

Université de Montréal

**Rôle de GPR40 dans la survie et la prolifération  
cellulaires induites par l'oléate dans les cellules de cancer  
du sein MDA-MB-231 et de cancer de la prostate DU145**

par

Geneviève St-Onge

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Doctorat  
en biologie moléculaire

Avril, 2010

© Geneviève St-Onge, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Rôle de GPR40 dans la survie et la prolifération cellulaires induites par l'oléate dans  
les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et de cancer de la prostate DU145**

Présentée par :  
Geneviève St-Onge

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Richard Bertrand, président-rapporteur  
Dr Yves Langelier, directeur de recherche  
Dre Isabelle Royal, membre du jury  
Dre Nathalie Lamarche, examinateur externe  
Dr Philippe Roux, représentant du doyen de la FES

## Résumé

La relation entre l'obésité et le cancer, bien qu'établie par des études épidémiologiques, est peu connue. Pourtant, environ 25 % des cancers pourraient y être attribuables. Parmi les cancers liés à l'obésité, les cancers du côlon, du sein chez les femmes ménopausées et de la prostate sont les plus fréquents. Des études sur modèles animaux ont suggéré une association positive entre une diète riche en gras et le développement du cancer mammaire et de la prostate.

Nous avons étudié les mécanismes moléculaires par lesquels les acides gras influencent le devenir de lignées de cellules cancéreuses du sein et de la prostate. Ces travaux ont montré que les acides gras insaturés, dont l'oléate, induisent la prolifération cellulaire tandis que les acides gras saturés, dont le palmitate, diminuent la prolifération. Un traitement à l'oléate stimule la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et de la prostate DU145 alors qu'un traitement au palmitate entraîne l'apoptose. Le mécanisme d'action de l'oléate sur la prolifération a été étudié de façon plus approfondie. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques nous a permis de déterminer que l'effet prolifératif de l'oléate implique la voie PI3K/Akt, la voie ERK1/2 et l'activation d'un ou de plusieurs récepteur(s) couplé(s) aux protéines G (GPCR). L'oléate induit la phosphorylation rapide des protéines Akt et ERK1/2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et de la prostate DU145.

Au cours des dernières années, deux GPCRs ont été identifiés comme étant activables par des acides gras à moyennes et à longues chaînes, GPR40 et GPR120. GPR40 étant exprimé dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate contrairement à l'expression de GPR120 qui était inexistante dans la plupart des lignées, nous avons étudié l'implication de GPR40 dans l'effet prolifératif de l'oléate. Ces deux

récepteurs n'étant pas exprimés dans les cellules épithéliales mammaires humaines en culture primaire, ces cellules ne répondent pas aux effets de l'oléate sur la prolifération et l'activation des voies de signalisation. L'activation des voies Akt et ERK1/2 par l'oléate dans les cellules MDA-MB-231 et DU145 est potentialisée par la surexpression du récepteur GPR40 et inhibée par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre ce récepteur. Cependant, la prolifération induite par l'oléate ne semble pas affectée par la présence d'un siRNA dirigé contre GPR40. L'oléate étant un acide gras, il est capable d'entrer librement dans les cellules et une partie de ses effets sur la prolifération pourrait être attribuée à sa métabolisation. Un agoniste de GPR40, le GW9508, est en mesure d'activer GPR40 sans toutefois entrer dans les cellules ni activer le métabolisme de l'oléate. Le GW9508 stimule la phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et de la prostate DU145, mais il n'est pas en mesure d'induire la prolifération cellulaire comme le fait l'oléate.

Ces résultats nous permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'oléate sur les cellules de cancer du sein et de la prostate. L'oléate induit la signalisation de GPR40 qui est impliquée dans l'activation rapide des voies de signalisation Akt et ERK1/2. De son côté, l'effet prolifératif induit par l'oléate s'effectue par un mécanisme GPR40-indépendant, possiblement lié au métabolisme de l'oléate.

**Mots-clés :** Akt, Cancer, ERK1/2, GPR40, Oléate, Prolifération

## Abstract

The relationship between obesity and cancer, although established by epidemiological studies, remains relatively unknown. However, about 25 % of cancers could be attributed to obesity. Among cancers that are affected by obesity, colon cancer, post-menopausal breast cancer and prostate cancer are the more frequent. Studies on animal models have suggested a positive association between high fat diets and the development of mammary and prostate cancer.

We have studied the molecular mechanisms by which fatty acids influence breast and prostate cancer cells fate. This work has shown that unsaturated fatty acids, including oleate, can induce cellular proliferation while saturated fatty acids, including palmitate, reduce proliferation. An oleate treatment stimulates lipid droplets formation in the cytoplasm of breast cancer cells MDA-MB-231 and prostate cancer cells DU145 while a palmitate treatment induces apoptosis. The action mechanism of oleate on proliferation was studied more closely. Using pharmacological inhibitors, we determine that oleate-induced cell proliferation involves PI3K/Akt signaling pathway, ERK1/2 signaling pathway and the activation of one or many G protein coupled receptor(s) (GPCR). Oleate induces rapid Akt and ERK1/2 phosphorylation in breast cancer cells MDA-MB-231 and prostate cancer cells DU145.

In the last few years, two GPCRs were identified as being activated by medium and long chain fatty acids, GPR40 and GPR120. GPR40 being expressed in many breast and prostate cancer cell lines while GPR120 expression was null in most cell lines tested, we studied the role of GPR40 in oleate-induced proliferation. Human epithelial mammary cells in primary culture did not express GPR40 nor GPR120 and failed to respond to oleate-induced cell proliferation or activation of signaling pathways. Akt and ERK1/2 signaling

pathways activation by oleate in MDA-MB-231 and DU145 cells is potentiated by GPR40 over-expression and inhibited by the use of an siRNA directed against that receptor. However, oleate-induced cell proliferation does not seem to be affected by the presence of the siRNA directed against GPR40. Oleate being a fatty acid, it can enter cells freely by crossing the plasma membrane and part of its effects on proliferation could be attributed to its metabolism. A GPR40 agonist, GW9508, is able to activate GPR40 without entering the cells nor activating oleate's metabolism. GW9508 stimulates Akt and ERK1/2 phosphorylation in breast cancer cells MDA-MB-231 and prostate cancer cells DU145, but does not induce cell proliferation as does oleate.

These results help us to understand the action mechanism of oleate in breast and prostate cancer cells. Oleate induces GPR40 signalization which is involved in the rapid Akt and ERK1/2 signaling pathways activation. On the other hand, oleate-induced cell proliferation is carried out by a GPR40-independent mechanism, possibly linked to oleate's metabolism.

**Keywords** : Akt, Cancer, ERK1/2, GPR40, Oleate, Proliferation

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Introduction.....	1
Chapitre 1. La relation entre le cancer et les acides gras.....	1
1.1 Statistiques concernant le cancer du sein et de la prostate.....	1
1.1.1 Le cancer du sein.....	1
1.1.2 Le cancer de la prostate.....	1
1.2 Études épidémiologiques sur la relation entre le cancer et les acides gras.....	2
1.2.1 Le cancer du sein.....	2
1.2.2 Le cancer de la prostate.....	8
Chapitre 2. Association entre les acides gras et le cancer dans des modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	10
2.1 Études sur des modèles animaux.....	10
2.1.1 Le cancer du sein.....	10
2.1.2 Le cancer de la prostate.....	14
2.2 Études <i>in vitro</i> .....	15
2.2.1 Le cancer du sein.....	15
2.2.2 Le cancer de la prostate.....	17

Chapitre 3. Le métabolisme des acides gras .....	19
3.1 L'utilisation des acides gras à longues chaînes de source exogène .....	19
3.2 La synthèse <i>de novo</i> des acides gras à longues chaînes .....	21
3.3 L'entreposage des acides gras : les gouttelettes lipidiques .....	25
3.3.1 Les protéines des gouttelettes lipidiques .....	25
3.3.2 Le métabolisme des gouttelettes lipidiques .....	27
3.4 La lipolyse des acides gras .....	28
 Chapitre 4. Voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire ..	31
4.1 La voie Akt .....	31
4.1.1 Rôle d'Akt dans la survie cellulaire .....	31
4.1.2 Rôle d'Akt dans la croissance cellulaire.....	34
4.1.3 Rôle d'Akt dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire .....	35
4.2 La voie ERK1/2 .....	36
4.2.1 Rôle d'ERK1/2 dans la survie cellulaire .....	36
4.2.2 Rôle d'ERK1/2 dans la croissance cellulaire.....	37
4.2.3 Rôle d'ERK1/2 dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire.....	38
 Chapitre 5. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	39
5.1 Activation des GPCRs via l'association avec leurs ligands .....	39
5.2 La sous-unité $G\alpha$ .....	40
5.2.1 Caractérisation .....	40
5.2.2 Signalisation induite par l'activation des sous-unités $G\alpha$ .....	40
5.3 Le dimère $G\beta\gamma$ .....	41
5.3.1 Caractérisation .....	41
5.3.2 Signalisation induite par l'activation du dimère $G\beta\gamma$ .....	42
 Chapitre 6. Les récepteurs aux acides gras .....	43
6.1 Les récepteurs de la famille GPR40-43.....	43



6.1.1 GPR40 .....	43
6.1.1.1 Caractérisation du récepteur GPR40 .....	43
6.1.1.2 Expression du récepteur GPR40 .....	44
6.1.1.3 Fonctions du récepteur GPR40 .....	44
6.1.2 GPR41 et GPR43 .....	46
6.1.2.1 Caractérisation des récepteurs GPR41 et GPR43 .....	46
6.1.2.2 Expression des récepteurs GPR41 et GPR43.....	46
6.1.2.3 Fonctions des récepteurs GPR41 et GPR43.....	47
6.2 GPR120 .....	47
6.2.1 Caractérisation du récepteur GPR120 .....	47
6.2.2 Expression du récepteur GPR120 .....	48
6.2.3 Fonctions du récepteur GPR120 .....	48
6.3 Récepteurs activés par des dérivés des acides gras.....	48
6.3.1 Récepteurs au LPA.....	49
6.3.2 Récepteurs au S1P.....	50
Objectifs de la thèse.....	51
Matériels et Méthodes.....	52
Résultats .....	59
L'oléate induit la prolifération des cellules DU145 et PC-3 tandis que le palmitate semble tuer les cellules par apoptose. ....	59
L'oléate induit la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt dans les cellules de cancer de la prostate DU145 et la phosphorylation d'Akt dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231. ....	61
La prolifération cellulaire induite par l'oléate dans les cellules cancéreuses de la prostate implique la PI3K, MEK1/2 et des petites protéines G $\alpha_i/o$ . ....	65

La phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt induite par l'oléate est diminuée pas des inhibiteurs de MEK1/2, PI3K et des protéines $G\alpha_i/o$ .	67
L'oléate entraîne un influx de calcium dans les cellules DU145.	69
Expression des récepteurs aux acides gras GPR40 et GPR120 dans des lignées cancéreuses du sein et de la prostate.	71
L'expression du récepteur GPR40 varie en fonction de la confluence des cellules.	74
Des cellules épithéliales mammaires humaines en culture primaire ne répondent pas à l'oléate.	76
L'oléate augmente la phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules cancéreuses du colon HRT-18.	79
La surexpression de GPR40 entraîne une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt induite par l'oléate à court terme.	81
La diminution de l'expression de GPR40 inhibe la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt dans les cellules DU145 et la phosphorylation d'Akt dans les cellules MDA-MB-231 induites par l'oléate à court terme, mais n'affecte pas la prolifération cellulaire.	83
Étude d'un agoniste de GPR40 et GPR120.	89
Discussion	94
Perspectives	107
Conclusion	112
Bibliographie	113
Annexe 1	i
Références des études répertoriées dans le tableau 1	i

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 : Résumé des études épidémiologiques concernant l'association entre une diète riche en gras, l'obésité et le cancer du sein ou de la prostate. ....</b>	<b>4</b>
<b>Tableau 2 : Résumé des méta-analyses d'études épidémiologiques évaluant l'association entre une diète riche en gras, l'obésité et le cancer du sein ou de la prostate.....</b>	<b>5</b>
<b>Tableau 3 : Paliers de la classification de l'indice de masse corporel par l'Organisation Mondiale de la Santé.....</b>	<b>7</b>
<b>Tableau 4 : Composition en acides gras des principales huiles utilisées dans les diètes. ....</b>	<b>12</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Le métabolisme des acides gras.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 2 : Signalisation des voies Akt et ERK1/2. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 3 : L'oléate induit la prolifération et la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules de cancer de la prostate DU145 et PC-3 tandis que le palmitate semble tuer les cellules par apoptose.....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 4 : L'oléate induit la phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2 dans les cellules de cancer de la prostate DU145 et la phosphorylation d'Akt dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231.....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 5 : L'oléate induit deux vagues d'activation des protéines Akt et ERK1/2 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 6 : L'induction de la prolifération par l'oléate dans les cellules DU145 et PC-3 implique les protéines MEK1/2, la PI3K ainsi que des petites protéines <math>G\alpha_{i/o}</math>. ....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 7 : Effets des différents inhibiteurs pharmacologiques sur la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite par l'oléate dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145.....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 8 : L'oléate et le palmitate induisent un influx de calcium intracellulaire dans les cellules du cancer de la prostate DU145.....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 9 : Expression des récepteurs GPR40 et GPR120 dans différentes cellules humaines.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 10 : L'expression de GPR40 augmente en fonction de la confluence des cellules du cancer du sein MDA-MB-231.....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 11 : L'oléate ne semble avoir aucun effet sur la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 ni sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires humaines.....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 12 : L'oléate induit la phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules du cancer du colon HRT-18.....</b>	<b>80</b>

<b>Figure 13 : La surexpression de GPR40 augmente la phosphorylation d’Akt et d’ERK1/2 dans les cellules du cancer de la prostate DU145 et la phosphorylation d’Akt dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 induites par l’oléate à court terme.</b> .....	82
<b>Figure 14 : La diminution de l’expression de GPR40 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 inhibe la phosphorylation d’Akt induite par l’oléate à court terme, mais n’affecte pas la prolifération cellulaire.</b> .....	85
<b>Figure 15 : La diminution de l’expression de GPR40 dans les cellules du cancer de la prostate DU145 semble réduire la phosphorylation d’Akt et d’ERK1/2 induite par l’oléate à court terme, mais n’affecte pas la prolifération cellulaire.</b> .....	88
<b>Figure 16 : L’agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120 n’induit pas la prolifération des cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145.</b> .....	91
<b>Figure 17 : L’agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120 induit la phosphorylation d’Akt et d’ERK1/2 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145.</b> .....	93
<b>Figure 18 : Modèle de travail.</b> .....	106

## Liste des abréviations

ACC- $\alpha$ , *Acetyl-CoA Carboxylase- $\alpha$*

ACL, *ATP Citrate Lyase*

AG-CoA, Acides gras estérifiés

AMPK, *AMP-Dependent Protein Kinase*

ATGL, *Adipose Triglyceride Lipase*

BH3, *Bcl-2 Homology Domain 3*

BSA, *Bovine Serum Albumin* (Albumine de sérum bovin)

cAMP, Cyclic AMP (AMP cyclique)

DGAT, *Diacylglycerol Acyltransferase*

DMBA, Diméthyl-benzanthracène

DMSO, *Dimethyl Sulfoxide*

Edg, *Endothelial Cell Differentiation Gene*

EGF, *Epidermal Growth Factor*

eIF4E, *Eucaryotic Initiation Factor 4E* (Facteur d'initiation eucaryotique 4E)

ERK1/2, *Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2*

FABP, *Fatty Acid Binding Proteins*

FAS, *Fatty Acid Synthase*

GAP, *GTPase-Activating Protein*

GDI, *Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor*

GEF, *Guanine-nucleotide Exchange Factor*

GPAT, *Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase*

GPCR, *G Protein Coupled Receptor* (Récepteur couplé aux protéines G)

HMECs, *Human Mammary Epithelial Cells* (Cellules épithéliales mammaires humaines)

HSL, *Hormone-Sensitive Lipase*

IMC, Indice de masse corporel

IP<sub>2</sub>, Inositol 4,5-bisphosphate

IP<sub>3</sub>, Inositol 1,4,5-triphosphate  
Jak2, Janus kinase 2  
JNK, *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase*  
LAT, *Lysophosphatidylphosphate Acyltransferase*  
LCFACS, *Long Chain Fatty Acid-CoA Synthetase*  
LPA, *Lysophosphatidic Acid*  
MAPKs, *Mitogen-Activated Protein Kinases*  
MEK1/2, *MAP Kinase / ERK Kinase 1 and 2*  
MGL, *Monoacylglycerol Lipase*  
MNU, Méthyl-nitrosourée  
mTOR, *Mammalian Target of Rapamycin*  
MTP, *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*  
PAP, *Phosphatidic Acid Phosphohydrolase*  
PARP, *Poly-(ADP-Ribose) Polymerase*  
PBS, *Phosphate-Buffered Saline*  
PCR, *Polymerase Chain Reaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)  
PI3K, *Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase*  
PKA, Protéine kinase A  
PPAR, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*  
RE, Réticulum endoplasmique  
S6K, *S6 Kinase*  
SNAREs,  *$\alpha$ -Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Adaptor Protein Receptors*  
SREBP-1, *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1*  
STAT, *Signal Transducer and Activator of Transcription*  
TNF- $\alpha$ , *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*   
TSC, *Tuberous Sclerosis Complex*  
UBF, *Upstream Binding Factor*

## Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Yves Langelier, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que la Dre Marie-Josée Sasseville pour son aide précieuse à mes débuts dans le laboratoire.

Je remercie tout spécialement Florent pour ces six années de franche amitié et de support mutuel dans les moments difficiles.

Mes remerciements vont également à mes parents et à ma sœur qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études. Finalement, je remercie Ben pour ses conseils professionnels, mais surtout pour son soutien moral indéfectible en dépit de mes crises émotionnelles.



# **Introduction**

## **Chapitre 1. La relation entre le cancer et les acides gras**

### **1.1 Statistiques concernant le cancer du sein et de la prostate**

#### **1.1.1 Le cancer du sein**

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué et le deuxième plus mortel chez les femmes après le cancer du poumon (Organisation Mondiale de la Santé, 2002). Environ une femme sur neuf développera un cancer du sein au cours de sa vie. En 2002, les nouveaux cas de cancer du sein au niveau mondial étaient estimés à 1,2 millions et la mortalité attribuée à ce cancer dépassait les 400 000 décès (Parkin *et al*, 2005). Au Canada, il y a eu 22 300 nouveaux cas diagnostiqués et 5300 décès en 2007 (Société Canadienne du Cancer, 2007). Bien que l'amélioration des méthodes de diagnostic de plus en plus précoces contribue à la diminution de la mortalité, le taux d'incidence du cancer du sein ne cesse d'augmenter. L'identification de nouveaux facteurs de risque, principalement de type environnementaux, permettrait d'effectuer des recommandations aux populations à risque et ainsi de diminuer le nombre de nouveaux cas déclarés annuellement.

#### **1.1.2 Le cancer de la prostate**

Le cancer de la prostate est le cancer le plus diagnostiqué et le troisième plus mortel chez les hommes après le cancer du poumon et du colon (Organisation Mondiale de la Santé, 2002). Un homme sur six développera la maladie. En 2002, les estimations mondiales font état de 680 000 nouveaux cas et de plus de 200 000 décès (Parkin *et al*, 2005). Au Canada seulement, 22 300 nouveaux cas ont été recensés et 4300 décès ont été attribués à ce cancer en 2007 (Société Canadienne du Cancer, 2007). Le développement de méthodes plus poussées de diagnostic ont participé à l'augmentation du taux d'incidence de

la maladie. Cependant, le taux de mortalité du cancer de la prostate reste stable malgré tous les efforts faits pour développer de nouveaux traitements.

## **1.2 Études épidémiologiques sur la relation entre le cancer et les acides gras**

### **1.2.1 Le cancer du sein**

Concernant l'incidence du cancer du sein, plusieurs facteurs de risque sont connus, comme l'âge ou les mutations sur des gènes tels que BRCA1 et BRCA2. Par contre, pour la majorité des patientes, aucun facteur de risque n'a pu être associé avec certitude au développement de la maladie. Des études tendent à montrer que certains facteurs environnementaux joueraient un rôle prépondérant dans le développement de ce cancer. Ces facteurs de risque, une fois identifiés, pourraient être écartés ou modifiés en proposant des modifications des habitudes de vie des personnes à risque. L'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer estime que 25 % des cas de cancer du sein dans le monde seraient dus à l'obésité et à un style de vie sédentaire (IARC, 2002).

Le taux d'incidence du cancer du sein varie grandement selon la région géographique, ce qui constitue un argument en faveur de facteurs de risque environnementaux (revu dans Prentice *et al*, 1989; revu dans Willett, 2001). Le risque de développer un cancer du sein dans les pays occidentaux est jusqu'à cinq fois plus élevé qu'au Japon ou à Hawaii. Chez les immigrantes des pays où le taux d'incidence est plus élevé, les femmes descendant en première génération de femmes ayant immigré voient leur risque de développer un cancer du sein atteindre celui des femmes vivant dans leur nouvel environnement (Kolonel *et al*, 1983; LeMarchand *et al*, 1985; Stoll, 2002). Une étude épidémiologique de type écologique effectuée en 1986 montre qu'il existe, dans plusieurs pays, une forte corrélation entre la consommation moyenne de gras *per capita* et la mortalité due aux cancers du sein et de la prostate (Rose *et al*, 1986). Une autre étude

écologique effectuée en comparant la diète de différents groupes culturels au niveau international a montré qu'une diète faible en gras et riche en fruits, légumes et fibres pourrait diminuer le risque de développer un cancer du sein (Marshall *et al*, 1992). Cependant, ces seules observations ne permettent pas d'établir un lien direct entre une consommation élevée en gras et le développement du cancer du sein puisque les femmes des pays où la diète est riche en gras ont aussi tendance à présenter d'autres facteurs de risques liés au cancer du sein. Ainsi, les femmes de ces pays ont souvent leurs premières menstruations à un âge plus précoce, une première maternité tardive ou un poids post-ménopause plus élevé comparativement aux pays où la diète est pauvre en gras (revu dans Kushi & Giovannucci, 2002).

