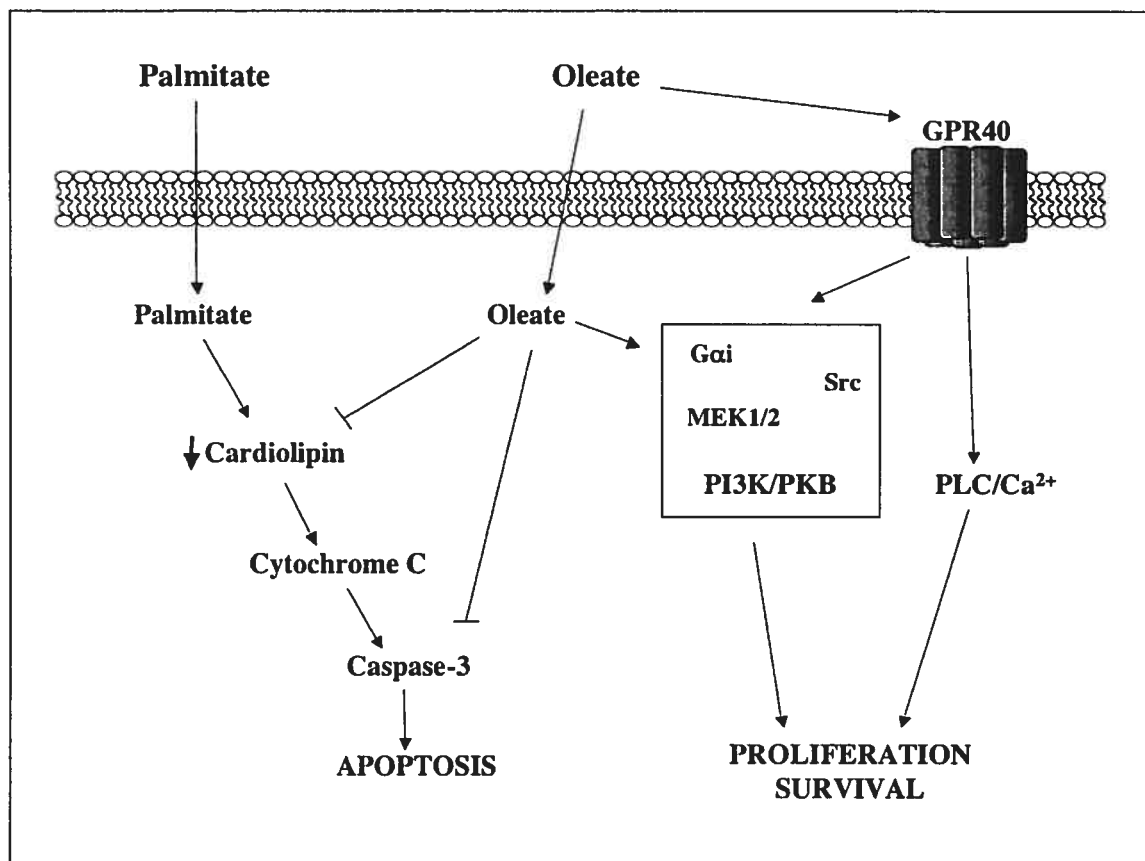


Figure 9 : Voies de signalisation impliquées lors de la prolifération et l'apoptose des cellules du cancer du sein en réponse aux acides gras.

PERSPECTIVES DU PROJET:

Les perspectives proposées dans cette section portent principalement sur le rôle de GPR40 dans la promotion du cancer du sein. La plupart des expériences suggérées se feront avec l'oléate mais d'autres acides gras pourront aussi être testés.

1) Définir le mécanisme moléculaire par lequel GPR40 participe à la signalisation intracellulaire dans les cellules du cancer du sein en réponse à l'oléate.

Étudier les voies de signalisation en aval de GPR40: Nos résultats ont démontré que GPR40 est impliqué dans la prolifération induite par l'oléate. Par contre, les voies de signaux de transduction en aval de l'activation de ce récepteur sont peu connues. La technologie du RNAi pourra permettre de mieux définir ces voies de signalisation. De plus, nous possédons des évidences que la protéine *src* ainsi que les voies de signalisation PI3K/AKT et PLC/Ca²⁺ sont impliqués dans l'effet prolifératif de l'oléate. Comme l'oléate active rapidement AKT dans les cellules MDA-MB-231, le RNAi contre GPR40 sera utilisé pour permettre d'évaluer la contribution de GPR40 dans l'activation de la voie PI3K/AKT. Il serait aussi intéressant de confirmer l'activation de *src* et PLC en réponse à l'oléate en mesurant directement l'activités de ces enzymes. L'utilisation du RNAi contre GPR40 pourrait également permettre d'évaluer la contribution de ces deux enzymes en réponse à l'activation de GPR40 par l'oléate. D'autres voies de signalisation comme Gβγ, certaines isoformes de la PKC, la p38MAPK pourront également être étudiées. Enfin, il serait important de valider notre approche pharmacologique à l'aide d'une approche moléculaire par l'utilisation de dominant négatif dans la prolifération cellulaire induite par l'oléate.

Étudier l'implication des arrestines en réponse à l'oléate : L'internalisation et la désensibilisation d'un GPCR pour en terminer sa signalisation impliquent les arrestines qui permettent aussi de recruter des partenaires des différentes voies signalétiques comme *src* et MEK1/2 (Luttrell and Lefkowitz, 2002) qui participent aussi dans la prolifération induite par l'oléate. L'oléate provoque le recrutement rapide à la

membrane d'une protéine chimérique GFP- β -arrestine surexprimée dans les cellules MDA-MB-231 ce qui suggère l'activation d'un GPCR en réponse à l'oléate (résultats non-montrés). Par contre, des expériences supplémentaires en microscopie confocale sont nécessaires pour confirmer ce résultat. Aussi, pour étudier le recrutement de l'arrestine par GPR40, la technologie de « bioluminescence résonance energy transfert » (BRET) sera utilisée (Milligan, 2004). Le BRET permet d'étudier les interactions entre deux protéines en mesurant le transfert d'énergie entre une protéine couplé à la luciférase (donneur) et une autre protéine couplé à la GFP (accepteur). Ainsi, des constructions GPR40-luciférase et GFP- β -arrestine pourraient être surexprimées dans les cellules MDA-MB-231 pour ensuite être stimulées par l'oléate. Un transfert d'énergie validerait cette interaction suggérant ainsi que GPR40 peut interagir avec l'arrestine en réponse à l'oléate permettant son internalisation et sa désensibilisation. De façon intéressante, le même type d'expérience pourrait être effectué avec une construction *src*-luciférase et GFP- β -arrestine pour étudier la possibilité d'une interaction entre ces protéines en réponse à l'oléate ce qui suggérerait l'activation de *src* via le recrutement de l'arrestine par un GPCR.

