

2M11.2792.6

Université de Montréal

**Étude du rôle de l'action des acides gras dans la prolifération et l'apoptose
des cellules du cancer du sein**

par
Serge Hardy

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Biochimie

Avril, 2000

© Serge Hardy, 2000



Université de Montréal
Faculté de Médecine

ce mémoire intitulé:

**Étude du rôle de l'action des acides gras dans la prolifération et l'apoptose
des cellules du cancer du sein**

présenté par:

Serge Hardy

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Sylvie Mader: Président du jury

Dr Marc Prentki: Directeur de recherche

Dr Yves Langelier: Codirecteur de recherche

Dr Gérald van de Werve: Membre du jury

Mémoire accepté le: *28 août 2000*

SOMMAIRE

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 augmenter le risque de cancer du sein. De plus, il existe peu d'information concernant le mécanisme d'action des acides gras dans la carcinogenèse mammaire. Afin de mieux comprendre l'action des acides gras sur le développement du cancer du sein, nous avons étudié les effets de deux des acides gras les plus abondants de la circulation, l'oléate et le palmitate, sur quatre 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 (PARP) et une fragmentation de l'ADN. La diminution de la prolifération est donc associée à une mort des cellules par apoptose. De plus, le 2-bromopalmitate, un analogue du palmitate non métabolisable, n'a pas d'effet sur la prolifération suggérant ainsi que le palmitate doit être métabolisé pour exercer son effet apoptotique. 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 l'oléate. En effet, des inhibiteurs de la PI3K, la wortmannin et le LY294002 ont complètement bloqué l'effet prolifératif de l'oléate.

Il existe peu d'information concernant l'influence des acides gras sur l'induction de gène à réponse précoce. L'induction de ces gènes par les acides gras pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération et de

l'apoptose de différents types cellulaires. Nous avons testé cette hypothèse sur une lignée cellulaire du cancer du sein (MDA-MB-231) en présence d'oléate. Pour ce faire, nous avons utilisé les membranes de la compagnie Clontech (Atlas Arrays) possédant des fragments d'ADNc représentant 588 gènes différents codant pour des facteurs de transcription, des cytokines, des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs et des «housekeeping genes». Après incubation en présence d'oléate des cellules, une augmentation de l'expression de seulement six ARNm a été observée. En effet, on observe une faible induction (20-40%) des gènes *myc*, *fra-1* et cAMP-dependant transcription factor ATF-4 mais une induction significative (60-90%) des gènes Y box binding protein 1 (YB-1), 60S ribosomal protein L6 (DNA-binding protein TAX) et guanine nucleotide-binding protein G-S. Ceci nous a donc permis d'identifier des gènes candidats qui pourraient être impliqués dans la promotion du cancer du sein par l'oléate.

L'ensemble des résultats démontrent que les acides gras influencent considérablement leur action sur la prolifération ou l'apoptose des cellules cancéreuses du sein. De plus, ils supportent l'idée que le type d'acide gras (saturé, monoinsaturé et polyinsaturé) et leur ratio dans la diète influencent 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. Ces résultats devraient avoir des implications nutritionnelles et épidémiologiques pour la compréhension de l'étiologie de divers cancers.

TABLES DES MATIÈRES

Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xv
Dédicaces	xvi
1. INTRODUCTION	1
1.1 Cancer du sein: généralités	1
1.1.1 Statistiques	1
1.1.2 Pathologie	1
1.2 Études Épidémiologiques	2
1.3 Études expérimentales	5
1.3.1 études <i>in vivo</i> chez l'animal	5
1.3.2 études <i>in vitro</i>	6

1.4 Lien entre le cancer du sein et divers désordres métaboliques reliés aux acides gras	8
1.5 Cancer et métabolisme des acides gras	10
1.5.1 Rôle de la biosynthèse des lipides et de l'acide gras synthétase	10
1.5.2 La protéine S14	11
1.6 Les PPARs	12
1.6.1 Définition et rôle des PPARs	12
1.6.2 PPAR γ , thiazolidinediones et cancer	14
1.7 Acides gras et apoptose	14
1.7.1 Voie des céramides	15
1.7.2 Peroxydation des lipides	18
1.8 Transduction de signaux par les acides gras	19
1.8.1 Acylation des protéines	20
1.8.2 Messagers lipidiques	20
1.8.2.1 Les produits de la PI3K	21
1.8.2.2 Le diacylglycérol	21
1.8.2.3 L'acide lysophosphatidique et la sphingosine-1-phosphate	22
1.9 Molécules de signalisation activées par les acides gras	24
1.10 Acides gras et gènes à réponse précoce	26
2. THÉMATIQUE DU PROJET DE RECHERCHE	27

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES	29
3.1 Culture cellulaire	29
3.2 Mesures d'incorporation de thymidine tritiée	29
3.3 Mesure d'apoptose par comptage des cellules détachées	30
3.4 Analyse de la fragmentation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	30
3.5 Extraction des protéines totales et mesure du clivage de la PARP	31
3.6 Extraction de l'ARNm et analyse Northern	32
3.7 Synthèse des sondes d'ADNc et hybridation des membranes «Atlas™ cDNA expression array»	32
4. RÉSULTATS	34
4.1 L'oléate et le palmitate ont un effet opposé sur la prolifération des lignées humaines du cancer du sein	34
4.2 L'oléate est antiapoptotique et protège contre l'action apoptotique du palmitate	35
4.3 La prolifération induite par l'oléate est diminuée par des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K	37

4.4 L'oléate induit des gènes à réponse précoce	37
5. DISCUSSION	49
6. RÉFÉRENCES	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Liste des acides gras communs	9
Tableau II:	Induction de l'expression des gènes par l'oléate dans la lignée cellulaire MDA-MB-231	48

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Corrélation entre le pourcentage des calories provenant des graisses et la mortalité attribuable au cancer du sein de différentes populations	3
Figure 2:	Étude de migration et incidence du cancer du sein	3
Figure 3:	Méta-analyse d'études épidémiologiques représentant le risque relatif entre une diète riche en graisse et l'incidence du cancer du sein.	4
Figure 4:	Modèle du mode d'action des PPARs.	13
Figure 5:	Voies impliquées dans la production des céramides.	16
Figure 6:	Voie possible de l'induction de l'apoptose par les acides gras.	17
Figure 7:	Peroxydation des acides gras polyinsaturés.	18
Figure 8:	Cibles potentiels pouvant être modulées par les acides gras dans les différentes voies de signalisation intracellulaire.	19
Figure 9:	Structure de l'acide lysophosphatidique et de la sphingosine-1-phosphate.	22
Figure 10:	Synthèse de l'acide lysophosphatidique	23

Figure 11:	Activation des voies de signalisation induite par l'acide lysophosphatidique.	24
Figure 12:	Effet de l'oléate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans diverses lignées cellulaires du cancer du sein	39
Figure 13:	Effet du palmitate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans diverses lignées cellulaires du cancer du sein.	40
Figure 14:	Dose-dépendance de l'oléate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans la lignée cellulaire MDA-MB-231	41
Figure 15:	Dose-dépendance du palmitate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans la lignée cellulaire MDA-MB-231.	42
Figure 16:	Effets de l'oléate et du sérum sur la prolifération cellulaire de la lignée MDA-MB-231.	43
Figure 17:	L'oléate protège de l'apoptose induite par la carence en sérum et le palmitate.	44
Figure 18:	La protection par l'oléate de l'apoptose induite par le palmitate est dose-dépendante dans la lignée MDA-MB-231.	45

- Figure 19:** Effets des inhibiteurs de la PI3K sur la prolifération cellulaire induit par l'oléate dans la lignée MDA-MB-231. 46
- Figure 20:** Représentation des membranes «Atlas™ cDNA expression array» hybridées avec l'ADNc obtenu de la lignée MDA-MB-231 traitée et non-traitée à l'oléate. 47

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACS	Acyl-CoA synthase
BSA	Bovine serum albumin
CoA	Coenzyme A
CPT I	Carnitine palmitoyltransferase I
EGF	Epidermal growth factor
ERK	extracellular regulated kinase
FABP	Fatty acid binding protein
FAT	Fatty acid translocase
GSK-3	Glycogène synthase kinase 3
IGF-II	Insulin growth factor II
iNOS	NO synthase inductible
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JAK	Janus activated kinase
LPA	Acide lysophosphatidique
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR1	Multidrug resistance 1
NO	Oxyde nitrique
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PFK-2	6-phosphofructo-2-kinase
PI3K	Phosphatidylinostol 3-kinase
PKA	Protein kinase A

PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	PPAR response element
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
RXR	Retinoid X receptor
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S14	Spot 14
SAPK	Stress activated protein kinase
SPT	Sérine palmitoyltransférase
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TZD	Thiazolidinedione
YB-1	Y box binding protein 1

Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Marc Prentki, pour sa confiance en moi, ses encouragements et pour m'avoir guidé tout au long de ma maîtrise.

Je tiens aussi à remercier le Dr Yves Langelier pour ses précieux conseils et sa disponibilité.

Remerciements aussi à tous les membres du laboratoire pour l'aide et l'amitié que vous m'avez apportée. Je vous en suis très reconnaissant.

Je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien au cours de ces dernières années.

*À ma mère,
pour ses encouragements et sa
confiance en moi*

1. INTRODUCTION

1.1 Cancer du sein: généralités

1.1.1 *Statistiques*

Le cancer du sein est le troisième type de cancer en importance au monde et le plus commun chez les femmes. On estime qu'une femme sur neuf développera un cancer du sein au cours de son existence. En 1996, 910000 nouveaux cas d'incidence ont été rapportés dans le monde (WHO, 1997). De plus, environ 50% des cas d'incidence du cancer du sein se situent dans les pays les plus développés. En effet, on remarque que le cancer du sein est une des principales causes de mortalité chez la femme en Amérique du Nord et en Europe. Les taux d'incidence les plus bas se situent en Asie et en Afrique. En 1996, la mortalité attribuable au cancer du sein dans le monde a été estimée à environ 390000 c'est-à-dire 5,5% de tous les cancers (WHO, 1997). Seulement au Canada, on estime à 62800 les nouveaux cas d'incidence du cancer en 1999 chez la femme. De ce nombre, 18700 sont des cancers du sein et on estime à 5400 les femmes qui vont mourir de ce type de cancer (NCIC, 1999).

1.1.2 *Pathologie*

Bien que certains facteurs de risque pour le cancer du sein aient été identifiés, les événements et les facteurs précis responsables de l'initiation et la transformation des cellules épithéliales mammaires ne sont pas clairs. Il existe des indications que certains agents chimiques comme la fumée de tabac (Smith et al., 1994; Morabia et al., 1996), diverses substances lipophiles (Morris et Seifter, 1992) et des composés aromatiques aminés (Perera et al., 1995), seraient des

facteurs importants. A ce jour, les facteurs de risque les plus établis sont ceux associés aux facteurs hormonaux (White, 1987; 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 (Wu et al., 1999). Par contre, on ne connaît pas encore clairement l'influence de ces facteurs hormonaux dans la carcinogenèse mammaire. 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*. Des études récentes ont démontré qu'une mutation de *p53* affecte l'instabilité génomique et facilite l'amplification de l'oncogène *erbB2*. Ce dernier est un récepteur pour des facteurs de croissance et est un marqueur de pronostic pour le cancer du sein (Eyfjord et al., 1995). Il existe aussi d'autres oncogènes comme *Hras* et *myc* qui sont souvent mutés dans les cellules tumorales mammaires. On a également identifié des «gènes du cancer du sein» héréditaires que l'on nomme *BRCA-1* et *BRCA-2* (Ormiston, 1996; Cornelisse et al., 1996).

1.2 Études épidémiologiques

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 (figure 1) (Pariza, 1987; Welsch, 1992; Rose, 1997). 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 montrent 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 (figure 2).

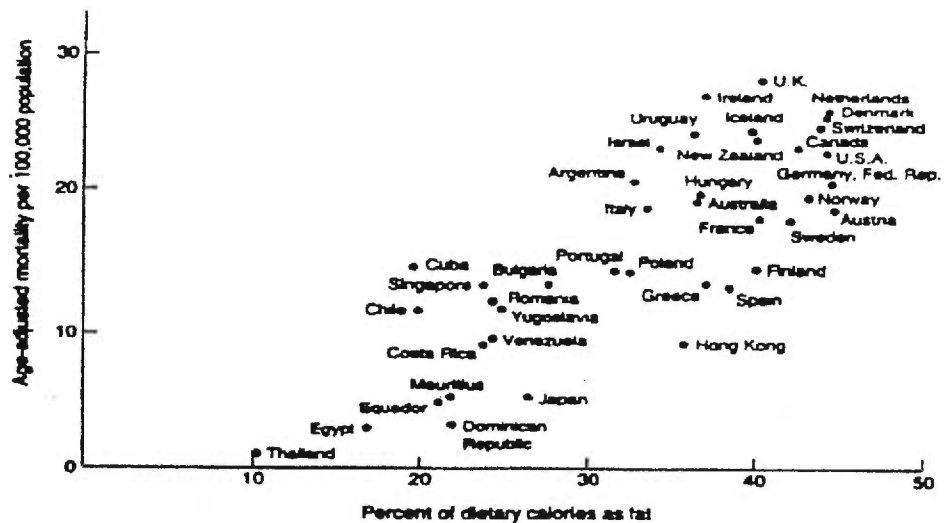


Figure 1: Corrélation entre le pourcentage des calories provenant des graisses et la mortalité attribuable au cancer du sein de différentes populations.

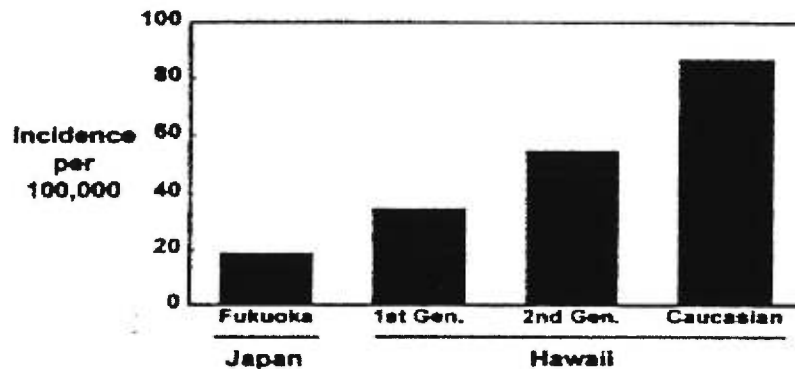


Figure 2: Étude de migration et incidence du cancer du sein

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 (case control studies) ainsi que par un grand nombre d'études utilisant des modèles animaux et des cellules du cancer du sein en culture (Cohen

et al., 1993). En revanche, de récentes études épidémiologiques (prospective studies) n'ont pas favorisé cette hypothèse (Willett et al., 1992; Hunter et Willett, 1993; Hunter et al., 1996) et une récente étude montre une corrélation inverse (Holmes et al., 1999). La question de savoir pourquoi les diverses études épidémiologiques ne sont pas aussi consistantes (figure 3) que les études avec les

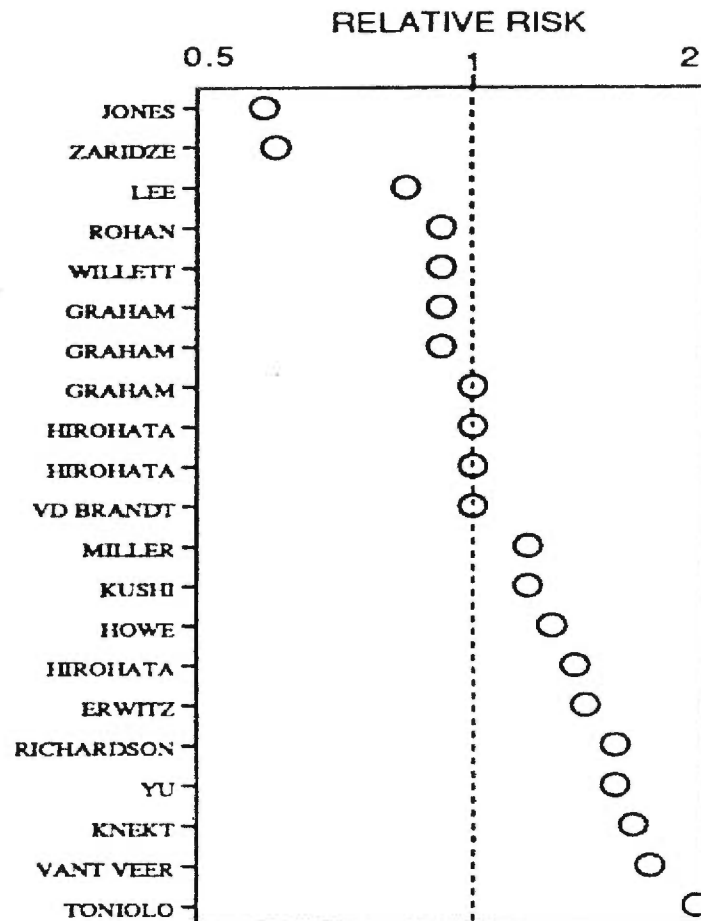


Figure 3: Méta-analyse d'études épidémiologiques représentant le risque relatif entre une diète riche en graisse et l'incidence du cancer du sein. Risque= 1 correspond à aucune corrélation, risque > 1 correspond à une corrélation positive et risque <1 correspond à une corrélation négative.