#### **1.2.1.1 Impact d'une diète riche en gras**

Depuis les années 70, beaucoup d'études examinant le lien entre une diète riche en acides gras et le développement du cancer du sein ont été publiées (revu dans Lof & Weiderpass, 2009; revu dans McTiernan, 2003). Plusieurs de ces études ont montré qu'une consommation élevée en gras pouvait augmenter le risque de développer un cancer du sein (Ewertz & Gill, 1990; Thiebaut *et al*, 2007; Wang *et al*, 2008) alors que d'autres études n'ont pas été en mesure d'établir un tel lien (Katsouyanni *et al*, 1994; Rohan *et al*, 1988; Sieri *et al*, 2008). Plus rarement, une diète riche en gras a même été associée à un risque plus faible de développer ce cancer (Lof *et al*, 2007; Witte *et al*, 1997). Certaines des études montrant une association inverse ont été effectuées auprès de femmes pré-ménopausées chez lesquelles il semblerait que l'obésité diminue le risque de développer un cancer du sein (revu dans Carmichael, 2006). Cette disparité entre les études empêche l'établissement d'une association claire entre la diète riche en gras et le développement du cancer du sein, incitant à l'élaboration de nouvelles études. Le tableau 1 résume la conclusion des études de cas-contrôles et de cohortes selon l'association établie entre la consommation en acides gras et le développement du cancer du sein : directe (augmente le risque), nulle (incluant les associations non-significatives) ou inverse (diminue le risque). Les différences dans les conclusions de ces études peuvent venir de plusieurs facteurs. Dans

le cas des études de cas-contrôles, des femmes atteintes du cancer du sein sont jumelées avec des femmes saines comme contrôle selon plusieurs facteurs (âge, localisation géographique, antécédents familiaux, traitement hormonal...). Ces femmes sont ensuite soumises à un questionnaire sur leurs habitudes alimentaires, remontant parfois plusieurs années en arrière. La mémoire et l'honnêteté des participantes sont des facteurs déterminants pour la validité de ces questionnaires, ce qui peut introduire de grandes incertitudes dans l'interprétation des résultats. Dans le cas des cohortes, un grand nombre de femmes sont suivies sur plusieurs années au cours desquelles leurs habitudes alimentaires sont enregistrées et les cas de cancer du sein sont répertoriés. Ces études doivent inclure une très grande cohorte de participantes afin que les cas de cancer du sein recensés soient en nombre assez important pour être statistiquement significatifs.

**Tableau 1 : Résumé des études épidémiologiques concernant l'association entre une diète riche en gras, l'obésité et le cancer du sein ou de la prostate.**

Études	Diète riche en gras			Obésité		
	Directe	Nulle <sup>a</sup>	Inverse	Directe	Nulle	Inverse
<b>Cas-Contrôles</b>						
Sein	16 <sup>b</sup>	15	3	3		
Prostate	12	5	1	10	11	6
<b>Cohortes</b>						
Sein	9	8	2	13	1	
Prostate	1	3		21	9	2

<sup>a</sup>Aucune association ou association non-significative.

<sup>b</sup>Voir l'annexe 1 pour la liste complète des études répertoriées dans ce tableau.

Afin de rassembler les résultats des différentes études et d'en tirer des conclusions éclairées, des méta-analyses ont été réalisées. Celles-ci consistent à effectuer des tests

statistiques en regroupant les résultats des études, ce qui augmente de façon substantielle l'étendue des données disponibles et accroît la significativité des résultats ainsi regroupés. Trois de ces méta-analyses ont montré une association positive entre une diète riche en gras et le cancer du sein (Boyd *et al*, 2003; Howe *et al*, 1990; Michels *et al*, 2007) alors que deux autres n'ont montré aucune association (Hunter *et al*, 1996; Smith-Warner *et al*, 2001). Le tableau 2 résume le nombre d'études dans chaque méta-analyse ainsi que le risque global calculé à partir du regroupement des données des études. Bien que le lien direct soit encore inconstant, une tendance nette vers une association positive mais faible entre une diète riche en gras et le développement du cancer du sein semble se dessiner suite à ces méta-analyses.

**Tableau 2 : Résumé des méta-analyses d'études épidémiologiques évaluant l'association entre une diète riche en gras, l'obésité et le cancer du sein ou de la prostate.**

<b>Méta-Analyses</b>	<b>Nombre d'études Cas-contrôles</b>	<b>RC Moy.</b>	<b>Nombre d'études Cohortes</b>	<b>RR Moy.</b>	<b>Ratio Total</b>
<b>Sein : Diète</b>					
Howe <i>et al</i> , 1990	12	1,46			
Hunter <i>et al</i> , 1996			7	1,05	
Smith-Warner <i>et al</i> , 2001			8	1,00	
Boyd <i>et al</i> , 2003	31	1,14	14	1,11	1,13
<b>Sein : Obésité</b>					
Michels <i>et al</i> , 2007			8	1,26 <sup>a</sup>	
<b>Prostate : Obésité</b>					
MacInnis <i>et al</i> , 2006	21	1,02 <sup>b</sup>	22	1,06 <sup>b</sup>	1,05 <sup>b</sup>

RC = Ratio de chances; RR = Ratio randomisé.

<sup>a</sup>IMC de plus de 28 kg/m<sup>2</sup> comparativement à moins de 21 kg/m<sup>2</sup>. <sup>b</sup>Par tranche de 5 kg/m<sup>2</sup>.

La plupart des études portent sur la consommation totale de gras. Des groupes ont tenté d'établir un lien entre le cancer du sein et la consommation de types particuliers d'acides gras, mais les résultats de ces études sont encore plus hétérogènes. L'imprécision dans l'estimation de l'apport de chaque type d'acides gras dans la diète en se basant sur les questionnaires de consommation pourrait expliquer ces résultats contradictoires (Heitmann & Frederiksen, 2007).

### **1.2.1.2 Impact de l'obésité**

Les cas d'obésité dans la plupart des pays industrialisés n'ont cessé d'augmenter au cours des deux dernières décennies. Aux États-Unis, le phénomène est même parfois qualifié d'épidémie puisque les deux tiers de la population souffriraient d'un surplus de poids, la moitié de ceux-ci étant obèses (Flegal *et al*, 2002). Il existe plusieurs façons de quantifier l'obésité. La méthode la plus répandue est l'indice de masse corporel (IMC), aussi appelé l'indice de Quetelet, qui se calcule en rapportant le poids (en kilogrammes) sur la taille (en mètres carrés). Les avantages de l'IMC comparativement à d'autres mesures de l'adiposité sont qu'il est indépendant de la grandeur des individus puisque le poids est rapporté sur la taille et que cette estimation de l'obésité peut être facilement comparée entre plusieurs études ou populations étudiées. La validité de l'utilisation de l'IMC est également justifiée par sa corrélation avec plusieurs facteurs de risques liés à l'obésité comme les taux de triglycérides circulants dans le sang, le taux de cholestérol ou la pression artérielle (Calle & Kaaks, 2004). Le tableau 3 définit les standards de classification de l'obésité tels que déterminés par l'Organisation Mondiale de la Santé.

**Tableau 3 : Paliers de la classification de l'indice de masse corporel par l'Organisation Mondiale de la Santé.**

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Classification OMS	Description populaire
< 18,5	Poids insuffisant	Maigre
18,5 – 24,9	Poids normal	Poids santé
25,0 – 29,9	Excès de poids de grade 1	Excès de poids
30,0 – 39,9	Excès de poids de grade 2	Obèse
≥ 40,0	Excès de poids de grade 3	Obèse morbide

IMC = indice de masse corporel; OMS = Organisation Mondiale de la Santé

La relation entre l'obésité et un taux plus élevé de mortalité, en particulier dû aux maladies cardiovasculaires, est établie depuis longtemps (Calle *et al*, 1999; Lindsted & Singh, 1998; Manson *et al*, 1995; Willett *et al*, 1995). Un nombre croissant d'études portent sur la relation entre l'obésité et le cancer. Notre compréhension de l'importance de ce lien, tant pour la mortalité associée au cancer en général que pour celle liée à certains types de cancers en particulier, est encore très limitée. Des études montrent une corrélation positive entre l'obésité des patientes et un risque accru de développer un cancer du sein chez les femmes post-ménopausées. Calle *et al*. ont rapporté que le risque relatif de mortalité dû au cancer (tous types confondus) chez les femmes passe de 1,23 pour celles ayant un excès de poids de grade 2 (IMC 30,0-39,9) à 1,62 chez les femmes ayant un excès de poids de grade 3 (IMC > 40,0) comparativement aux femmes ayant un poids normal (Calle *et al*, 2003). L'étude de la cohorte de la *Womens's Health Initiative* a montré un risque 2,5 fois plus grand de développer un cancer du sein chez les femmes post-ménopausées ayant un excès de poids de grade 2, ou plus, comparativement aux femmes ayant un poids normal, mais seulement parmi les femmes n'ayant jamais suivi de thérapie hormonale (Morimoto *et al*, 2002). Cette conclusion a été obtenue également lors d'autres études examinant le lien entre le cancer du sein, l'obésité et la thérapie hormonale (Feigelson *et al*, 2004; Huang *et al*,

1997; Schairer *et al*, 2000). Par contre, l'obésité ne semble pas être un facteur de risque pour le cancer du sein chez les femmes pré-ménopausées (Ballard-Barbash & Swanson, 1996; Galanis *et al*, 1998; Hsieh *et al*, 1990; Trentham-Dietz *et al*, 1997); en fait, un surplus de poids chez ces femmes diminuerait légèrement le risque (revu dans Carmichael, 2006). Ces observations pourraient être expliquées par le fait qu'un excès de poids chez les jeunes femmes entraîne une baisse des taux d'hormones circulants (comme la progestérone ou l'œstradiol) ainsi que des cycles menstruels anovulants (Potischman *et al*, 1996). Ces effets, ainsi que l'âge tardive des premières menstruations, constituent des facteurs pouvant réduire le risque de développer un cancer du sein chez les femmes pré-ménopausées.

## **1.2.2 Le cancer de la prostate**

Des études écologiques montrent que le risque de développer un cancer de la prostate chez les immigrants japonais et chinois arrivant aux États-Unis augmente de trois à neuf fois comparativement au risque des populations asiatiques et ce, dès la première génération suivant la migration (Muir *et al*, 1991; Shimizu *et al*, 1991). Cette augmentation du risque suggère fortement l'implication d'un facteur environnemental ou nutritionnel dans le développement de la maladie.

### **1.2.2.1 Impact d'une diète riche en gras**

Bien que l'association entre les acides gras et le cancer de la prostate soit moins bien caractérisée que dans le cas du cancer du sein, plusieurs études épidémiologiques cas-contrôles, ou sur des cohortes de patients, ont montré un lien direct entre une consommation élevée en gras et une augmentation du risque de développer ce type de cancer (Giovannucci *et al*, 1993; Lee *et al*, 1998; Whittemore *et al*, 1995). Néanmoins, d'autres études n'ont trouvé aucune association (Mettlin *et al*, 1989; Rohan *et al*, 1995; Severson *et al*, 1989). Comme dans le cas du cancer du sein, les résultats des études examinant la relation entre la diète riche en gras et le développement du cancer de la prostate sont contradictoires, appelant à l'élaboration de nouvelles études. Le tableau 1



résume les conclusions des différentes études concernant le gras dans la diète et le cancer de la prostate. Des équipes ont également analysé le risque de cancer de la prostate en lien avec une consommation élevée d'un type donné d'acide gras. Par exemple, Schuurman *et al.* (1999) ont montré un accroissement du risque relatif de développer un cancer de la prostate de 1,38 fois avec une diète riche en oléate. Cependant, les études concernant des types précis d'acides gras sont inconstantes en raison de la difficulté d'estimer la proportion exacte de chaque acide gras dans la diète des participants, comme nous l'avons décrit précédemment pour le cancer du sein.

### **1.2.2.2 Impact de l'obésité**

Tout comme chez la femme, l'obésité a aussi été montrée comme un facteur de risque de cancer pour l'homme. Une étude a montré que le risque relatif de mortalité dû au cancer (tous types confondus) chez les hommes ayant un excès de poids de grade 2 et 3 comparativement aux hommes ayant un poids normal est respectivement de 1,20 et 1,52 (Calle *et al.*, 2003). Pour le cancer de la prostate, les hommes ayant un excès de poids de grade 2 ont un taux relatif de mortalité de 1,20 et de 1,34 pour les hommes ayant un excès de poids de grade 3 comparativement aux hommes ayant un poids normal. Plusieurs autres études ont montré une corrélation positive entre un IMC élevé et l'incidence et/ou la mortalité dues au cancer de la prostate (Efstathiou *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008b; Rodriguez *et al.*, 2001) malgré que certaines études n'ont pu confirmer ce type d'association (Hsing *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 1989). Une méta-analyse regroupant 31 cohortes et 25 études cas-contrôles a montré un risque relatif de cancer de la prostate de 1,05 par tranche de 5 kg/m<sup>2</sup>, ce qui donne un risque de 1,2 pour les hommes ayant un excès de poids de grade 3 comparativement aux hommes ayant un poids normal (MacInnis & English, 2006).

## **Chapitre 2. Association entre les acides gras et le cancer dans des modèles *in vivo* et *in vitro***

### **2.1 Études sur des modèles animaux**

#### **2.1.1 Le cancer du sein**

L'évaluation de la diète des participants aux études cliniques comporte souvent des erreurs et il est parfois difficile de déterminer l'apport exact en certains types d'acides gras. D'ailleurs, les différences quant au pourcentage des acides gras dans la diète des participants sont parfois bien faibles, ce qui limite le potentiel comparatif. Contrairement aux études épidémiologiques chez l'humain, les études sur modèles animaux permettent une gestion plus contrôlée de la diète. Celle-ci peut être modifiée afin d'être particulièrement enrichie en certains acides gras, ce qui permet l'étude plus approfondie de leur effet particulier sur l'incidence et la croissance des tumeurs.

La modification de la diète de souris normales n'étant pas suffisante pour induire la formation de tumeurs, divers modèles animaux développant spontanément des tumeurs mammaires sont utilisés afin d'étudier l'effet de la diète sur la progression du cancer ou encore le taux d'apparition des tumeurs mammaires. La grande majorité des groupes utilisent des rongeurs (souris ou rats) dont le développement spontané de tumeurs a été accéléré grâce à l'introduction d'un oncogène (MMTV, C3H) ou au moyen de carcinogènes chimiques comme le diméthyl-benzanthracène (DMBA) ou le méthyl-nitrosourée (MNU). D'autres équipes ont plutôt recours à des xénogreffes de cellules mammaires tumorales sur des souris immuno-déficientes.

Des groupes ont montré qu'une diète riche en acides gras, particulièrement en gras mono-insaturés ou polyinsaturés n-6, augmente la croissance de tumeurs mammaires chez différents modèles murins (revu dans Welsch, 1992). Cependant, comme plusieurs de ces

anciennes études ne prenaient pas en compte l'apport en calories des différentes diètes, il était difficile de déterminer si cet effet était dû au gras en lui-même ou à l'apport plus élevé en calories des diètes riches en gras. Des études complémentaires sur des modèles animaux suggérant qu'une diminution de l'apport en énergie provenant de la diète ou une augmentation de la dépense d'énergie par l'exercice pourraient constituer de bons moyens de prévention contre le cancer mammaire (revu dans Thompson *et al*, 2003), il était donc essentiel d'équilibrer l'apport énergétique des différentes alimentations afin de mieux cerner l'effet des diètes riches en gras sur le développement des tumeurs mammaires. Des études subséquentes ont permis de montrer que l'effet inducteur des diètes riches en gras mono-insaturés et polyinsaturés n-6 sur les tumeurs mammaires était toujours présent lorsque les différentes diètes étudiées étaient iso-caloriques (Fay *et al*, 1997). Un groupe a montré qu'une diète riche en gras (20 % de l'apport calorique) provenant d'huiles de maïs ou de tournesol (riches en linoléate, un acide gras polyinsaturé n-6; voir le tableau 4) stimulait la prolifération de tumeurs mammaires induites par le DMBA dans des rats alors qu'une diète riche en gras provenant d'huile de noix de coco (riche en gras saturés) n'entraînait pas cet effet (Carroll & Hopkins, 1979). De façon intéressante, une diète composée à 3 % d'huile de tournesol et 17 % d'huile de noix de coco stimulait la carcinogénèse autant qu'une diète composée à 20 % d'huile de tournesol. Cette observation va dans le sens de l'hypothèse de Ip *et al*. (1985) stipulant que le linoléate posséderait une concentration de saturation au-delà de laquelle son effet inducteur sur les tumeurs resterait constant. Le pourcentage en linoléate nécessaire pour induire son effet tumorigène maximal serait approximativement 4 % de l'apport en calories. Cette hypothèse a été reprise et soutenue dans la méta-analyse de 97 études sur modèles animaux compilée par Fay *et al*. (1997).

**Tableau 4 : Composition en acides gras des principales huiles utilisées dans les diètes.**

	Huile de maïs	Huile de noix de coco	Huile d'olive	Huile de palme	Huile de tournesol
Octanoate 8 : 0		7 - 8			
Décanoate 10 : 0		5 - 6			
Laurate 12 : 0		42 - 46			
Myristate 14 : 0		16 - 26			
Palmitate 16 : 0	10 – 13 <sup>a</sup>	8 - 15	11 - 12	40 - 45	6 - 7
Stéarate 18 : 0	2 - 3	2 - 3	2 - 4	4 - 5	2 - 4
Oléate 18 : 1	24 - 37	6 - 12	70 - 78	40 - 43	18 - 27
Linoléate 18 : 2	49 - 63	2 – 5	5 - 10	10 - 11	65 - 70

<sup>a</sup>Pourcentages approximatifs.

Une diète riche en linoléate stimule la croissance de xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-435 dans des souris nues ainsi que l'apparition de métastases osseuses (Rose & Connolly, 1997; Rose *et al*, 1993). Dans un modèle de souris MMTV-TGF $\alpha$ , l'incidence de tumeurs mammaires était plus élevée pour les souris ayant reçu une diète riche en gras comparativement à celles suivant une diète pauvre en gras (Dogan *et al*, 2007). Le gras utilisé étant de l'huile de maïs, la diète était riche en linoléate. De plus, l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la survie cellulaire et l'apoptose, comme la Janus kinase 2 (Jak2) et le *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), était diminuée dans les tumeurs des souris soumises à une diète riche en gras. L'activité de la caspase-3 était aussi diminuée dans ces cellules tumorales. Ces études d'expression protéique supportent l'idée d'un rôle du linoléate dans la croissance des tumeurs mammaires tel que suggéré par plusieurs études utilisant

différents types de modèles animaux (Cohen *et al*, 1986; Katz & Boylan, 1989; Rose *et al*, 1994; Senzaki *et al*, 1998).

L'oléate est l'acide gras mono-insaturé le plus abondant dans l'alimentation. Son rôle dans la croissance et le développement des tumeurs est des plus ambigus. Dayton *et al*. (1977) ont montré qu'une diète riche en oléate augmentait le développement de tumeurs mammaires induites par le DMBA chez des rats de façon similaire à une diète riche en linoléate comparativement à une diète à base d'huile de noix de coco (riche en acides gras saturés). Ces résultats ont été confirmés par la suite par Chan *et al*. (1983). De leur côté, Katz et Boylan (1989) n'ont observé aucune différence dans la croissance des tumeurs implantées sur des rats soumis à une diète riche en linoléate ou en oléate, mais ils ont noté que la diète riche en linoléate entraînait le développement d'un plus grand nombre de métastases. Cependant, les diètes riches en oléate de cette étude contenaient également une proportion non négligeable de linoléate, ce qui implique que l'effet de ces diètes sur la croissance tumorale pourrait découler de la présence de celui-ci. Des études ont montré qu'une diète riche en oléate, mais faible en linoléate (sous le seuil de saturation du linoléate de 4 % de l'apport en calories (Ip *et al*, 1985)), perd son effet inducteur sur les tumeurs mammaires et présente parfois même un léger effet protecteur (Cohen *et al*, 1986; Lasekan *et al*, 1990; Tinsley *et al*, 1981). L'effet de l'oléate sur la croissance des tumeurs mammaires n'est donc pas encore déterminé. Une explication possible de l'absence d'effet de l'oléate observé dans certaines études serait que toutes les diètes riches en oléate comportent comme ingrédient de base de l'huile d'olive, riche en antioxydants et autres composés qui pourraient contrecarrer un potentiel effet inducteur tumoral de l'oléate. Par exemple, l'huile d'olive contient environ 0,7 % de squalène, un intermédiaire dans la synthèse du cholestérol, alors que la majorité des autres huiles utilisées dans l'alimentation en contiennent environ 0,002 à 0,03 % (revu dans Waterman & Lockwood, 2007). Cet hydrocarbure induit une inhibition de la HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol, ce qui entraîne une diminution de la production du cholestérol et de certains de ses intermédiaires impliqués dans l'activation d'oncogènes. Des études ont

montré un lien entre l'inactivation de cette enzyme et l'inhibition de carcinomes de la peau (revu dans Newmark, 1997). Afin d'écarter l'implication potentielle des divers composés mineurs des huiles dans le développement des cancers, des études utilisant de l'oléate purifié additionné directement à la diète des souris seraient utiles pour déterminer le rôle exact de cet acide gras sur le développement de tumeurs mammaires.