Étudier l'implication de GPR40 dans le métabolisme des acides gras: Comme l'effet antiapoptotique de l'oléate et possiblement son effet prolifératif impliquent son métabolisme, nous étudierons la contribution de GPR40 au niveau du métabolisme de cet acide gras. Il a été démontré que l'oléate provoque une accumulation de triglycéride dépendante de la voie AKT/PI3K (Whitehead et al., 2004) qui est aussi une voie impliquée dans l'effet prolifératif de l'oléate et qui pourrait être également activée en réponse à la liaison de l'oléate à GPR40. Ainsi, la partition lipidique de l'oléate sera étudiée suite à la surexpression de GPR40 ou la diminution de l'expression de GPR40 par le RNAi dans les cellules MDA-MB-231. En effet, la mesure de l'oxydation et de estérification en présence d'oléate dans ces conditions pourrait donner des indications sur le possible rôle de GPR40 dans le métabolisme de l'oléate. Ainsi, les niveaux de triglycérides, de diacylglycérol ainsi que les différentes espèces de phospholipides formés via l'activation de GPR40 pourraient être déterminés. Comme le métabolisme du glucose est important pour les cellules cancéreuses (Gatenby and Gillies, 2004),

celui-ci pourrait également être étudié suite à la surexpression de GPR40 ou suite la diminution de l'expression de GPR40 par le RNAi dans les cellules MDA-MB-231. Ainsi, le lien entre un récepteur aux acides gras impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses et le métabolisme du glucose, qui est important pour la prolifération des cellules tumorales, pourrait être établi.

2) Étudier l'expression de GPR40 et GPR120 dans les tumeurs du cancer du sein

La surexpression de certains GPCRs, comme celui au chemokine CXCR4 (Li et al., 2004) et à l'endotheline-1 (Wulfing et al., 2004), a été décrite dans le cancer du sein impliquant ainsi ces GPCRs dans la progression tumorale. Due à son implication possible dans la prolifération des cellules du cancer du sein, l'expression de GPR40 est un lien potentiel entre le cancer du sein et l'action des acides gras. Une mesure des niveaux de GPR40 dans les tumeurs mammaires humaines en comparaison avec les tissus normaux sera effectuée. Pour ce faire, l'expression du niveau de la protéine GPR40 sera mesuré par immunohistochimie dans les tissus cancéreux mammaires et cette expression sera corrélée selon le grade histopathologique. De plus, il serait aussi intéressant de mesurer l'expression de GPR40 dans les tissus cancéreux mammaires des patients obèses vs les tissus cancéreux mammaires des patients non-obèses. Une corrélation positive entre l'expression de GPR40 et le cancer du sein démontrerait que ce GPCR pourrait être impliqué dans la progression tumorale et pourrait être utilisé comme un marqueur pronostique. Les mêmes expériences seront effectuées avec un autre récepteur aux acides gras, GPR120 (Hirasawa et al., 2005), dont l'expression aura préalablement été confirmée dans les lignées cellulaires du cancer du sein.

3) Utiliser des modèles de souris transgéniques pour étudier le rôle des acides gras dans la promotion du cancer du sein

Étudier le rôle in vivo de GPR40 dans la promotion de la carcinogenèse mammaire. L'interprétation de nos résultats est limitée par le fait que les travaux de recherche ont été effectués sur des lignées cellulaires en culture. L'utilisation de modèles de souris pourrait permettre de valider certaines hypothèses dans un environnement physiologique. Ces expériences ont pour but d'étudier la contribution de GPR40 dans la promotion du cancer du sein. Ainsi, le gène codant pour GPR40 chez la souris sera inactivé par recombinaison homologe dans le but de générer une souris *-/-* pour GPR40. Pour étudier le rôle *in vivo* de GPR40 dans la promotion du cancer, ces souris *-/-* pour GPR40 (et des souris GPR40 *+/+*) seront croisées avec des souris surexprimant Her-2/*neu*, un modèle animal de cancer mammaire bien connu (Andrechek et al., 2000). En effet, ces souris développent des tumeurs mammaires en moyenne 120 jours suivant leurs naissances et, par la suite, des métastases principalement aux poumons. Aussi, le gène Her-2/*neu* est amplifié dans 25-30 % des cancers du sein (Zhou and Hung, 2003). De façon intéressante, il existe un rôle biochimique vital entre Her-2/*neu*, le métabolisme des acides gras et la croissance des cellules tumorales (Alli et al., 2005). Une étude sera effectuée entre autre sur la formation des tumeurs en fonction du temps ainsi que sur la survie des souris GPR40 *-/-* (Her-2/*neu*) en comparaison des souris GPR40 *+/+* (Her-2/*neu*). La capacité des cellules cancéreuses mammaires de ces souris à migrer et envahir une matrice artificielle sera aussi étudiée pour évaluer leurs potentiels métastatiques. De plus, une lignée de souris transgénique où GPR40 est surexprimé spécifiquement dans les cellules mammaires des souris (White et al., 2001) sera générée dans le but de croiser ces souris avec le modèle de souris surexprimant Her-2/*neu*. Par la suite, les mêmes mesures que pour les expériences avec les souris GPR40 *-/-* seront effectuées. Ces expériences vont permettre d'impliquer GPR40 dans la progression tumorale et indirectement les acides gras.