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. 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 niveau du développement du cancer du sein.

1.3 Études expérimentales

1.3.1 *Études in vivo 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. Une méta-analyse d'une centaine d'études sur des rongeurs indique que les acides gras polyinsaturés (n-6) augmentent le développement des tumeurs tandis que les acides gras saturés n'ont pas d'effet (Fay et al, 1997). De plus, Khor a démontré que les rats possédant des tumeurs mammaires induites par des agents chimiques 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 noix de coco) (Rose, 1997). 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. 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 et Connolly, 1999). De plus, il semble que l'huile de poisson a un effet protecteur sur le cancer du sein. Une hypothèse émise est que les acides gras oméga-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 et 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 (Cohen et al., 1986; Gabriel et al., 1987; Sundram et al., 1989). Par contre, on ne retrouve pas cette corrélation dans toutes les études (Welsch, 1992; Kohlmeier et Mendez, 1997). En effet, le ratio, 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).

1.3.2 Études *in vitro*

Les expériences *in vitro* permettent d'étudier l'effet de différents acides gras et leurs métabolites sur la croissance des cellules cancéreuses en culture. Différents effets des acides gras saturés et insaturés sur la prolifération cellulaire ont aussi été documentés sur des lignées épithéliales mammaires tumorales en culture (Sundram et al., 1989; Buckman et al., 1990; Buckman et Erickson, 1991a; Buckman et al., 1991b; Wickramasinghe et al., 1996). Rose et Connolly 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 et Connolly, 1990). De plus, ils observent 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 dépendantes des oestrogènes mais qu'il y avait une augmentation de la prolifération chez les lignées indépendantes des oestrogènes (Chajes et al., 1995). Généralement, les acides gras polyinsaturés comme le linoléate stimulent la prolifération cellulaire et ce peut-être en étant métabolisés en prostaglandines et en leukotriènes (Rose, 1997). De plus, tout comme dans les études chez les animaux, les acides gras omega-3 inhibent la croissance des cellules tumorales mammaires.

Il existe également des inconsistances pour 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; Rose et Connolly, 1990). En effet, certaines études *in vitro* ont testé l'action des acides gras non liés à l'albumine à des doses excédant leurs concentrations physiologiques. L'albumine est 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 empêcher d'exposer la cellule à des concentrations élevées d'acides gras libres ce qui peut avoir des conséquences néfastes pour celles-ci. En effet, l'albumine empêche de former des agrégats et des micelles insolubles qui peuvent se lier aux membranes ou avoir des effets non spécifiques détergents. Ceci soulève donc des doutes quant à la validité de certains résultats obtenus.

1.4 Lien entre le cancer du sein et divers désordres métaboliques reliés aux acides gras

Les graisses consommées par la diète contiennent divers types d'acides gras qui peuvent être saturés, monoinsaturés et polyinsaturés. Ces acides gras proviennent de sources animales et végétales. On retrouve principalement les acides gras sous formes estérifiées dans la diète c'est-à-dire sous forme de triglycérides. Lors de la digestion, ces triglycérides sont hydrolysés pour produire des acides gras libres qui vont se lier à des molécules d'albumine pour pouvoir être transportés dans la circulation. La concentration plasmatique en acide gras chez l'humain est environ de 400 μM et est appelée à augmenter suite à la prise d'un repas riche en graisse (Jungling et Kammermeier, 1988). Les principaux acides gras libres que l'on retrouve en circulation sont le palmitate (acide gras saturé à 16 carbone), l'oléate (acide gras monoinsaturé à 18 carbone) et le linoléate (acide gras polyinsaturé à 18 carbones) (van der Vusse et al., 1983). Le Tableau I représente les acides gras les plus communs. Les acides gras peuvent servir de constituants des membranes de phospholipides des cellules mais ils sont aussi impliqués dans la transduction de signaux. De plus, les acides gras servent de source d'énergie à la plupart des cellules. Par contre, il existe une controverse quant à savoir si les acides gras diffusent à travers la membrane des cellules ou s'il existe des transporteurs d'acides gras (Hamilton et Kamp, 1999).

Il existe une corrélation positive entre le cancer du sein et l'obésité, surtout chez les femmes post-ménopausées (Carroll, 1998). Cette même corrélation existe pour d'autres types de cancer comme le cancer du colon et le cancer de la prostate (Carroll, 1998). Il est généralement admis qu'une diète riche en acide gras augmente le risque d'obésité. De plus, les personnes obèses ont des quantités d'acides gras libres circulants plus élevées que des personnes non-obèses. Ces facteurs semblent donc favoriser l'hypothèse que les acides gras jouent un rôle important au niveau de la promotion du cancer du sein. On sait aussi qu'une

Tableau I: Liste des acides gras les plus communs

Nom commun	Nombre de carbone	Nom systématique	Famille ω ou n
Myristique	C14 :0	Tétradécanoïque	-----
Palmitique	C16 :0	Hexadécanoïque	-----
Stéarique	C18 :0	Octadécanoïque	-----
Arachidique	C20 :0	Eicosanoïque	-----
Palmitoléique	C16 :1	cis-9 Hexadécanoïque	-----
Oléique	C18 :1	cis-9-octadécenoïque	ω -9
Linoléique	C18 :2	cis-9,12-octadécenoïque	ω -6
Linoléinique	C18 :3	cis-9,12,15-octadécenoïque	ω -3
γ -Linoléinique	C18 :3	cis-6,9,12-octadécenoïque	ω -6
Arachidonique	C20 :4	cis-5,8,11,14-eicosatétraenoïque	ω -6
ETYA	C20 :4	5,8,11,14-eicosatétraénoïque	ω -6
EPA	C20 :5	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	ω -3
DHA	C22 :6	cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaénoïque	ω -3

fraction des personnes obèses (environ 15%) développent le diabète de type II (Jensen, 1998). Certaines études ont démontré une augmentation d'incidence du cancer du sein chez des femmes souffrant de ce type de diabète comparativement à des personnes n'ayant pas la maladie (Stoll, 1996).

1.5 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 tumorigénèse est encore à un stade peu avancé. Les dernières années ont permis de mettre en évidence certaines enzymes ou facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme des acides gras qui auraient un rôle important à jouer au niveau de la carcinogénèse.

1.5.1 Rôle de la biosynthèse des lipides et de l'acide gras synthétase

L'acide gras synthétase est une enzyme qui a été montrée dans plusieurs études comme étant surexprimée dans le cancer du sein (Alo et al., 1996; Milgraum et al., 1997; Alo et al., 1999) ainsi que d'autres cancers (Shurbaji et al., 1996; Rashid et al., 1997; Gansler et al., 1997; Pizer et al., 1998). Sa surexpression a aussi été identifiée *in situ* dans des carcinomes mammaires lobulaires et intraductaux qui sont des lésions associées à une augmentation des risques de développer un cancer infiltrant (Milgraum et al., 1997). L'acide gras synthétase est une enzyme clé de la synthèse des acides gras . Il catalyse la

condensation à l'aide du NADPH du malonyl-CoA et de l'acétyl-CoA pour produire principalement un acide gras saturé à 16 carbones, le palmitate (Wakil, 1989). Des mesures *ex vivo* dans des tissus tumoraux ont révélé des hauts niveaux d'acide gras synthétase et de synthèse d'acide gras, ce qui pourrait indiquer que les cellules sont très actives métaboliquement (Pizer et al., 1998). Dans les cellules du cancer du sein en culture, on a remarqué que lorsque l'on traite celles-ci avec la cerulenin, un inhibiteur de l'acide gras synthétase, on constate une forte diminution de la synthèse d'acide gras ainsi qu'un arrêt de synthèse d'ADN et du cycle cellulaire résultant en une induction de l'apoptose (Pizer et al., 1996; Pizer et al., 1998). Ces résultats suggèrent un rôle biochimique vital entre la synthèse d'acide gras et la croissance des cellules tumorales.

1.5.2 La protéine S14

Dans environ 20% des cancers du sein, on note une amplification au chromosome 11 (11q13) (Schuuring et al., 1992; Champeme et al., 1995). On pense que cette amplification à 11q13 résulte en une surexpression de gènes critiques pour la croissance tumorale. La découverte que le gène «Spot 14» (S14) réside à cet endroit du chromosome amplifié a permis de démontrer que celui-ci est surexprimé dans les cellules du cancer du sein (Moncur et al., 1998). S14 est une petite protéine qui est exprimée spécifiquement dans les tissus synthétisant des lipides comme le tissu adipeux et le foie (Jump et Oppenheimer, 1985). Dans le foie, son expression est rapidement induite par des stimuli permettant d'induire la synthèse d'acides gras comme le glucose ainsi que l'insuline (Jump et Oppenheimer, 1985) et inhibée par le glucagon ainsi que d'autres stimuli réduisant la lipogénèse (Kinlaw et al., 1986). Une hypothèse envisagée est que S14 régule de façon tissu-spécifique les gènes codant pour des enzymes de la synthèse lipidique. S14 établit donc un lien métabolique entre deux événements

impliqués dans la carcinogenèse mammaire: l'amplification de 11q13 et une augmentation de la synthèse des acides gras.

1.6 Les PPARs

On sait depuis quelques années que les acides gras provenant du métabolisme endogène et/ou de la nutrition peuvent agir comme seconds messagers et réguler certaines voies de transduction de signaux dans la cellule. Un récent développement dans le domaine de la transduction de signaux par les acides gras concerne les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor) qui sont des récepteurs nucléaires aux acides gras.

1.6.1 Définition et rôle des PPARs

La découverte récente des PPARs, a augmenté encore plus la complexité de la réponse cellulaire aux acides gras. En effet, on a démontré que ce récepteur nucléaire est capable de lier les acides gras et d'être activé par ceux-ci (figure 4) (Issemann et Green, 1990; Schmidt et al., 1992; Keller et al., 1993). Tout comme les autres récepteurs nucléaires, les PPARs sont des facteurs de transcription activés par des ligands qui contrôlent l'expression de certains gènes en interagissant avec une séquence spécifique d'ADN (PPRE; PPAR response element) située en amont de certains gènes cibles (Tugwood et al., 1992). Pour ce lier au PPRE, les PPARs doivent s'hétérodimériser avec RXR (retinoid X receptor). Il existe plusieurs gènes possédant un PPRE dont certains gènes du métabolisme des lipides comme l'acyl-CoA oxidase, la carnitine-palmitoyl transférase 1 et l'enzyme malique. Les nombreux gènes régulés par les acides gras via les PPARs ont des rôles importants dans le métabolisme des lipides, la différenciation cellulaire et la carcinogenèse.

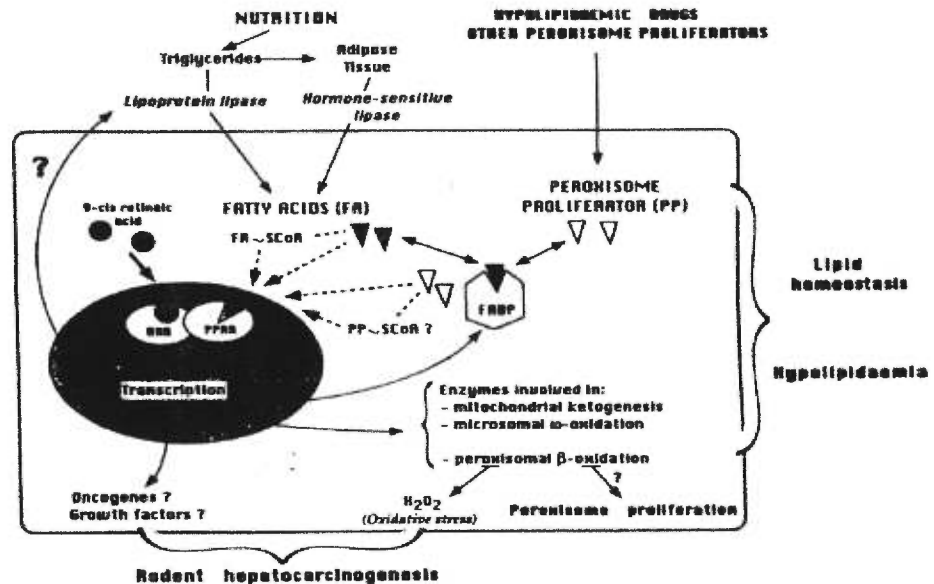


Figure 4: Modèle du mode d'action des PPARs. Les acides gras libres sont relâchés par les triglycérides circulants sous l'action de la lipoprotéine lipase. Dans le cytoplasme des cellules cibles, les acides gras se lient aux «fatty acid binding proteins» (FABP) et entrent aussi dans le noyau (possiblement après estérification) où ils activent les PPARs. Les PPARs hérodimérisent avec le facteur de transcription RXR et se lient à un élément de réponse DR-1 situé dans le promoteur de gènes cibles. La réponse résulte en une modulation positive ou négative de l'expression des gènes impliqués, entre autre, dans le métabolisme lipidique. (Wahli et al, 1997)

Il existe trois types de PPAR que l'on a catégorisé en sous-type: PPAR α , PPAR β et PPAR γ . Certains agents chimiques peuvent activer individuellement chacun des ces sous-types et la distribution tissulaire des PPARs est très variée (Braissant et Wahli, 1998; Desvergne et Wahli, 1999). En effet, PPAR α est fortement exprimé dans le foie, le cœur, le rein et le muscle squelettique. PPAR β est exprimé de façon ubiquitaire et quelque fois plus fortement que α et γ . 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. On ne connaît pas encore le rôle exact de PPAR β .

1.6.2 PPAR γ , thiazolidinediones et cancer

Il existe des indices expérimentaux indiquant que PPAR γ aurait un rôle à jouer dans la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'apoptose (Saez et al., 1998; Lefebvre et al., 1998; Sarraf et al., 1998; Demetri et al., 1999). Par exemple, l'activation de PPAR γ par des thiazolidinediones (TZDs), des ligands synthétiques spécifiques de PPAR γ , inhibe la prolifération et cause une accumulation de lipides dans les cellules épithéliales mammaires en culture (Kilgore et al., 1997; Mueller et al., 1998). Un autre groupe a démontré que l'ajout d'un agoniste de PPAR γ , induit l'apoptose *in vitro* et diminue la croissance des tumeurs mammaires chez les souris (Elstner et al., 1998). Les mêmes résultats ont été obtenus dans des lignées cellulaires humaines du cancer du sein avec un autre ligand de PPAR γ , la 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 (15dPGJ2) (Clay et al., 1999). Par contre, dans les tumeurs du colon, des ligands synthétiques (TZDs) de PPAR γ favorisent la formation de polypes (Saez et al., 1998; Lefebvre et al., 1998). Ces études démontrent que le rôle exact que PPAR γ joue dans la carcinogénèse n'est pas clair et que son activation peut résulter en une réponse différente selon les différents tissus.

1.7 Acides gras et apoptose

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. On nomme ce phénomène «mort cellulaire programmée» ou apoptose. Il est essentiel que ce processus soit régulé de façon contrôlée car une mort cellulaire excessive ou insuffisante va changer l'intégrité du tissu ce qui peut mener à des conséquences fatales pour l'organisme. Les cellules qui sont en apoptose sont caractérisées par des changements morphologiques distincts (condensation du noyau, fragmentation de la chromatine, bris de la cellule en corps cellulaire) et plusieurs gènes régulant ce processus ont été identifiés.

1.7.1 Voie des 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 (Paumen et al., 1997b). En effet, la synthèse *de novo* des céramides (figure 5) est initiée par la condensation par la serine palmitoyltransférase (SPT) d'une serine 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 (van Echten et Sandhoff, 1993).