Evans *et al.* (2009) ont examiné l'effet d'une diète riche en stéarate, un acide gras saturé, sur la croissance de tumeurs de cellules MDA-MB-435 injectées dans des souris nues. Comparativement à une diète pauvre en gras, une diète riche en stéarate induisait chez ces souris une diminution du volume et du poids des tumeurs ainsi qu'une réduction du nombre de métastases aux poumons (Evans *et al.*, 2009). Lorsqu'il est ajouté au milieu de cellules MDA-MB-435 *in vitro*, le stéarate induit le clivage de la caspase-3 et de sa cible, *Poly-(ADP-Ribose) Polymerase* (PARP), et donc l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses.

### **2.1.2 Le cancer de la prostate**

Les études concernant l'effet de diètes riches en gras sur la carcinogenèse de la prostate chez les animaux sont plus rares. La croissance de tumeurs, formées lors de l'injection de cellules tumorales prostatiques LNCaP dans des souris nues, était fortement inhibée lorsque ces souris étaient transférées d'une diète riche en gras à une diète pauvre en gras (Wang *et al.*, 1995). Les différentes diètes de cette étude étant iso-caloriques, les souris dans les différents groupes ne montraient pas de différences au niveau de leur poids. Les effets observés sur la croissance des tumeurs peuvent par conséquent être associés à la proportion de gras dans la diète plutôt qu'à l'obésité ou à une différence dans l'apport énergétique des diètes. Une étude similaire a été effectuée par Mavropoulos *et al.* (2009) menant à des résultats comparables.

Le modèle de souris Hi-Myc exprime un taux élevé de la protéine Myc. Ces souris développent naturellement des néoplasmes intra-épithéliaux prostatiques entre deux et

quatre semaines et des carcinomes invasifs entre six et neuf mois. Lorsqu'elles ont été soumises à une diète riche en gras, elle ont développé plus de tumeurs invasives (Kobayashi *et al*, 2008). La phosphorylation et l'activité d'Akt, ainsi que l'activation de protéines cibles d'Akt, ont été plus élevées dans les tumeurs des souris soumises à une diète riche en gras.

Les études concernant les effets spécifiques de divers types d'acides gras sur la croissance de tumeurs prostatiques portent principalement sur l'antagonisme des acides gras polyinsaturés n-6 et n-3. Une diète riche en acides gras polyinsaturés n-6 augmente le nombre et la croissance des tumeurs induites par xénogreffes chez des souris immunodéficientes alors qu'une diète riche en acides gras polyinsaturés n-3 a un effet inhibiteur (Cesano *et al*, 1998; Connolly *et al*, 1997; Karmali *et al*, 1987; Kelavkar *et al*, 2006).

## 2.2 Études *in vitro*

### 2.2.1 Le cancer du sein

De façon générale, les acides gras polyinsaturés n-6 ont été associés à une augmentation du développement d'un carcinome mammaire *in vivo*, mais également à l'induction d'un phénotype invasif et métastatique *in vitro*. Une étude dans des cellules de cancer du sein T47D a montré que le linoléate est en mesure d'induire la prolifération de ces cellules *in vitro* (Reyes *et al*, 2004). Le linoléate stimule également la prolifération des cellules tumorales mammaires humaines MCF-7 *in vitro*, ainsi que celle de la lignée cellulaire immortalisée mais non-transformée MCF-10A (Grammatikos *et al*, 1994). Au contraire, l'ajout de linoléate dans le milieu n'induit pas de stimulation de la croissance des cellules épithéliales mammaires humaines isolées de tumeurs bénignes non-cancéreuses cultivées *in vitro* (Balakrishnan *et al*, 1989). Un groupe a, par ailleurs, étudié l'effet de différents types d'acides gras sur la prolifération *in vitro* de cellules d'une lignée dérivée d'un carcinome mammaire de rat induit par le DMBA. L'ajout de linoléate dans le milieu de culture a conduit à une stimulation de la croissance qui fut encore plus marquée lorsque

le linoléate fut remplacé par de l'oléate. Par contre, l'ajout de stéarate, un acide gras saturé, a causé une inhibition de la prolifération de façon dose-dépendante (Wicha *et al*, 1979). Un traitement à l'oléate semble promouvoir la migration des cellules MDA-MB-231 (Navarro-Tito *et al*, 2009). La plupart de ces études ayant été effectuées en absence d'albumine et donc dans des conditions non-physiologiques, elles sont à examiner avec précaution. Des travaux complémentaires viennent cependant confirmer l'effet prolifératif du linoléate, et d'autres acides gras insaturés comme l'oléate, liés à l'albumine, sur les cellules de cancer du sein en culture (Park *et al*, 2000; Rose & Connolly, 1990).

Plusieurs études dans divers types cellulaires ont montré que la lipotoxicité engendrée par l'accumulation d'acides gras à longues chaînes serait spécifique aux acides gras saturés (Cnop *et al*, 2001; Hardy *et al*, 2000; Listenberger *et al*, 2001; Maedler *et al*, 2001; Wickramasinghe *et al*, 1996). Hardy *et al*. (2003) ont montré que le palmitate induit une diminution du potentiel membranaire des mitochondries, ce qui entraîne le relâchement du cytochrome c dans le cytoplasme. Ces effets ne sont pas observés lorsqu'un analogue non-métabolisable du palmitate est utilisé, prouvant l'implication du métabolisme des acides gras dans leurs effets sur la survie des cellules cancéreuses. Le palmitate induirait l'apoptose en causant une diminution des niveaux de cardiolipine, un phospholipide présent dans les mitochondries qui est nécessaire à la rétention du cytochrome c (Hardy *et al*, 2003).

De leur côté, les acides gras insaturés ont un effet prolifératif et protecteur contre l'apoptose dans les lignées cellulaires en culture (Hardy *et al*, 2000; Vinciguerra *et al*, 2009). Le linoléate induit la survie sur plusieurs jours de cellules Caco-2 de carcinome colorectal en culture (Dommels *et al*, 2003). Des acides gras insaturés, dont l'oléate et le linoléate, induisent la prolifération d'hépatocytes *in vitro* (Vinciguerra *et al*, 2009). Ces études montrent que l'effet des acides gras insaturés sur le développement des cellules cancéreuses n'est pas observé uniquement dans des cellules cancéreuses du sein. Cette disparité au niveau de la toxicité entre les acides gras saturés et insaturés est directement liée à la capacité différentielle des acides gras à promouvoir l'accumulation de triglycérides



dans la cellule : les acides gras insaturés induisent une forte accumulation de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques des cellules traitées contrairement aux acides gras saturés. Un co-traitement d'acides gras saturés et insaturés prévient la lipotoxicité induite par les acides gras saturés dans des cellules cancéreuses du sein *in vitro* (Hardy et al, 2000). L'ajout d'oléate stimule l'incorporation du palmitate dans les triglycérides tout en restaurant les niveaux de cardiolipine dans les mitochondries, empêchant ainsi le palmitate d'induire son effet cytotoxique (Hardy et al, 2003). Cet effet protecteur contre l'apoptose apporté par l'oléate a été observé dans plusieurs lignées cancéreuses du sein (Przybytkowski et al, 2007). Un traitement de 24 h à l'oléate protège également, durant plusieurs jours, les cellules cancéreuses de la mort cellulaire induite par l'absence de sérum. Cette capacité anti-apoptotique n'est observée que dans les cellules tumorales ayant un haut potentiel d'accumulation de triglycérides (Przybytkowski et al, 2007). En outre, l'oléate serait toxique dans des cellules dont la capacité de synthèse des triglycérides serait inhibée (Listenberger et al, 2003).

### **2.2.2 Le cancer de la prostate**

Très peu de groupes de recherche ont examiné l'effet des divers types d'acides gras sur la prolifération de cellules tumorales de prostate *in vitro* et les résultats obtenus sont très divergents. Rose & Connolly (1991) ont observé une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses PC-3 suite à un traitement au linoléate et une diminution en réponse à un traitement par des acides gras polyinsaturés n-3. Aucun des acides gras testés n'a eu d'effet sur la prolifération des cellules de la lignée DU145. De leur côté, du Toit et al. (1996) ont obtenu une augmentation de la prolifération des cellules DU145 en réponse à un traitement à l'oléate et à l'acide eicosapenténoïque (un acide gras polyinsaturé n-3) tandis qu'une fois encore le linoléate n'avait aucun effet sur la croissance cellulaire. Un troisième groupe n'a pas observé d'effet de l'oléate ou du linoléate sur les cellules tumorales de prostate DU145 (Motaung et al, 1999). Le faible nombre des études *in vitro* effectuées et l'hétérogénéité des résultats ne permettent donc pas de tirer de conclusions concernant un

principe général sur l'effet potentiel des divers types d'acides gras sur la prolifération des cellules tumorales de la prostate.

## Chapitre 3. Le métabolisme des acides gras

Les acides gras à longues chaînes sont, pour les cellules, une importante source d'énergie (sous forme de triglycérides) et de substrats pour la biogenèse des membranes (phospholipides). Les acides gras à longues chaînes, et leur dérivés estérifiés (CoA), régulent l'activité, de façon directe ou indirecte, de nombreux processus cellulaires : la signalisation via des récepteurs membranaires ou des canaux ioniques, la différenciation cellulaire, le développement et l'expression génique (Glatz *et al*, 1995; Hertz *et al*, 1998). Plusieurs de leurs métabolites servent d'intermédiaires dans la signalisation intracellulaire.

### 3.1 L'utilisation des acides gras à longues chaînes de source exogène

Les acides gras sont des molécules amphiphiles possédant une chaîne apolaire (queue) et un groupement polaire (tête), ce dernier pouvant ou non être chargé. En solution aqueuse à pH physiologique de 7,4, les acides gras à longues chaînes se retrouvent principalement sous forme anionique (99,6 %). En dépit du fait que ce soient des molécules possédant une tendance à l'agglomération, peu d'agrégats lipidiques sont retrouvés dans le sérum. L'albumine, à laquelle la majorité des acides gras circulants sont associés, joue un rôle essentiel dans le transport des acides gras dans le sérum. Elle possède plusieurs sites de liaison aux acides gras et sa concentration dans le sérum est proche de celle de ces derniers (albumine 625-800  $\mu\text{M}$ , acides gras à longues chaînes 200-600  $\mu\text{M}$ ) (revu dans Hamilton, 1998).

Pour entrer dans la cellule, les acides gras doivent se dissocier de l'albumine. La constante de dissociation de cette réaction est de 0,04 - 0,14  $\text{s}^{-1}$  (Daniels *et al*, 1985; Weisiger, 1985; Weisiger & Ma, 1987). Les acides gras sont alors libres d'entrer en contact avec la membrane cellulaire qu'ils traverseraient soit par diffusion passive soit avec l'aide de protéines de la famille des translocases. Des études effectuées sur des modèles de

membranes sans protéines *in vitro* tendent à montrer que la diffusion passive à travers la membrane plasmique serait la principale voie d'entrée des acides gras dans la cellule, par un mouvement transmembranaire rapide appelé « flip-flop » ( $t_{1/2} < 1$  sec) (Hamilton *et al*, 2002). Ce terme définit le mouvement des acides gras intégrés dans la couche externe de phospholipides de la bicouche lipidique de la membrane plasmique vers la couche interne, avec réorientation de leur tête polaire vers l'intérieur de la cellule. Ce processus serait également utilisé par les acides gras pour sortir de la cellule. L'existence de protéines translocases et leur utilité dans le transport transmembranaire des acides gras sont de plus en plus contestées. La plupart de ces protéines dites translocases (*Fatty Acid Transport Protein*, CD36, Caveolin-1) seraient impliquées dans le métabolisme des acides gras plutôt que dans leur transport à travers la membrane (revu dans Hamilton, 2007).

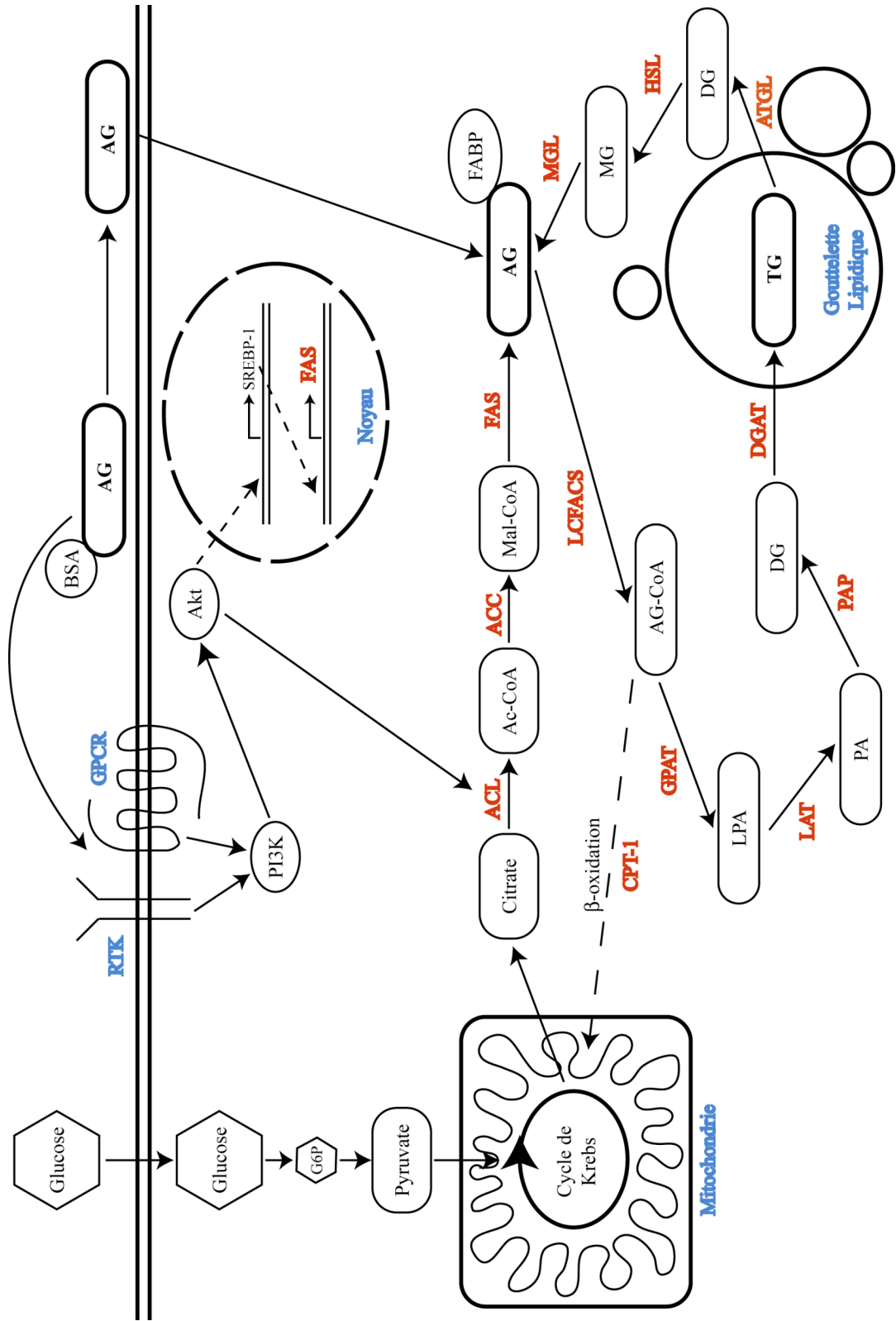
Tout comme l'albumine dans le sérum, il existe des protéines spécialisées dans le transport des acides gras dans le cytosol (*Fatty Acid Binding Proteins* (FABP)). Les FABPs sont de petites protéines formant des complexes 1 : 1 avec les acides gras une fois la membrane cellulaire franchie. La fonction première de ces protéines est de confiner les acides gras dans le cytosol, protégeant ainsi la cellule de leurs effets néfastes, et de faciliter le trafic lipidique intracellulaire (Bernlohr *et al*, 1997). Ces protéines interagissent aussi avec d'autres protéines comme l'enzyme *Hormone-Sensitive Lipase* (HSL) afin de favoriser leur translocation du cytosol vers les gouttelettes lipidiques (voir la section 3.2) (Shen *et al*, 1999).

Une fois dans la couche interne de la membrane de la cellule, les acides gras à longues chaînes subissent une estérification (AG-CoA) par des enzymes CoA synthétases. Cette étape se produit rapidement et les acides gras sont délogés de la membrane cellulaire par les FABPs. En fonction des besoins en énergie de la cellule, une partie des AG-CoA est orientée par certaines FABPs vers les mitochondries et les peroxysomes afin qu'ils soient convertis en énergie métabolique par oxydation. Les autres AG-CoA sont acétylés par l'enzyme *Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase* (GPAT) en acide lysophosphatidique puis par l'enzyme *Lysophosphatidylphosphate Acyltransferase* (LAT) en acide phosphatidique

(voir Figure 1). Ils seront ensuite convertis en différents types de phospholipides pour servir à la synthèse des membranes cellulaires ou encore en diglycérides puis en triglycérides qui seront entreposés dans des gouttelettes lipidiques (revu dans McArthur *et al*, 1999). Au besoin, ces triglycérides pourront être retransformés en acides gras à longues chaînes puis en AG-CoA afin d'être utilisés comme source d'énergie métabolique.

### **3.2 La synthèse *de novo* des acides gras à longues chaînes**

L'*ATP Citrate Lyase* (ACL) catalyse la synthèse d'une molécule d'acétyl-CoA, le principal substrat requis pour la synthèse *de novo* des acides gras, à partir d'une molécule de citrate (Figure 1). L'*Acetyl-CoA Carboxylase- $\alpha$*  (ACC- $\alpha$ ) catalyse ensuite la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (revu dans Swinnen *et al*, 2006). L'utilisation par ACL du citrate relâché dans le cytosol par le cycle de Krebs couple la synthèse des acides gras au métabolisme du glucose. Cette réaction permet de transformer en gras l'excédant de glucides apporté par la diète et d'entreposer cette énergie sous forme de triglycérides (Figure 1).



**Figure 1 : Le métabolisme des acides gras.**

ACC, *Acetyl-CoA Carboxylase- $\alpha$* ; Ac-CoA, acétyl-CoA; ACL, *ATP Citrate Lyase*; AG, acide gras; ATGL, *Adipose Triglyceride Lipase*; BSA, *Bovine Serum Albumin*; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase-1; DG, diglycéride; DGAT, *Diacylglycerol Acyltransferase*; FABP, *Fatty Acid Binding Proteins*; FAS, *Fatty Acid Synthase*; G6P, glucose-6-phosphate; GPAT, *Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase*; GPCR, *G Protein Coupled Receptor*; HSL, *Hormone-Sensitive Lipase*; LAT, *Lysophosphatidylphosphate Acyltransferase*; LCFACS, *Long Chain Fatty Acid-CoA Synthetase*; LPA, *Lysophosphatidic Acid*; Mal-CoA, malonyl-CoA; MG, monoglycéride; MGL, *Monoacylglycerol Lipase*; PA, *Phosphatidic Acid*; PAP, *Phosphatidic Acid Phosphohydrolase*; PI3K, *Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase*; RTK, récepteur tyrosine kinase; SREBP-1, *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1*; TG, triglycéride.

La *Fatty Acid Synthase* (FAS), exprimée principalement dans le foie et les tissus adipeux, catalyse la synthèse d'une molécule de palmitate (acide gras saturé possédant une longue chaîne de 16 carbones) à partir d'une molécule d'acétyl-CoA et de sept molécules de malonyl-CoA. Dans les tissus normaux, FAS est faiblement exprimé en raison de l'apport en gras de notre diète. L'endomètre et les glandes mammaires durant la lactation font exception, FAS y étant fortement exprimé. Plusieurs types de cancers humains présentent un taux élevé de synthèse *de novo* des acides gras dont le cancer du sein et le cancer de la prostate. L'augmentation de la lipogenèse reflète une augmentation de l'activité et/ou de l'expression de certaines enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras telles que FAS (revu dans Kuhajda, 2000) et ACC- $\alpha$  (Swinnen *et al*, 2000). L'inhibition de FAS par des inhibiteurs ou des ARNs interférents entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans les cellules de cancers de la prostate et du sein (De Schrijver *et al*, 2003; Pizer *et al*, 1996). L'utilisation d'inhibiteurs ou d'ARNs interférents ciblant ACC- $\alpha$  ou ACL entraînent également une inhibition de la prolifération cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose, ce qui suggère que ce ne serait pas

directement l'inhibition de FAS qui aurait un effet sur la prolifération des cellules cancéreuses, mais plutôt l'inhibition de la lipogenèse dans son ensemble (Brusselmans *et al*, 2005; Hatzivassiliou *et al*, 2005). Cette conclusion ne fait cependant pas l'unanimité. Certains groupes n'ont pas été en mesure d'observer une induction de l'apoptose des cellules suite à l'inhibition d'ACC- $\alpha$  ou d'ACL (Knowles *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2003). Ils suggèrent donc que l'inhibition de ces enzymes diminuerait la prolifération cellulaire par un autre mécanisme que celui impliquant l'inhibition de FAS et que l'inhibition de la lipogénèse ne serait pas suffisante à elle seule pour engendrer l'apoptose des cellules cancéreuses.