Étudier la contribution des acides gras dans la promotion de la carcinogenèse mammaire. Les études utilisant des modèles animaux pour mesurer l'implication des acides gras dans la promotion du cancer du sein, se servent d'animaux traités avec des fortes doses de substances chimiques cancérigènes pour induire des tumeurs mammaires spontanées (Ishikawa et al., 2001). Il existe maintenant des modèles génétiques de

cancer mammaire de souris bien établis qui pourrait refléter de façon plus réelle la progression tumorale comme c'est le cas pour le modèle de souris surexprimant Her-2/neu. Ainsi, ces souris seront exposées à une diète riche en gras dans le but de mesurer la formation des tumeurs en fonction du temps et aussi leurs potentiels métastatiques. La comparaison va se faire avec des souris exposées à une diète faible en gras. Le ratio des types d'acides gras (saturés vs insaturés) présent dans la diète riche en gras sera varié dans le but de vérifier l'hypothèse que les types d'acides gras influencent différemment la croissance des cellules cancéreuses du sein. Ce type d'expérience sera également effectué avec les souris GPR40 $-/-$ (Her-2/neu), les souris GPR40-surexprimé (Her-2/neu) (voir section précédente) ainsi qu'avec leur contrôle respectif. Ces résultats vont permettre de comprendre le rôle des acides gras dans la progression tumorale et l'implication de GPR40 dans la promotion du cancer du sein en réponse aux acides gras.

BIBLIOGRAPHIE:

- Abdi-Dezfuli, F., Froyland, L., Thorsen, T., Aakvaag, A., and Berge, R. K. (1997). Eicosapentaenoic acid and sulphur substituted fatty acid analogues inhibit the proliferation of human breast cancer cells in culture. *Breast Cancer Res Treat* 45, 229-239.
- Acker, T., and Plate, K. H. (2002). A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med* 80, 562-575.
- Akbar, M., and Kim, H. Y. (2002). Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J Neurochem* 82, 655-665.
- Alli, P. M., Pinn, M. L., Jaffee, E. M., McFadden, J. M., and Kuhajda, F. P. (2005). Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* 24, 39-46.
- Alo, P. L., Visca, P., Marci, A., Mangoni, A., Botti, C., and Di Tondo, U. (1996). Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 77, 474-482.
- Anderson, K. E., Coadwell, J., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 8, 684-691.
- Andrecheck, E. R., Hardy, W. R., Siegel, P. M., Rudnicki, M. A., Cardiff, R. D., and Muller, W. J. (2000). Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3444-3449.
- Andresen, B. T., Rizzo, M. A., Shome, K., and Romero, G. (2002). The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett* 531, 65-68.
- Arita, K., Kobuchi, H., Utsumi, T., Takehara, Y., Akiyama, J., Horton, A. A., and Utsumi, K. (2001). Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Pharmacol* 62, 821-828.
- Bakillah, A., and El Abbouyi, A. (2003). The role of microsomal triglyceride transfer protein in lipoprotein assembly: an update. *Front Biosci* 8, d294-305.

- Ballard-Barbash, R., and Swanson, C. A. (1996). Body weight: estimation of risk for breast and endometrial cancers. *Am J Clin Nutr* 63, 437S-441S.
- Baron, A., Migita, T., Tang, D., and Loda, M. (2004). Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem* 91, 47-53.
- Bartsch, H., Nair, J., and Owen, R. W. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20, 2209-2218.
- Bauer, G. (2002). Signaling and proapoptotic functions of transformed cell-derived reactive oxygen species. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 41-56.
- Beeharry, N., Chambers, J. A., and Green, I. C. (2004). Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. *Apoptosis* 9, 599-607.
- Begin, M. E., Ells, G., Das, U. N., and Horrobin, D. F. (1986). Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Natl Cancer Inst* 77, 1053-1062.
- Bergsten, P. (2002). Role of oscillations in membrane potential, cytoplasmic Ca²⁺, and metabolism for plasma insulin oscillations. *Diabetes* 51 *Suppl 1*, S171-176.
- Bingham, S. A., Luben, R., Welch, A., Wareham, N., Khaw, K. T., and Day, N. (2003). Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet* 362, 212-214.
- Boya, P., Morales, M. C., Gonzalez-Polo, R. A., Andreau, K., Gourdier, I., Perfettini, J. L., Larochette, N., Deniaud, A., Baran-Marszak, F., Fagard, R., *et al.* (2003). The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family. *Oncogene* 22, 6220-6230.
- Brazil, D. P., Yang, Z. Z., and Hemmings, B. A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29, 233-242.
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M., and Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608-8618.

- Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., Ellis, C., Elshourbagy, N. A., Goetz, A. S., Minnick, D. T., *et al.* (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278, 11303-11311.
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., *et al.* (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278, 11312-11319.
- Buckman, D. K., Chapkin, R. S., and Erickson, K. L. (1990). Modulation of mouse mammary tumor growth and linoleate enhanced metastasis by oleate. *J Nutr* 120, 148-157.
- Buckman, D. K., Hubbard, N. E., and Erickson, K. L. (1991). Eicosanoids and linoleate-enhanced growth of mouse mammary tumor cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 44, 177-184.
- Buteau, J., Foisy, S., Joly, E., and Prentki, M. (2003). Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 52, 124-132.
- Byrne, C., Rockett, H., and Holmes, M. D. (2002). Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer risk: lack of an association among postmenopausal women with no history of benign breast disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 261-265.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., and Hamm, H. E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 24, 765-781.
- Calle, E. E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4, 579-591.
- Calle, E. E., and Thun, M. J. (2004). Obesity and cancer. *Oncogene* 23, 6365-6378.
- Carafoli, E. (2004). The ambivalent nature of the calcium signal. *J Endocrinol Invest* 27 *Suppl*, 134-136.