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 (Mathias et al., 1998; Kolesnick et Kronke, 1998). 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»

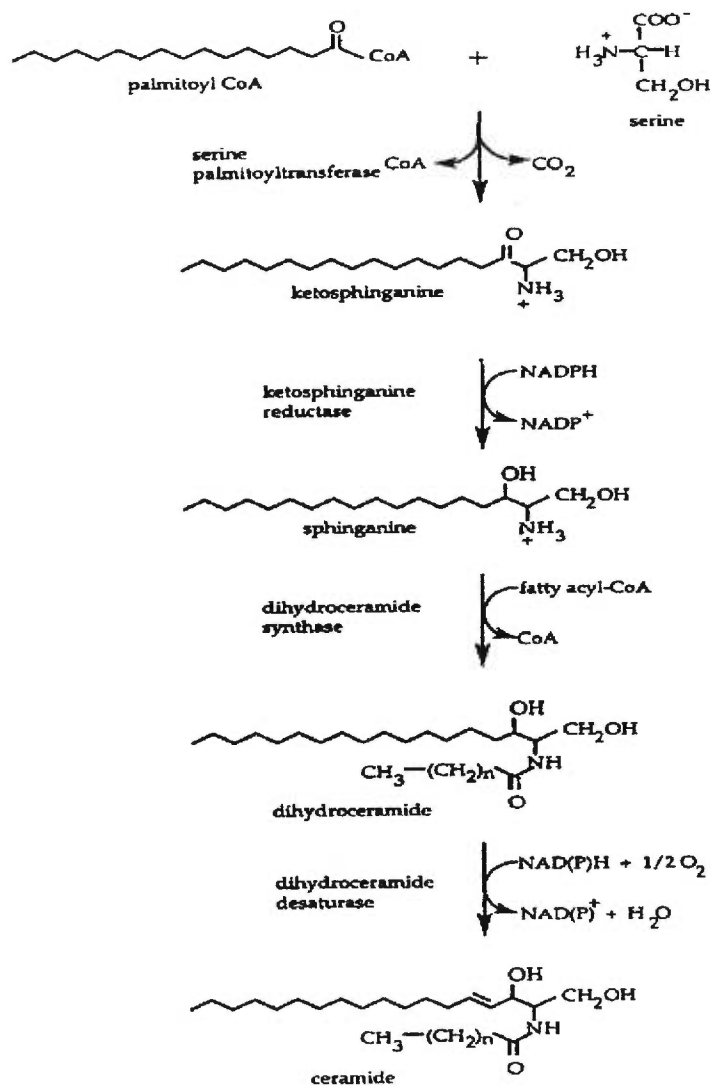


Figure 5: Voies impliquées dans la synthèse des céramides. (Perry et al, 2000)

(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 PKB/AKT, ce qui a pour effet d'inhiber l'effet antiapoptotique de ce dernier (Zundel et Giaccia, 1998; Zhou et al., 1998; Schmitz-Peiffer et al., 1999). Un groupe a aussi démontré que le palmitate et le stéarate induisent l'apoptose dans

des lignées hématopoïétiques de souris via la synthèse de céramides (Paumen et al., 1997b). Par contre, d'autres acides gras comme le myristate et le palmitoléate n'ont aucun effet apoptotique sur ces cellules (Paumen et al., 1997b). Dans les cellules β des îlots de Langerhans de rats diabétiques, on a corrélié l'apoptose induite par les acides gras avec la production de céramides (figure 6). De plus, les céramides stimulent l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) qui catalyse la formation du radical cytotoxique NO (Shimabukuro et al., 1998). Il a aussi été démontré que les céramides peuvent agir sur la voie de signalisation de la PKC (Gottlieb et Engler, 1999). Plusieurs résultats semblent démontrer que les céramides jouent un rôle important au niveau de l'apoptose et que comprendre leurs modes d'action permettra de développer des thérapies pour combattre le cancer.

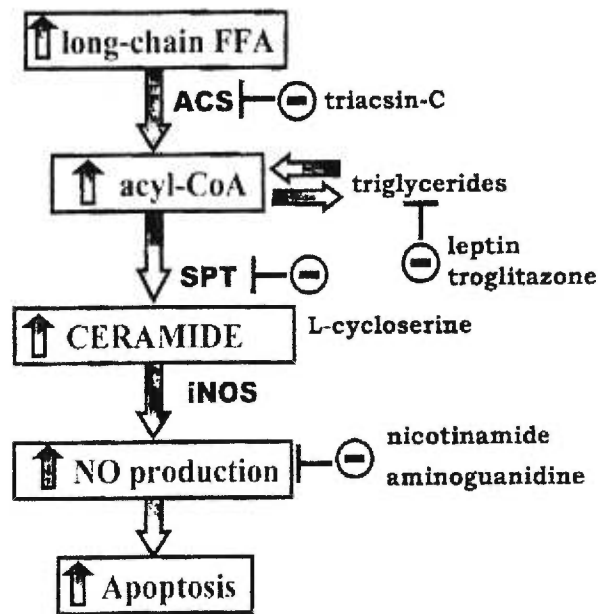


Figure 6: Voie possible de l'induction de l'apoptose par les acides gras. ACS = Acyl-CoA synthase, SPT = serine palmitoyl transférase, iNOS = NO synthétase inductible (Unger, 1999)

1.7.2 Peroxidation des lipides

Des études ont démontré que certains acides gras polyinsaturés peuvent provoquer l'apoptose chez des cellules cancéreuses en culture (Chajes et al., 1995; Hawkins et al., 1998; Ren et al., 1998; Finstad et al., 1998; Das, 1999). 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 peroxidation des lipides (figure 7) menant 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 peroxidation de ces acides gras mène aussi à la formation de H_2O_2 qui est connu comme un agent pouvant induire l'apoptose (Mates et Sanchez-Jimenez, ; Kamata et Hirata, 1999). De plus, il y a formation de composés à partir des radicaux libres qui sont capables de réagir avec l'ADN comme certains agents alkylants (Vaca et al., 1988; Chung et al., 1996). Ces agents peuvent induire l'apoptose mais ils peuvent aussi provoquer des mutations qui peuvent mener à un cancer.

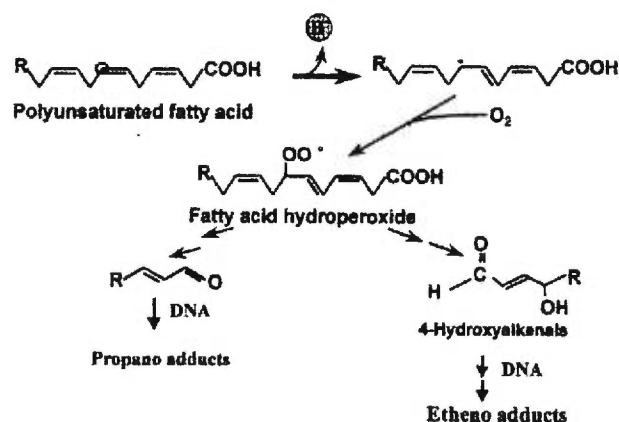


Figure 7: Peroxidation des acides gras polyinsaturés. Mécanisme suggéré pour la formation de composés pouvant interagir avec l'ADN et entraîner des mutations responsable de l'induction de l'apoptose ou de l'oncogénécité. (Bartsch et al, 1999)

1.8 Transduction de signaux 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 différenciation, ou l'apoptose. De plus, des indications suggèrent que les acides gras, en plus de leur rôle de composants des membranes lipidiques, peuvent agir comme second messagers ou réguler des molécules impliquées dans les voies de transduction de signaux. 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 stimuli. Les différentes cascades de protéines kinases (figure 8) sont principalement celles des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK), protéines kinases C (PKC), JAK-STAT, protéine kinase A (PKA), et phosphatidylinostol 3-kinase (PI3K).

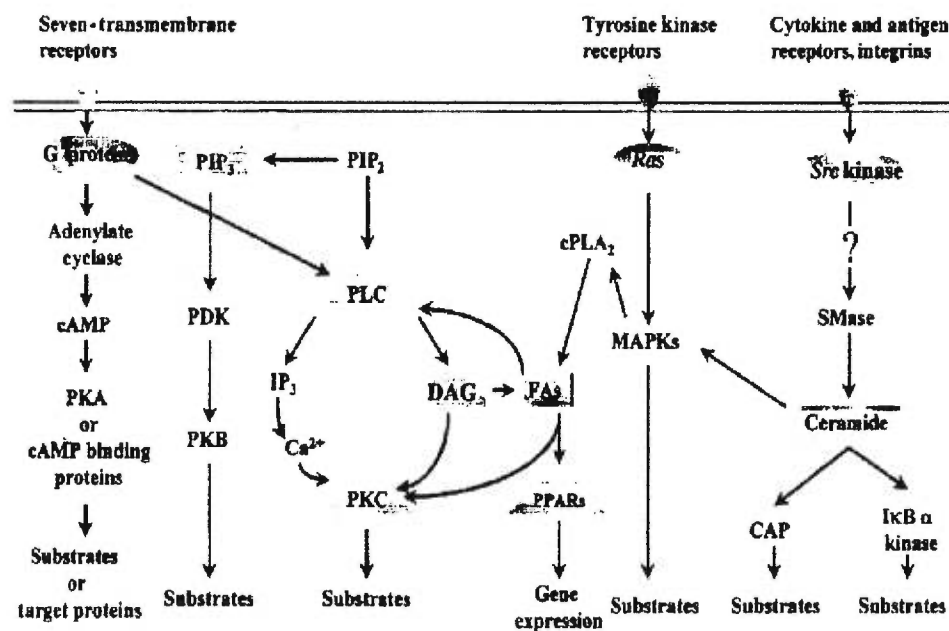


Figure 8: Cibles potentielles pouvant être modulées par les acides gras dans les différentes voies de signalisation intracellulaire. (Hwang et Rhee, 1999)

1.8.1 *Acylation des protéines*

On peut diviser en trois groupes les molécules pouvant être modulées par les acides gras. Le premier groupe consiste en des protéines impliquées dans la signalisation qui nécessitent une acylation pour la translocation membranaire et leur activation. En effet, plusieurs molécules de signalisation se retrouvent dans des compartiments cellulaires. L'activation d'un récepteur par son ligand mène à la translocation de cette molécule qui peut interagir avec le récepteur ou d'autres molécules de signalisation ce qui va initier le signal de propagation. Certains acides gras à longue chaîne peuvent s'attacher de façon covalente sur diverses protéines ce qui va influencer leur translocation et leur activation (Towler et al., 1988; Resh, 1999). On parle alors d'acylation des protéines et il existe deux modes d'acylation connus: la myristoylation et la palmitoylation qui consistent en un ajout d'une molécule de myristate et de palmitate respectivement à une protéine. Les molécules de signalisation connues pour être myristoylées sont les «Protéines liant le GTP», la «Protéine kinase dépendant du cAMP» et les membres de la famille *Src* (Towler et al., 1988; Resh, 1999). Certaines protéines transmembranaires et les membres de la famille *Ras* sont des protéines qui peuvent être palmitoylées (Buss et Sefton, 1986; Hancock et al., 1989; Dunphy et Linder, 1998). Il semble donc possible de concevoir que l'acylation de ces protéines puissent être modulée par la présence d'acides gras ce qui affecterait les voies de signalisation en aval de ces protéines acylées et l'expression de gènes cibles.

1.8.2 *Messageur lipidiques*

Le deuxième groupe de molécules pouvant être régulé par les acides gras sont les messageurs lipidiques qui contiennent des acides gras.

1.8.2.1 Les produits de la PI3K

La PI3K est une enzyme qui phosphoryle différents phosphatidylinositols qui agissent comme seconds messagers de différentes voies menant à la prolifération et la survie des cellules (Kaplan et al., 1987; Varticovski et al., 1989; Parker et Waterfield, 1992; Yao et Cooper, 1995). La PI3K produit du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate et le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate qui activent PKB/AKT (Burgering et Coffey, 1995; Datta et al., 1999) laquelle participe entre autres à l'activation de la «ribosomal protein S6 kinase» (Dudek et al., 1997), inhibent la glycogène synthase kinase 3 (Cross et al., 1995), et inhibent l'apoptose (del Peso et al., 1997). Il existe aussi une enzyme appelée PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) capable de catalyser la réaction inverse de la PI3K. PTEN a récemment été identifié comme un gène suppresseur de tumeurs et il est muté dans environ 10% des cancers mammaires (Teng et al., 1997). Une surexpression de cette enzyme induit une diminution de la prolifération et provoque l'apoptose dans des lignées tumorales mammaires (Lu et al., 1999). Une étude récente a aussi démontré que l'activité du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate varie avec le type d'acide gras présents à la position *sn-1* et *sn-2* (Stokoe et al., 1997). Comme la consommation d'acide gras par la cellule peut modifier les acides gras présent à ces deux positions du phosphatidylinositol, il est donc possible que les acides gras puissent moduler l'activité de PKB/AKT.

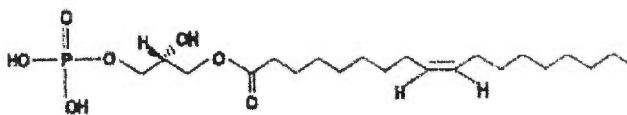
1.8.2.2 Le diacylglycérol

Le diacylglycérol active certaines isoformes de la PKC en se liant à leur domaine régulateur (Newton, 1997). L'activation de la PKC est connue pour être impliquée dans diverses réponses cellulaires (Nishizuka, 1992, 1995). Malgré son

large spectre de substrats potentiels déterminé à partir de plusieurs protéines testées *in vitro* sur les résidus serine et thréonine (mais pas de résidus tyrosine), la nature des substrats physiologiques des différents isozymes de PKC n'est pas encore bien compris. La nature des acides gras présents sur le diacylglycérol peut avoir une influence sur l'activation des PKC. En effet, il est bien connu que des acides gras polyinsaturés en position 2, en particulier l'acide arachidonique, rendent le diacylglycérol efficace en ce qui a trait à l'activation de la PKC. De plus, un groupe de chercheur a démontré que la présence d'un métabolite du linoléate (acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque) à la position 2 inhibe la PKC- β contrairement à la présence de l'oléate à cette position (Zeisel, 1993). De plus il semble que la présence d'un groupement alkyl à la position 1 à la place d'un groupement acylé diminue l'activité de la PKC (Cho et Ziboh, 1994).

1.8.2.3 L'acide lysophosphatidique et la sphingosine 1-phosphate

L'acide lysophosphatidique (LPA) et la sphingosine 1-phosphate (S1P) (figure 9) sont des lysophospholipides qui initient et régulent la prolifération cellulaire par



Acide lysophosphatidique



Sphingosine-1-phosphate

Figure 9: Structure de l'acide lysophosphatidique et de la sphingosine-1-phosphate.

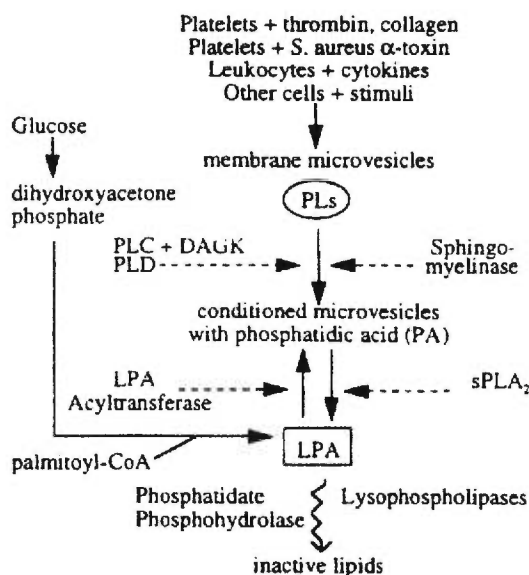


Figure 10: Synthèse de l'acide lysophosphatidique. La synthèse *de novo* se situe dans la partie gauche de la figure tandis que le reste de la figure montre la génération de LPA à partir de précurseurs. (Goetzel et al, 1998)

un mécanisme semblable aux facteurs de croissance (Zeisel, 1993; Spiegel et Milstien, 1995; Moolenaar et al., 1997). Ceux-ci peuvent être synthétisés *de novo* à partir des acides gras ou par l'hydrolyse de précurseurs dans la cellule et ils peuvent être sécrétés par celle-ci (figure 10). Il existe des récepteurs couplés aux protéines G pour ces lysophospholipides (Hill et Treisman, 1995). Ceux-ci activent diverses voies de signalisation comme par exemple la voie de la PI3K et celle des MAPK (figure 11) (Hill et Treisman, 1995). Il est donc possible que la présence d'acides gras puisse favoriser la synthèse *de novo* de ces lysophospholipides. Le LPA et le S1P augmentent la prolifération des cellules du cancer du sein (Goetzl et al., 1999). De plus, ils favorisent la production et la sécrétion de l'IGF-II qui peut aussi agir sur la prolifération. Il a aussi été démontré que les patients atteints d'un cancer ont des taux élevés de LPA dans la circulation et ils semblent que les cellules cancéreuses sont capables de sécréter le LPA. La

possibilité d'une stimulation autocrine et paracrine par le LPA sur les cellules cancéreuses n'est pas écartée.