La cascade signalétique d'Akt (voir le chapitre 4, section 4.1 pour plus de détails sur cette protéine) est constitutivement active dans plusieurs lignées cancéreuses et cette activation chronique corrèle souvent avec la surexpression de FAS (Bandyopadhyay *et al*, 2005; Van de Sande *et al*, 2005; Wang *et al*, 2005). Le lien entre ces deux protéines a été étudié de façon plus approfondie : Akt, via l'activation du complexe *Mammalian Target of Rapamycin 1* (mTORC1), stimule la synthèse et l'accumulation nucléaire des *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBPs), des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gènes intervenant dans la lipogenèse, dont FAS et GPAT (Bengoechea-Alonso & Ericsson, 2007; Porstmann *et al*, 2005; Porstmann *et al*, 2008). Akt peut aussi activer directement ACL par phosphorylation et stimuler la transcription du transporteur du glucose GLUT1, augmentant la lipogenèse et la couplant au métabolisme du glucose (Barthel *et al*, 1999; Bauer *et al*, 2005; Berwick *et al*, 2002). L'inhibition de FAS diminue en retour l'activation d'Akt, suggérant un mécanisme d'activation en boucle de ces deux protéines (Wang *et al*, 2005). Des ARNs interférents dirigés contre FAS et des inhibiteurs pharmacologiques de la *Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase* (PI3K), un des principaux activateurs d'Akt, affectent de façon synergique la prolifération de cellules cancéreuses.



### 3.3 L'entreposage des acides gras : les gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques (appelées aussi corps lipidiques) sont formées d'un noyau de lipides neutres (principalement des triglycérides) entouré d'une monocouche de lipides amphiphiles, tels que des phospholipides et du cholestérol, ainsi que de protéines (revu dans Olofsson *et al*, 2008). Chez les mammifères, les gouttelettes lipidiques sont présentes non seulement dans les cellules adipeuses et stéroïdogéniques, mais dans pratiquement tous les types de cellules bien que leur nombre et leur taille soient variables. Pendant longtemps, les gouttelettes lipidiques ont été considérées comme des sites d'entreposage inertes de lipides neutres. Avec l'avancement des connaissances sur leur structure et leur biologie, elles sont maintenant reconnues comme des organelles dynamiques. Les protéines présentes à leur surface sont impliquées dans leur transport et leur métabolisme en interagissant avec les autres organelles présentes dans le cytoplasme des cellules (Binns *et al*, 2006; Liu *et al*, 2007; Ozeki *et al*, 2005; Shaw *et al*, 2008).

L'entreposage de lipides dans les gouttelettes lipidiques permet à la cellule de constituer une réserve d'énergie dans laquelle elle peut puiser de façon régulée selon ses besoins métaboliques. Cette énergie est libérée par un processus d'hydrolyse catalysé par des enzymes hydrolases lipidiques appelées lipases. Les produits de la lipolyse des triglycérides, un diglycéride et un acide gras, peuvent influencer la signalisation cellulaire de façon directe ou suite à une modification subséquente (revu dans Ducharme & Bickel, 2008). Les acides gras peuvent entre autres agir sur l'expression génique en tant que ligands des *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR), des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires (revu dans Ferre, 2004).

#### 3.3.1 Les protéines des gouttelettes lipidiques

Les protéines de la famille des périlipines (aussi appelée famille PAT en référence aux trois premiers membres identifiés de cette famille : périlipine, adipophiline (aussi appelée ADRP) et TIP47) sont les principales protéines localisées à la membrane des

gouttelettes lipidiques (revu dans Londos *et al*, 2005; Miura *et al*, 2002). Elles possèdent de grandes similarités de séquence et proviennent vraisemblablement d'un gène ancestral commun (revu dans Londos *et al*, 2005). La périlipine n'est présente que dans les cellules adipeuses et stéroïdogéniques. Son rôle à la surface des gouttelettes lipidiques semble être de protéger les triglycérides de la lipolyse dans des conditions basales, c'est-à-dire ne demandant pas un accroissement de l'apport en énergie (Brasaemle *et al*, 2000b). En cas de besoin en énergie, la périlipine, une fois activée, sert de point d'ancrage sur les gouttelettes lipidiques à HSL qui effectue la lipolyse (Tansey *et al*, 2003). L'adipophiline et TIP47, quant à elles, sont exprimées de façon ubiquitaire. L'adipophiline est présente à la surface de la majorité des gouttelettes lipidiques, mais ne semble pas protéger les triglycérides de la lipolyse dans des conditions basales (Tansey *et al*, 2001). Le rôle principal de l'adipophiline semble être le partitionnement des triglycérides entre les gouttelettes lipidiques et la membrane cellulaire (Chang *et al*, 2006). De son côté, TIP47 n'est présente qu'occasionnellement à la surface des gouttelettes lipidiques, mais semble être recrutée rapidement aux gouttelettes préexistantes suite à un traitement des cellules avec certains acides gras tel que l'oléate (Ohsaki *et al*, 2006). Les autres membres de la famille des périlipines sont OXPAT, jouant également un rôle protecteur contre la lipolyse, et S3-12, exprimé seulement dans les adipocytes (Dalen *et al*, 2007; Wolins *et al*, 2003).

En plus des protéines de la famille des périlipines, un grand nombre de protéines sont présentes à la surface des gouttelettes lipidiques. Certaines sont impliquées dans la biosynthèse des triglycérides comme GPAT, *Diacylglycerol Acyltransferase* (DGAT), *Phosphatidic Acid Phosphohydrolase* (PAP), *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) et son co-activateur CGI-58 (aussi appelé Abhd5). D'autres telles que des protéines de la famille de Rab, des petites GTPases de la famille de Ras, mais aussi les *Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2* (ERK1/2) et PI3K sont impliquées dans diverses voies de signalisation incluant l'endocytose, la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'oncogenèse (revu dans Fujimoto & Ohsaki, 2006; Yu *et al*, 1998; Yu *et al*, 2000).

Le rôle principal des protéines de la famille des périlipines est de réguler le recrutement et l'activité des lipases en fonction des besoins en énergie de la cellule, ce qui contrôle la lipolyse des triglycérides contenus dans les gouttelettes lipidiques. Cependant, comme suggéré par leur expression et localisation différentielles, chacun des membres de cette famille pourrait avoir un rôle spécifique à remplir, rôles encore peu étudiés à l'heure actuelle. De façon intéressante, lorsque des cellules sont cultivées *in vitro* en présence d'acides gras à longues chaînes, un sous-groupe de gouttelettes lipidiques se forme. Ces gouttelettes, plus petites et rassemblées à la périphérie des cellules, présentent à leur surface les protéines S3-12 et TIP47, mais non la périlipine (Wolins *et al*, 2005; Wolins *et al*, 2003). Au fur et à mesure que ces nouvelles gouttelettes lipidiques grossissent par fusion et se rapprochent du centre de la cellule, leur composition en protéines change, incluant progressivement l'adipophiline puis la périlipine pour les gouttelettes lipidiques localisées les plus proches du noyau. Cette hétérogénéité de composition protéique suggère un processus coordonné de maturation et de transport des gouttelettes lipidiques dans la cellule, de leur site de biosynthèse à leur site d'entreposage (Wolins *et al*, 2006).

### **3.3.2 Le métabolisme des gouttelettes lipidiques**

Il semblerait que les gouttelettes lipidiques soient formées dans une région spécialisée à la surface du réticulum endoplasmique (RE) puisqu'un marqueur du RE, le GRP-78, a été identifié à la surface des gouttelettes lipidiques (Marchesan *et al*, 2003; Robenek *et al*, 2006). Des observations effectuées dans des souris adipophiline-nulles suggèrent que cette protéine aurait un rôle à jouer dans la formation des gouttelettes lipidiques (Chang *et al*, 2006). Elle entraînerait la condensation des triglycérides dans la membrane du RE, formant ainsi une sorte de lentille en les empêchant de s'étaler entre les deux parois de la double couche de phospholipides. Les gouttelettes lipidiques pourraient alors se former en bourgeonnant à partir de la membrane du RE. Cependant, des études sont encore nécessaires afin de déterminer si les gouttelettes lipidiques se détachent complètement du RE ou si elles y restent liées. Des observations au microscope

électronique montrent parfois une continuité entre ces deux organelles, bien qu'une telle connexion ne semble pas fréquente (Blanchette-Mackie *et al*, 1995).

Les gouttelettes lipidiques sont transportées dans la cellule par les microtubules. La protéine motrice dynéine a été mise en évidence à la surface des gouttelettes en réponse à son activation par la protéine kinase ERK2 (Bostrom *et al*, 2005; Targett-Adams *et al*, 2003; Welte *et al*, 1998). L'association des gouttelettes lipidiques avec le réseau de microtubules est essentiel à l'accroissement de leur taille par fusion, un processus catalysé par le système  $\alpha$ -Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Adaptor Protein Receptors (SNAREs) (Bostrom *et al*, 2007). L'entreposage de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques facilite d'une part leur transport vers certaines destinations cellulaires et d'autre part l'interaction des lipides neutres et de leurs métabolites avec des cascades signalétiques spécifiques. Il permet aussi aux gouttelettes lipidiques d'entrer en contact avec diverses organelles nécessaires à leurs fonctions. Les triglycérides doivent être hydrolysés pour être utilisés et certaines des protéines indispensables à ce processus, comme l'hydrolase des triglycérides et la *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTP), se trouvent dans le lumen du RE (Hussain *et al*, 2003; Lehner *et al*, 1999). Ces deux organelles forment probablement des contacts rapprochés à certains moments. À ce titre, la protéine Rab18 semble jouer un rôle important en éradiquant l'adipophiline de la surface des gouttelettes lipidiques ce qui facilite l'interaction des gouttelettes avec le RE (Ozeki *et al*, 2005). Les gouttelettes lipidiques assurent aussi le transport des lipides du RE vers d'autres organelles comme les mitochondries, l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique (Levine, 2004; Voelker, 2003).

### **3.4 La lipolyse des acides gras**

Au cours du processus de lipolyse, une molécule de glycérol et trois molécules d'acide gras sont produites par l'hydrolyse d'une molécule de triglycéride. Les acides gras sont relâchés dans la circulation afin d'être utilisés par des tissus présentant un besoin en énergie où ils seront estérifiés et dirigés vers les mitochondries pour produire de l'énergie

par oxydation. La lipolyse est sous le contrôle d'hormones telles que les catécholamines et l'insuline dont la sécrétion est régulée par la nutrition. En temps de besoin en énergie, comme lors d'exercice ou de jeûne, la lipolyse est activée par les catécholamines. Celles-ci se lient à des récepteurs couplés à des protéines  $G\alpha_s$  ce qui stimule l'activation de l'adénylate cyclase et induit l'accumulation d'AMP cyclique (cAMP; *Cyclic AMP*) (voir le chapitre 5 pour plus de détails sur les récepteurs couplés aux protéines G). La cAMP active la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle HSL, ce qui augmente son activité lipolytique. L'activation de HSL par PKA *in vitro* est bien trop modeste (activation d'environ deux fois) pour expliquer à elle seule le niveau de lipolyse engendré par la stimulation de cette enzyme dans des cellules (entre 50 et 100 fois) (revu dans Londos *et al*, 1999). L'étude de la localisation cellulaire de HSL a montré qu'elle est normalement située dans le cytosol des adipocytes mais, suite à l'initiation de la lipolyse, elle s'associe aux gouttelettes lipidiques (Brasaemle *et al*, 2000a; Egan *et al*, 1992). La stimulation de PKA entraîne l'activation de la périlipine qui aide au recrutement de HSL aux gouttelettes lipidiques et facilite son activation par PKA. Cependant, même en absence de HSL, la stimulation de la périlipine par PKA cause une augmentation de la lipolyse ce qui suggère la présence d'autres lipases également sous le contrôle de la voie PKA (Souza *et al*, 2002; Tansey *et al*, 2003). Les protéines kinases GSK et ERK1/2 (voir le chapitre 4, section 4.2 pour plus de détails sur cette dernière) assurent aussi la phosphorylation de HSL, entraînant une activité lipolytique similaire à celle observée suite à la phosphorylation de HSL par PKA (Greenberg *et al*, 2001). La kinase *AMP-Dependent Protein Kinase* (AMPK), une protéine servant de senseur d'énergie cellulaire, peut également phosphoryler HSL. La phosphorylation de HSL par AMPK empêcherait néanmoins sa phosphorylation subséquente par PKA, ce qui suggère qu'AMPK aurait un rôle anti-lipolytique (Garton & Yeaman, 1990). ATGL, également présente à la surface des gouttelettes lipidiques, est une autre lipase identifiée plus récemment. Contrairement à HSL, elle semble se lier aux gouttelettes de façon PKA-indépendante (Zimmermann *et al*, 2004). Son activation ne nécessite ni phosphorylation ni translocation, mais plutôt la liaison avec son co-activateur CGI-58 (Lass *et al*, 2006). Chez la souris, un modèle a été proposé selon lequel ATGL

serait la lipase principalement responsable de la lipolyse du premier acide gras des triglycérides alors que HSL s'occuperait essentiellement de la lipolyse des diglycérides (Zechner *et al*, 2005). Cependant, il n'a pas été montré que ce modèle pouvait être transposé à l'humain. Finalement, la lipolyse des monoglycérides s'effectue par la *Monoacylglycerol Lipase* (MGL).

La lipolyse est régulée de bien des façons, non seulement par phosphorylation des différentes enzymes impliquées, mais aussi par la régulation de leur expression. Le *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) réduit l'expression de la périlipine. La forme inactive de cette protéine ayant comme principal rôle de protéger les triglycérides de la lipolyse dans des conditions ne demandant pas un apport en énergie, la diminution de son expression favorise l'accès des lipases aux gouttelettes lipidiques et entraîne une augmentation de la lipolyse. À l'opposé, l'activation de PPAR $\gamma$  stimule l'expression de la périlipine qui, en diminuant l'accès des lipases aux gouttelettes lipidiques, produit une accumulation de triglycérides (revu dans Carmen & Victor, 2006; Ryden *et al*, 2004; Souza *et al*, 2003).

## **Chapitre 4. Voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire**

Deux des voies les plus importantes pour la prolifération et la survie cellulaire sont les voies Akt et ERK1/2. Les premières études sur la voie Akt se sont concentrées sur son rôle en tant qu'oncogène inhibant l'apoptose (Downward, 1998). À la même époque, les études sur la voie ERK1/2 définissaient son importance dans la progression G1/S du cycle cellulaire, menant à une conception générale que la voie Akt contrôlerait la survie de la cellule alors que la voie ERK1/2 gérerait la progression du cycle cellulaire et la prolifération (Lavoie *et al*, 1996). Cependant, l'émergence de plusieurs preuves de l'implication de ERK1/2 dans des voies signalétiques de survie cellulaire ont brisé cette démarcation et il est accepté que ces deux voies contribuent toutes deux à la prolifération et à la survie des cellules (Erhardt *et al*, 1999; Kinoshita *et al*, 1997; Le Gall *et al*, 2000).

### **4.1 La voie Akt**

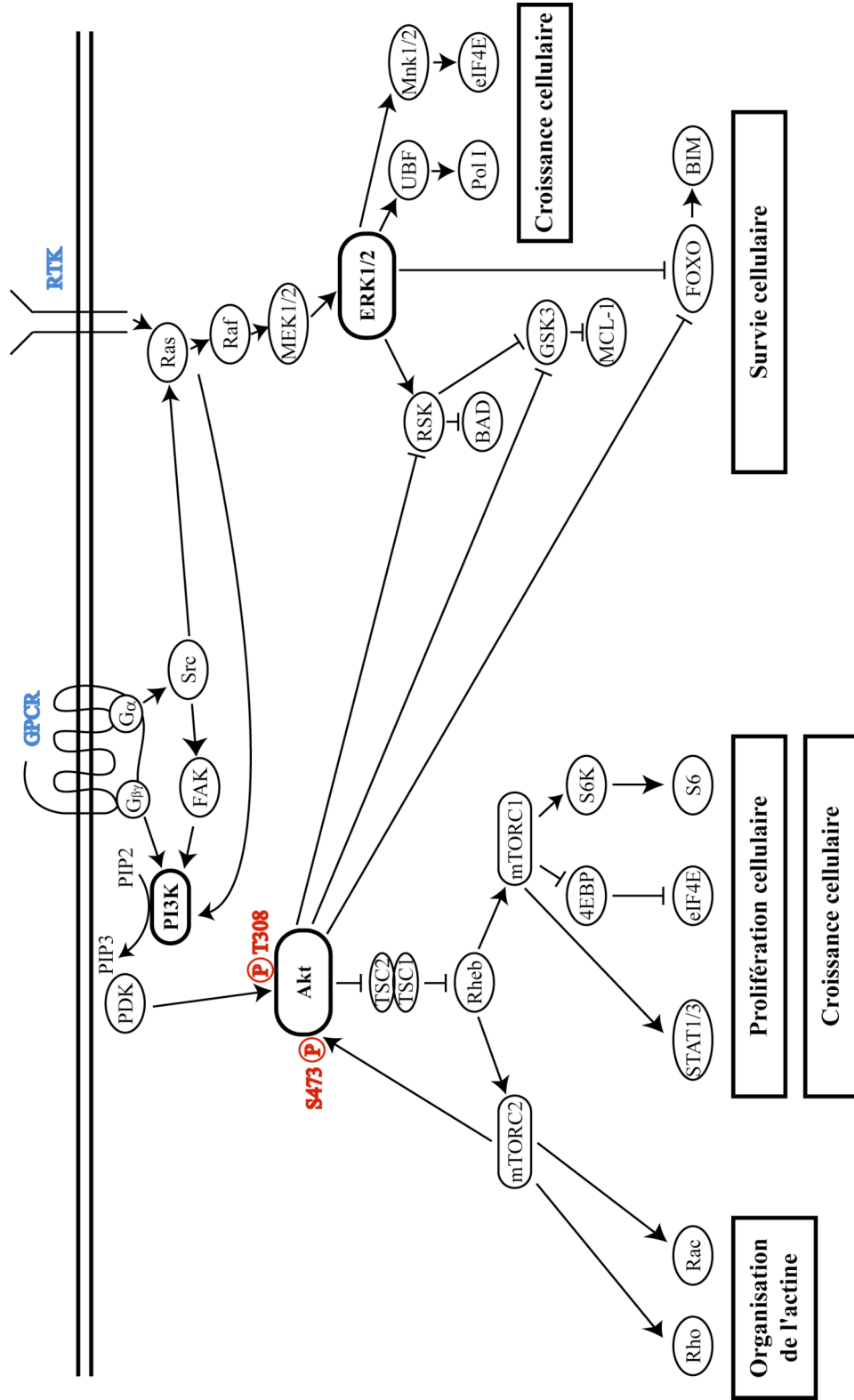
Avec plus de 100 substrats répertoriés à ce jour, la sérine/thréonine kinase Akt est un noyau central dans la réponse aux facteurs de croissance, cytokines et autres stimuli cellulaires. Akt est impliquée dans le métabolisme du glucose, stimulant son entrée dans la cellule en réponse à l'insuline (Kohn *et al*, 1996). Elle joue également un rôle dans plusieurs pathologies humaines, dont le cancer, favorisant entre autres la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et la migration cellulaire (revu dans Altomare & Testa, 2005).

#### **4.1.1 Rôle d'Akt dans la survie cellulaire**

Le mécanisme principalement utilisé par Akt pour permettre la survie cellulaire est l'inhibition de processus ou de protéines pro-apoptotiques. Akt régule de façon négative la fonction ou l'expression de plusieurs protéines de la famille des *Bcl-2 Homology Domain 3* (BH3)-*only* qui exercent leur fonction pro-apoptotique en se liant et en inactivant les

membres « pro-survie » de la famille des Bcl-2. Ainsi, Akt entraîne l'inhibition de la protéine pro-apoptotique BAD par phosphorylation, créant un site de liaison aux protéines 14-3-3 lesquelles catalysent la dissociation de BAD de ses cibles telle que BLC-x<sub>L</sub> (Figure 2) (Datta *et al*, 1997; Datta *et al*, 2000). Akt inhibe aussi des facteurs de transcription tels que FOXO1, FOXO3a et FOXO4. Une fois phosphorylés par Akt, ces facteurs de transcription sont reconnus par les protéines 14-3-3 qui les délogent des promoteurs de leurs gènes cibles codant pour des protéines impliquées, entre autres, dans l'apoptose tels que la protéine BH3-*only* BIM ou le ligand de Fas, une cytokine pro-apoptotique (revu dans Tran *et al*, 2003). Akt phosphoryle également la kinase GSK3 entraînant son inactivation et l'empêchant d'inhiber la protéine pro-survie MCL-1 de la famille des Bcl-2 (Maurer *et al*, 2006). Finalement, Akt peut inhiber la caspase-9 par phosphorylation, mais l'importance de cette action dans la survie cellulaire induite par Akt reste à approfondir (Cardone *et al*, 1998).