- Carey, M. C., Small, D. M., and Bliss, C. M. (1983). Lipid digestion and absorption. *Annu Rev Physiol* 45, 651-677.
- Carriere, F., Barrowman, J. A., Verger, R., and Laugier, R. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 105, 876-888.
- Carroll, K. K. (1991). Dietary fats and cancer. *Am J Clin Nutr* 53, 1064S-1067S.
- Chajes, V., Sattler, W., Stranzl, A., and Kostner, G. M. (1995). Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: relationship to peroxides and vitamin-E. *Breast Cancer Res Treat* 34, 199-212.
- Chang, C. H., Chey, W. Y., and Chang, T. M. (2000). Cellular mechanism of sodium oleate-stimulated secretion of cholecystokinin and secretin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G295-303.
- Chang, L. C., and Wang, J. P. (2001). Signal transduction pathways for activation of extracellular signal-regulated kinase by arachidonic acid in rat neutrophils. *J Leukoc Biol* 69, 659-665.
- Cho, E., Spiegelman, D., Hunter, D. J., Chen, W. Y., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., and Willett, W. C. (2003). Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 1079-1085.
- Chong, H., Vikis, H. G., and Guan, K. L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 15, 463-469.
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., and Toker, A. (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 8, 1069-1077.
- Cifone, M. G., Alesse, E., Di Marzio, L., Ruggeri, B., Zazzeroni, F., Moretti, S., Famularo, G., Steinberg, S. M., Vullo, E., and De Simone, C. (1997). Effect of L-carnitine treatment in vivo on apoptosis and ceramide generation in peripheral blood lymphocytes from AIDS patients. *Proc Assoc Am Physicians* 109, 146-153.
- Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L., and Pipeleers, D. G. (2001). Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50, 1771-1777.

- Cohen, L. A., Rose, D. P., and Wynder, E. L. (1993). A rationale for dietary intervention in postmenopausal breast cancer patients: an update. *Nutr Cancer* 19, 1-10.
- Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43, 134-176.
- Coleman, R. A., Smith, W. L., and Narumiya, S. (1994). International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46, 205-229.
- Cong, L. N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M. A., Taylor, S. I., and Quon, M. J. (1997). Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 11, 1881-1890.
- Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Coyle, Y. M. (2004). The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 84, 273-288.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Cross, T. G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M., and Lord, J. M. (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256, 34-41.
- Cui, Z., and Houweling, M. (2002). Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1585, 87-96.
- Das, U. N. (1999). Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61, 157-163.
- Daub, H., Wallasch, C., Lanckenau, A., Herrlich, A., and Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo J* 16, 7032-7044.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476, 118-123.
- De Schrijver, E., Brusselmans, K., Heyns, W., Verhoeven, G., and Swinnen, J. V. (2003). RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene

- attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 63, 3799-3804.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., Hue, L., and Rider, M. H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem* 272, 17269-17275.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-688.
- Diaz-Guerra, M. J., Junco, M., and Bosca, L. (1991). Oleic acid promotes changes in the subcellular distribution of protein kinase C in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 266, 23568-23576.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Dulin, N. O., Sorokin, A., and Douglas, J. G. (1998). Arachidonate-induced tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor and Shc-Grb2-Sos association. *Hypertension* 32, 1089-1093.
- Duval, C., Auge, N., Frisach, M. F., Casteilla, L., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (2002). Mitochondrial oxidative stress is modulated by oleic acid via an epidermal growth factor receptor-dependent activation of glutathione peroxidase. *Biochem J* 367, 889-894.
- Dwyer, J. T. (1997). Human studies on the effects of fatty acids on cancer: summary, gaps, and future research. *Am J Clin Nutr* 66, 1581S-1586S.
- Eitel, K., Staiger, H., Rieger, J., Mischak, H., Brandhorst, H., Brendel, M. D., Bretzel, R. G., Haring, H. U., and Kellerer, M. (2003). Protein kinase C delta activation and

- translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Diabetes* 52, 991-997.
- Escrich, E., Moral, R., Garcia, G., Costa, I., Sanchez, J. A., and Solanas, M. (2004). Identification of novel differentially expressed genes by the effect of a high-fat n-6 diet in experimental breast cancer. *Mol Carcinog* 40, 73-78.
- Fang, X., Schummer, M., Mao, M., Yu, S., Tabassam, F. H., Swaby, R., Hasegawa, Y., Tanyi, J. L., LaPushin, R., Eder, A., *et al.* (2002). Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 1582, 257-264.
- Fang, X., Yu, S., LaPushin, R., Lu, Y., Furui, T., Penn, L. Z., Stokoe, D., Erickson, J. R., Bast, R. C., Jr., and Mills, G. B. (2000). Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 352 Pt 1, 135-143.
- Fay, M. P., Freedman, L. S., Clifford, C. K., and Midthune, D. N. (1997). Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res* 57, 3979-3988.
- Felber, J. P., and Golay, A. (2002). Pathways from obesity to diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 2, S39-45.
- Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Canbay, A., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Ryzdzewski, R., Burgart, L. J., and Gores, G. J. (2004). Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 40, 185-194.
- Fernandez-Checa, J. C., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Mari, M., Miranda, M., and Ardite, E. (1998). Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 8, 7-11.
- Ferre, P. (2004). The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53 Suppl 1, S43-50.
- Filippa, N., Sable, C. L., Filloux, C., Hemmings, B., and Van Obberghen, E. (1999). Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 19, 4989-5000.
- Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L., and Johnson, C. L. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *Jama* 288, 1723-1727.

- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- Furuno, T., Kanno, T., Arita, K., Asami, M., Utsumi, T., Doi, Y., Inoue, M., and Utsumi, K. (2001). Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem Pharmacol* 62, 1037-1046.
- Futerman, A. H., and Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 5, 777-782.
- Gabriel, H. F., Melhem, M. F., and Rao, K. N. (1987). Enhancement of DMBA-induced mammary cancer in Wistar rats by unsaturated fat and cholestyramine. *In Vivo* 1, 303-307.
- Galanis, D. J., Kolonel, L. N., Lee, J., and Le Marchand, L. (1998). Anthropometric predictors of breast cancer incidence and survival in a multi-ethnic cohort of female residents of Hawaii, United States. *Cancer Causes Control* 9, 217-224.
- Gamberucci, A., Fulceri, R., Bygrave, F. L., and Benedetti, A. (1997). Unsaturated fatty acids mobilize intracellular calcium independent of IP3 generation and VIA insertion at the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 312-316.
- Gao, Y., Tang, S., Zhou, S., and Ware, J. A. (2001). The thromboxane A2 receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent Gi coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 426-433.
- Gasco, M., Shami, S., and Crook, T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 4, 70-76.
- Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899.
- Geiszt, M., and Leto, T. L. (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *J Biol Chem*.
- Goetzl, E. J., Dolezalova, H., Kong, Y., and Zeng, L. (1999). Dual mechanisms for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 59, 4732-4737.

- Goldenthal, M. J., and Marin-Garcia, J. (2004). Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem* 262, 1-16.
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., and Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2, 156-162.
- Graves, T. K., and Hinkle, P. M. (2003). Ca(2+)-induced Ca(2+) release in the pancreatic beta-cell: direct evidence of endoplasmic reticulum Ca(2+) release. *Endocrinology* 144, 3565-3574.
- Greco, S., Muscella, A., Elia, M. G., Salvatore, P., Storelli, C., Mazzotta, A., Manca, C., and Marsigliante, S. (2003). Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 196, 370-377.
- Green, D., and Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 8, 267-271.
- Grey, A., Chen, Q., Callon, K., Xu, X., Reid, I. R., and Cornish, J. (2002). The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase. *Endocrinology* 143, 4755-4763.
- Grijalba, M. T., Vercesi, A. E., and Schreier, S. (1999). Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* 38, 13279-13287.
- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 20, 1594-1600.
- Guicciardi, M. E., Leist, M., and Gores, G. J. (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23, 2881-2890.
- Gulbins, E. (2003). Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol Res* 47, 393-399.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Zechner, R. (2003). Letting lipids go: hormone-sensitive lipase. *Curr Opin Lipidol* 14, 289-297.

- Hajri, T., and Abumrad, N. A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr* 22, 383-415.
- Hamilton, J. A., and Kamp, F. (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48, 2255-2269.
- Hardy, R. W., Wickramasinghe, N. S., Ke, S. C., and Wells, A. (1997). Fatty acids and breast cancer cell proliferation. *Adv Exp Med Biol* 422, 57-69.
- Hawkins, R. A., Sangster, K., and Arends, M. J. (1998). Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism. *J Pathol* 185, 61-70.
- Hermans, E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 99, 25-44.
- Hickson-Bick, D. L., Buja, M. L., and McMillin, J. B. (2000). Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32, 511-519.
- Hii, C. S., Moghadammi, N., Dunbar, A., and Ferrante, A. (2001). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase B signaling pathway in arachidonic acid-stimulated human myeloid and endothelial cells: involvement of the ErbB receptor family. *J Biol Chem* 276, 27246-27255.
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 11, 90-94.
- Holbro, T., and Hynes, N. E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 195-217.
- Holmes, M. D., Hunter, D. J., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Hankinson, S. E., Speizer, F. E., Rosner, B., and Willett, W. C. (1999). Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *Jama* 281, 914-920.
- Hong, M. Y., Chapkin, R. S., Barhoumi, R., Burghardt, R. C., Turner, N. D., Henderson, C. E., Sanders, L. M., Fan, Y. Y., Davidson, L. A., Murphy, M. E., *et al.* (2002). Fish oil increases mitochondrial phospholipid unsaturation, upregulating reactive oxygen species and apoptosis in rat colonocytes. *Carcinogenesis* 23, 1919-1925.

- Hooks, S. B., Santos, W. L., Im, D. S., Heise, C. E., Macdonald, T. L., and Lynch, K. R. (2001). Lysophosphatidic acid-induced mitogenesis is regulated by lipid phosphate phosphatases and is Edg-receptor independent. *J Biol Chem* 276, 4611-4621.
- Hosoi, T., Koguchi, Y., Sugikawa, E., Chikada, A., Ogawa, K., Tsuda, N., Suto, N., Tsunoda, S., Taniguchi, T., and Ohnuki, T. (2002). Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J Biol Chem* 277, 31459-31465.
- Huang, J. M., Xian, H., and Bacaner, M. (1992). Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6452-6456.
- Huang, Y. S., Tseng, Y. Z., Wu, J. C., and Wang, S. M. (2004). Mechanism of oleic acid-induced gap junctional disassembly in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 37, 755-766.
- Hug, H., and Sarre, T. F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291 (Pt 2), 329-343.
- Hunter, D. J., and Willett, W. C. (1993). Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15, 110-132.
- Hwang, D., and Rhee, S. H. (1999). Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr* 70, 545-556.
- Hwang, S. C., Jhon, D. Y., Bae, Y. S., Kim, J. H., and Rhee, S. G. (1996). Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 271, 18342-18349.
- Ishikawa, T., Ide, F., Qin, X., Zhang, S., Takahashi, Y., Sekiguchi, M., Tanaka, K., and Nakatsuru, Y. (2001). Importance of DNA repair in carcinogenesis: evidence from transgenic and gene targeting studies. *Mutat Res* 477, 41-49.
- Islam, M. S. (2002). The ryanodine receptor calcium channel of beta-cells: molecular regulation and physiological significance. *Diabetes* 51, 1299-1309.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., *et al.* (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-176.