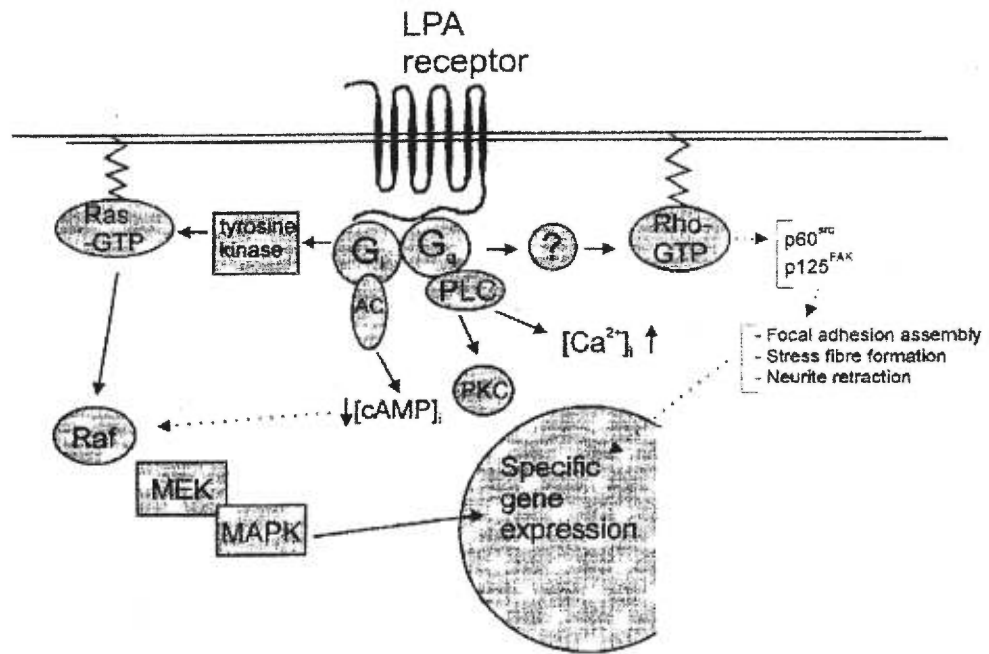


Figure 11: Activation des voies de signalisation induite par l'acide lysophosphatidique. (Nietgen et Durieux, 1998)

1.9 Molécules de signalisation activées par les acides gras

Il existe des molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire qui peuvent être directement modulées par les acides gras. Il a été démontré que les acides gras sont des ligands des PPARs et les activent (voir section 1.6). De plus, plusieurs études utilisant des ligands synthétiques ont démontré que les PPARs pouvaient être régulés par phosphorylation via la voie MAPK (Adams et al., 1997). Les acides gras peuvent aussi activer la PKC indépendamment du

diacylglycérol. En effet, les acides gras insaturés incluant l'oléate, le linoléate, le linolénate et l'arachidonate, augmentent l'activité de certaines isoformes de la PKC (McPhail et al., 1984; Hug et Sarre, 1993). Les phospholipases sont un groupe d'enzymes qui se distinguent par leur site d'hydrolyse sur les molécules de phospholipides. Les acides gras insaturés augmentent également l'activité de la phospholipase C γ (Hwang et al., 1996). Par contre, on remarque une diminution de l'activité de la phospholipase A2 dans les macrophages de souris en présence d'acides gras insaturés (Lister et al., 1988). Il est intéressant de noter que l'activation de ces différentes phospholipases a un effet important sur l'activité de différentes isoformes de la PKC

On a aussi montré que l'acide arachidonique et d'autres acides gras régulent l'activité de plusieurs protéines, incluant des canaux ioniques et des protéines kinases (Oishi et al., 1990; Swarts et al., 1990). De plus, il semble que ces acides gras stimulent directement des protéines G dans les leucocytes polymorphonucléaires pour mener à leur agrégation (Abramson et al., 1991). L'activation de ERK, JNK ou P38 par l'acide arachidonique a été démontrée dans plusieurs lignées cellulaires (Rao et al., 1994; Hii et al., 1995; Hii et al., 1998; Barry et al., 1999). Par contre, il semble que l'effet soit variable selon le type cellulaire car l'activité de JNK est stimulée dans les cellules Jurkat mais non dans les neutrophiles et on observe le contraire en ce qui concerne la phosphorylation de P38 (Hii et al., 1995). L'acide linoléique active ERK dans les cellules musculaires lisses (Hu et al., 1998) et JNK dans les cellules mésangiales (Huang et al., 1999). De plus, l'acide arachidonique et linoléique activent p21ras dans des cellules de rein (Jiao et al., 1998).

1.10 Acides gras et gènes à réponse précoce

La réponse primaire à une variété de signaux mitogènes externes à la cellule est l'induction rapide de groupes de gènes que l'on nomme gènes à réponse précoce (Herschman, 1991; McMahon et Monroe, 1992). Les produits de la majorité de ces gènes codent pour des facteurs de transcription (*jun*, *fos*, *myc*). De plus, l'induction de ces gènes est très rapide, généralement temporaire et ne nécessite pas la synthèse de protéines *de novo*. On porte une attention particulière à ces gènes car il y a des indications qui les impliquent dans la transformation oncogénique et la croissance cellulaire (Morgan et Curran, 1989; Cole et al., 1989; Lewin, 1991; McMahon et Monroe, 1992).

Il existe peu d'information concernant l'influence des acides gras sur l'induction de gènes à réponse précoce. Des études récentes ont démontré que les acides gras peuvent influencer la croissance de la lignée de cellules pancréatique β INS-1 par l'induction de proto-oncogènes comme *c-fos* et *nur-77* (Roche et al., 1999). Il semble que le Ca^{2+} et la voie de signalisation de la PKC sont impliqués dans cette induction. Une autre étude a démontré l'effet des métabolites de l'acide arachidonique sur l'induction de gènes à réponse précoce (Lacroix et al., 1996). Un membre de la famille *fos*, *fra1* est aussi induit par les acides gras dans les préadipocytes et les fibroblastes. On peut penser que les acides gras peuvent agir sur la promotion des tumeurs en stimulant la croissance des cellules tumorales. Ce mécanisme impliquerait différents systèmes de transduction de signaux qui résulteraient en l'activation de gènes à réponse précoce codant pour des proto-oncogènes ou des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire.

2. THÉMATIQUE DU PROJET DE RECHERCHE

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. Ils jouent aussi un rôle important dans le contrôle de l'expression génique, permettant de modifier le métabolisme, la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose.

La prolifération des cellules humaines du cancer du sein implique une interaction complexe entre les gènes, des facteurs de croissance, des hormones et des nutriments calorigéniques. Des études ont déjà démontré que les acides gras pouvaient influencer *in vivo* et *in vitro* la prolifération de ces cellules. Par contre, il existe peu d'information concernant le mécanisme d'action des acides gras dans la carcinogenèse mammaire.

Afin de mieux comprendre l'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 diverses lignées cellulaires humaines du cancer du sein. Contrairement à la plupart des études *in vitro* précédentes, ces acides gras ont été utilisés liés à l'albumine. En effet, ceci empêche de former des agrégats et des micelles insolubles qui peuvent se lier aux membranes ou avoir des effets non spécifiques détergents. Ainsi, pour étudier le mode d'action de ces acides gras sur la prolifération et l'apoptose, nous avons effectué des mesures d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules tumorales mammaires incubées pendant 24 heures en présence des acides gras. Ces mesures ont été faites sur quatre lignées humaines du cancer du sein: les MCF-7, T47D, ZR-75-1 qui sont œstrogènes dépendantes et la lignée MDA-MB-231 qui est œstrogène indépendante. En ce qui concerne la caractérisation de l'apoptose, nous avons mesuré le clivage de la poly-(ADP-ribose)-polymérase

(PARP) par immunobuvardage Western à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme mature et clivée de l'enzyme. En plus des caractérisations morphologiques des cellules apoptotiques, des mesures de la fragmentation de l'ADN en fragments internucléosomiaux sur gel d'agarose ont aussi été effectuées. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation intracellulaires a été faite dans le but de déterminer les voies impliquées dans le mécanisme d'action de l'oléate et du palmitate. Nous avons étudié l'effet de ces inhibiteurs sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.

Une publication récente de notre groupe de recherche a démontré que les acides gras augmentent l'expression de certains gènes à réponse précoce pouvant être impliqués dans la prolifération cellulaire de la cellule pancréatique β . Ceci suggère que l'induction de certains gènes à réponse précoce par les acides gras pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose de différents types cellulaires. Nous avons donc testé cette hypothèse sur une lignée cellulaire du cancer du sein (MDA-MB-231) en présence d'oléate. Pour ce faire, nous avons utilisé les membranes de la compagnie Clontech (Atlas Arrays). Ces membranes de nylon possèdent des fragments d'ADNc représentant 600 gènes différents codant pour des facteurs de transcription, des cytokines, des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, une seule expérience permet de générer un profil d'expression de centaines de gènes en même temps. Nous avons fait une hybridation différentielle des membranes à partir des ARNm isolés de la lignée cellulaire MDA-MB-231 traitée et non-traitée à l'oléate pendant un court laps de temps dans le but d'identifier des gènes à réponse précoce induits par cet acide gras. Ceci nous a permis d'identifier des gènes candidats qui pourraient être impliqués dans la promotion du cancer du sein par l'oléate.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Culture cellulaire

Les lignées épithéliales humaines du cancer du sein MCF-7, ZR-75-1, T47D et MDA-MB-231 ont été obtenues de «American Type Culture Collection». Les cellules ont été maintenues à 37°C et 5% CO₂ dans un milieu MEM sans rouge de phénol contenant les acides aminés essentiels auquel a été ajouté du sérum de veau fœtal inactivé à une concentration finale de 10%, de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 U/ml), de la L-glutamine (2 mM) et de l'insuline (10 ug/ml).

La liaison des acides gras (palmitate et oléate) à l'albumine a été effectuée en mélangeant pendant 16 h. les acides gras sous forme de sels de sodium (pureté $\geq 99\%$, Sigma) à 37 °C avec 5% d'albumine de sérum de boeuf (BSA) ne contenant pas d'acides gras (Sigma) (Roche et al., 1999). Ensuite, la solution d'acide gras a été ajustée à un pH de 7,4 pour être ensuite filtrée à travers un filtre de 0.22 micron. Les concentrations exactes des solutions d'acides gras ont été déterminées par une méthode colorimétrique en utilisant un kit NEFAC (Wako Chemicals GmbH). Lors des incubations avec les acides gras dans le milieu de culture sans sérum, la concentration finale de BSA était toujours de 0,5%.

3.2 Mesures d'incorporation de thymidine tritiée

Les cellules ont été inoculées dans des plaques de 96 puits à une densité de 5000 cellules par puits et incubées dans le milieu MEM de culture standard pendant 24 h. Par la suite, les cellules ont été incubées dans un milieu de culture en absence de sérum et d'insuline mais en présence de 0,5% BSA pendant 24 h.

Les cellules ont ensuite été incubées en présence ou absence des acides gras liés à l'albumine pendant une autre période de 24 h. Les mesures de synthèse d'ADN ont été effectuées suite à l'ajout de thymidine tritiée (1 uCi/puits; activité spécifique, 71Ci/mmmole) pendant le 4 dernières heures d'incubation. Le milieu de culture a ensuite été aspiré et les cellules ont été recueillies à l'aide d'un «cell harvester». La radioactivité retenue sur les filtres en fibres de verre contenant l'ADN des cellules a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Buteau et al., 1999).

3.3 Mesure d'apoptose par comptage des cellules détachées

Les cellules ont été inoculées dans des pétris de 100 mm à une densité de 10^6 cellules par pétri et traitées comme indiqué dans la légende des figures. Pour déterminer le pourcentage d'apoptose, les cellules détachées présentes dans le milieu de culture ont été centrifugées à 1000xg pendant 5 min. après un lavage au PBS des pétris dans le but de récolter la totalité des cellules détachées. Après avoir resuspendu le culot des cellules dans du PBS, celles-ci ont été comptées à l'aide d'un hématocytomètre. Les cellules attachées aux pétris ont été trypsinisées et comptées d'une manière identique. Le pourcentage d'apoptose a été évalué en divisant le nombre de cellules détachées par le nombre de cellules totales (détachées + attachées).

3.4 Analyse de la fragmentation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Les cellules ont été inoculées dans des pétris de 100 mm à une densité de 10^6 cellules par pétri et traitées comme indiqué dans la légende des figures. Les cellules détachées ont ensuite été récupérées par centrifugation à 1000xg pendant

5 min. et l'ADN isolé de ces cellules par la méthode de Miller (Miller et al., 1988). Brièvement, les cellules sont lysées dans un tampon [50 mM Tris (pH 8,0), 20 mM EDTA, 2% SDS, 100 ug/ml protéinase K] et incubées à 60 °C pendant 1 h. Ensuite on ajoute 1 vol. d'une solution saturée en NaCl et on centrifuge l'extrait 15 min. à 2000xg. On récupère le surnageant qu'on traite à la Rnase (20 ug/ml) pendant 15 min. à 37 °C. On précipite l'ADN à l'éthanol (95 %) et après lavage avec de l'éthanol 70%, on resuspend le culot d'ADN dans de l'eau. Par la suite, on a déposé les échantillons d'ADN sur un gel d'agarose (1,5 %) et l'électrophorèse a été effectuée dans un tampon Tris-borate (pH 8,0). L'ADN a ensuite été visualisé sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

3.5 Extraction des protéines totales et mesure du clivage de la PARP

Les cellules ont été inoculées dans des pétris de 100 mm à une densité de 1×10^6 cellules par pétri et traitées comme indiqué dans la légende des figures. Les extraits des protéines totales ont été obtenus en lysant les cellules dans un tampon d'extraction de protéines [65 mM Tris (pH 6,8), 6 M urée, 2 % SDS] suivi d'une sonication dans le but de briser l'ADN. La concentration des protéines a été déterminée en utilisant un essai colorimétrique Bio-Rad DC (detergent compatible) et la BSA comme standard. Ensuite on a ajouté du DTT à une concentration final de 5 % (V/V) et les échantillons des protéines ont été chauffés à 100 °C pour être ensuite soumis à un SDS-PAGE et un Western blot (immunobuvardage Western). Après incubation de la membrane avec un anticorps monoclonal de souris anti-PARP/Ab-2 (Calbiochem) dirigé contre la PARP, la membrane a ensuite été incubée avec un anticorps couplé à la peroxidase dirigé contre l'anticorps primaire. Le signal a ensuite été révélé avec le kit de détection SuperSignal (Pierce).

3.6 Extraction de l'ARNm et analyse Northern

Les cellules ont été traitées avec 400 μ M d'oléate lié à la BSA ou 0,5% BSA pendant 90 minutes et l'ARNm a été isolé par la méthode de la protéinase K. Brièvement, les cellules sont lysées dans un tampon de lyse [20 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,5% SDS, 0,1 M NaCl, 200 μ g/ml protéinase K], homogénéisées avec un polytron et incubées 90 min. à 37°C. Ensuite on ajoute du NaCl (0,4 M) et on dépose les extraits sur une colonne oligo dT préalablement équilibrée avec un tampon élevé en sels [0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS]. Après des lavages avec ce tampon, on élue l'ARNm avec un tampon faible en sels [1 mM EDTA, 0,25% SDS]. On précipite l'ARNm avec de l'éthanol 95% et on lave ensuite avec de l'éthanol 70% avant de resuspendre dans l'eau. On a ensuite déposé 100 ng d'ARNm dénaturé en présence de formamide sur un gel dénaturant agarose (1,2%)/formaldéhyde et après électrophorèse, l'ARNm a été transféré sur une membrane de nylon. Cette membrane a été hybridée avec une sonde d'actine marquée au 32 P par la méthode de «random priming».

3.7 Synthèse des sondes d'ADNc et hybridation des membranes «Atlas™ cDNA expression array»

Le marquage au 32 P de l'ADNc ainsi que l'hybridation des membranes ont été faits en suivant le protocole de la compagnie Clontech. À partir de 1 μ g d'ARNm, les ADNc ont été générés par transcription inverse en présence de [α - 32 P-dATP] et après purification des sondes, la membrane est hybridée en présence de 5×10^6 cpm de sondes d'ADNc. Ceci est effectué à partir de l'ARNm des cellules traitées et non-traitées à l'oléate (voir section 2.6) sur une membrane pour chaque condition. Ainsi, une membrane est hybridée à partir de l'ARNm des cellules traitées à l'oléate et une autre membrane identique est hybridée à partir de l'ARNm des cellules contrôles. L'intégrité de l'ARNm est vérifiée par Northern à

l'aide d'une sonde actine (résultat non-montré). Après trois lavages des membranes dans un tampon [2X SSC, 0,1% SDS], elles sont exposées sur un film à rayon-X pendant différentes périodes. Les signaux sont ensuite quantifiés par densitométrie et un rapport des signaux identiques sur chaque membranes est effectué.

4. RÉSULTATS

4.1 L'oléate et le palmitate ont un effet opposé sur la prolifération des lignées humaines du cancer du sein

Nous avons étudié l'effet de l'oléate et du palmitate sur la prolifération de trois lignées cancéreuses mammaires oestrogènes dépendantes (MCF-7, ZR-75-1 et T47D) et une lignée oestrogène indépendante (MDA-MB-231). Nous avons utilisé ces acides gras car ce sont les plus abondants de la circulation (van der Vusse et al., 1983). On peut remarquer que l'oléate a stimulé l'incorporation de thymidine tritiée de 2 à 4 fois dans l'ADN des lignées cellulaires MDA-MB-231, ZR-75 et MCF-7 carencées en sérum mais que cet acide gras a peu d'effet sur les cellules T47D (figure 12). En revanche, le palmitate a eu un effet complètement opposé à l'oléate car il a diminué de 30-90 % l'incorporation de thymidine tritiée dans les quatre lignées cellulaires (figure 13). La lignée T47D, qui était insensible à l'oléate, a montré une sensibilité au palmitate comparable aux lignées MCF-7 et ZR-75. Il est intéressant de constater que l'effet opposé de ces deux acides gras était plus prononcé pour la lignée oestrogène indépendante MDA-MB-231. Ces résultats indiquent que l'oléate stimule la prolifération de la majorité des lignées cellulaires étudiées mais que le palmitate a un effet toxique pour toutes les lignées cellulaires. De plus, l'analogue non-métabolisable 2-bromopalmitate (200 μ M), n'a pas eu d'effet sur la prolifération de la lignée MDA-MB-231 (résultat non-montré).