**Figure 2 : Signalisation des voies Akt et ERK1/2.**

4EBP, *Eucaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein*; eIF4E, *Eucaryotic Initiation Factor 4E*; ERK1/2, *Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2*; FAK, *Focal Adhesion Kinase*; FOXO, *Forkhead Box O*; GPCR, *G Protein Coupled Receptor*; GSK3, *Glycogen Synthase Kinase 3*; MCL-1, *Myeloid Cell Leukemia Sequence 1*; MEK1/2, *MAP Kinase / ERK Kinase 1 and 2*; mTORC, *Mammalian Target of Rapamycin Complex*; PI3K, *Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase*; PIP2, *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate*; PIP3, *Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate*; PDK, *Phosphoinositide-Dependent Kinase*; Pol I, *ARN polymérase I*; RSK, *Ribosomal S6 Kinase*; RTK, *récepteur tyrosine kinase*; S6K, *S6 Kinase*; STAT1/3, *Signal Transducer and Activator of Transcription 1 and 3*; TSC, *Tuberous Sclerosis Complex*; UBF, *Upstream Binding Factor*.

**4.1.2 Rôle d'Akt dans la croissance cellulaire**

Une des fonctions les plus étudiées d'Akt est son rôle dans la croissance cellulaire, un processus par lequel les cellules augmentent leur masse en accentuant la biosynthèse des macromolécules, des membranes et des organelles. Akt phosphoryle et inhibe le *Tuberous Sclerosis Complex 2* (TSC2) qui est lui-même un régulateur négatif de mTORC1, un complexe ayant une activité kinase composé entre autres des protéines mTOR et raptor (Goncharova *et al*, 2002; Inoki *et al*, 2002; Manning *et al*, 2002). TSC1, le partenaire de TSC2, est une protéine activant les GTPases (*GTPase-Activating Protein* (GAP)) qui agit sur Rheb, une petite GTPase de la famille de Ras. Rheb active fortement mTORC1 lorsque liée à la GTP (revu dans Manning & Cantley, 2003). Ainsi, Akt stimule de façon indirecte l'activité de mTORC1 en inhibant le complexe TSC2/TSC1 ce qui garde Rheb sous sa forme active et lui permet d'activer mTORC1. Le complexe mTORC1 est un régulateur important de l'initiation de la transcription et de la biogénèse des ribosomes, qui active entre autres la *S6 Kinase 1* (S6K1) et le facteur d'initiation eucaryotique 4E (eIF4E; *Eucaryotic Initiation Factor 4E*), l'élément limitant de la transcription eucaryotique (Figure

2) (revu dans Wullschleger *et al*, 2006). Les cellules cancéreuses ayant une forte activité Akt présentent une augmentation de leur sensibilité aux inhibiteurs de mTORC1, comme la rapamycine, ce qui illustre l'importance de l'activation de ce complexe dans la signalisation de cette kinase (revu dans Sabatini, 2006). Il existe un deuxième complexe, mTORC2, formé entre autres des protéines mTOR et rictor, dont l'activité est insensible à la rapamycine. mTORC2 stimule l'activation de Rac et Rho, deux protéines impliquées dans l'organisation de l'actine, agissant ainsi sur le contrôle spatial de la croissance cellulaire (Jacinto *et al*, 2004).

En plus d'augmenter sa production de protéines, une cellule en pleine croissance doit aussi augmenter sa synthèse de membranes afin d'accroître sa taille. Certaines cibles d'Akt, telles que ACL et FAS, ont un rôle dans le métabolisme des lipides et pourraient donc avoir un impact sur la synthèse des membranes (Berwick *et al*, 2002; Sundqvist *et al*, 2005).

#### **4.1.3 Rôle d'Akt dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire**

Malgré le fait que la voie Akt soit plutôt connue pour sa fonction dans la survie cellulaire, elle joue également un rôle dans la prolifération des cellules. En effet, des inhibiteurs du cycle cellulaire, comme p21 et p27, comptent parmi les cibles d'Akt. Leur phosphorylation entraîne leur interaction avec les protéines 14-3-3 et leur séquestration au cytoplasme (Sekimoto *et al*, 2004; Zhou *et al*, 2001). Les cyclines D et E ainsi que les facteurs de transcription c-Jun et c-Myc sont importants dans la transition G1/S du cycle cellulaire. La kinase GSK3 induit la phosphorylation de ces protéines, entraînant leur dégradation par le protéasome. L'activation d'Akt augmente la stabilité de ces protéines, et donc favorise la division cellulaire, en inactivant GSK3 par phosphorylation (Diehl *et al*, 1998; Wei *et al*, 2005; Welcker *et al*, 2003; Yeh *et al*, 2004).

## 4.2 La voie ERK1/2

ERK1/2 sont des sérine/thréonine kinases multifonctionnelles, exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules. Elles activent ou désactivent par phosphorylation une vaste panoplie de protéines localisées dans tous les compartiments cellulaires. Elles font partie de la grande famille des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) qui inclut également, entre autres, *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase* (JNK) et p38. Les substrats d'ERK1/2 incluent des protéines kinases, des protéines signalétiques, des récepteurs, des protéines du cytosquelette et des régulateurs de la transcription (Lewis *et al*, 1998; Pearson *et al*, 2001; Widmann *et al*, 1999). Cette voie de signalisation montre une grande conservation au cours de l'évolution, ce qui tend à prouver son importance pour la survie des cellules. Cette voie est activée préférentiellement par des facteurs extracellulaires mitogéniques, des stimuli de différenciation et des cytokines. L'association de ces ligands à leurs récepteurs membranaires respectifs induit l'activation de la petite GTPase Ras, laquelle recrute la MAP kinase kinase kinase Raf à la membrane cellulaire et la phosphoryle. Raf activée phosphoryle à son tour les MAP kinase kinases MEK1/2 (*MAP Kinase / ERK Kinase 1 and 2*) qui activent les effecteurs MAP kinases ERK1/2 par phosphorylation (Figure 2). L'activation de la voie ERK1/2 par des mitogènes se fait en deux phases, une première phase rapide et aiguë entre 5 et 10 minutes après stimulation, puis une phase moins intense mais soutenue qui persiste jusqu'en phase G1 du cycle cellulaire (Kahan *et al*, 1992; Meloche *et al*, 1992).

### 4.2.1 Rôle d'ERK1/2 dans la survie cellulaire

L'effet d'ERK1/2 sur la survie cellulaire implique souvent l'activation ou l'inhibition des protéines de la famille des Bcl-2. Cette famille comporte des membres pro-apoptotiques (comme BIM, BAD, BAX et BAK) ainsi que des membres pro-survie (Bcl-2, BCL-x<sub>L</sub> et MCL-1). Ces protéines contrôlent le relâchement du cytochrome *c* des mitochondries, un mécanisme assurant l'activation des caspases et la mort cellulaire (Brunelle & Letai, 2009).

L'absence de facteurs de croissance dans le milieu mène à l'inactivation d'ERK1/2, à la déphosphorylation et à l'entrée de FOXO3A au noyau, ce qui entraîne l'augmentation de l'expression de BIM (Yang *et al*, 2008). L'activation d'ERK1/2, tout comme celle d'Akt, induit la phosphorylation de FOXO3A, ce qui cause sa dégradation par le protéasome et engendre une baisse du niveau d'expression de BIM (Figure 2) (Fu & Tindall, 2008). ERK1/2 activées peuvent aussi bloquer la liaison entre BIM et des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2, comme BCL-x<sub>L</sub> et MCL-1 (Ewings *et al*, 2007).

L'activation d'ERK1/2 induit l'ubiquitination et la dégradation de BAD en activant RSK (*Ribosomal S6 Kinase*) (Fueller *et al*, 2008). L'inhibition de BAD par phosphorylation par RSK ou Akt facilite son interaction avec les protéines 14-3-3, entraînant sa dégradation. À l'opposé, la phosphorylation de BAD induite par PKA bloque son interaction avec des protéines pro-survie et conduit à sa dissociation des mitochondries (Datta *et al*, 2000; Lizcano *et al*, 2000; Virdee *et al*, 2000).

L'expression de MCL-1 est souvent élevée dans les tumeurs ou les lignées cancéreuses et son expression est associée à un mauvais pronostic et à la résistance aux traitements. La phosphorylation de MCL-1 par ERK1/2 conduit à sa stabilisation (Domina *et al*, 2004). MCL-1 peut également être phosphorylé par GSK3 $\beta$ , ce qui a pour effet de la rendre instable et d'induire sa dégradation. L'activation d'ERK1/2 ou d'Akt inhibe GSK3 $\beta$  par phosphorylation (Figure 2) (Kobayashi *et al*, 2005; Sutherland *et al*, 1993). ERK1/2 possèdent donc un double mécanisme afin d'assurer la stabilité de la protéine MCL-1 et l'inhibition de la voie ERK1/2 est souvent accompagnée d'une réduction de l'expression de MCL-1.

#### **4.2.2 Rôle d'ERK1/2 dans la croissance cellulaire**

L'Activation d'ERK1/2 induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la transcription eIF4E par l'intermédiaire des protéines kinases Mnk1/2 (Ueda *et al*, 2004; Waskiewicz *et al*, 1999). ERK1/2 agit aussi sur la transcription ribosomale en

phosphorylant *Upstream Binding Factor* (UBF), un activateur de l'ARN polymérase I (Stefanovsky *et al*, 2001). L'impact principal d'ERK1/2 sur la croissance se trouve au niveau de son activation de la voie mTOR par l'inactivation du complexe TSC1/TSC2 (Ma *et al*, 2005; Roux *et al*, 2004). Ainsi, les voies de signalisation d'ERK1/2 et d'Akt coopèrent dans l'activation des complexes kinases mTOR afin de promouvoir la croissance cellulaire.

### **4.2.3 Rôle d'ERK1/2 dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire**

L'activation de la voie ERK1/2 est nécessaire à l'initiation de la transcription de la cycline D1 et à la stabilisation du facteur de transcription c-Myc, deux acteurs majeurs du cycle cellulaire (Balmanno & Cook, 1999; Sears *et al*, 2000). L'activation continue d'ERK1/2 durant la phase G1 est requise pour permettre une entrée en phase S, mais insuffisante à elle seule pour faire entrer les cellules en phase S (Yamamoto *et al*, 2006), l'activité de la PI3K étant aussi requise (Jones & Kazlauskas, 2001; Treinies *et al*, 1999). ERK1/2 sont ensuite rapidement inactivées durant la transition G1/S, leur activité ne semblant pas requise lors de la phase S (Meloche, 1995).

## Chapitre 5. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR; *G Protein Coupled Receptor*) forment la plus grande famille de protéines membranaires et sont responsables de la majorité des réponses cellulaires aux hormones, aux neurotransmetteurs, ainsi qu'aux stimuli olfactifs et gustatifs. Il existerait environ 865 gènes codant pour des GPCRs chez l'humain, dont approximativement 500 récepteurs olfactifs, ce qui correspondrait à ~ 5 % du génome (Heilker *et al*, 2009). Une centaine de GPCRs seraient toujours dits « orphelins », c'est-à-dire sans ligands connus.

Les GPCRs sont formés de sept domaines transmembranaires reliés par des boucles intracellulaires et extracellulaires en alternance. Leur queue N-terminale, à l'extérieur de la cellule, sert de point d'ancrage à leurs ligands tandis que leur queue C-terminale, du côté cytosolique, lie les protéines effectrices appelées petites protéines G. Ces dernières sont responsables de la transmission des signaux cellulaires induits par l'activation des GPCRs.

### 5.1 Activation des GPCRs via l'association avec leurs ligands

Les protéines liant la guanine, ou « protéines G », alternent entre un état actif lié à la GTP et un état inactif lié à la GDP. Elles forment un hétéro-trimère composé des sous-unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$  qui sont liées à la fois à la queue N-terminale des GPCRs et à la membrane plasmique. La sous-unité  $G\alpha$  est responsable de la liaison avec le GTP/GDP.  $G\alpha$ -GDP se lie fermement au dimère  $G\beta\gamma$ , favorisant leur localisation à la membrane et renforçant leur association aux GPCRs (Robillard *et al*, 2000). Le dimère  $G\beta\gamma$  agit comme inhibiteur de la dissociation de la guanine (*Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor* (GDI)), ralentissant le relâchement du GDP par la sous-unité  $G\alpha$  et donc empêchant son activation (Brandt & Ross, 1985; Higashijima *et al*, 1987). Une fois associé à son ligand, le GPCR agit en tant que facteur d'échange de la guanine (*Guanine-nucleotide Exchange Factor* (GEF)), libérant le GDP lié à la sous-unité  $G\alpha$ . Cette dernière est alors

libre de se lier au GTP, qui se trouve en excès par rapport au GDP dans les cellules, ce qui entraîne son activation.  $G\alpha$ -GTP se dissocie de  $G\beta\gamma$  (Wall *et al*, 1998) et ces deux complexes interagissent avec diverses protéines effectrices pour initier une signalisation intracellulaire. L'activité intrinsèque GTPase de la sous-unité  $G\alpha$  cause l'hydrolyse du GTP en GDP, ramenant  $G\alpha$  à son état inactif et entraînant sa réassociation au dimère  $G\beta\gamma$  (Ford *et al*, 1998; Li *et al*, 1998).

## 5.2 La sous-unité $G\alpha$

### 5.2.1 Caractérisation

Il existe 16 gènes chez l'humain codant pour des sous-unités  $G\alpha$ , ces protéines étant regroupées en quatre classes selon leur similarité de séquence :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_{12/13}$  (revu dans Simon *et al*, 1991). La sous-unité  $G\alpha$  est composée de deux domaines. Le premier comporte une structure similaire à la famille des GTPases Ras et le deuxième est constitué d'hélices alpha. Les deux domaines forment ensemble une pochette servant à lier la guanine. La sous-unité  $G\alpha$  contient également trois régions flexibles qui changent de conformation lors de la liaison avec le GTP, ce qui diminue l'affinité pour le dimère  $G\beta\gamma$  et augmente celle pour les protéines effectrices de  $G\alpha$  (revu dans Sprang, 1997).

### 5.2.2 Signalisation induite par l'activation des sous-unités $G\alpha$

Chacune des classes de sous-unités  $G\alpha$  possède des effecteurs particuliers.  $G\alpha_s$  fût la première protéine G identifiée, nommée ainsi pour son rôle de stimulateur de l'adénylate cyclase (Ross & Gilman, 1977). L'activation de l'adénylate cyclase catalyse la formation de cAMP, un second messenger impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires. Le cAMP active entre autres la PKA et la voie ERK1/2 via la GTPase Rap-1 (Schmitt & Stork, 2002).

$G\alpha_i$  a été le premier membre de sa classe identifié et fût nommé ainsi en raison de son rôle d'inhibiteur de l'adénylate cyclase (Hildebrandt *et al*, 1983; Smith & Limbird,



1982). En plus d'inhiber les effets engendrés par la production de cAMP, les protéines  $G\alpha_i$  et  $G\alpha_o$  entraînent la signalisation de c-Src qui active STAT3 et ERK1/2. La voie  $G\alpha_{i/o}$  est inhibée de façon spécifique par la toxine de pertussis qui ajoute un ribose-ADP à la queue C-terminale des sous-unités  $G\alpha_{i/o}$  ce qui les empêche de se lier à leur récepteur et donc les maintient dans leur forme inactive (Murayama & Ui, 1983).

La sous-unité  $G\alpha_q$  active la phospholipase C- $\beta$  qui hydrolyse l'inositol 4,5-bisphosphate ( $IP_2$ ) en inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) et en diglycéride, deux seconds messagers (revu dans Rhee, 2001). Le diglycéride recrute la protéine kinase C à la membrane et l'active alors que l' $IP_3$  entraîne un relâchement du calcium dans le cytosol. Ce relâchement stimule les canaux calciques à la surface des cellules qui initient le recrutement du calcium extracellulaire.

$G\alpha_{12}$  et  $G\alpha_{13}$  ont été découvertes plus tardivement grâce à leur similarité de séquence avec les autres protéines  $G\alpha$ . Elles peuvent stimuler l'activité de PDZ-RhoGEF, un facteur d'échange de la guanine et donc activateur de la famille Rho (Fukuhara *et al*, 1999).  $G\alpha_{12}$  a été identifiée comme oncogène et il semblerait que ses effets sur l'expression génique passeraient par l'activation de membres de la famille des MAPKs tels que ERK5 ou JNK (Chan *et al*, 1993).

## 5.3 Le dimère $G\beta\gamma$

### 5.3.1 Caractérisation

Il existe 5 gènes codant pour des sous-unités  $G\beta$  (revu dans Clapham & Neer, 1997; Fletcher *et al*, 1998) et 12 gènes codant pour des sous-unités  $G\gamma$  chez l'humain (Huang *et al*, 1999; Ray *et al*, 1995) (revu dans Simon *et al*, 1991). La plupart des combinaisons  $G\beta\gamma$  sont fonctionnelles, bien qu'il y ait quelques exceptions comme par exemple  $G\beta_2\gamma_1$ . Des évidences montrent que des combinaisons spécifiques de dimères  $G\beta\gamma$  seraient nécessaires pour l'activation de certains récepteurs et l'induction subséquente de voies de signalisation

précises. Contrairement à la sous-unité  $G\alpha$ , le dimère  $G\beta\gamma$  forme une structure stable qui ne change pas de conformation lors de la dissociation induite par la fixation de GTP à  $G\alpha$  (Sondek *et al*, 1996). L'association avec la sous-unité  $G\alpha$  empêche le dimère  $G\beta\gamma$  de se lier à ses effecteurs, ce qui suggère que le site de liaison de  $G\beta\gamma$  pour ses effecteurs et pour  $G\alpha$  est au moins partiellement partagé.

### **5.3.2 Signalisation induite par l'activation du dimère $G\beta\gamma$**

Le complexe  $G\beta\gamma$  régule au moins quatre effecteurs de façon directe : la phospholipase  $C\beta$ , l'adénylate cyclase, les canaux potassiques et la PI3K (Boyer *et al*, 1992; Logothetis *et al*, 1987; Stephens *et al*, 1994; Tang & Gilman, 1991). Le dimère  $G\beta\gamma$  active aussi de façon indirecte la petite GTPase Ras, entraînant l'activation de voies de signalisation des MAPKs dont ERK1/2, JNK et p38 (Coso *et al*, 1996; Crespo *et al*, 1994; Yamauchi *et al*, 1997).

## Chapitre 6. Les récepteurs aux acides gras

Les acides gras jouent des rôles importants dans divers processus physiologiques, mais jusqu'à récemment, le dogme accepté était que ces processus ne pouvaient être activés que suite à l'entrée des acides gras dans les cellules et à leur métabolisme. L'identification de récepteurs membranaires spécifiques aux acides gras a ouvert d'autres hypothèses quant à l'influence de ces métabolites sur la signalisation intracellulaire.

### 6.1 Les récepteurs de la famille GPR40-43

Les gènes encodant les protéines GPR40, GPR41 et GPR43 (également nommées FFA1, FFA3 et FFA2 ou FFAR1, FFAR3 et FFAR2, respectivement) sont regroupés sur le chromosome 19q13.1 chez l'humain (Sawzdargo *et al*, 1997). Un quatrième gène identifié dans cette famille, GPR42, possède 98 % d'homologie de séquence avec GPR41 ; il serait vraisemblablement une duplication non-fonctionnelle de GPR41 (Brown *et al*, 2003).

#### 6.1.1 GPR40

##### 6.1.1.1 Caractérisation du récepteur GPR40

En 2003, trois groupes ont identifié, indépendamment les uns des autres, les acides gras à moyennes et à longues chaînes comme étant les ligands de GPR40 (Briscoe *et al*, 2003; Itoh *et al*, 2003; Kotarsky *et al*, 2003). Une quarantaine d'acides gras saturés et insaturés sont en mesure d'activer GPR40 à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Ce récepteur peut également être activé par des membres de la famille des thiazolidinédiones, des drogues synthétiques agonistes du récepteur PPAR $\gamma$  utilisées dans le traitement du diabète (Kotarsky *et al*, 2003). Des essais d'influx de calcium ont déterminé que GPR40 est couplé à la petite protéine G $\alpha_q$  alors qu'un traitement à la toxine de

pertussis, qui bloque les effets de l'activation de ce récepteur, a révélé que GPR40 serait aussi couplé à  $G\alpha_{i/o}$  (Fujiwara *et al*, 2005; Hardy *et al*, 2005; Yonezawa *et al*, 2004).

### 6.1.1.2 Expression du récepteur GPR40

Les trois études initiales portant sur GPR40 ont montré qu'il était exprimé dans le pancréas, plus spécifiquement dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (Briscoe *et al*, 2003; Itoh *et al*, 2003; Kotarsky *et al*, 2003). Son expression dans le cerveau a été longtemps controversée, mais des études récentes semblent la confirmer (Ma *et al*, 2008a; Ma *et al*, 2007). GPR40 a aussi été détecté dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires humaines (Hardy *et al*, 2005; Yonezawa *et al*, 2004), dans des cellules épithéliales mammaires bovines (Yonezawa *et al*, 2008), dans l'appareil gastro-intestinal de souris (Edfalk *et al*, 2008) ainsi que dans les cellules normales épithéliales bronchiales humaines (Gras *et al*, 2009).

### 6.1.1.3 Fonctions du récepteur GPR40

Les acides gras jouent un rôle important dans les cellules  $\beta$  du pancréas. Une hausse de la concentration en acides gras circulant dans le sang augmente la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose (Seyffert & Madison, 1967; Stein *et al*, 1997). L'absence d'acides gras circulants entrave la sécrétion d'insuline induite par le glucose ce qui tend à montrer que les acides gras seraient essentiels à la sécrétion basale d'insuline (Stein *et al*, 1996). Étant donné la forte expression de GPR40 dans les cellules  $\beta$  du pancréas, plusieurs études se sont penchées sur sa fonction dans ce tissu. L'inhibition de l'expression de GPR40 par siRNA dans les lignées cellulaires murines pancréatiques MIN6 et INS-1E cause une diminution importante de la sécrétion d'insuline induite par les acides gras en présence d'une concentration de glucose élevée (Itoh *et al*, 2003; Salehi *et al*, 2005; Schnell *et al*, 2007; Shapiro *et al*, 2005). Ceci a été confirmé par des études sur des îlots pancréatiques isolés de souris n'exprimant pas GPR40 à la suite d'une délétion génique (Latour *et al*, 2007; Steneberg *et al*, 2005; Tan *et al*, 2008). De façon inverse, la

surexpression transgénique du récepteur GPR40 ou l'administration d'agonistes de GPR40 augmente la sécrétion d'insuline chez les souris (Doshi *et al*, 2009; Nagasumi *et al*, 2009; Tan *et al*, 2008).