- Iverson, S. L., and Orrenius, S. (2004). The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 423, 37-46.
- Jiao, H., Cui, X. L., Torti, M., Chang, C. H., Alexander, L. D., Lapetina, E. G., and Douglas, J. G. (1998). Arachidonic acid mediates angiotensin II effects on p21ras in renal proximal tubular cells via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7417-7421.
- Kampert, J. B., Whittemore, A. S., and Paffenbarger, R. S., Jr. (1988). Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 128, 962-979.
- Kharroubi, I., Ladriere, L., Cardozo, A. K., Dogusan, Z., Cnop, M., and Eizirik, D. L. (2004). Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145, 5087-5096.
- Kilgore, M. W., Tate, P. L., Rai, S., Sengoku, E., and Price, T. M. (1997). MCF-7 and T47D human breast cancer cells contain a functional peroxisomal response. *Mol Cell Endocrinol* 129, 229-235.
- Kim, J. H., Kim, Y., Lee, S. D., Lopez, I., Arnold, R. S., Lambeth, J. D., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (1999). Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett* 454, 42-46.
- Kohlmeier, L., and Mendez, M. (1997). Controversies surrounding diet and breast cancer. *Proc Nutr Soc* 56, 369-382.
- Kotarsky, K., Nilsson, N. E., Flodgren, E., Owman, C., and Olde, B. (2003). A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 406-410.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60, 619-642.
- Kuhajda, F. P. (2000). Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 16, 202-208.
- Kuhajda, F. P., Pizer, E. S., Li, J. N., Mani, N. S., Frehywot, G. L., and Townsend, C. A. (2000). Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3450-3454.

- Kuhl, M. (2004). The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 9, 967-974.
- Kumar-Sinha, C., Ignatoski, K. W., Lippman, M. E., Ethier, S. P., and Chinnaiyan, A. M. (2003). Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res* 63, 132-139.
- Kushi, L., and Giovannucci, E. (2002). Dietary fat and cancer. *Am J Med* 113 Suppl 9B, 63S-70S.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.
- Lapillonne, H., Konopleva, M., Tsao, T., Gold, D., McQueen, T., Sutherland, R. L., Madden, T., and Andreeff, M. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 63, 5926-5939.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., and Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 79, 935-945.
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., and Parker, P. J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-2045.
- Lee, M. M., and Lin, S. S. (2000). Dietary fat and breast cancer. *Annu Rev Nutr* 20, 221-248.
- LeMarchand, L., Kolonel, L. N., and Nomura, A. M. (1985). Breast cancer survival among Hawaii Japanese and Caucasian women. Ten-year rates and survival by place of birth. *Am J Epidemiol* 122, 571-578.
- Leopold, P. (2004). Neuronal differentiation: TOR and insulin receptor pathways set the tempo. *Cell* 119, 4-5.
- Li, J. N., Gorospe, M., Chrest, F. J., Kumaravel, T. S., Evans, M. K., Han, W. F., and Pizer, E. S. (2001). Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity

- produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res* 61, 1493-1499.
- Li, Y. M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B. P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G. N., Yu, D., and Hung, M. C. (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6, 459-469.
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr., Ory, D. S., and Schaffer, J. E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3077-3082.
- Listenberger, L. L., Ory, D. S., and Schaffer, J. E. (2001). Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem* 276, 14890-14895.
- Liu, J., Liu, Z., Chuai, S., and Shen, X. (2003). Phospholipase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling are involved in the exogenous arachidonic acid-stimulated respiratory burst in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 74, 428-437.
- Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2004). Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766-2773.
- Louet, J. F., Chatelain, F., Decaux, J. F., Park, E. A., Kohl, C., Pineau, T., Girard, J., and Pegorier, J. P. (2001). Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem J* 354, 189-197.
- Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Del Guerra, S., Masini, M., Santangelo, C., Patane, G., Boggi, U., Piro, S., Anello, M., *et al.* (2002). Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51, 1437-1442.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2, 754-761.

- Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465.
- Maedler, K., Oberholzer, J., Bucher, P., Spinas, G. A., and Donath, M. Y. (2003). Monounsaturated Fatty Acids Prevent the Deleterious Effects of Palmitate and High Glucose on Human Pancreatic beta-Cell Turnover and Function. *Diabetes* 52, 726-733.
- Maedler, K., Spinas, G. A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., and Donath, M. Y. (2001). Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 50, 69-76.
- Malaney, S., and Daly, R. J. (2001). The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 101-113.
- Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.
- Mates, J. M., and Sanchez-Jimenez, F. M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 157-170.
- Maudsley, S., Pierce, K. L., Zamah, A. M., Miller, W. E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J., and Luttrell, L. M. (2000). The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 275, 9572-9580.
- McCullough, M. L., and Giovannucci, E. L. (2004). Diet and cancer prevention. *Oncogene* 23, 6349-6364.
- Menendez, J. A., Vellon, L., Mehmi, I., Oza, B. P., Ropero, S., Colomer, R., and Lupu, R. (2004). Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10715-10720.
- Merrill, A. H., Jr., and Jones, D. D. (1990). An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1044, 1-12.
- Metzger, F., and Kapfhammer, J. P. (2003). Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity. *Cerebellum* 2, 206-214.

- Michalik, L., Desvergne, B., and Wahli, W. (2004). Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer* 4, 61-70.
- Miinalainen, I. J., Chen, Z. J., Torkko, J. M., Pirila, P. L., Sormunen, R. T., Bergmann, U., Qin, Y. M., and Hiltunen, J. K. (2003). Characterization of 2-enoyl thioester reductase from mammals. An ortholog of YBR026p/MRF1p of the yeast mitochondrial fatty acid synthesis type II. *J Biol Chem* 278, 20154-20161.
- Milgraum, L. Z., Witters, L. A., Pasternack, G. R., and Kuhajda, F. P. (1997). Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 3, 2115-2120.
- Milligan, G. (2004). Applications of bioluminescence- and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. *Eur J Pharm Sci* 21, 397-405.
- Mills, G. B., and Moolenaar, W. H. (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 582-591.
- Mishra, R., and Simonson, M. S. (2005). Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and endonuclease G. *Cardiovasc Diabetol* 4, 2.
- Moller, J. V., Juul, B., and le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1286, 1-51.
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., and Giepmans, B. N. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26, 870-881.
- Morabia, A., Bernstein, M., Heritier, S., and Khatchatrian, N. (1996). Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am J Epidemiol* 143, 918-928.
- Moynahan, M. E. (2002). The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. *Oncogene* 21, 8994-9007.
- Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R. M., Martin, K. J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S., and Spiegelman, B. M. (1998). Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1, 465-470.
- Muise-Helmericks, R. C., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Malstrom, S. E., Tschlis, P. N., and Rosen, N. (1998). Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally

- via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 273, 29864-29872.
- Nabauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L., and Morad, M. (1989). Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* 244, 800-803.
- NCIC (2004).
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T., and Nakagawa, Y. (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 351, 183-193.
- Ohanian, J., and Ohanian, V. (2001). Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci* 58, 2053-2068.
- Ostrander, D. B., Sparagna, G. C., Amoscato, A. A., McMillin, J. B., and Dowhan, W. (2001). Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 276, 38061-38067.
- Paine, E., Palmantier, R., Akiyama, S. K., Olden, K., and Roberts, J. D. (2000). Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 275, 11284-11290.
- Palmantier, R., George, M. D., Akiyama, S. K., Wolber, F. M., Olden, K., and Roberts, J. D. (2001). Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu. *Cancer Res* 61, 2445-2452.
- Pariza, M. W. (1987). Dietary fat, calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer risk. *Nutr Rev* 45, 1-7.
- Park, Y., Allen, K. G., and Shultz, T. D. (2000). Modulation of MCF-7 breast cancer cell signal transduction by linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res* 20, 669-676.
- Paumen, M. B., Ishida, Y., Han, H., Muramatsu, M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., and Honjo, T. (1997a). Direct interaction of the mitochondrial membrane protein

- carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 523-525.
- Paumen, M. B., Ishida, Y., Muramatsu, M., Yamamoto, M., and Honjo, T. (1997b). Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 3324-3329.
- Perez, F. R., Camina, J. P., Zugaza, J. L., Lage, M., Casabiell, X., and Casanueva, F. F. (1997). cis-FFA do not alter membrane depolarization but block Ca²⁺ influx and GH secretion in KCl-stimulated somatotroph cells. Suggestion for a direct cis-FFA perturbation of the Ca²⁺ channel opening. *Biochim Biophys Acta* 1329, 269-277.
- Petrelli, J. M., Calle, E. E., Rodriguez, C., and Thun, M. J. (2002). Body mass index, height, and postmenopausal breast cancer mortality in a prospective cohort of US women. *Cancer Causes Control* 13, 325-332.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
- Pike, M. C., Pearce, C. L., and Wu, A. H. (2004). Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene* 23, 6379-6391.
- Pizer, E. S., Chrest, F. J., DiGiuseppe, J. A., and Han, W. F. (1998). Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 58, 4611-4615.
- Pizer, E. S., Thupari, J., Han, W. F., Pinn, M. L., Chrest, F. J., Frehywot, G. L., Townsend, C. A., and Kuhajda, F. P. (2000). Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 60, 213-218.
- Poitout, V. (2003). The ins and outs of fatty acids on the pancreatic beta cell. *Trends Endocrinol Metab* 14, 201-203.
- Popescu, N. C., and Zimonjic, D. B. (2002). Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J Cell Mol Med* 6, 151-159.
- Powell, D. J., Hajduch, E., Kular, G., and Hundal, H. S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 23, 7794-7808.

- Prentki, M., Biden, T. J., Janjic, D., Irvine, R. F., Berridge, M. J., and Wollheim, C. B. (1984). Rapid mobilization of Ca²⁺ from rat insulinoma microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 309, 562-564.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888.
- Radeff-Huang, J., Seasholtz, T. M., Matteo, R. G., and Brown, J. H. (2004). G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem* 92, 949-966.
- Raghupathi, R., and Franson, R. C. (1992). Inhibition of phospholipase A2 by cis-unsaturated fatty acids: evidence for the binding of fatty acid to enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1126, 206-214.
- Ravichandran, K. S. (2003). "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell* 113, 817-820.
- Reed, J. C. (2002). Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1, 111-121.
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S. C., Unterman, T. G., and Cohen, P. (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* 274, 17179-17183.
- Revoltella, R. P., Dal Canto, B., Caracciolo, L., and D'Urso, C. M. (1994). L-carnitine and some of its analogs delay the onset of apoptotic cell death initiated in murine C2.8 hepatocytic cells after hepatocyte growth factor deprivation. *Biochim Biophys Acta* 1224, 333-341.
- Reyes, N., Reyes, I., Tiwari, R., and Geliebter, J. (2004). Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett* 209, 25-35.
- Rose, D. P. (1997a). Dietary fatty acids and cancer. *Am J Clin Nutr* 66, 998S-1003S.
- Rose, D. P. (1997b). Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am J Clin Nutr* 66, 1513S-1522S.

- Rose, D. P., and Connolly, J. M. (1990). Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res* 50, 7139-7144.
- Rose, D. P., and Connolly, J. M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* 83, 217-244.
- Rose, D. P., and Connolly, J. M. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr Cancer* 37, 119-127.
- Rowinsky, E. K. (2004). The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med* 55, 433-457.
- Saha, A. K., Schwarsin, A. J., Roduit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., Prentki, M., and Ruderman, N. B. (2000). Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta -D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 275, 24279-24283.
- Sarau, H. M., Ames, R. S., Chambers, J., Ellis, C., Elshourbagy, N., Foley, J. J., Schmidt, D. B., Muccitelli, R. M., Jenkins, O., Murdock, P. R., *et al.* (1999). Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 56, 657-663.
- Sato, K., and Kawashima, S. (2001). Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol Chem* 382, 743-751.
- Sauer, L. A., Dauchy, R. T., and Blask, D. E. (2000). Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res* 60, 5289-5295.
- Sawzdargo, M., George, S. R., Nguyen, T., Xu, S., Kolakowski, L. F., and O'Dowd, B. F. (1997). A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 543-547.
- Schlame, M., Rua, D., and Greenberg, M. L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 39, 257-288.
- Schmitz-Peiffer, C., Craig, D. L., and Biden, T. J. (1999). Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in