Comme la lignée MDA-MB-231 était plus sensible aux deux acides gras étudiés, cette lignée a été utilisée pour les expériences subséquentes. Comme le démontrent les figures 14 et 15, les effets de l'oléate et du palmitate sur l'incorporation de thymidine tritiée étaient dose-dépendants. La stimulation de la synthèse d'ADN par l'oléate était détectable à une concentration de 1 μ M et a

atteint un plateau à 10 uM (figure 14). Ce maximum de stimulation a été maintenu jusqu'à une concentration de 400 uM, la dose maximale utilisée. En revanche, l'inhibition de la croissance cellulaire par le palmitate se situe dans un intervalle de 10 à 100 uM (figure 15). De plus, l'observation microscopique des cellules ayant été traitées au palmitate a démontré que cet acide gras provoque une augmentation dose dependante des cellules montrant des caractéristiques de l'apoptose qui suit la diminution de l'incorporation de thymidine tritiée (figure 17 A).

Pour mieux comprendre l'effet prolifératif de l'oléate, les cellules MDA-MB-231, après une carence en sérum de 24 h., ont été incubées en présence de BSA seule, d'oléate lié à la BSA ou de sérum, et les cellules attachées ont été comptées sur une période de six jours (figure 16). On remarque que la croissance des cellules contrôles (BSA) s'est arrêtée après 24 h. d'incubation et que la journée suivante le nombre de cellules attachées avait chuté considérablement. Les observations microscopiques ont révélés que les cellules qui se détachaient du pétris montraient des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. En revanche, le nombre de cellules traitées à l'oléate augmente d'un facteur deux durant une période de trois jours et demeure ensuite constant pour les deux jours suivants. La prolifération des cellules traitées à l'oléate était moins rapide que celles incubées en présence de sérum et un plateau est observé à une densité plus faible pour les cellules traitées à l'oléate. Ces résultats indiquent que le processus de mort cellulaire enclenché par la carence en sérum des MDA-MB-231 est bloqué par l'oléate. Par contre, le palmitate accélère le processus de mort cellulaire des cellules carencées en sérum.

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

Les changements morphologiques observés dans les cellules MDA-MB-231 incubées en présence de palmitate étaient typiques de l'apoptose. Afin d'obtenir des évidences directes de l'effet proapoptotique du palmitate, nous avons examiné la protéolyse de la PARP et le clivage de l'ADN en fragments internucléosomiaux, deux caractéristiques importantes de l'apoptose. Pour minimiser l'apoptose dans la situation contrôle (cellules incubées en présence de BSA seule) causée par la carence en sérum, la période de carence a été raccourcie à 12 h. Dans ces conditions expérimentales où environ 10% des cellules avaient des caractéristiques morphologiques de l'apoptose (figure 17 A), une faible quantité de produit de protéolyse de PARP (89 kDa) a été détectée (figure 17 B). L'oléate a diminué le clivage de la PARP et le palmitate l'a augmenté. Lorsque nous avons analysé la dégradation de l'ADN sur la population entière, le clivage de l'ADN en fragments internucléosomiaux était peu visible. Par contre, lorsque l'ADN a été isolé des cellules qui flottaient dans le milieu de culture, la fragmentation qui était peu visible dans la situation contrôle était apparente lorsque les cellules avaient été incubées en présence de palmitate. De plus, l'incubation avec l'oléate ne provoquait pas la fragmentation de l'ADN (figure 17 C). En effet, les cellules en présence d'oléate se détachent peu car ce dernier ne provoque pas l'apoptose ainsi la fragmentation de l'ADN est minimale. Ces résultats démontrent que l'oléate exerce une fonction antiapoptotique sur la carence en sérum des cellules MDA-MB-231 et que le palmitate a un effet apoptotique.

Afin de mieux caractériser l'effet antiapoptotique de l'oléate, le pourcentage d'apoptose induite par le palmitate (100 μ M) en présence de concentrations croissantes d'oléate a été mesuré (figure 18). La moitié de la protection était déjà atteinte à une concentration de 1 μ M, et à 10 μ M le pourcentage d'apoptose était comparable à la situation contrôle (9%). Ainsi, un ratio molaire de 1/10 d'oléate versus palmitate était suffisant pour une protection complète contre l'effet proapoptotique du palmitate. De plus, la combinaison de ces deux acides gras à une concentration de 100 μ M chacun résulte en une

augmentation de la prolifération cellulaire (résultat non-montré) Les cellules protégées par l'oléate contre le palmitate avaient une morphologie similaire aux cellules traitées uniquement à l'oléate (figure 17 A). De plus, les cellules incubées en présence de palmitate (100 μ M) plus d'oléate (30 μ M) montrent un faible clivage de la PARP ainsi qu'une fragmentation de l'ADN comparable aux cellules contrôles (figure 17 B et C)

4.3 La prolifération cellulaire induite par l'oléate est diminuée par des inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K

Comme l'oléate semble agir comme un facteur de croissance et que la plupart des facteurs de croissance activent la PI3K, nous avons testé l'effet de deux inhibiteurs de la PI3K sur l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN de la lignée cellulaire MDA-MB-231. La wortmannin et le LY294002, deux inhibiteurs spécifiques de la PI3K, ont complètement bloqué la prolifération induite par l'oléate (figure 19). De plus, ces inhibiteurs n'avaient qu'un faible effet (une diminution de 20 % de l'incorporation de thymidine tritiée) dans la situation contrôle (résultat non-montré). Cette approche pharmacologique suggère que la PI3K est impliquée dans le mode d'action de l'oléate sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires.

4.4 L'oléate induit des gènes à réponse précoce

Une étude initiale de l'effet de l'oléate sur l'expression de gènes à réponse précoce a été effectuée. Pour ce faire, nous avons utilisé des membranes de la compagnie Clontech (Atlas™ cDNA expression array) possédant des fragments d'ADNc représentant 588 gènes différents codant pour des facteurs de transcription, des cytokines, des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs et

des «housekeeping genes». Ces membranes ont été hybridées avec des ADNc marqués au ^{32}P obtenus à partir de cellules témoins ou incubées pendant une courte période de temps en présence d'oléate. Après 90 min. d'incubation en présence de 400 μM d'oléate sur des cellules MDA-MB-231, une augmentation de l'expression de seulement six ARNm a été observée (Tableau II). En effet, on observe une faible induction (20-40%) des gènes *myc*, *fra-1* et le facteur de transcription dépendant du cAMP ATF-4 mais une induction significative (60-90%) des gènes de la protéine liant la boîte Y (YB-1), la protéine ribosomale 60S L6 (la protéine liant l'ADN, TAX) et la guanine nucleotide-binding protein G-S. L'expression des ARNm correspondant aux autres gènes testés sur la membrane n'était pas altérée par l'oléate. Il est à noter que ces résultats ont été obtenus à partir d'une seule expérience et qu'ainsi une prudence s'avère nécessaire quant à leur interprétation.

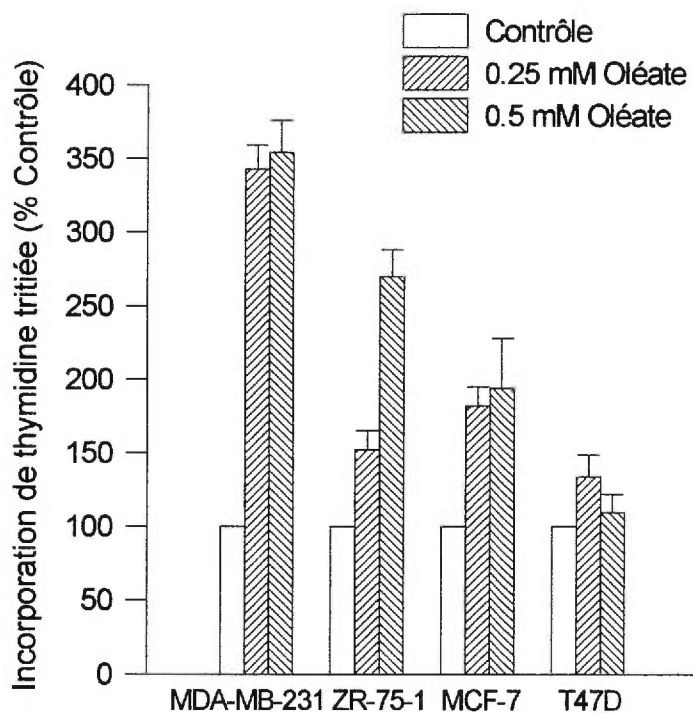


Figure 12: Effet de l'oléate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans diverses lignées cellulaires du cancer du sein. Après 24 h de carence en sérum en présence de 0,5 % BSA dans du milieu MEM, les cellules ont été incubées pendant 24 h avec 0,5 % de BSA (Contrôle) ou d'oléate lié à la BSA. Pendant les dernière 4 h d'incubation, les cellules ont été incubées en présence de thymidine tritiée comme décrit dans la section «Matériels et Méthodes». Les résultats représentent la moyenne (\pm l'erreur standard) de trois expériences indépendantes effectuées en triplicats.

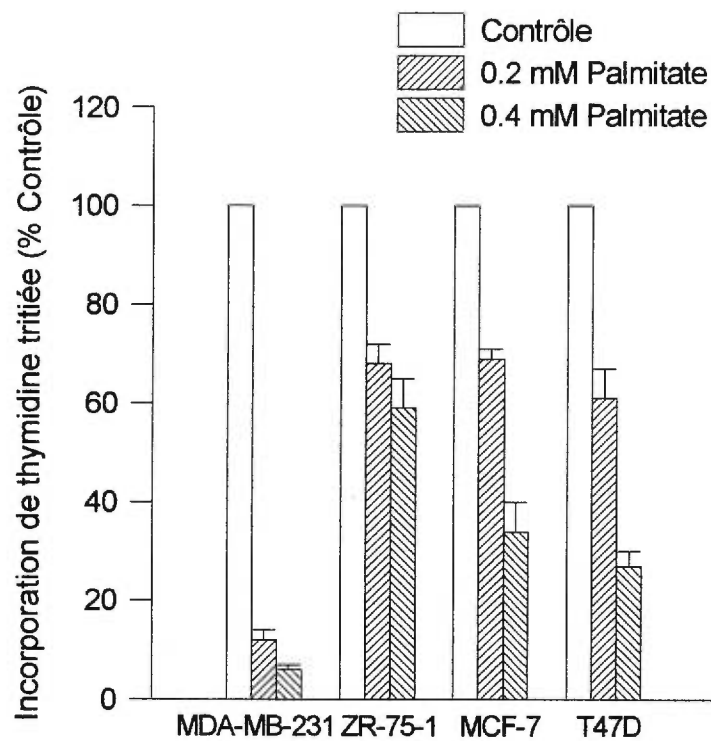


Figure 13: Effet du palmitate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans diverses lignées cellulaires du cancer du sein. Après 24 h de carence en sérum en présence de 0,5 % BSA dans du milieu MEM, les cellules ont été incubées pendant 24 h avec 0,5 % de BSA (Contrôle) ou de palmitate lié à la BSA. Pendant les dernière 4 h d'incubation, les cellules ont été incubées en présence de thymidine tritiée comme décrit dans la section «Matériels et Méthodes». Les résultats représentent la moyenne (\pm l'erreur standard) de trois expériences indépendantes effectuées en triplicats.

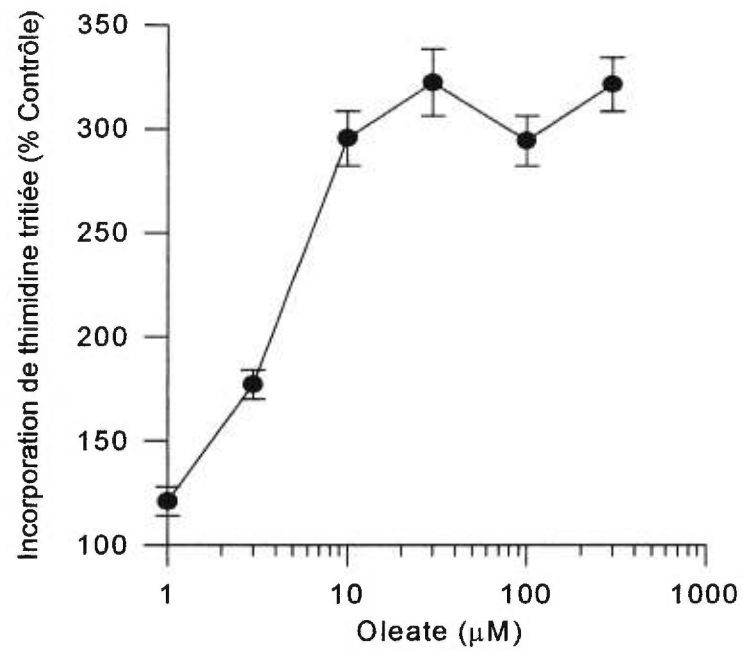


Figure 14: Dose-dépendance de l'effet de l'oléate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans la lignée cellulaire MDA-MB-231. Les cellules ont été incubées pendant 24 h comme décrit à la figure 12 avec 0,5 % BSA (Contrôle) ou en présence de concentrations d'oléate lié à la BSA. Les valeurs d'incorporation de thymidine tritiée sont exprimées en pourcentage du contrôle. Les résultats représentent la moyenne (\pm l'erreur standard) de trois expériences indépendantes effectuées en triplicats.

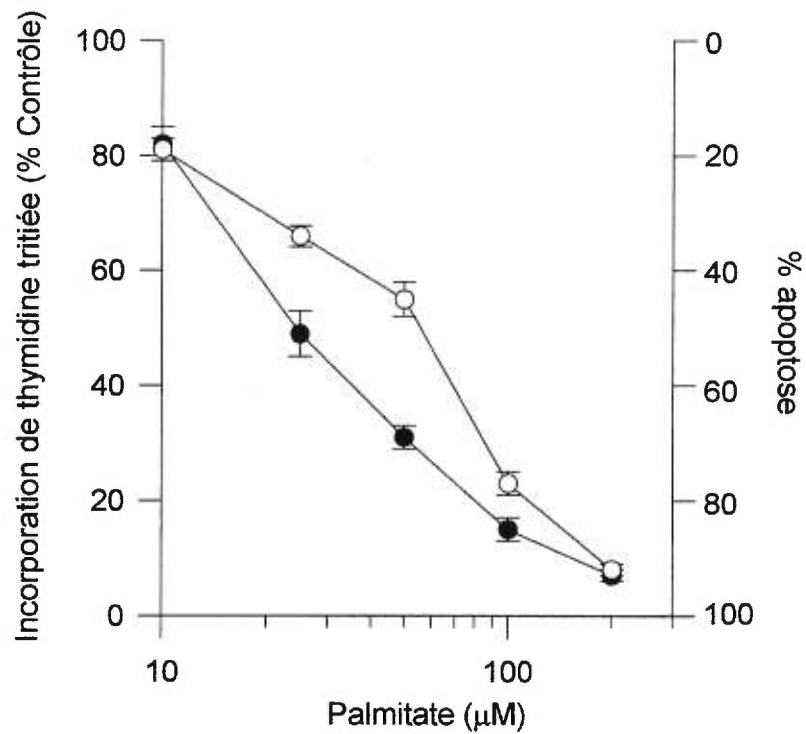


Figure 15: Dose-dépendance de l'effet du palmitate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans la lignée cellulaire MDA-MB-231. Les cellules ont été incubées pendant 24 h comme décrit à la figure 12 avec 0,5 % BSA (Contrôle) ou en présence de différentes concentrations de palmitate lié à la BSA. Les valeurs d'incorporation de thymidine tritiée (●) sont exprimées en pourcentage du contrôle. Le pourcentage d'apoptose (○) a été déterminé comme décrit dans la section «Matériels et Méthodes». Les résultats représentent la moyenne (\pm l'erreur standard) de trois expériences indépendantes effectuées en triplicats.

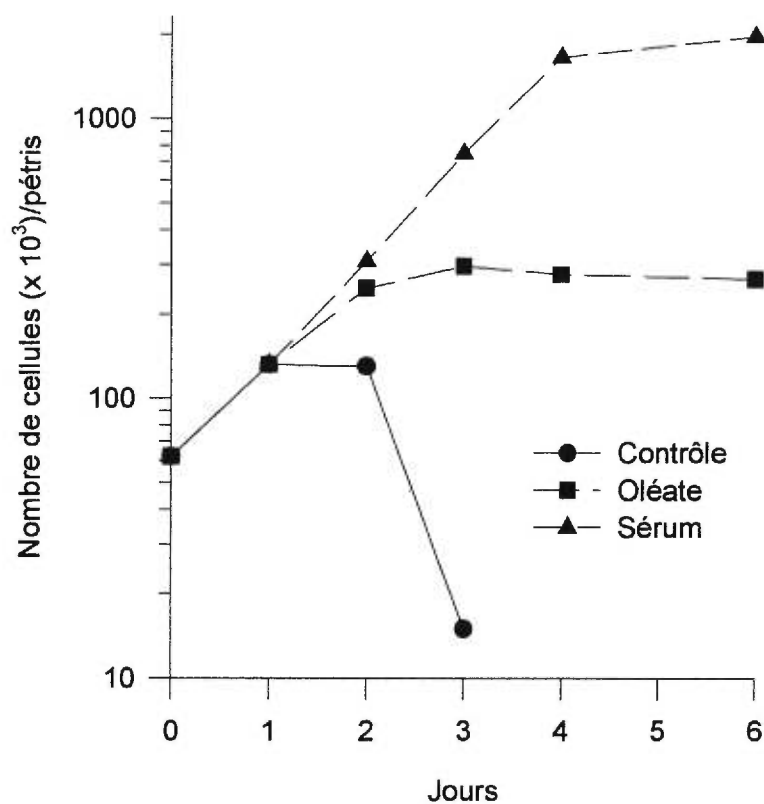


Figure 16: Effets de l'oléate et du sérum sur la prolifération cellulaire de la lignée MDA-MB-231. Les cellules ont été incubées dans du milieu MEM en présence de 5% sérum à une densité de 4×10^4 cellules/pétri. Après 24 h d'incubation (temps 0), les cellules ont été carencées en sérum comme décrit à la figure 12. Au jour 1, les cellules ont été incubées dans du milieu MEM contenant soit 0,5% de BSA (Contrôle), de l'oléate (100 μ M) lié à la BSA ou 5% de sérum. Au temps indiqués, les cellules ont été trypsiniées et comptées à l'aide d'un hémacymètre. La figure est représentative de trois expériences faites en duplicats.