À plus long terme, une concentration élevée d'acides gras inhibe les fonctions des cellules  $\beta$  du pancréas. Une élévation chronique des niveaux d'acides gras dans le sang bloque la sécrétion d'insuline (Prentki *et al*, 2002) et entraîne l'apoptose des cellules  $\beta$  (El-Asaad *et al*, 2003; Lee *et al*, 1994). Un groupe a montré que des souris n'exprimant pas GPR40, suite à une délétion génique, et soumises à une diète riche en acides gras devenaient obèses tout comme les souris sauvages soumises à la même diète. Par contre, ces souris semblaient protégées contre le développement de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline observées chez les souris sauvages (Steneberg *et al*, 2005). Plusieurs études subséquentes sur des souris n'exprimant pas GPR40 n'ont pu reproduire cette protection vis-à-vis des effets de l'exposition à long terme aux acides gras (Kebede *et al*, 2008; Lan *et al*, 2008; Latour *et al*, 2007; Tan *et al*, 2008). Les souris transgéniques semblaient même développer de l'hyperglycémie plus rapidement que les souris sauvages et la sécrétion d'insuline induite par le glucose était limitée par l'absence de GPR40 (Kebede *et al*, 2008). Ces études ont mené à l'élaboration de l'hypothèse selon laquelle l'hyperinsulinémie induite par les acides gras représenterait un mécanisme par lequel les cellules  $\beta$  tenteraient de compenser la résistance à l'insuline et cette capacité serait compromise par la délétion de GPR40 (Kebede *et al*, 2009). Le récepteur GPR40 jouerait donc un rôle essentiel dans la compensation de la résistance à l'insuline et le développement du diabète de type 2.

Des lignées cancéreuses du sein étant sensibles aux effets de divers acides gras à longues chaînes, l'expression du récepteur GPR40 dans ces cellules a été caractérisée et son rôle potentiel a été étudié. L'oléate et le linoléate induisent un influx rapide de calcium dans les cellules MCF-7, influx sensible à un traitement à la toxine de pertussis, un inhibiteur des petites protéines G (Yonezawa *et al*, 2004). Dans les cellules MDA-MB-231, l'oléate induit également la prolifération cellulaire ainsi qu'un influx rapide de calcium (Hardy *et al*,

2000; Hardy *et al*, 2005; Soto-Guzman *et al*, 2008). De plus, l'utilisation d'un shRNA contre GPR40 diminue légèrement l'effet prolifératif de l'oléate sur ces cellules (Hardy *et al*, 2005). Une étude dans des cellules épithéliales bronchiales humaines a suggéré que la rosiglitazone et la troglitazone, deux drogues de la famille des thiazolidinédiones, des agonistes du récepteur PPAR $\gamma$ , induiraient la prolifération de ces cellules *in vitro* par un mécanisme impliquant GPR40, indépendamment de PPAR $\gamma$  (Gras *et al*, 2009).

## **6.1.2 GPR41 et GPR43**

### **6.1.2.1 Caractérisation des récepteurs GPR41 et GPR43**

En 2003, trois études indépendantes ont montré que les récepteurs GPR41 et GPR43 ont comme ligands des acides gras à courtes chaînes, ceux ne dépassant pas cinq carbones ayant le plus haut potentiel en tant qu'agonistes (Brown *et al*, 2003; Le Poul *et al*, 2003; Nilsson *et al*, 2003). GPR41 et GPR43 partagent 43 % d'homologie de séquence et ont des potentiels de liaison très similaires avec les mêmes acides gras. Cependant, alors que GPR43 peut se coupler aux petites protéines G $\alpha_{i/o}$  et G $\alpha_q$ , GPR41 ne semble capable de se coupler qu'aux protéines G $\alpha_{i/o}$ .

### **6.1.2.2 Expression des récepteurs GPR41 et GPR43**

GPR43 est principalement exprimé dans les cellules immunitaires ainsi que dans la moelle épinière et la rate (Brown *et al*, 2003; Le Poul *et al*, 2003; Nilsson *et al*, 2003). GPR41 semble avoir un plus large éventail d'expression, ayant été retrouvé principalement dans les tissus adipeux, mais également dans le pancréas, la rate, la moelle épinière, les ganglions et des cellules mononucléées du sang périphérique (Brown *et al*, 2003; Le Poul *et al*, 2003).

### 6.1.2.3 Fonctions des récepteurs GPR41 et GPR43

Le rôle des récepteurs GPR41 et GPR43 est encore vague. Une augmentation locale de la concentration en acides gras à courtes chaînes a été observé lors d'infections par des bactéries anaérobiques (Ladas *et al*, 1979). Ces acides gras induisent, par chimiotaxie, le recrutement des leucocytes vers le site d'infection par un mécanisme impliquant un influx de calcium (Cavaglieri *et al*, 2003; Le Poul *et al*, 2003; Nakao *et al*, 1992). L'expression de GPR43 étant élevée dans les leucocytes, il pourrait intervenir dans ce processus. Cependant, les études d'inhibition de ces récepteurs par siRNA se sont concentrées uniquement sur leur rôle potentiel dans les adipocytes. L'expression de GPR43 semble augmenter dans les adipocytes différenciés (Hong *et al*, 2005). L'inhibition de GPR43 par siRNA bloquerait la différenciation des adipocytes. La présence d'acides gras à courtes chaînes entraîne une augmentation de l'expression de la leptine dans ces cellules (Xiong *et al*, 2004). L'inhibition de GPR41 par siRNA abolit presque totalement la capacité du propionate à induire l'expression de la leptine.

## 6.2 GPR120

### 6.2.1 Caractérisation du récepteur GPR120

GPR120 est activé par des acides gras saturés et insaturés à moyennes et à longues chaînes (Hirasawa *et al*, 2005). Identifié plus récemment, moins de choses sont connues sur ce récepteur. Il ne présente pas de similarité significative au niveau de sa séquence avec les membres de la famille GPR40-43. L'activation de GPR120 par des acides gras causant une élévation transitoire du calcium, ce récepteur serait probablement couplé à des petites protéines  $G\alpha_q$ .

### 6.2.2 Expression du récepteur GPR120

GPR120 est exprimé au niveau des tissus adipeux, des poumons et du système digestif, principalement dans le colon, ainsi que dans la lignée de cellules endocrines intestinales STC-1 (Gotoh *et al*, 2007; Hirasawa *et al*, 2005; Katsuma *et al*, 2005). Malgré un premier rapport négatif concernant l'expression de ce récepteur dans les MIN6 (Hirasawa *et al*, 2005), une lignée de cellules  $\beta$  pancréatiques murines, deux groupes ont récemment détecté son expression dans les îlots pancréatiques murins et humains (Kebede *et al*, 2009; Morgan & Dhayal, 2009).

### 6.2.3 Fonctions du récepteur GPR120

Les acides gras saturés et insaturés à moyennes et à longues chaînes induisent un influx de calcium dans les cellules STC-1 via l'activation de GPR120 (Hirasawa *et al*, 2005). Cependant, seuls les acides gras insaturés semblent aptes à entraîner la sécrétion de GLP-1 en réponse à la stimulation de ce récepteur. L'activation de GPR120 par le linoléate entraîne la protection des cellules STC-1 contre l'apoptose induite par la privation en sérum. Cette protection impliquerait les voies de signalisation ERK1/2 et Akt (Katsuma *et al*, 2005). De plus, l'expression de GPR120 augmentant durant la différenciation des adipocytes, ce récepteur semble jouer un rôle important lors du développement des cellules adipeuses (Gotoh *et al*, 2007; Miyauchi *et al*, 2009).

## 6.3 Récepteurs activés par des dérivés des acides gras

Plusieurs GPCRs sont des récepteurs pour des dérivés des acides gras, comme les récepteurs aux leukotriènes (revu dans Duroudier *et al*, 2009), aux prostaglandines (revu dans Sugimoto & Narumiya, 2007) et aux lysophospholipides comme l'acide lysophatidique (LPA) et la sphingosine 1-phosphate (S1P) (revu dans Meyer zu Heringdorf & Jakobs, 2007). Diverses études ont montré que ces dérivés pouvaient réguler la prolifération et la survie cellulaires. D'autres travaux ont montré leur importance dans le



développement du cancer (Bergelin *et al*, 2009; Gibbs *et al*, 2009; Hurst & Hooks, 2009; revu dans Wymann & Schneider, 2008).

### 6.3.1 Récepteurs au LPA

Les récepteurs au LPA sont divisés en deux familles. Les trois premiers récepteurs à avoir été identifiés font partie de la famille des *Endothelial Cell Differentiation Gene* (Edg) (An *et al*, 1998; Bando *et al*, 1999; Hecht *et al*, 1996). Les trois récepteurs au LPA membres de cette famille (LPA<sub>1</sub>/Edg2, LPA<sub>2</sub>/Edg4 et LPA<sub>3</sub>/Edg7) sont exprimés de façon ubiquitaire. Ils sont généralement couplés aux petites protéines G $\alpha_{i/o}$ , G $\alpha_q$  ou G $\alpha_{12/13}$  et leur activation peut entraîner l'inhibition de l'adénylate cyclase, un influx de calcium cytosolique, le remodelage du cytosquelette, la migration, l'invasion et l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire comme ERK1/2 ou Akt (revu dans Mills & Moolenaar, 2003).

Le deuxième groupe de récepteurs au LPA, membres de la famille des récepteurs purinergiques P2Y, incluent LPA<sub>4</sub>/P2Y9, LPA<sub>5</sub>/GPR92, LPA<sub>6</sub>/P2Y5 et possiblement LPA<sub>7</sub>/GPR87 et LPA<sub>8</sub>/P2Y10 (Murakami *et al*, 2008; Tabata *et al*, 2007). Les récepteurs LPA<sub>4-6</sub> sont exprimés faiblement dans la majorité des tissus (revu dans Ishii *et al*, 2009). LPA<sub>4</sub> est fortement exprimé dans les ovaires et un haut niveau d'expression de LPA<sub>5</sub> a été observé dans les intestins. Plusieurs études seront encore nécessaires afin de déterminer avec précision leur couplage avec les petites protéines G et leurs fonctions. Le LPA est également en mesure de se lier au récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  et de stimuler l'expression de gènes contrôlés par ce récepteur, mais les implications physiologiques de cette liaison ne sont pas encore connues (McIntyre *et al*, 2003).

Depuis longtemps, le LPA est connu pour jouer un rôle dans l'initiation et la progression de plusieurs types de cancers dont le cancer de l'ovaire, du sein et de la prostate (Xie *et al*, 2002; Xu *et al*, 1995). Le LPA entraîne la prolifération et la migration de cellules du cancer du sein et de la prostate, ainsi que l'activation de mécanismes

d'invasion. Ces effets ont aussi été observés suite à un traitement au lysophospholipide S1P (Boucharaba *et al*, 2009; Gibbs *et al*, 2009).

### 6.3.2 Récepteurs au S1P

Il existe cinq récepteurs au S1P connus, tous membres de la famille des Edg : S1P<sub>1</sub>/Edg1, S1P<sub>2</sub>/Edg5, S1P<sub>3</sub>/Edg3, S1P<sub>4</sub>/Edg6 et S1P<sub>5</sub>/Edg8 (revu dans Sanchez & Hla, 2004). S1P<sub>1-3</sub> sont exprimés de façon ubiquitaire alors que S1P<sub>4</sub> est retrouvé principalement dans les tissus hématopoïétiques et lymphoïdes et S1P<sub>5</sub> dans le cerveau. Le récepteur S1P<sub>1</sub> est particulier puisqu'il est couplé uniquement à G $\alpha_{i/o}$ . Son activation peut entraîner, entre autres, une augmentation de la prolifération, de la survie cellulaire, de la migration et de l'angiogénèse en activant les voies ERK1/2, Akt et Rac (Li *et al*, 2009; Okamoto *et al*, 1998; Van Brocklyn *et al*, 2002). S1P<sub>2</sub> et S1P<sub>3</sub>, couplés à G $\alpha_{i/o}$ , G $\alpha_q$  et G $\alpha_{12/13}$ , activant la phospholipase C, ERK1/2 et Rho, induisent un influx de calcium cytosolique et contribuent au développement vasculaire (An *et al*, 2000). Contrairement à S1P<sub>1</sub> et S1P<sub>3</sub> qui augmentent la migration par l'activation de la voie Rac, S1P<sub>2</sub> inhibe la migration de plusieurs types cellulaires (Arikawa *et al*, 2003; Sanchez *et al*, 2005). S1P<sub>4</sub> et S1P<sub>5</sub> quant à eux ne sont couplés qu'à G $\alpha_{i/o}$  et G $\alpha_{12/13}$ . S1P<sub>5</sub> est unique parmi des récepteurs au S1P puisqu'il est le seul à induire une inhibition de la voie ERK1/2, entraînant une diminution de la prolifération (Malek *et al*, 2001).

## Objectifs de la thèse

Les études épidémiologiques concernant une diète riche en gras ou l'obésité et le développement du cancer du sein et de la prostate présentent des résultats incohérents; il est difficile d'en tirer des renseignements utiles permettant d'établir un lien entre le gras et le cancer. Afin d'être en mesure de concevoir de nouvelles études plus appropriées desquelles nous pourrions tirer de meilleures conclusions sur le rôle des acides gras dans le développement et la croissance des cancers, il serait important, dans un premier temps, de mieux connaître l'implication des acides gras et de leur métabolisme dans la carcinogenèse puisque peu de choses sont connues à ce sujet.

Les acides gras insaturés causent une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses du sein *in vitro*. L'oléate est l'acide gras insaturé le plus abondant dans la diète et le sérum humains. L'oléate étant également l'acide gras insaturé qui causait le meilleur effet prolifératif dans les cellules de cancer du sein, l'objectif principal de ce projet sera d'identifier les étapes moléculaires de cet effet prolifératif afin de connaître le rôle potentiel de l'oléate dans la tumorigenèse. Le métabolisme des acides gras ainsi que certains récepteurs membranaires aux acides gras semblent jouer un rôle dans l'effet prolifératif de l'oléate, mais leur implication respective précise dans ce phénomène n'est pas clairement définie. Ces connaissances pourraient être très utiles pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques ainsi que pour définir des recommandations diététiques pour la prévention des cancers chez les humains. GPR40 étant un récepteur des acides gras, l'étude de son mécanisme d'action pourrait également avoir des implications dans l'obésité et le diabète.

# Matériels et Méthodes

## Matériels

Les sels sodiques d'acides gras ont été achetés chez Nu-Check Prep (Elysian, MN). L'albumine de sérum bovin (BSA; *Bovine Serum Albumin*) sans acides gras (fraction V) a été obtenue de Sigma (St-Louis, MO). La [<sup>3</sup>H]-thymidine (activité spécifique, 71 Ci/mmol) a été obtenue de PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). La lipofectamine 2000, le réactif TRIzol et la transcriptase inverse M-MLV ont été achetés chez Invitrogen (Paisley, UK). La toxine de pertussis provient de Calbiochem (La Jolla, CA). Les inhibiteurs pharmacologiques PD98059 et LY294002 ont été achetés chez Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Le substrat pour les essais d'activité de la caspase-3 Ac-DEVD-7-amino-4-trifluorométhyl coumarin et l'inhibiteur wortmannin proviennent de Biomol International L.P. (Plymouth Meeting, PA).

## Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231, T47D et ZR-75, les lignées de cancer de la prostate DU145, PC-3, LNCaP et 22Rv1 et la lignée de cancer du colon HRT-18 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA). Les cellules cancéreuses ont été cultivées à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> dans un milieu minimum essentiel sans rouge phénol comprenant des acides aminés essentiels (Sigma) supplémenté de glutamine à 2 mM, d'HEPES à 10 mM (pH 7,4) et de 5 % de sérum de veau fœtal (Wisent Inc., St-Bruno, Québec). Ce milieu est subséquentment appelé milieu standard. Les cellules épithéliales mammaires humaines (HMECs; *Human Mammary Epithelial Cells*) obtenues chez Cambrex Bio Science (Walkersville, MD) ont été cultivées à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> soit dans un milieu basal minimum essentiel, sans rouge phénol, comprenant de l'hydrocortisone, de l'insuline et du GA-1000 (MBME) soit dans du MBME supplémenté d'extrait de glande pituitaire bovine et de facteur de croissance épidermique recombinant humain (milieu de croissance minimum essentiel; MCME).

Les acides gras couplés à la BSA ont été préparés en mélangeant les sels sodiques d'acides gras dans un tampon Krebs-Ringer comprenant 5 % de BSA (pH 7,4) pendant une nuit à 37°C. Après filtration sur un filtre de 0,22 µm, la concentration en acide gras de la solution a été calculée en utilisant le kit NEFA C (Wako Chemicals, Richmond, VA). La concentration finale en acide gras de la solution mère a été ajustée à 4 mM. Lorsque les acides gras étaient ajoutés au milieu de culture, la concentration finale de BSA dans le milieu était ajustée à 0,5 %. L'agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120, caractérisé par Briscoe et al. (Briscoe *et al*, 2006), a été synthétisé par le Dr Pierre Lavallée, département de chimie, Université de Montréal. Il se solubilise complètement dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), mais précipite une fois dilué à sa concentration finale dans le milieu de culture. Il a également été dissout dans de l'eau à laquelle furent ajoutées quelques gouttes de NaOH afin d'obtenir un pH de 9,5 ce qui lui permet de se solubiliser complètement dans un milieu aqueux.

## **Prolifération cellulaire**

Dans une plaque de 96 puits, 4500 cellules par puit ont étéensemencées et cultivées dans du milieu standard pendant 24 h. Après 24 h additionnelles dans du milieu sans sérum, les cellules ont été cultivées pendant 24 h dans du milieu supplémenté de 0,5 % de BSA, de 200 µM d'acides gras liés à la BSA (0,5 % de BSA finale) ou 10 % de sérum de veau fœtal. Durant les dernières 4 h, les cellules ont été marquées avec de la [<sup>3</sup>H]-thymidine à 1 µCi par puit. Les cellules ont été récoltées avec à un PHD Cell Harvester de Cambridge Technology (Watertown, MA). La radioactivité retenue sur les filtres en fibre de verre a été mesurée avec à un compteur à scintillation liquide.

## **Comptes cellulaires**

Pour l'analyse de la croissance cellulaire des HMECs, 25 000 cellules par puit ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits dans du milieu MCME. Au jour 1 de culture,

le milieu des puits a été remplacé par les milieux contenant les différents traitements : MCME ou MBME supplémenté de 0,5 % BSA en absence ou en présence de 200  $\mu$ M d'oléate. Les milieux de traitements ont été changés tous les deux jours. À partir du jour 2 de culture, les cellules vivantes adhérentes de deux puits par traitement ont été récoltées et comptées sur un microscope en utilisant un hématocytomètre.

## **Analyses d'immunobuvardage de type western**

Pour les analyses de la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt, les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre à  $2,5 \times 10^5$  cellules par boîte et cultivées dans du milieu standard pendant 24 h. Après 24 h additionnelles dans du milieu sans sérum, les cellules ont été cultivées dans du tampon salin au phosphate (*Phosphate-Buffered Saline (PBS)*) Dulbecco supplémenté de glucose à 5 mM et de 0,5 % de BSA pendant 2 h. L'incubation dans le PBS a été utilisée afin de diminuer le niveau d'activation basal des protéines ERK1/2 et Akt. Les cellules ont ensuite été stimulées avec de l'oléate ou le facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor (EGF)*) comme contrôle positif pendant les temps indiqués, de 10 minutes à 10 h. Pour les analyses utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, ceux-ci ont été ajoutés au milieu pendant la phase d'incubation dans le PBS supplémenté. Après quelques lavages au PBS, les cellules ont été récoltées et des extraits cellulaires totaux ont été préparés. Le tampon de lyse utilisé contient 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 1 % de Triton X-100, 2,5 mM de NaPi, 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mg/ml d'aprotinine, 10 mg/ml de leupeptine, 10 mg/ml de pepstatine et 1 mM de PMSF. Les lysats ont été centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires et la concentration protéique des échantillons a été déterminée en utilisant l'essai colorimétrique DC de Bio-Rad (Hercules, CA). Pour la séparation sur gel d'acrylamide, 30  $\mu$ g de protéines ont été utilisées par puit et les buvardages ont été effectuées sur des membranes de PVDF. Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de blocage constituée de PBS additionné de 5 % de lait en poudre sans gras et de 0,1 % de Tween. Les réactions de détection ont été

effectuées dans la solution de blocage contenant un des anticorps suivants : phospho(Thr-202/Tyr-204)-ERK1/2 # 9101, ERK1/2 totaux # 9102, phospho(Ser-473)-Akt # 9271, Akt totaux # 9272, PABP1 # 4992 (Cell Signalling Technology), GPR40 # sc-32905, GPR40 # sc-28416 (Santa Cruz Biotechnology), GPR40 # EB06761 (Everest Biotech), GPR40 # LS-A1595, GPR40 # LS-A1599 (MBL International Corporation), GPR120 # OPA1-15199 et GPR120 # OPA1-15201 (ABR Afinity BioReagents). Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : stabilized goat anti-mouse HRP-conjugated # 32430, stabilized goat anti-rabbit HRP-conjugated # 32460 (Thermo scientific (Pierce)) et donkey anti-goat HRP-conjugated # sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology). La révélation est effectuée avec la solution SuperSignal WestDura Extended Duration # 34075 (Thermo Scientific (Pierce), Rockford, IL) diluée entre 5 et 10 fois et incubée sur les membranes pendant 5 min.