- C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274, 24202-24210.
- Schubert, K. M., Scheid, M. P., and Duronio, V. (2000). Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem* 275, 13330-13335.
- Schulte, G., and Fredholm, B. B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 15, 813-827.
- Seidell, J. C., and Visscher, T. L. (2003). [Nutrition and health--obesity]. *Ned Tijdschr Geneesk* 147, 281-286.
- Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 60, 3504-3513.
- Shi, Y., and Burn, P. (2004). Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* 3, 695-710.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y. T., Levi, M., and Unger, R. H. (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2498-2502.
- Shimada, T., and Somlyo, A. P. (1992). Modulation of voltage-dependent Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth muscle. *J Gen Physiol* 100, 27-44.
- Singh, R. K., Hardy, R. W., Wang, M. H., Williford, J., Gladson, C. L., McDonald, J. M., and Siegal, G. P. (1995). Stearate inhibits human tumor cell invasion. *Invasion Metastasis* 15, 144-155.
- Sintchak, M. D., and Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* 47, 163-184.
- Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Adami, H. O., Beeson, W. L., van den Brandt, P. A., Folsom, A. R., Fraser, G. E., Freudenheim, J. L., Goldbohm, R. A., Graham, S., *et al.* (2001). Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 92, 767-774.

- Spiegel, S., and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 397-407.
- Stoll, B. A. (2002a). N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br J Nutr* 87, 193-198.
- Stoll, B. A. (2002b). Upper abdominal obesity, insulin resistance and breast cancer risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 747-753.
- Suhara, T., Mano, T., Oliveira, B. E., and Walsh, K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res* 89, 13-19.
- Sul, H. S., Latasa, M. J., Moon, Y., and Kim, K. H. (2000). Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *J Nutr* 130, 315S-320S.
- Sundram, K., Khor, H. T., Ong, A. S., and Pathmanathan, R. (1989). Effect of dietary palm oils on mammary carcinogenesis in female rats induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res* 49, 1447-1451.
- Terry, P. D., Rohan, T. E., and Wolk, A. (2003). 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* 77, 532-543.
- Thomas, G., and Hall, M. N. (1997). TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 9, 782-787.
- Trentham-Dietz, A., Newcomb, P. A., Storer, B. E., Longnecker, M. P., Baron, J., Greenberg, E. R., and Willett, W. C. (1997). Body size and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 145, 1011-1019.
- Unger, R. H., and Orci, L. (2002). Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta* 1585, 202-212.
- Vacaresse, N., Lajoie-Mazenc, I., Auge, N., Suc, I., Frisach, M. F., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1999). Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ Res* 85, 892-899.
- Velasco, G., Gomez del Pulgar, T., Carling, D., and Guzman, M. (1998). Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett* 439, 317-320.

- Verheij, M., Bose, R., Lin, X. H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., *et al.* (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* *380*, 75-79.
- Wakil, S. J. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* *28*, 4523-4530.
- Wang, M., Liu, Y. E., Ni, J., Aygun, B., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2000). Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an omega-3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. *Cancer Res* *60*, 6482-6487.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* *124*, 269-270.
- Welsch, C. W. (1992). Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res* *52*, 2040s-2048s.
- Welters, H. J., Tadayyon, M., Scarpello, J. H., Smith, S. A., and Morgan, N. G. (2004). Mono-unsaturated fatty acids protect against beta-cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure. *FEBS Lett* *560*, 103-108.
- White, D. E., Cardiff, R. D., Dedhar, S., and Muller, W. J. (2001). Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice. *Oncogene* *20*, 7064-7072.
- Whitehead, J. P., Simpson, F., Hill, M. M., Thomas, E. C., Connolly, L. M., Collart, F., Simpson, R. J., and James, D. E. (2004). Insulin and oleate promote translocation of inosine-5' monophosphate dehydrogenase to lipid bodies. *Traffic* *5*, 739-749.
- WHO (2004) World Health Organization.
- Wickramasinghe, N. S., Jo, H., McDonald, J. M., and Hardy, R. W. (1996). Stearate inhibition of breast cancer cell proliferation. A mechanism involving epidermal growth factor receptor and G-proteins. *Am J Pathol* *148*, 987-995.
- Wirfalt, E., Mattisson, I., Gullberg, B., Johansson, U., Olsson, H., and Berglund, G. (2002). Postmenopausal breast cancer is associated with high intakes of omega6 fatty acids (Sweden). *Cancer Causes Control* *13*, 883-893.

- Wise, A., Jupe, S. C., and Rees, S. (2004). The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 43-66.
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., and Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14, 473-486.
- Wrede, C. E., Dickson, L. M., Lingohr, M. K., Briaud, I., and Rhodes, C. J. (2002). Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 277, 49676-49684.
- Wright, M. M., Howe, A. G., and Zarembeg, V. (2004). Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. *Biochem Cell Biol* 82, 18-26.
- Wright, M. M., and McMaster, C. R. (2002). Phospholipid synthesis, diacylglycerol compartmentation, and apoptosis. *Biol Res* 35, 223-229.
- Wulfing, P., Diallo, R., Kersting, C., Wulfing, C., Poremba, C., Greb, R. R., Bocker, W., and Kiesel, L. (2004). Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep* 11, 791-796.
- Yamagishi, S., Okamoto, T., Amano, S., Inagaki, Y., Koga, K., Koga, M., Choei, H., Sasaki, N., Kikuchi, S., Takeuchi, M., and Makita, Z. (2002). Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes. *Mol Med* 8, 179-184.
- Yaney, G. C., Korchak, H. M., and Corkey, B. E. (2000). Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells. *Endocrinology* 141, 1989-1998.
- Yart, A., Chap, H., and Raynal, P. (2002). Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim Biophys Acta* 1582, 107-111.
- Yonezawa, T., Katoh, K., and Obara, Y. (2004). Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 805-809.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 277, 43553-43556.

- Zhang, W., and Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9-18.
- Zhou, B. P., and Hung, M. C. (2003). Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol* 30, 38-48.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.
- Zucchi, R., and Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 49, 1-51.
- Zylinska, L., and Soszynski, M. (2000). Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim Pol* 47, 529-539.