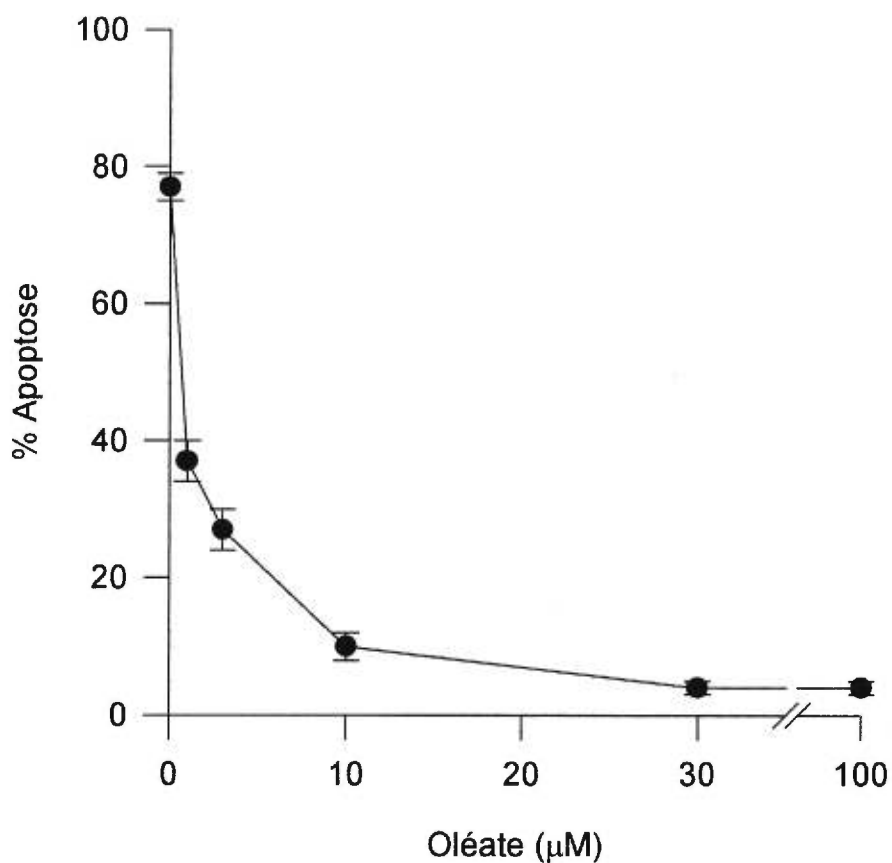


Figure 18: La protection par l'oléate de l'apoptose induite par le palmitate est dose-dépendante dans la lignée MDA-MB-231. Les cellules ont été carencées en sérum comme décrit à la figure 12 et incubées par la suite pendant 24 h en présence de 100 μM de palmitate et différentes concentrations d'oléate. Le pourcentage d'apoptose a été évalué comme décrit à la figure 15. Les résultats représentent la moyenne (\pm l'erreur standard) de trois expériences indépendantes effectuées en triplicats.

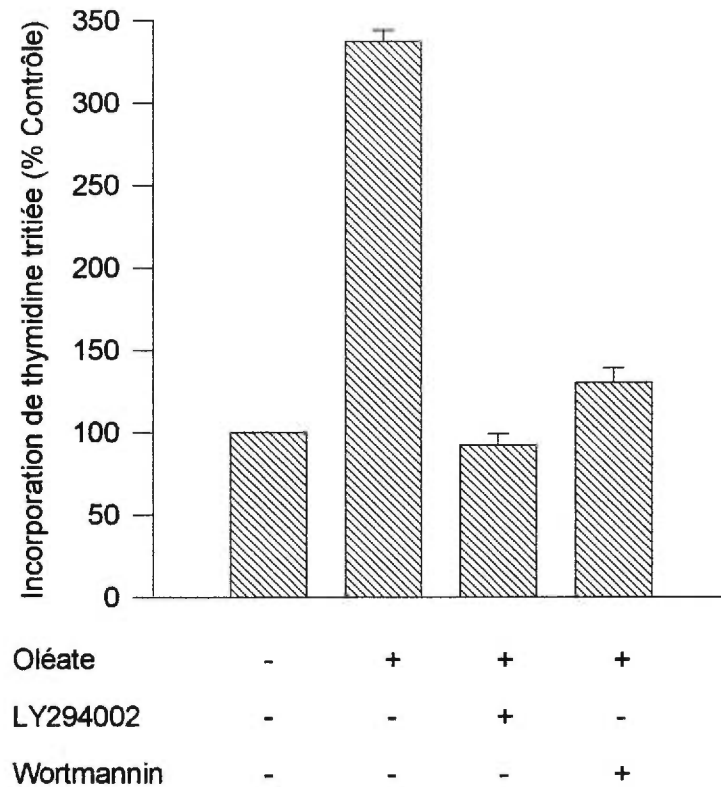


Figure 19: Effets des inhibiteurs de la PI3K sur la prolifération cellulaire induite par l'oléate dans la lignée MDA-MB-231. Les cellules ont été carencées en sérum comme décrit à la figure 12 et incubées par la suite pendant 24 h en présence de 0,5% BSA (Contrôle) ou d'oléate (100 μ M) lié à la BSA en absence ou en présence de wortmannin (50 nM) ou LY294002 (50 μ M). La prolifération a été évaluée par l'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats représentent la moyenne (\pm l'erreur standard) de trois expériences indépendantes effectuées en triplicats.

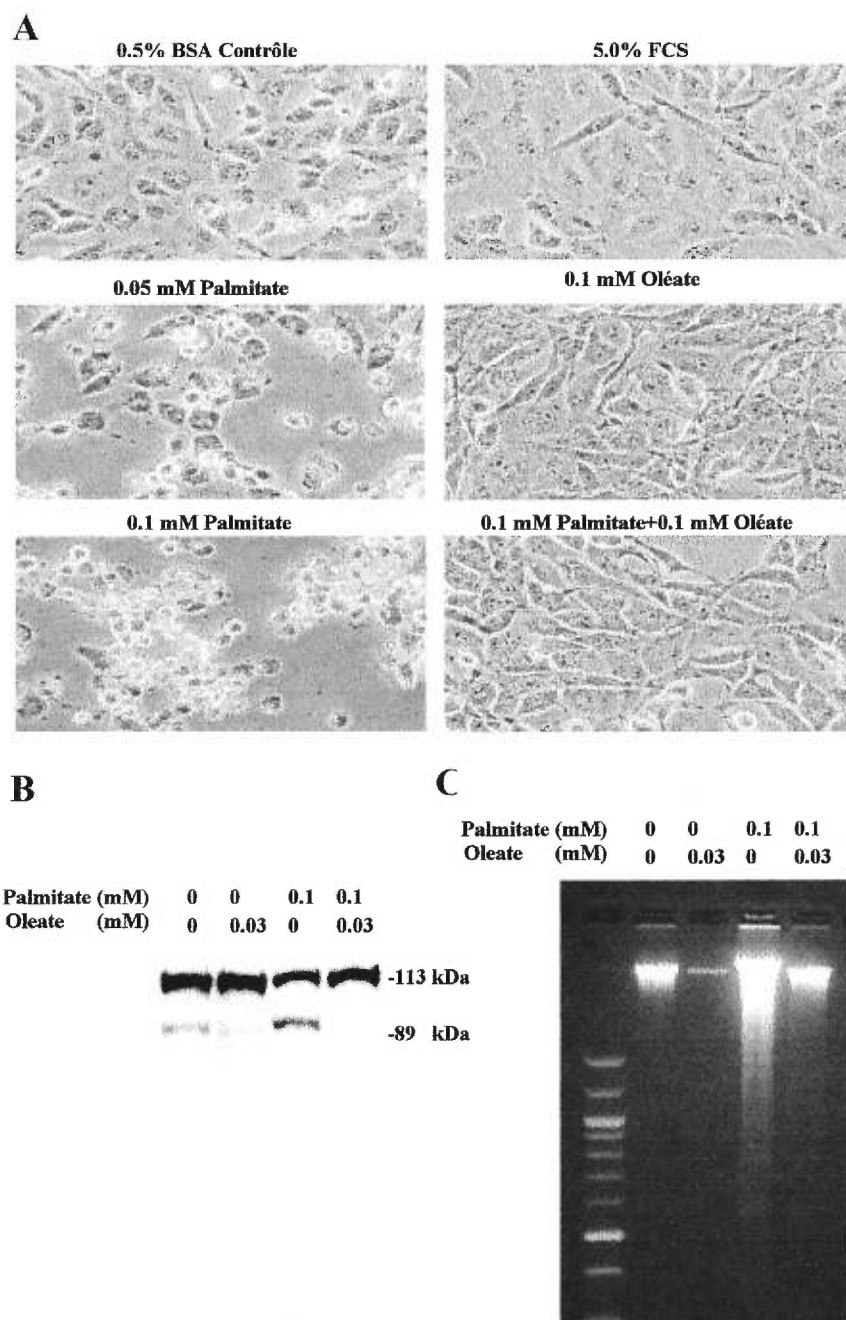


Figure 17: L'oléate protège de l'apoptose induite par la carence en sérum et le palmitate. Après une période de 12 h de carence en sérum, les cellules MDA-MB-231 ont été incubées en présence de 0,5% BSA (Contrôle), des concentrations indiquées d'oléate et/ou de palmitate liés à la BSA ou en présence de 5% de sérum. Les effets ont été évalués après 24 h au moyen d'un microscope à contraste de phase (*A*), de l'analyse du clivage de la PARP (*B*), ou par la fragmentation de l'ADN des cellules détachées (*C*). Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences séparées.

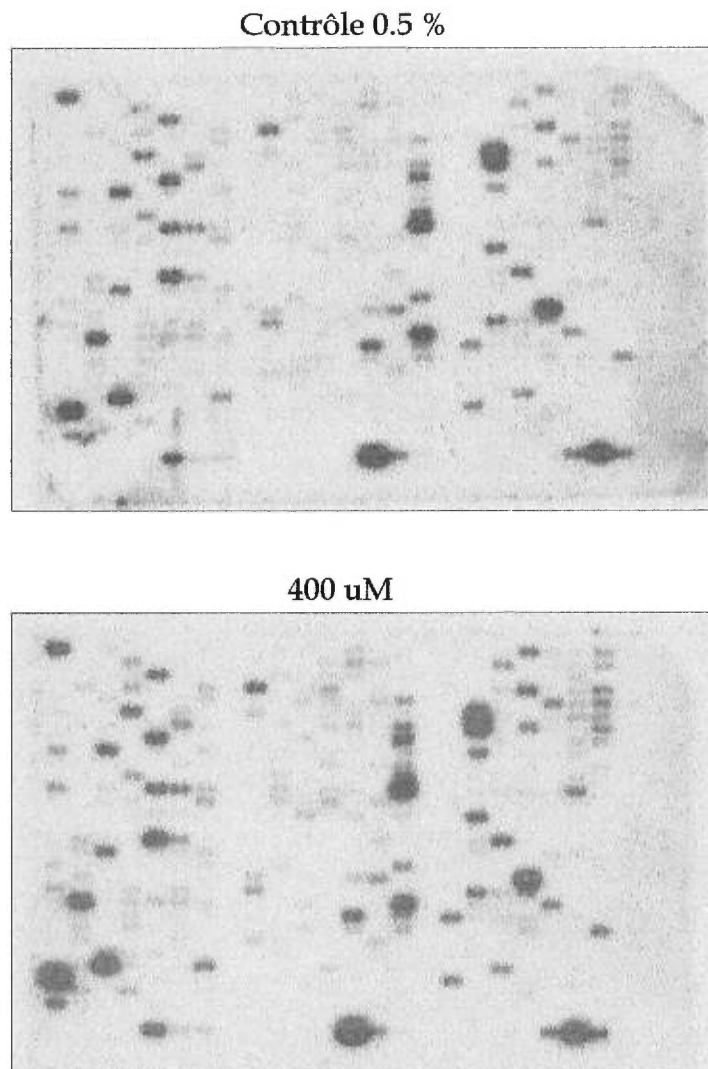


Figure 20: Représentation des membranes «Atlas™ cDNA expression array» hybridées avec l'ADNc obtenu de la lignée MDA-MB-231 traitée et non-traitée à l'oléate. Après une carence en sérum de 24 h, les cellules ont été incubées en présence de 0,5% BSA (Contrôle) ou 400 uM d'oléate pendant 90 min. L'ARNm a été isolé comme décrit dans la section «Matériels et Méthodes». Après génération de l'ADNc marquée au ^{32}P , les membranes ont été hybridées, lavées et exposées sur un film à rayon X comme décrit dans la section «Matériels et Méthodes». La figure représente les autoradiogrammes suite à une exposition de 4h et le résultat de la densitométrie des gènes différenciellement exprimés est résumé au Tableau II.

Tableau II: Induction de l'expression des gènes par l'oléate dans la lignée cellulaire MDA-MB-231

Gène	Facteur d'induction
Protéine ribosomal 60S L6	1,9
Guanine nucleotide-binding protein G-S (sous-unités α)	1,7
Protéine liant la boîte Y (YB-1)	1,6
Myc	1,4
Fra-1	1,3
Facteur de transcription dépendant du cAMP ATF-4	1,2

5. DISCUSSION

La prolifération des cellules cancéreuses mammaires implique une interaction complexe entre les gènes, les facteurs de croissance, les hormones et les nutriments calorigéniques. Plusieurs études ont démontré que les acides gras libres peuvent influencer la croissance de ces cellules *in vivo* et *in vitro*. Par contre, il existe peu d'information concernant le mécanisme d'action des acides gras sur la prolifération et l'apoptose des cellules du cancer du sein.

Nous avons étudié l'action de deux acides gras, l'oléate et le palmitate tous deux liés à l'albumine, sur la croissance de quatre lignées humaines du cancer du sein dans un milieu défini sans sérum. Nos résultats démontrent que l'oléate stimule la prolifération de ces cellules tandis que le palmitate inhibe cette prolifération. De plus, cette diminution de la prolifération par le palmitate est reliée à une induction de l'apoptose. L'effet proapoptotique du palmitate est bloqué par l'oléate. Il est donc surprenant de constater que deux acides gras qui sont présents dans la diète et qui sont les plus abondants de la circulation, ont des effets opposés sur la prolifération des cellules du cancer du sein. De plus, comme l'analogue non-métabolisable 2-bromopalmitate (200 uM), n'a pas eu d'effet sur la prolifération de la lignée MDA-MB-231, nous pouvons conclure que le palmitate doit être métabolisé pour exercer son effet cytotoxique. Une possibilité envisagée est que le palmitate puisse être métabolisé en céramide qui est un métabolite connu pour induire l'apoptose dans diverses lignées cellulaires.

Il a été montré que l'oléate active le récepteur à l'EGF dans la lignée cellulaire endothéliale ECV-304 tandis que le palmitate ne l'active pas (Vacaresse et al., 1999). Cette observation est en accord avec les effets opposés de ces deux acides gras sur la prolifération des lignées cellulaires du cancer du sein. Le récepteur à l'EGF est considéré comme un intermédiaire critique de plusieurs voies de signalisation des différents récepteurs membranaires et il est impliqué

dans la migration cellulaire, la prolifération et la différenciation (Hackel et al., 1999). Son activation induit sa phosphorylation et il peut activer lui même plusieurs voies de signalisation dont celle de la PI3K. Il est intéressant de noter que l'oléate ainsi que divers acides gras polyinsaturés induisent rapidement l'autophosphorylation du récepteur à l'EGF et activent certaines MAPKs (Vacaresse et al., 1999). Le mécanisme par lequel le récepteur à l'EGF est activé par certains acides gras est obscur pour l'instant. Il est possible qu'il existe un récepteur membranaire aux acides gras pouvant transactiver le récepteur à l'EGF. En effet, plusieurs groupes ont montrés qu'il existait des transporteurs membranaires des acides gras mais ce concept est néanmoins controversé (Hamilton et Kamp, 1999). CD36/FAT (Fatty acid translocase) est une de ces protéines membranaires qui pourrait participer au transport des acides gras dans la cellule (Harmon et Abumrad, 1993; Febbraio et al., 1999). Néanmoins certains auteurs ont proposé que CD36 servirait plutôt comme un senseur des acides gras (Greenwalt et al., 1995). Il est intéressant de noter que CD36 est présent à la surface des cellules épithéliales mammaires (Greenwalt et Mather, 1985; Greenwalt et al., 1990; Abbadia et al., 1997) et qu'il possède un domaine en C-terminal capable d'interagir avec les protéines tyrosines kinases de la famille *src* (Huang et al., 1991). Ceci nous permet d'émettre l'hypothèse que CD36 pourrait lier les acides gras et cette liaison serait associée à diverses cascades de protéines kinases via *src*. En effet, CD36 est capable d'activer le récepteur à l'EGF et aussi d'autres voies de signalisation comme celle de la PI3K (Belsches et al., 1997; Porter et Vaillancourt, 1998).