## **Analyse des films par densitométrie**

Les films ont été numérisés à l'aide d'un numériseur équipé d'un rabat lumineux permettant d'effectuer la prise d'image par trans-illumination. L'analyse de densitométrie des bandes a été effectuée à l'aide du programme Quantity One 1-D Analysis de Bio-Rad. Pour chaque film analysé, le bruit de fond général a été retiré, puis les valeurs de densitométrie des bandes ont été exprimées par rapport à la bande contrôle afin de rassembler les données provenant des différents films des répétitions d'expérience. Les valeurs de densitométrie obtenues pour les analyses utilisant un anticorps dirigé contre une protéine phosphorylée ont été rapportées sur les valeurs obtenues lors des analyses utilisant un anticorps total de la protéine effectuées sur les mêmes buvardages.

## **Influx de calcium cytosolique**

Des cellules DU145 ont été cultivées dans des boîtes de Petri de 150 mm jusqu'à une confluence d'environ 70 %. Elles ont été décollées avec de la trypsine diluée dix fois, centrifugées et resuspendues à  $2 \times 10^6$  cellules/ml dans du PBS Dulbecco contenant 5 mM

de glucose, 20 mM d'HEPES (pH 7,4), 2,5 mM de probénécide (inhibiteur des pompes anioniques) et 3 mM de fura-2/AM couplé 1:1 avec de l'acide pluronique F-127 (augmente la solubilité et l'absorption du Fura-2/AM). Après 30 minutes d'incubation avec le fura-2/AM à 25°C à l'abri de la lumière, les cellules ont été lavées et resuspendues dans la même solution, mais sans fura-2/AM. Les cellules ont ensuite été distribuées dans une plaque de 96 puits noire opaque à  $2 \times 10^5$  cellules/puit. La concentration de calcium intracellulaire a été mesurée à 37°C par la méthode de ratio (longueurs d'onde d'excitation à 340 et 380 nm et fluorescence d'émission à 500 nm) sur un lecteur de microplaques FLUOstar OPTIMA (BMG Labtechnologies Inc., Durham, NC). Les cellules ont été lysées par l'ajout de 0,5 % Triton X-100 et la plaque a été lue afin de déterminer la concentration maximale de calcium dans les cellules. De l'EGTA à 100 mM, un chélateur du calcium, a été ajouté et la plaque lue afin de déterminer le niveau basal de fluorescence.

## **Transfections cellulaires**

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre à  $3 \times 10^6$  cellules par boîte et cultivées dans du milieu standard pendant 24 h. Elles ont été transfectées avec 10 µg du plasmide pIRESpuro-GPR40 exprimant la protéine GPR40 humaine (fourni par le Dr Bjorn Olde) ou du plasmide contrôle CMV-Rluc exprimant la luciférase du *Renilla* en utilisant 20 µl de Lipofectamine 2000. Cinq heures après le début de la transfection, les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine etensemencées dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre à  $2,5 \times 10^5$  cellules par boîte. Les analyses de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt ont été effectuées comme décrites plus haut.

## **Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel**

L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide de TRIzol en utilisant le protocole fourni avec le réactif et 2 µg d'ARN ont été utilisés pour effectuer la transcription inverse en utilisant la transcriptase inverse M-MLV. Les réactions de polymérisation en chaîne



(PCR; *Polymerase Chain Reaction*) en temps réel ont été effectuées sur un appareil Rotor-Gene (Corbett Research, Kirkland, Québec) en utilisant la trousse pour PCR QuantiTect SYBR Green de Qiagen Inc. (Valencia, CA) selon les instructions du manufacturier. Les amorces utilisées sont les suivantes : GPR40 5'-CTGCTGCTCTGCGTAGGAC-3' (sens) et 5'-CACTGTCTTCAGGCCAGGAC-3' (anti-sens), GPR120 5'-TGGTCATTGTGATCAGTTAC-3' (sens) et 5'-CATTCTGCACAGTGTCATG-3' (anti-sens) et glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' (sens) et 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3' (anti-sens). Les résultats sont exprimés en nombre de copies par ng d'ARN total utilisé et ont été calculés à l'aide d'une courbe standard du nombre de copies des récepteurs. Pour l'élaboration des courbes standard, des PCR classiques ont été effectuées pour GPR40 et GPR120 en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour les PCR en temps réel. Le produit de ces PCR a été séparé sur gel d'agarose, puis les bandes correspondant aux fragments de GPR40 et GPR120 amplifiés ont été extraites. L'ADN contenu dans ces bandes a été purifié, dosé, puis dilué de façon sériée afin de constituer une courbe.

## **ARN interférents**

Un contrôle négatif non-spécifique et deux siRNAs ciblant spécifiquement GPR40 humain ont été obtenus de la compagnie Qiagen Inc. Les séquences sont les suivantes :

siGPR40 #1 5'-TAGCCTGGTCTACGCCCTGAA-3'

siGPR40 #2 5'-TGCCTGGAGTGTGGTGCTTAA-3'.

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre à  $3 \times 10^6$  cellules par Pétri et cultivées dans du milieu standard pendant 24 h. Les cellules ont été transfectées avec 25 µl de siRNAs à 20 µM en utilisant 25 µl de Lipofectamine 2000. Cinq heures après la transfection, les cellules ont été décollées en utilisant de la trypsine etensemencées dans des boîtes de 60 mm de diamètre à  $2,5 \times 10^5$  cellules par boîte ou dans

des plaques de 96 puits à 4500 cellules par puit. Les analyses de la prolifération cellulaire ont été effectuées comme décrites plus haut. Les cellules dans les boîtes de 60 mm ont été cultivées pendant 24 h additionnelles dans du milieu standard puis les analyses de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt ont été effectuées comme décrites plus haut afin qu'elles corrélaient avec un temps de 72 h de transfection des siRNAs.

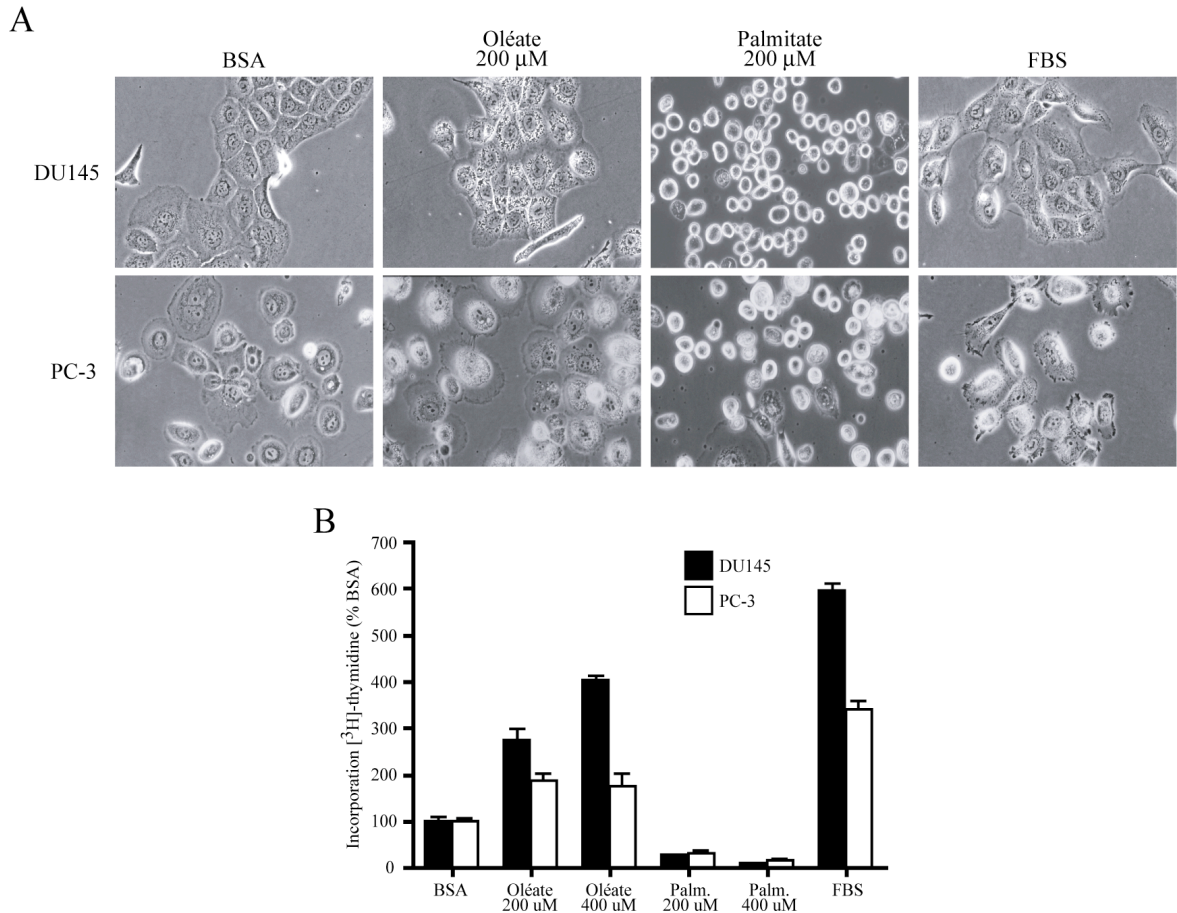
### **Activité de la caspase-3**

Les cellules ont été transfectées avec les siRNAs comme décrit précédemment, ensemencées dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre à  $2,5 \times 10^5$  cellules par boîte et cultivées dans du milieu standard pendant 24 h. Après 24 h dans du milieu sans sérum, les cellules ont été cultivées dans du milieu sans sérum contenant 0,5 % de BSA, supplémenté ou non en oléate lié à la BSA à différentes concentrations pour 24 h additionnelles. Les cellules ont été lysées en utilisant le tampon suivant : 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 130 mM de NaCl, 10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 1 % de Triton X-100. 45  $\mu\text{g}$  de lysats ont été incubés en présence du substrat peptidique fluorogénique Ac-DEVD-AFC. Le taux initial du relâchement de l'AFC a été mesuré en utilisant un lecteur de plaque Wallac 1420 (PerkinElmer, Woodbridge, Ontario) à une longueur d'onde d'excitation de 380 nm et une longueur d'onde d'émission de 505 nm.

## Résultats

### **L'oléate induit la prolifération des cellules DU145 et PC-3 tandis que le palmitate semble tuer les cellules par apoptose.**

Dans le laboratoire, nous avons montré que les acides gras insaturés induisent la prolifération de cellules de lignées de cancer du sein alors que les acides gras saturés provoquent l'apoptose (Hardy *et al*, 2003; Hardy *et al*, 2000; Hardy *et al*, 2005). Nous avons voulu vérifier si cet effet pouvait aussi être observé avec des lignées dérivées d'autres types de cancers afin d'établir si un principe général pouvait en être déduit. Plusieurs études épidémiologiques ayant montré un lien entre l'obésité et l'incidence du cancer de la prostate, ce cancer a donc été choisi comme deuxième modèle pour notre étude. L'oléate et le palmitate, les acides gras insaturé et saturé les plus abondants dans la diète, ont été choisis comme modèles dans l'étude de l'effet des acides gras sur la prolifération de cellules cancéreuses de la prostate. Deux différentes lignées de cellules cancéreuses de la prostate hormono-indépendantes ont été utilisées, les lignées DU145 et PC-3. Après 24 h dans du milieu sans sérum, les cellules ont été cultivées dans du milieu sans sérum supplémenté en oléate ou en palmitate liés à la BSA pendant 24 h additionnelles et des observations morphologiques ont été effectuées. Une accumulation de gouttelettes lipidiques a été observée dans le cytoplasme des cellules traitées avec de l'oléate alors que les cellules traitées au palmitate montraient des signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose, c'est-à-dire une compaction de la cellule, une condensation de la chromatine ainsi que des convolutions de la membrane plasmique (Fig. 3A). De la [<sup>3</sup>H]-thymidine a été ajoutée au milieu durant les quatre dernières heures de culture avec les acides gras afin d'évaluer l'effet de ceux-ci sur la prolifération cellulaire. L'oléate induisait une augmentation de trois à quatre fois de l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans l'ADN des cellules DU145 et de deux fois dans les cellules PC-3 (Fig. 3B). Le palmitate quant à lui diminuait drastiquement cette incorporation dans les cellules des deux lignées. Ces résultats dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate étaient similaires à ceux observés dans les lignées de cellules du cancer du sein (Hardy *et al*, 2000).



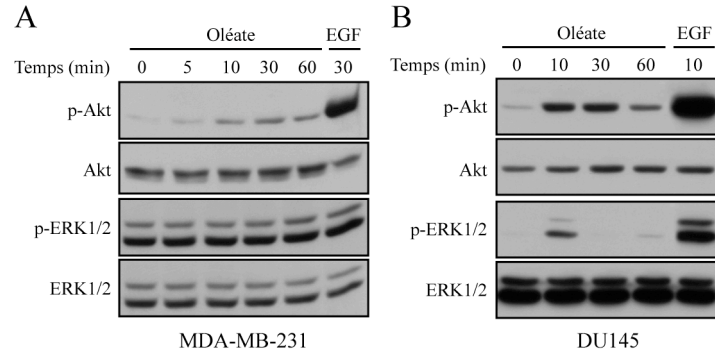
**Figure 3 : L'oléate induit la prolifération et la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules de cancer de la prostate DU145 et PC-3 tandis que le palmitate semble tuer les cellules par apoptose.**

A, Morphologie des cellules DU145 et PC-3 cultivées dans un milieu supplémenté en oléate ou en palmitate liés à la BSA aux concentrations indiquées ou 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) pendant 24 h. B, Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans les DU145 et PC-3 cultivées dans du milieu supplémenté de 0,5 % BSA, de différentes concentrations d'oléate ou de palmitate liés à la BSA ou de 10 % FBS pendant 24 h. Durant les dernières 4 h, les cellules ont été marquées avec de la [<sup>3</sup>H]-thymidine. Moyennes ± ES de trois expériences réalisées en triplicatas.

## **L'oléate induit la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt dans les cellules de cancer de la prostate DU145 et la phosphorylation d'Akt dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231.**

Pour la suite de ces travaux portant sur les effets prolifératifs de l'oléate sur les cellules cancéreuses, nous avons choisi deux modèles que nous étudierons en parallèle: les cellules DU-145 comme modèle pour le cancer de la prostate et les cellules MDA-MB-231 qui avaient déjà été utilisées dans le laboratoire comme modèle pour le cancer du sein.

Les protéines ERK1/2 et Akt sont des régulateurs importants, faisant partie de deux voies de signalisation majeures impliquées dans la prolifération cellulaire et la survie. Puisque ces voies semblaient impliquées dans la prolifération induite par l'oléate, nous avons examiné la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt suite à un traitement à l'oléate sur des lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate. Deux heures avant le début du traitement à l'oléate, le milieu des cellules fut changé pour du PBS Dulbecco supplémenté de glucose à 5 mM et de 0,5 % de BSA dans lequel l'oléate fut directement ajouté lors du traitement. Cette incubation avait pour effet de diminuer la phosphorylation basale d'ERK1/2 et d'Akt afin de mettre en valeur l'effet de l'oléate sur la phosphorylation de ces protéines. Dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231, l'effet maximal de l'oléate sur la phosphorylation d'Akt était observé à 30 minutes de traitement (Fig. 4A). La phosphorylation d'ERK1/2 basale étant très élevée dans cette lignée (Price *et al*, 1999), nous n'avons pu observer d'augmentation de sa phosphorylation suite à un traitement à l'oléate ou à l'EGF, utilisé comme contrôle positif (Price *et al*, 1999). Dans les cellules de cancer de la prostate DU145, un traitement à l'oléate de 10 minutes fut suffisant pour induire un effet transitoire maximal sur la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt (Fig. 4B). La phosphorylation d'Akt diminuait à partir de 60 minutes tandis que la phosphorylation d'ERK1/2 revenait à son niveau basal 30 minutes après le traitement à l'oléate (Fig. 4B).

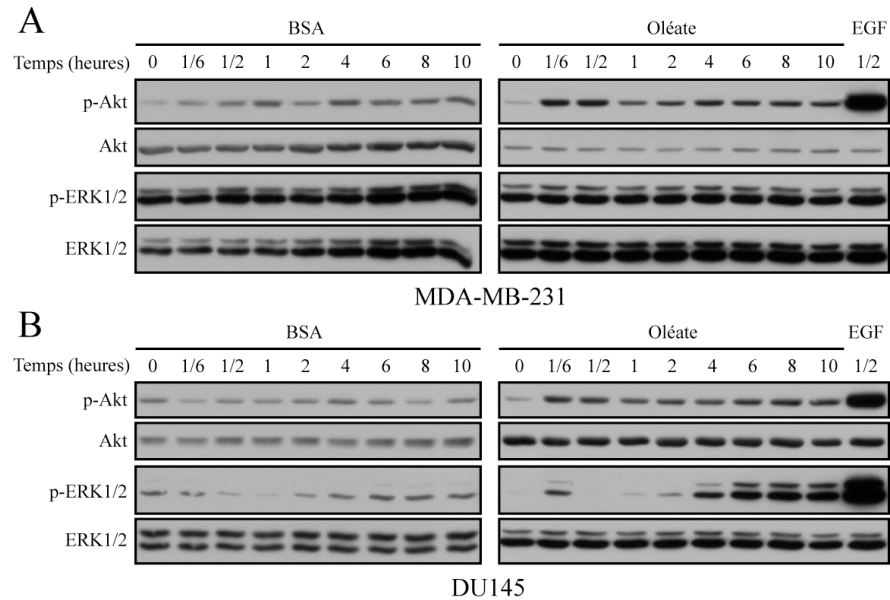


**Figure 4 : L'oléate induit la phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2 dans les cellules de cancer de la prostate DU145 et la phosphorylation d'Akt dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231.**

Immunobuvardage de lysats de cellules MDA-MB-231 (A) et DU145 (B) stimulées avec 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant les temps indiqués. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas.

La durée de l'activation d'ERK1/2 et d'Akt dans le temps peut avoir un impact important sur les effets de ces voies sur la cellule. La phosphorylation d'ERK1/2 doit être soutenue sur plusieurs heures afin d'induire la survie des macrophages soumis à l'hyperoxémie (Nyunoya *et al*, 2005) ainsi que pour entraîner la prolifération de fibroblastes suite à un traitement à la thrombine (Balmanno & Cook, 1999). Une activation prolongée d'Akt corrèle avec l'activité anti-apoptotique de l'*Insulin-like Growth Factor* dans des cellules mammaires épithéliales de souris (Moorehead *et al*, 2001). Nous avons donc examiné la durée de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt suite à un traitement à l'oléate sur une période allant jusqu'à 10 heures de traitement. Afin de garder les mêmes conditions d'expérience, le traitement à l'oléate a été effectué directement dans le milieu de pré-incubation, c'est-à-dire dans du PBS supplémenté en BSA à 0,5 %. Puisque cette

incubation dans une solution de PBS sur une longue période pouvait entraîner une réaction de survie chez les cellules et donc l'activation de voies de signalisation, des mesures de la phosphorylation sans traitement d'ERK1/2 et d'Akt dans ce milieu ont été faites en parallèle au traitement à l'oléate afin de servir de contrôle de niveau de base. Dans les cellules MDA-MB-231, l'oléate induisait un pic de phosphorylation d'Akt entre 10 et 30 minutes de traitement, suivi d'une baisse à 60 minutes et d'une deuxième vague de phosphorylation à partir de 4 heures qui restait constante au minimum pendant 6 heures additionnelles (Fig. 5A). La phosphorylation d'Akt dans le milieu contrôle augmentait légèrement, mais le niveau de cette augmentation par rapport au temps 0 restait toutefois bien en deçà du niveau de phosphorylation induit par l'oléate. Aucune augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 n'a été observée tout au long de l'expérience pour les deux conditions. Dans les cellules DU145, la phosphorylation d'Akt atteignait son maximum à 10 minutes de traitement à l'oléate, ne diminuant que légèrement après 1 heure et remontant progressivement pendant le reste du traitement (Fig. 5B). La phosphorylation d'Akt dans le milieu contrôle variait légèrement, mais aucune réelle augmentation n'a été observée. Dans ces cellules, les deux vagues d'activation engendrées par le traitement à l'oléate étaient également visibles sur la phosphorylation d'ERK1/2. Le premier pic de phosphorylation d'ERK1/2 apparaissait à 10 minutes de traitement. Dès 30 minutes, la phosphorylation de ces protéines retournait à son niveau basal pour ensuite remonter progressivement jusqu'au deuxième pic vers 6 heures de traitement où la phosphorylation restait alors constante jusqu'à 10 heures. La phosphorylation d'ERK1/2 dans le milieu contrôle suivait la même tendance, mais les niveaux de phosphorylation ne dépassaient pas ceux observés au temps 0. Ces résultats montrent que l'oléate entraîne deux vagues d'activation des protéines Akt et ERK1/2, une première vague rapide et transitoire entre 10 et 30 minutes puis une seconde vague, soutenue dans le temps, débutant vers 4 heures après le début du traitement.