La stimulation 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 et Connolly, 1990). En supposant que ces observations peuvent être extrapolées à la situation *in vivo*, il est donc possible de postuler qu'une diète riche en oléate puisse favoriser la progression du cancer du sein. Ainsi, l'obésité qui est caractérisée par des niveaux d'acides gras libres

circulants élevés est non seulement associée au développement du diabète de type II (Jensen, 1998), mais de plus, est considérée un facteur de risque dans l'incidence du cancer du sein (Carroll, 1998) et du colon (Giovannucci, 1995). De plus, il existe une corrélation positive entre la résistance à l'insuline chez les femmes post-ménopausées et ces deux types de cancer (Giovannucci, 1995; Tran et al., 1996; Stoll, 1996; Stoll, 1998). L'oléate peut-être métabolisé en acide lysophosphatidique (LPA) dans la cellule ce qui peut mener à la sécrétion de ce phospholipide (Goetzl et An, 1998). Le LPA est un puissant agent mitogène qui est capable de lier un récepteur spécifique et activer les voies de signalisation, dont celle de la PI3K, menant à la prolifération cellulaire (Moolenaar et al., 1997). Il est donc possible que l'effet prolifératif de l'oléate sur les lignées cancéreuses mammaires soit provoqué par une stimulation autocrine du LPA sur ces cellules. Il est intéressant de noter que la liaison du LPA à son récepteur est capable de transactiver le récepteur à l'EGF via *src* (Daub et al., 1997) ce qui est consistant avec l'observation de l'activation du récepteur à l'EGF par l'oléate.

En revanche, le palmitate diminue la prolifération de toutes les lignées cellulaires du cancer du sein que nous avons testée. D'autres groupes ont aussi observé que les acides gras saturés diminuent la prolifération des cellules du cancer du sein (Rose et 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. Le palmitate induit aussi l'apoptose des îlots pancréatiques de rats (Shimabukuro et al., 1998), des cellules précurseur hématopoïétique LyD9 (Paumen et al., 1997b) et des cardiomyocytes de rats (de Vries et al., 1997). Le mécanisme par lequel le palmitate exerce son effet pro-apoptotique est incertain. Le palmitate est un précurseur de la synthèse des céramides mais l'oléate ne l'est pas (Merrill et Jones, 1990). Il existe des évidences que le palmitate induirait l'apoptose via la production de céramide dans les îlots pancréatiques de rats (Shimabukuro et al., 1998) et la lignée précurseur hématopoïétique LyD9 (Paumen et al., 1997b). En effet, lorsque l'on bloque la synthèse *de novo* des céramides en inhibant différents

enzymes de la voie de synthèse, on remarque une diminution de l'apoptose (Paumen et al., 1997b; Shimabukuro et al., 1998). De plus, une inhibition par l'etomoxir de la carnitine palmitoyltransférase I (CPT 1), qui catalyse l'étape limitante de la β -oxydation des acides gras, provoque une augmentation de l'apoptose induite par le palmitate (Paumen et al., 1997b). Les cardiomyocytes incubés en présence de palmitate montrent une augmentation de la production de céramides, une augmentation des niveaux de malonyl-CoA et une diminution de la capacité des cellules à oxyder les acides gras, ce qui pourrait mener à l'apoptose (Hickson-Bick et al., 2000). Comme le palmitate doit être métabolisé dans la lignée MDA-MB-231 pour avoir son effet apoptotique, il serait intéressant d'évaluer dans des études ultérieures si la synthèse *de novo* des céramides est impliquée dans son action proapoptotique.

Une autre possibilité pouvant expliquer l'action proapoptotique du palmitate serait l'inhibition de l'acide gras synthétase, l'enzyme responsable de la synthèse endogène des acides gras. En effet, le palmitate inhibe l'activité de l'acide gras synthétase et son expression dans diverses lignées cellulaires et l'inhibition de cette enzyme par la cerulenin a déjà été associée à l'apoptose des cellules du cancer du sein (Pizer et al., 1996; Pizer et al., 1998). De plus, l'expression de la protéine S14 est aussi régulée de façon négative par les acides gras (Jump et al., 1993) et celle-ci est impliquée dans la régulation des enzymes lipogéniques (acetyl-CoA carboxylase, acide gras synthétase et ATP-citrate lyase) (Cunningham et al., 1998). Comme la protéine S14 est surexprimée dans le cancer du sein (Moncur et al., 1998), il est donc possible que son inhibition par le palmitate entraîne une diminution de la lipogénèse qui semble essentielle à la croissance des tumeurs mammaires (Desvergne et Wahli, 1999). Le groupe de recherche de Kuhajda a démontré que l'inhibition de l'acide gras synthétase par divers agents pharmacologiques provoque une accumulation de malonyl-CoA qui pourrait lui-même être un médiateur potentiel de cytotoxicité dans les cellules du cancer du sein (Pizer et al., 2000). En plus de sa fonction de substrat lors de la

synthèse d'acide gras, le malonyl-CoA régule l'oxydation des acides gras en inhibant la CPT I située dans la membrane externe de la mitochondrie (Witters et Kemp, 1992). La façon dont les niveaux de malonyl-CoA supraphysiologiques pourraient mener à l'apoptose n'est pas bien compris. La CPT I qui est régulée par le malonyl-CoA interagit directement avec la protéine antiapoptotique mitochondriale Bcl-2 (Paumen et al., 1997a). De plus, le palmitate cause l'apoptose des cardiomyocytes peut-être via l'augmentation des niveaux de malonyl-CoA ainsi qu'une inhibition de la CPT I et de l'oxydation du palmitate (Hickson-Bick et al., 2000). 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 apoptotiques. Une inhibition de l'oxydation mitochondriale du palmitate pourrait aussi rediriger le partitionnement cellulaire de cet acide gras vers la voie des céramides, laquelle est associée à l'apoptose.

La production de céramides semble entraîner une diminution de l'activité de la PI3K et/ou de PKB/AKT (Zundel et Giaccia, 1998; Zhou et al., 1998; Schmitz-Peiffer et al., 1999). Il est aussi intéressant de constater que l'activation de la voie de la PI3K provoque une augmentation de l'expression de l'acide gras synthétase et que l'inhibition de la PI3K est associée à une diminution de l'expression de cette enzyme (Wang et Sul, 1998). Ainsi on peut spéculer que le palmitate pourrait causer l'apoptose des cellules du cancer du sein en redirigeant les acides gras vers la biosynthèse des céramides lesquelles diminueraient l'activité de la PI3K et aussi, l'expression de l'acide gras synthétase pour diminuer la biosynthèse des lipides nécessaires à la survie et la prolifération cellulaire.

L'effet du palmitate sur l'apoptose de la lignée cellulaire MDA-MB-231 est contrecarré par l'oléate. De plus, la combinaison de ces deux acides gras à une concentration de 100 μ M chacun résulte en une augmentation de la prolifération de cette lignée cellulaire. L'action antiapoptotique de l'oléate contre l'effet du

palmitate a aussi été observée dans les cardiomyocytes de rats où une quantité équimolaire des deux acides gras était nécessaire pour une protection complète (de Vries et al., 1997). 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 ils contiennent aussi d'autres acides gras qui pourraient influencer la croissance des tumeurs de façons différentes.

L'activation de la PI3K suivant la stimulation par des facteurs de croissance est associée à la prolifération cellulaire et à la survie des cellules (Kaplan et al., 1987; Yao et Cooper, 1995). 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 dans la lignée MDA-MB-231. À notre connaissance, ceci est la première preuve expérimentale démontrant que les acides gras influencent l'activité de la PI3K. Par contre, il est nécessaire de confirmer ce résultat en mesurant l'activité de la PI3K en présence d'oléate et d'utiliser des dominants négatifs de l'enzyme pour compléter l'expérience avec les inhibiteurs pharmacologiques. L'activation de la PI3K est connue pour entraîner une augmentation de l'activité de la PKB/AKT. Cette dernière exerce son action sur plusieurs cibles impliquées dans l'apoptose, le métabolisme, la prolifération et la survie cellulaire. 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 via probablement la PI3K. Ainsi, l'effet antiapoptotique de l'oléate pourrait impliquer la phosphorylation de la PKB/AKT et ensuite la phosphorylation de la

protéine apoptotique BAD qui médie son action en liant la protéine 14-3-3 bloquant ainsi l'apoptose (del Peso et al., 1997).

PKB/AKT est aussi 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 (PFK-2) (Deprez et al., 1997). On peut penser que les acides gras pourraient aussi influencer l'activité de la PI3K et de la PKB/AKT dans le but de réguler le métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses mammaires. En effet, on sait depuis longtemps que les cellules cancéreuses possèdent une voie glycolytique très active et ce même en présence d'oxygène (l'effet Warburg) (Warburg, 1956; Levin et Gevers, 1981). Les mécanismes de régulation responsables de cette glycolyse élevée et de la synthèse *de novo* accrue des acides nucléiques impliquant la voie des pentoses phosphates demeurent encore obscurs. L'activation de certains oncogènes comme *myc*, *ras* et *src*, pourrait être responsable de ce phénomène (Dang et Semenza, 1999). De plus, la découverte récente qu'il existe une PFK-2 constitutivement active dans diverses lignées cancéreuses humaines pourrait expliquer en partie cette glycolyse élevée ainsi qu'une prolifération élevée permise grâce à l'augmentation de synthèse de l'ADN (Chesney et al., 1999).

Afin de mieux comprendre comment les acides gras peuvent réguler la promotion du cancer du sein, il est intéressant d'identifier des gènes candidats qui sont induits rapidement par ces acides gras. Lorsque nous avons étudié les gènes pouvant être rapidement activés par l'oléate, nous avons observé que l'expression de gènes codant pour certains facteurs de transcription et des oncogènes étaient rapidement induite. En effet, *fra-1* et *myc* sont reconnus pour être induit rapidement en réponse à des facteurs de croissance et des cytokines. *Myc* est reconnu pour être impliqué dans la prolifération cellulaire et dans l'apoptose

(Fuhrmann et al., 1999). *fra-1* est aussi induit par les acides gras dans les préadipocytes et les fibroblastes et ce facteur de transcription fait partie du complexe AP-1, comprenant des membres des famille *fos* et *jun*, qui joue un rôle important dans le contrôle de la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Smeyne et al., 1993; Karin, 1995; Bossy-Wetzel et al., 1997).

Un autre candidat intéressant qui est induit par l'oléate est *YB-1*. La protéine codée par le gène est capable de lier le promoteur du gène MDR1 (multidrug resistance 1) et est impliquée dans l'activation de ce gène (Uchiumi et al., 1993; Goldsmith et al., 1993; Ohga et al., 1996). MDR1 est une glycoprotéine qui est fortement activée lors de la sélection de cellules résistantes aux drogues comme les agents anticancéreux (Kohno et al., 1989; Kohno et al., 1994; Combates et al., 1997). Cette glycoprotéine agit comme une pompe ATP-dépendante qui diminue les concentrations cytosoliques des agents anticancéreux (Gerlach et al., 1986). *YB-1* est localisée dans le cytoplasme mais est translocalisée dans le noyau lorsque la cellule est traitée avec des agents anticancéreux. De plus, *YB-1* lie le promoteur du gène MDR1 dans les cellules cancéreuses mammaires provoquant ainsi une augmentation de la synthèse de la glycoprotéine codant pour ce gène (Bargou et al., 1997). En plus de sa surexpression dans le cancer mammaire, sa surexpression a été montré dans les cellules cancéreuses du colon, de l'ovaire et dans les ostéosarcomes (Oda et al., 1998; Shibao et al., 1999; Kamura et al., 1999). Le fait qu'un acide gras augmente l'expression de *YB-1* suggère que ceux-ci pourraient favoriser l'acquisition de la résistance à des agents chimiothérapeutiques dans les cellules du cancer du sein. Il serait donc intéressant d'étudier plus dans le détail l'expression du gène MDR1 en réponse à l'oléate et d'autres acides gras.

Les résultats obtenus utilisant le «ATLAS array» doivent par contre être confirmé en répétant l'expérience. De plus, une analyse par northern des gènes

qui sont rapidement induit par l'oléate est nécessaire pour confirmer le résultat obtenu avec le «ATLAS array».

L'ensemble des résultats supportent l'idée que le type d'acide gras (saturé, monoinsaturé et polyinsaturé) et leur ratio dans la diète influencent la carcinogenèse mammaire. Il serait intéressant de déterminer le mécanisme d'action de l'oléate et du palmitate sur la croissance des cellules du cancer du sein, particulièrement leur implication en amont et en aval de la PI3K. Nos résultats devraient avoir des implications pour la compréhension du lien entre les acides gras et le cancer . De plus, ils 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.

6. RÉFÉRENCES

Abbadia, Z., Vericel, E., Mathevet, P., Bertin, N., Panaye, G., and Frappart, L. (1997). Fatty acid composition and CD36 expression in breast adipose tissue of premenopausal and postmenopausal women. *Anticancer Res.* 17, 1217-1221.

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.

Abramson, S.B., Leszczynska-Piziak, J., and Weissmann, G. (1991). Arachidonic acid as a second messenger. Interactions with a GTP-binding protein of human neutrophils. *J.Immunol.* 147, 231-236.

Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A., and Chatterjee, V.K. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J.Biol.Chem.* 272, 5128-5132.

Alo, Visca, P., Marci, A., Mangoni, A., Botti, C., and Di, T.U. (1996). Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 77, 474-482.

Alo, P.L., Visca, P., Trombetta, G., Mangoni, A., Lenti, L., Monaco, S., Botti, C., Serpieri, D.E., and Di, T.U. (1999). Fatty acid synthase (FAS) predictive strength in poorly differentiated early breast carcinomas. *Tumori.* 85, 35-40.

Bargou, R.C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M.Y., Winzer, K.J., Dietel, M., Dorken, B., and Royer, H.D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression [see comments]. *Nat.Med.* 3, 447-450.

Barry, O.P., Kazanietz, M.G., Pratico, D., and FitzGerald, G.A. (1999). Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* 274, 7545-7556.

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.

Belsches, A.P., Haskell, M.D., and Parsons, S.J. (1997). Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front.Biosci.* 2:d501-18, d501-d518

Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L., and Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* 16, 1695-1709.

Braissant, O. and Wahli, W. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139, 2748-2754.

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. and Erickson, K.L. (1991a). 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.

Buckman, D.K., Hubbard, N.E., and Erickson, K.L. (1991b). Eicosanoids and linoleate-enhanced growth of mouse mammary tumor cells. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* 44, 177-184.

Burgering, B.M. and Coffey, P.J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.

Buss, J.E. and Sefton, B.M. (1986). Direct identification of palmitic acid as the lipid attached to p21ras. *Mol.Cell Biol.* 6, 116-122.

Buteau, J., Roudot, R., Susini, S., and Prentki, M. (1999). 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.

Carroll, K.K. (1991). Dietary fats and cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* 53, 1064S-1067S.

Carroll, K.K. (1998). Obesity as a risk factor for certain types of cancer. *Lipids* 33, 1055-1059.

- 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.
- Champeme, M.H., Bieche, I., Lizard, S., and Lidereau, R. (1995). 11q13 amplification in local recurrence of human primary breast cancer. *Genes Chromosomes.Cancer* *12*, 128-133.
- Chesney, J., Mitchell, R., Benigni, F., Bacher, M., Spiegel, L., Al-Abed, Y., Han, J.H., Metz, C., and Bucala, R. (1999). An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *96*, 3047-3052.
- Cho, Y. and Ziboh, V.A. (1994). Expression of protein kinase C isozymes in guinea pig epidermis: selective inhibition of PKC-beta activity by 13-hydroxyoctadecadienoic acid-containing diacylglycerol. *J.Lipid Res.* *35*, 913-921.
- Chung, F.L., Chen, H.J., and Nath, R.G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* *17*, 2105-2111.
- Clay, C.E., Namen, A.M., Atsumi, G., Willingham, M.C., High, K.P., Kute, T.E., Trimboli, A.J., Fonteh, A.N., Dawson, P.A., and Chilton, F.H. (1999). Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* *20*, 1905-1911.
- 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.
- Cohen, L.A., Thompson, D.O., Maeura, Y., Choi, K., Blank, M.E., and Rose, D.P. (1986). 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.
- Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M., and Worley, P.F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* *340*, 474-476.
- Combates, N.J., Kwon, P.O., Rzepka, R.W., and Cohen, D. (1997). Involvement of the transcription factor NF-IL6 in phorbol ester induction of P-glycoprotein in U937 cells. *Cell Growth Differ.* *8*, 213-219.

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.

Cornelisse, C.J., Cornelis, R.S., and Devilee, P. (1996). Genes responsible for familial breast cancer. *Pathol.Res.Pract.* *192*, 684-693.

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.

Cunningham, B.A., Moncur, J.T., Huntington, J.T., and Kinlaw, W.B. (1998). "Spot 14" protein: a metabolic integrator in normal and neoplastic cells. *Thyroid.* *8*, 815-825.

Dang, C.V. and Semenza, G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends.Biochem.Sci.* *24*, 68-72.

Das, U.N. (1999). Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* *61*, 157-163.

Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* *13*, 2905-2927.

Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., and Ullrich, A. (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* *16*, 7032-7044.

De Vries V.J., Vork, M.M., Roemen, T.H., de, J.Y., Cleutjens, J.P., van der Vusse GJ, and van, B.M. (1997). Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J.Lipid Res.* *38*, 1384-1394.

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.

Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M., and Singer, S. (1999). Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *96*, 3951-3956.

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.

Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* *275*, 661-665.

Dunphy, J.T. and Linder, M.E. (1998). Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim.Biophys.Acta* *1436*, 245-261.

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.

Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J.W., Heber, D., and Koeffler, H.P. (1998). Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *95*, 8806-8811.

Eyford, J.E., Thorlacius, S., Steinarsdottir, M., Valgardsdottir, R., Ogmundsdottir, H.M., and Anamthawat-Jonsson, K. (1995). p53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. *Cancer Res.* *55*, 646-651.

Fay, M.P., Freedman, L.S., Clifford, C.K. and Midthune, D.N. (1997). Effect of different types and amount of fat on the development of mammary tumors in rodent: a review. *Cancer Res.* *57*, 3979-3988.

Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., and Silverstein, R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J.Biol.Chem.* *274*, 19055-19062.

Finstad, H.S., Myhrstad, M.C., Heimli, H., Lomo, J., Blomhoff, H.K., Kolset, S.O., and Drevon, C.A. (1998). Multiplication and death-type of leukemia cell lines exposed to very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Leukemia* *12*, 921-929.

Fuhrmann, G., Rosenberger, G., Grusch, M., Klein, N., Hofmann, J., and Krupitza, G. (1999). The MYC dualism in growth and death. *Mutat.Res.* *437*, 205-217.

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.

Gansler, T.S., Hardman, W., Hunt, D.A., Schaffel, S., and Hennigar, R.A. (1997). Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum.Pathol.* *28*, 686-692.

Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., and Ling, V. (1986). Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* *324*, 485-489.

Giovannucci, E. (1995). Insulin and colon cancer. *Cancer Causes.Control.* *6*, 164-179.

Goetzl, E.J. and An, S. (1998). Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* *12*, 1589-1598.

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.

Goldsmith, M.E., Madden, M.J., Morrow, C.S., and Cowan, K.H. (1993). A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (*mdr1*) gene. *J.Biol.Chem.* *268*, 5856-5860.

Gottlieb, R.A. and Engler, R.L., (1999). Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann N Y Acad Sci.* *874*, 412-426.

Greenwalt, D.E. and Mather, I.H. (1985). Characterization of an apically derived epithelial membrane glycoprotein from bovine milk, which is expressed in capillary endothelia in diverse tissues. *J.Cell Biol.* *100*, 397-408.

Greenwalt, D.E., Scheck, S.H., and Rhinehart-Jones, T. (1995). Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *J.Clin.Invest.* *96*, 1382-1388.

Greenwalt, D.E., Watt, K.W., So, O.Y., and Jiwani, N. (1990). PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV). *Biochemistry* *29*, 7054-7059.

Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N., and Ullrich, A. (1999). Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* *11*, 184-189.

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.

Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., and Marshall, C.J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* *57*, 1167-1177.

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*, 57-69.

Harmon, C.M. and Abumrad, N.A. (1993). 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.

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.

Herschman, H.R. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu.Rev.Biochem.* *60:281-319*, 281-319.

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., Ferrante, A., Edwards, Y.S., Huang, Z.H., Hartfield, P.J., Rathjen, D.A., Poulos, A., and Murray, A.W. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid in rat liver epithelial WB cells by a protein kinase C-dependent mechanism. *J.Biol.Chem.* *270*, 4201-4204.

Hii, C.S., Huang, Z.H., Bilney, A., Costabile, M., Murray, A.W., Rathjen, D.A., Der, C.J., and Ferrante, A. (1998). Stimulation of p38 phosphorylation and activity by arachidonic acid in HeLa cells, HL60 promyelocytic leukemic cells, and human neutrophils. Evidence for cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* *273*, 19277-19282.

Hill, C.S. and Treisman, R. (1995). Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J.* 14, 5037-5047.

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.

Hu, Z.Y., Madamanchi, N.R., and Rao, G.N. (1998). cAMP inhibits linoleic acid-induced growth by antagonizing p27(kip1) depletion, but not interfering with the extracellular signal-regulated kinase or AP-1 activities. *Biochim.Biophys.Acta* 1405, 139-146.

Huang, M.M., Bolen, J.B., Barnwell, J.W., Shattil, S.J., and Brugge, J.S. (1991). 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.

Huang, S., Konieczkowski, M., Schelling, J.R., and Sedor, J.R. (1999). Interleukin-1 stimulates Jun N-terminal/stress-activated protein kinase by an arachidonate-dependent mechanism in mesangial cells. *Kidney Int.* 55, 1740-1749.

Hug, H. and Sarre, T.F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem.J.* 291, 329-343.

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., and Howe, G.R. (1996). Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N.Engl.J.Med.* 334, 356-361.

Hunter, D.J. and Willett, W.C. (1993). Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol.Rev.* 15, 110-132.

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.

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

Jensen, M.D. (1998). Diet effects on fatty acid metabolism in lean and obese humans. *Am.J.Clin.Nutr.* *67*, 531S-534S.

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.

Jump, D.B., Clarke, S.D., MacDougald, O., and Thelen, A. (1993). Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *90*, 8454-8458.

Jump, D.B. and Oppenheimer, J.H. (1985). High basal expression and 3,5,3'-triiodothyronine regulation of messenger ribonucleic acid S14 in lipogenic tissues. *Endocrinology* *117*, 2259-2266.

Jungling, E. and Kammermeier, H. (1988). A one-vial method for routine extraction and quantification of free fatty acids in blood and tissue by HPLC. *Anal.Biochem.* *171*, 150-157.

Kamata, H. and Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* *11*, 1-14.

Kampert, J.B., Whittemore, A.S., and Paffenbarger, R.S.J. (1988). Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am.J.Epidemiol.* *128*, 962-979.

Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi, H., Mitsumoto, M., Kohno, K., Kuwano, M., and Nakano, H. (1999). Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer* *85*, 2450-2454.

Kaplan, D.R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Pallas, D.C., White, M., Cantley, L., and Roberts, T.M. (1987). Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. *Cell* *50*, 1021-1029.

Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* *270*, 16483-16486.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of

peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 2160-2164.

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.

Kinlaw, W.B., Schwartz, H.L., Towle, H.C., and Oppenheimer, J.H. (1986). Opposing effects of glucagon and triiodothyronine on the hepatic levels of messenger ribonucleic acid S14 and the dependence of such effects on circadian factors. *J.Clin.Invest.* 78, 1091-1096.

Kohlmeier, L. and Mendez, M. (1997). Controversies surrounding diet and breast cancer. *Proc.Nutr.Soc.* 56, 369-382.

Kohno, K., Sato, S., Takano, H., Matsuo, K., and Kuwano, M. (1989). The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 165, 1415-1421.

Kohno, K., Tanimura, H., Sato, S., Nakayama, Y., Makino, Y., Wada, M., Fojo, A.T., and Kuwano, M. (1994). Cellular control of human multidrug resistance 1 (mdr-1) gene expression in absence and presence of gene amplification in human cancer cells. *J.Biol.Chem.* 269, 20503-20508.

Kolesnick, R.N. and Kronke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu.Rev.Physiol.* 60:643-65, 643-665.

Lacroix, S., Vallieres, L., and Rivest, S. (1996). C-fos mRNA pattern and corticotropin-releasing factor neuronal activity throughout the brain of rats injected centrally with a prostaglandin of E2 type. *J.Neuroimmunol.* 70, 163-179.

Lefebvre, A.M., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J.C., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R., and Auwerx, J. (1998). Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat.Med.* 4, 1053-1057.

Levin, L. and Gevers, W. (1981). Metabolic alterations in cancer. Part I. Carbohydrate metabolism. *S.Afr.Med.J.* 59, 518-521.

Lewin, B. (1991). Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 64, 303-312.

Lister, M.D., Deems, R.A., Watanabe, Y., Ulevitch, R.J., and Dennis, E.A. (1988). Kinetic analysis of the Ca²⁺-dependent, membrane-bound, macrophage phospholipase A2 and the effects of arachidonic acid. *J.Biol.Chem.* 263, 7506-7513.

Lu, Y., Lin, Y.Z., LaPushin, R., Cuevas, B., Fang, X., Yu, S.X., Davies, M.A., Khan, H., Furui, T., Mao, M., Zinner, R., Hung, M.C., Steck, P., Siminovitch, K., and Mills, G.B. (1999). The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene* 18, 7034-7045.

Mates, J.M. and Sanchez-Jimenez, F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2000.Feb.;32.(2.):157.-70. 32, 157-170.

Mathias, S., Pena, L.A., and Kolesnick, R.N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem.J.* 335, 465-480.

McMahon, S.B. and Monroe, J.G. (1992). Role of primary response genes in generating cellular responses to growth factors. *FASEB J.* 6, 2707-2715.

McPhail, L.C., Clayton, C.C., and Snyderman, R. (1984). A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. *Science* 224, 622-625.

Merrill, A.H.J. and Jones, D.D. (1990). An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim.Biophys.Acta* 1044, 1-12.

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.

Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic.Acids.Res.* 16, 1215

Moncur, J.T., Park, J.P., Memoli, V.A., Mohandas, T.K., and Kinlaw, W.B. (1998). The "Spot 14" gene resides on the telomeric end of the 11q13 amplicon and is expressed in lipogenic breast cancers: implications for control of tumor metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 6989-6994.

Moolenaar, W.H., Kranenburg, O., Postma, F.R., and Zondag, G.C. (1997). Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 168-173.

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.

Morgan, J.I. and Curran, T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends.Neurosci.* 12, 459-462.

Morris, J.J. and Seifter, E. (1992). The role of aromatic hydrocarbons in the genesis of breast cancer. *Med.Hypotheses.* 38, 177-184.

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.

NCIC. Canadian Cancer Statistics 1999. Toronto, Canada, 1999.

Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 161-167.

Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.

Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.

Oda, Y., Sakamoto, A., Shinohara, N., Ohga, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M., and Iwamoto, Y. (1998). Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin.Cancer Res.* 4, 2273-2277.

Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M., and Kohno, K. (1996). Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res.* 56, 4224-4228.

Oishi, K., Zheng, B., and Kuo, J.F. (1990). Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J.Biol.Chem.* 265, 70-75.

Ormiston, W. (1996). Hereditary breast cancer. *Eur.J.Cancer Care (Engl.)* 5, 13-20.

Pariza, M.W. (1987). Dietary fat, calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer risk. *Nutr.Rev.* 45, 1-7.

Parker, P.J. and Waterfield, M.D. (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: a novel effector. *Cell Growth Differ.* 3, 747-752.

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.

Perera, F.P., Estabrook, A., Hewer, A., Channing, K., Rundle, A., Mooney, L.A., Whyatt, R., and Phillips, D.H. (1995). Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. *Cancer Epidemiol.Biomarkers.Prev.* 4, 233-238.

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., Jackisch, C., Wood, F.D., Pasternack, G.R., Davidson, N.E., and Kuhajda, F.P. (1996). Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 56, 2745-2747.

Pizer, E.S., Lax, S.F., Kuhajda, F.P., Pasternack, G.R., and Kurman, R.J. (1998). Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer* 83, 528-537.

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.

Porter, A.C. and Vaillancourt, R.R. (1998). Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 17, 1343-1352.

Rao, G.N., Baas, A.S., Glasgow, W.C., Eling, T.E., Runge, M.S., and Alexander, R.W. (1994). Activation of mitogen-activated protein kinases by arachidonic acid and its metabolites in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 269, 32586-32591.

Rashid, A., Pizer, E.S., Moga, M., Milgraum, L.Z., Zahurak, M., Pasternack, G.R., Kuhajda, F.P., and Hamilton, S.R. (1997). Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am.J.Pathol.* 150, 201-208.

Ren, J.G., Zheng, R.L., Shi, Y.M., Gong, B., and Li, J.F. (1998). Apoptosis, redifferentiation and arresting proliferation simultaneously triggered by oxidative stress in human hepatoma cells. *Cell Biol.Int.* 22, 41-49.

Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1451, 1-16.

Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J.A., Soria, B., and Prentki, M. (1999). 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.

Rose, D.P. (1997). 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.

Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. (1998). Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat.Med.* 4, 1058-1061.

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. (1998).

Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat.Med.* 4, 1046-1052.

Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Shinar, D., and Rodan, G.A. (1992). Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol.Endocrinol.* 6, 1634-1641.

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.

Schuuring, E., Verhoeven, E., van, T.H., Peterse, J.L., Nunnink, B., Thunnissen, F.B., Devilee, P., Cornelisse, C.J., van de Vijver MJ, and Mooi, W.J. (1992). Amplification of genes within the chromosome 11q13 region is indicative of poor prognosis in patients with operable breast cancer. *Cancer Res.* 52, 5229-5234.

Shibao, K., Takano, H., Nakayama, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K., and Itoh, H. (1999). Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int.J.Cancer* 83, 732-737.

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.

Shurbaji, M.S., Kalbfleisch, J.H., and Thurmond, T.S. (1996). Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum.Pathol.* 27, 917-921.

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.

Smeyne, R.J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Robertson, L.M., Curran, T., and Morgan, J.I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363, 166-169.

Smith, S.J., Deacon, J.M., and Chilvers, C.E. (1994). Alcohol, smoking, passive smoking and caffeine in relation to breast cancer risk in young women. UK National Case-Control Study Group. *Br.J.Cancer* 70, 112-119.

Spiegel, S. and Milstien, S. (1995). Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *J.Membr.Biol.* 146, 225-237.

Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., and Hawkins, P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570.

Stoll, B.A. (1996). Nutrition and breast cancer risk: can an effect via insulin resistance be demonstrated? *Breast Cancer Res.Treat.* 38, 239-246.

Stoll, B.A. (1998). Association between breast and colorectal cancers. *Br.J.Surg.* 85, 1468-1472.

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.

Swarts, H.G., Schuurmans, S.F., and De, P.J. (1990). Binding of unsaturated fatty acids to Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase leading to inhibition and inactivation. *Biochim.Biophys.Acta* 1024, 32-40.

Teng, D.H., Hu, R., Lin, H., Davis, T., Iliev, D., Frye, C., Swedlund, B., Hansen, K.L., Vinson, V.L., Gumper, K.L., Ellis, L., El-Naggar, A., Frazier, M., Jasser, S., Langford, L.A., Lee, J., Mills, G.B., Pershouse, M.A., Pollack, R.E., Tornos, C., Troncoso, P., Yung, W.K., Fujii, G., Berson, A., and Steck, P.A. (1997). MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* 57, 5221-5225.

Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P., and Glaser, L. (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu.Rev.Biochem.* 57:69-99, 69-99.

Tran, T.T., Medline, A., and Bruce, W.R. (1996). Insulin promotion of colon tumors in rats. *Cancer Epidemiol.Biomarkers.Prev.* 5, 1013-1015.

Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., and Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11, 433-439.

Uchiumi, T., Kohno, K., Tanimura, H., Matsuo, K., Sato, S., Uchida, Y., and Kuwano, M. (1993). Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ.* 4, 147-157.

Vaca, C.E., Wilhelm, J., and Harms-Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat.Res.* 195, 137-149.

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.

van der Vusse GJ, Roemen, T.H., Flameng, W., and Reneman, R.S. (1983). Serum-myocardium gradients of non-esterified fatty acids in dog, rat and man. *Biochim.Biophys.Acta* 752, 361-370.

Van Echten, G. and Sandhoff, K. (1993). Ganglioside metabolism. *Enzymology, Topology, and regulation.* *J.Biol.Chem.* 268, 5341-5344.

Varticovski, L., Druker, B., Morrison, D., Cantley, L., and Roberts, T. (1989). The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol-3 kinase. *Nature* 342, 699-702.

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., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N. (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, D. and Sul, H.S. (1998). Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J.Biol.Chem.* 273, 25420-25426.

Warburg, O. (1956). *Science* 123, 309-314.

Welsch, C.W. (1992). Relationship between dietary fat and experimental mammary tumorigenesis: a review and critique. *Cancer Res.* 52, 2040s-2048s.

White, E. (1987). Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. *Am.J.Public Health* 77, 495-497.

WHO. World Health Organisation. The World Health Report. Geneva:WHO 1997

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.

Willett, W.C., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Colditz, G., Manson, J.E., Spiegelman, D., Rosner, B., Hennekens, C.H., and Speizer, F.E. (1992). Dietary fat and fiber in relation to risk of breast cancer. An 8-year follow-up. *JAMA* 268, 2037-2044.

Witters, L.A. and Kemp, B.E. (1992). Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 267, 2864-2867.

Wu, A.H., Pike, M.C., and Stram, D.O. (1999). Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 91, 529-534.

Yao, R. and Cooper, G.M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.

Zeisel, S.H. (1993). Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J.* 7, 551-557.

Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Pittman, R.N. (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 273, 16568-16575.

Zundel, W. and Giaccia, A. (1998). Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev.* 12, 1941-1946.