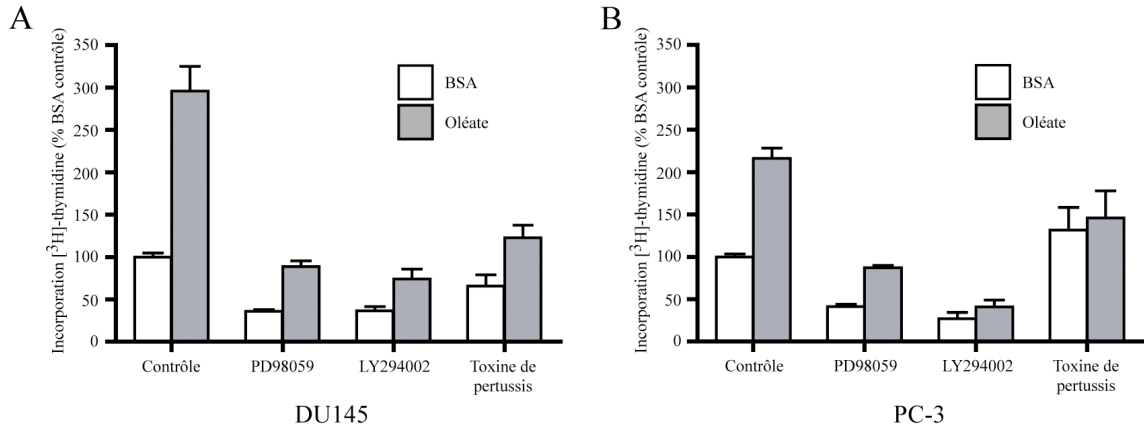
**Figure 5 : L'oléate induit deux vagues d'activation des protéines Akt et ERK1/2 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145.**

Immunobuvardage de lysats de cellules MDA-MB-231 (A) et DU145 (B) stimulées avec 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant les temps indiqués. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas.



## **La prolifération cellulaire induite par l'oléate dans les cellules cancéreuses de la prostate implique la PI3K, MEK1/2 et des petites protéines $G\alpha_i/o$ .**

Nous avons observé que les voies de signalisation Akt et ERK1/2 sont activées par un traitement à l'oléate dans les cellules de cancer de la prostate DU145. L'activation rapide de ces voies par un traitement à l'oléate pourrait signifier l'implication d'un récepteur membranaire dans la première vague d'activation des voies Akt et ERK1/2 par l'oléate. L'effet de différents inhibiteurs pharmacologiques spécifiques aux voies de signalisation des GPCRs, d'ERK1/2 et d'Akt a été étudié afin de déterminer l'implication de ces voies dans l'induction de l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine par l'oléate. L'effet des inhibiteurs n'a pas été testé en présence de palmitate puisque celui-ci diminue la prolifération cellulaire. Le PD98059, le LY294002 et la toxine de pertussis, des inhibiteurs de MEK1/2, PI3K et des protéines  $G\alpha_i/o$  respectivement, inhibaient partiellement l'effet de l'oléate sur l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans les cellules DU145 (Fig. 6A) et PC-3 (Fig. 6B). Les inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2 et Akt diminuaient l'incorporation basale (contrôle sans traitement) de [<sup>3</sup>H]-thymidine des cellules puisque ces voies sont particulièrement importantes pour la prolifération cellulaire, mais la baisse spécifique entraînée par ces inhibiteurs sur l'augmentation de la prolifération induite par l'oléate étaient notables. Dans les cellules de la lignée cancéreuse du sein MDA-MB-231, ces inhibiteurs avaient montré des effets similaires sur l'augmentation de l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine induite par l'oléate (Hardy *et al*, 2005). Ces résultats suggèrent que l'effet prolifératif de l'oléate sur les lignées cancéreuses de la prostate DU145 et PC-3 implique, au moins partiellement, un ou des GPCRs couplés aux protéines  $G\alpha_i/o$  ainsi que les voies de signalisation ERK1/2 et Akt.

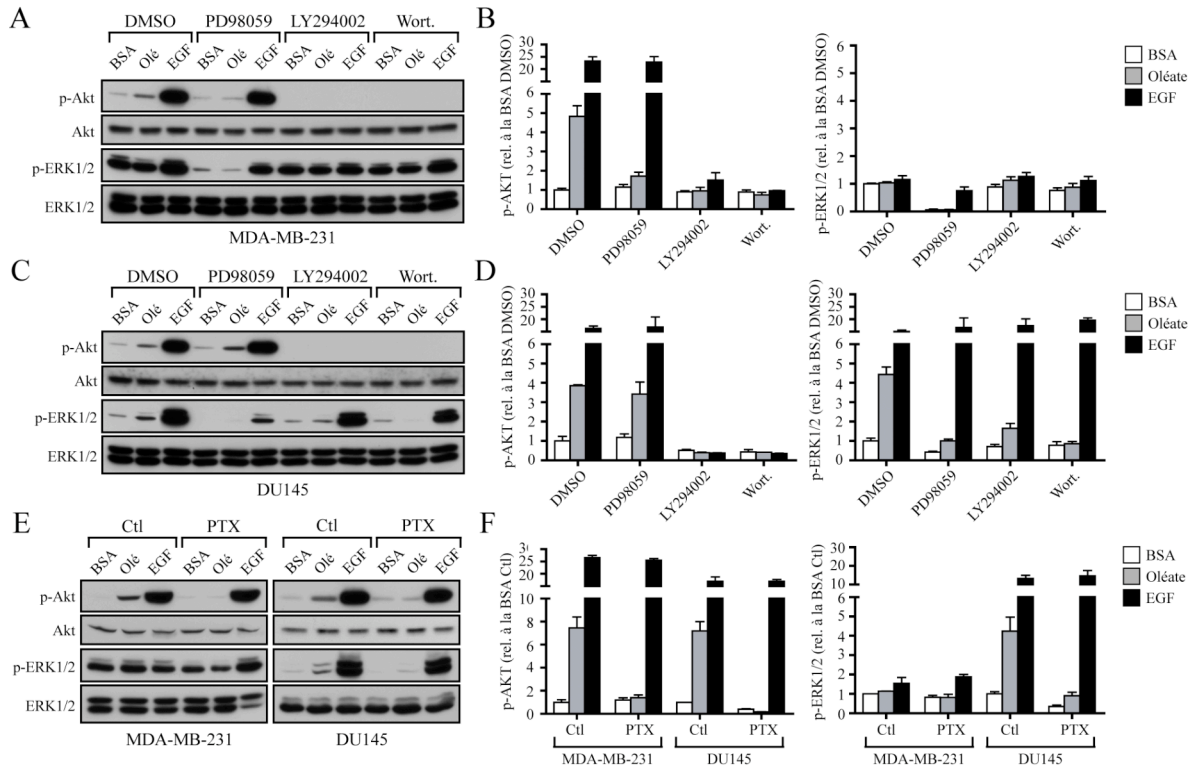


**Figure 6 : L'induction de la prolifération par l'oléate dans les cellules DU145 et PC-3 implique les protéines MEK1/2, la PI3K ainsi que des petites protéines  $G\alpha_{i/o}$ .**

A-B, Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-thymidine dans les DU145 (A) et PC-3 (B) cultivées en absence ou en présence de 50  $\mu\text{M}$  de l'inhibiteur de MEK1/2 (PD98059), de 50  $\mu\text{M}$  de l'inhibiteur de la PI3K (LY294002) ou de 100 ng/ml d'un inhibiteur des protéines  $G\alpha_{i/o}$  (toxine de pertussis) dans du milieu supplémenté en BSA à 0,5 % ou de 200  $\mu\text{M}$  d'oléate lié à la BSA pendant 24 h. Durant les dernières 4 h, les cellules ont été marquées avec de la [ $^3\text{H}$ ]-thymidine. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en triplicatas.

## **La phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt induite par l'oléate est diminuée pas des inhibiteurs de MEK1/2, PI3K et des protéines $G\alpha_i/o$ .**

Afin de vérifier si l'activation d'ERK1/2 et d'Akt par l'oléate se faisait par les voies de signalisation classiques, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques des protéines se trouvant en amont de ces protéines dans leur cascade signalétique. Le PD98059, un inhibiteur de MEK1/2 qui est l'activateur direct d'ERK1/2, a réduit de façon prononcée la phosphorylation d'ERK1/2 induite par l'oléate dans les cellules DU145. Le LY294002 et la wortmannine, deux inhibiteurs de PI3K qui est un des activateurs principaux d'Akt, ont diminué la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate dans les deux lignées (Fig. 7A-D). La phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt par l'oléate est donc engendrée par l'activation des voies de signalisation classiques pour ces protéines. Ces inhibiteurs diminuaient la phosphorylation basale des protéines ERK1/2 pour le PD98059 et Akt pour le LY294002 et la wortmannine, ce qui pourrait expliquer leur effet inhibiteur sur la prolifération basale dans ces lignées (Fig. 6A) (Hardy *et al*, 2005). De plus, le PD98059 a inhibé la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate dans les cellules MDA-MB-231 sans avoir d'effet sur la phosphorylation induite par l'EGF (Fig. 7A-B). Le LY294002 et la wortmannine ont respectivement réduit et inhibé la phosphorylation d'ERK1/2 induite par l'oléate dans les cellules DU145 sans affecter la phosphorylation d'ERK1/2 induite par l'EGF (Fig. 7C-D). L'effet de ces inhibiteurs sur la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt indique que l'activation de ces voies semble être interreliée par un phénomène d'excitation croisée. Ces deux voies peuvent interagir de multiples façons : Akt peut phosphoryler Raf sur la Ser259 ce qui a un effet négatif sur l'activation de la voie Raf/MEK/ERK (Rommel *et al*, 1999; Zimmermann & Moelling, 1999) alors que PI3K, par l'intermédiaire de la protéine Pak, peut entraîner la phosphorylation de Raf sur les Ser338 et Ser341, induisant l'activation de la voie Raf/MEK/ERK (Sebolt-Leopold & Herrera, 2004; Zang *et al*, 2002; Zang *et al*, 2001). L'inhibition de l'activation d'ERK1/2 par un inhibiteur de PI3K a déjà été observée dans un autre modèle (Bradley *et al*, 2008).



**Figure 7 : Effets des différents inhibiteurs pharmacologiques sur la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite par l'oléate dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145.**

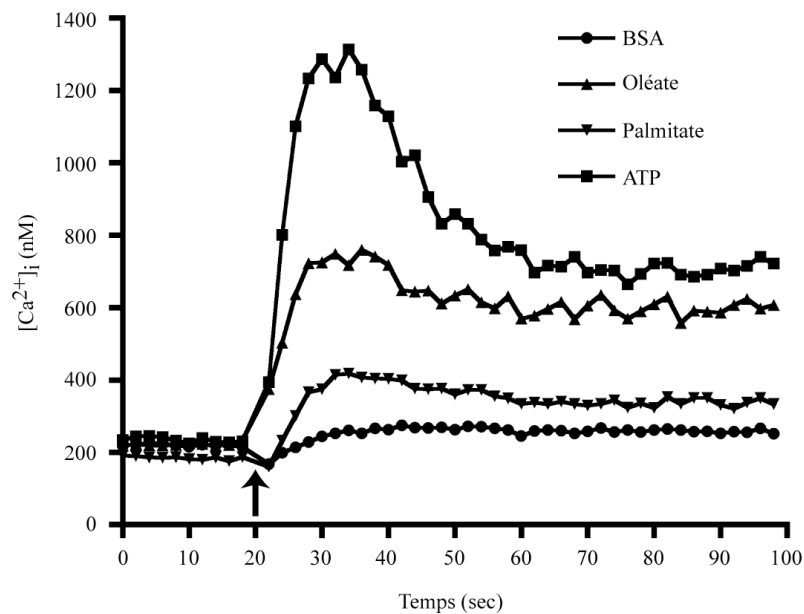
A, C, E, Immunobuvardage de lysats de cellules MDA-MB-231 et DU145 stimulées avec 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant 30 minutes pour les MDA-MB-231 ou 10 minutes pour les DU145 en absence ou en présence de 50  $\mu$ M de l'inhibiteur de MEK1/2 PD98059, de 50  $\mu$ M de l'inhibiteur de la PI3K LY294002, de 50 nM de l'inhibiteur de la PI3K wortmannine ou de 100 ng/ml d'un inhibiteur des protéines  $G\alpha_{i/o}$ , la toxine de pertussis. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas. B, D, F, Analyse des immunobuvardages par densitométrie effectuée en utilisant le programme Quantity One 1-D Analysis de Bio-Rad. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en duplicatas.

Puisque la toxine de pertussis, un inhibiteur des petites protéines  $G\alpha_{i/o}$ , inhibait la prolifération cellulaire induite par l'oléate dans les deux lignées étudiées (Fig. 6A) (Hardy *et al.*, 2005), nous avons aussi examiné son effet sur la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt. La toxine de pertussis a complètement inhibé la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate dans les cellules MDA-MB-231. Une inhibition complète de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt induite par un traitement à l'oléate a aussi été observée dans les cellules DU-145 en présence de la toxine de pertussis (Fig. 7E-F). Ces résultats suggèrent un rôle pour un ou des GPCRs dans la phosphorylation induite par l'oléate des protéines ERK1/2 et Akt et dans l'activation de ces voies de signalisation.

### **L'oléate entraîne un influx de calcium dans les cellules DU145.**

Un influx rapide de calcium dans le cytoplasme des cellules est caractéristique d'une signalisation passant par un GPCR couplé  $G\alpha_q$ . Un tel influx suite à un traitement à l'oléate a été observé dans les cellules MDA-MB-231 (Hardy *et al.*, 2005). Afin d'amener une preuve supplémentaire de l'implication d'un GPCR dans l'effet de l'oléate sur les cellules DU145, nous avons effectué un essai d'influx de calcium. Les cellules DU145 ont été cultivées en présence de Fura-2/AM, une sonde fluorescente du calcium. L'ajout de 100  $\mu\text{M}$  d'oléate sur les cellules a causé une augmentation rapide du calcium intracellulaire alors que l'ajout de 100  $\mu\text{M}$  de palmitate n'a entraîné qu'un très faible effet (Fig. 8). 100  $\mu\text{M}$  d'ATP, un ligand des récepteurs purinergiques qui induisent un influx rapide de calcium lorsqu'ils sont activés, a été utilisé comme contrôle positif (Fischer & Krugel, 2007). Ce résultat confirme l'implication d'au moins un GPCR dans la signalisation de l'oléate dans les cellules DU145. Ce ou ces GPCRs par le(s)quel(s) l'oléate induirait ses effets serai(en)t couplé(s) aux petites protéines  $G\alpha_{i/o}$  (sensibilité à la toxine de pertussis) et/ou  $G\alpha_q$  (influx de calcium).

L'activation des petites protéines  $G\alpha_q$  peut entraîner une signalisation induisant la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires en agissant entre autres sur des effecteurs tels que p38 et la phospholipase C- $\beta$  (Mizuno & Itoh, 2009). Il aurait été intéressant de définir l'implication de cette voie dans la prolifération induite par l'oléate dans les cellules du cancer de la prostate DU145 en utilisant entre autres des inhibiteurs pharmacologiques tels que le U73122 contre la phospholipase C- $\beta$  et le YM-254890 contre les petites protéines  $G\alpha_q$  (Smith *et al*, 1990; Takasaki *et al*, 2004).



**Figure 8 : L'oléate et le palmitate induisent un influx de calcium intracellulaire dans les cellules du cancer de la prostate DU145.**

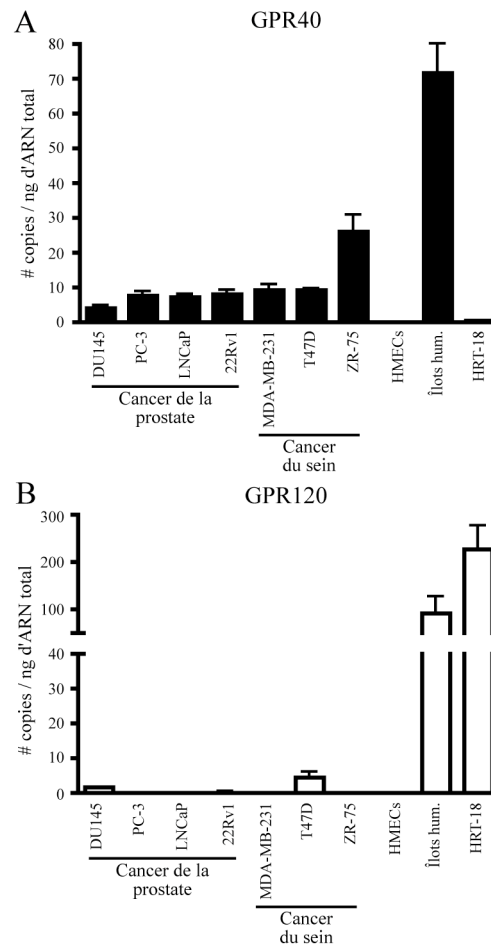
Influx de calcium intracellulaire dans les cellules DU145 stimulées avec 100  $\mu$ M d'acides gras liés à la BSA ou 100  $\mu$ M d'ATP. La flèche indique le moment de la stimulation. Des mesures de la fluorescence intracellulaire ont été prises à toutes les 2 sec. Le graphique montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas.

## **Expression des récepteurs aux acides gras GPR40 et GPR120 dans des lignées cancéreuses du sein et de la prostate.**

GPR40 et GPR120 sont deux GPCRs activables, entre autres, par l'oléate. Comme première étape dans l'étude de leur implication potentielle dans l'effet prolifératif de l'oléate, nous avons d'abord tenté de quantifier leur expression dans différentes lignées cancéreuses du sein et de la prostate. Il existe encore peu d'outils pour étudier l'expression de ces récepteurs au niveau protéique. La synthèse d'anticorps spécifiquement dirigés contre un GPCR est très compliquée en raison du nombre élevé de ces récepteurs chez l'humain et de leur grande homologie de séquence. Nous avons testé par immunobuvardage de type Western cinq anticorps disponibles commercialement pour GPR40 humain sur des cellules MDA-MB-231 et DU145 surexprimant le récepteur GPR40. Comme contrôle positif de la présence de GPR40, nous avons utilisé une préparation d'îlots pancréatiques humains puisque les cellules  $\beta$  du pancréas expriment fortement ce récepteur (Briscoe *et al*, 2003). Toutes les expériences effectuées avec ces anticorps montraient un large spectre de bandes dont aucune n'a pu être associée à GPR40 de façon assurée. Aucun des anticorps testés ne semble spécifique et n'a donné de résultats reproductibles. Certaines expériences ont révélé une bande d'environ 28 kDa, mais sa présence n'était pas corrélée avec la surexpression du récepteur GPR40. De plus, ce résultat n'était pas reproductible avec le même anticorps, il est donc possible qu'il soit artéfactuel. Deux anticorps dirigés contre GPR120 humain ont aussi été testés. Les cellules de la lignée de cancer du colon HRT-18 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression de ce récepteur puisque GPR120 est fortement exprimé dans les tissus du système digestif (Hirasawa *et al*, 2005). Parmi un large spectre de bandes, l'expression d'une protéine d'environ 42 kDa a été détectée par un des anticorps dans les cellules HRT-18. Une bande au même poids moléculaire a été faiblement détectée dans les cellules MDA-MB-231 et DU145, mais il a été impossible d'identifier positivement cette bande comme étant GPR120. Étant donné le manque de spécificité des anticorps et de reproductibilité des résultats obtenus, un autre mode de quantification de leur expression s'avérait nécessaire.

Afin de quantifier l'expression des récepteurs GPR40 et GPR120 dans des lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate, nous avons utilisé le PCR en temps réel. Nous avons décidé d'étendre notre étude de l'expression de ces récepteurs à quatre lignées de cancer de la prostate et trois lignées de cancer du sein afin de déterminer si l'expression de ces récepteurs pouvait être généralisée dans les cellules de ces deux types de cancer ou différait d'une lignée à l'autre. Les lignées de cancer de la prostate utilisées sont les lignées cellulaires hormono-indépendantes DU145 et PC-3 et les lignées hormono-sensibles LNCaP et 22Rv1. Les lignées de cancer du sein analysées sont les cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231 et les lignées cellulaires hormono-sensibles T47D et ZR-75. Comme contrôle positif de l'expression de GPR40, nous avons utilisé des îlots pancréatiques humains et pour GPR120, la lignée HRT-18. La figure 9A montre que les cellules HRT-18 exprimaient fortement GPR120 alors qu'il y avait un haut taux d'expression des deux récepteurs dans les îlots humains. Dans les cellules de cancer du sein et de la prostate, l'expression de GPR40 était similaire dans toutes les lignées testées et environ 10 fois moins élevée que dans les îlots humains, à l'exception d'une expression légèrement plus forte dans les cellules ZR-75. L'expression de GPR120 était pratiquement indétectable dans la plupart des cellules de lignées cancéreuses du sein et de la prostate testées, à l'exception des lignées DU145 et T47D dans lesquelles son expression est tout de même 40 à 100 fois moins élevée que dans les cellules HRT-18 (Fig. 9B). En raison de la faible expression du récepteur GPR120 dans la plupart des lignées cancéreuses du sein et de la prostate testées, nous avons décidé de concentrer nos efforts autour du récepteur GPR40 en tant que potentiel acteur dans l'effet de l'oléate sur la survie et la prolifération des cellules cancéreuses, sans toutefois écarter la possibilité d'un rôle pour GPR120 dans les lignées l'exprimant.





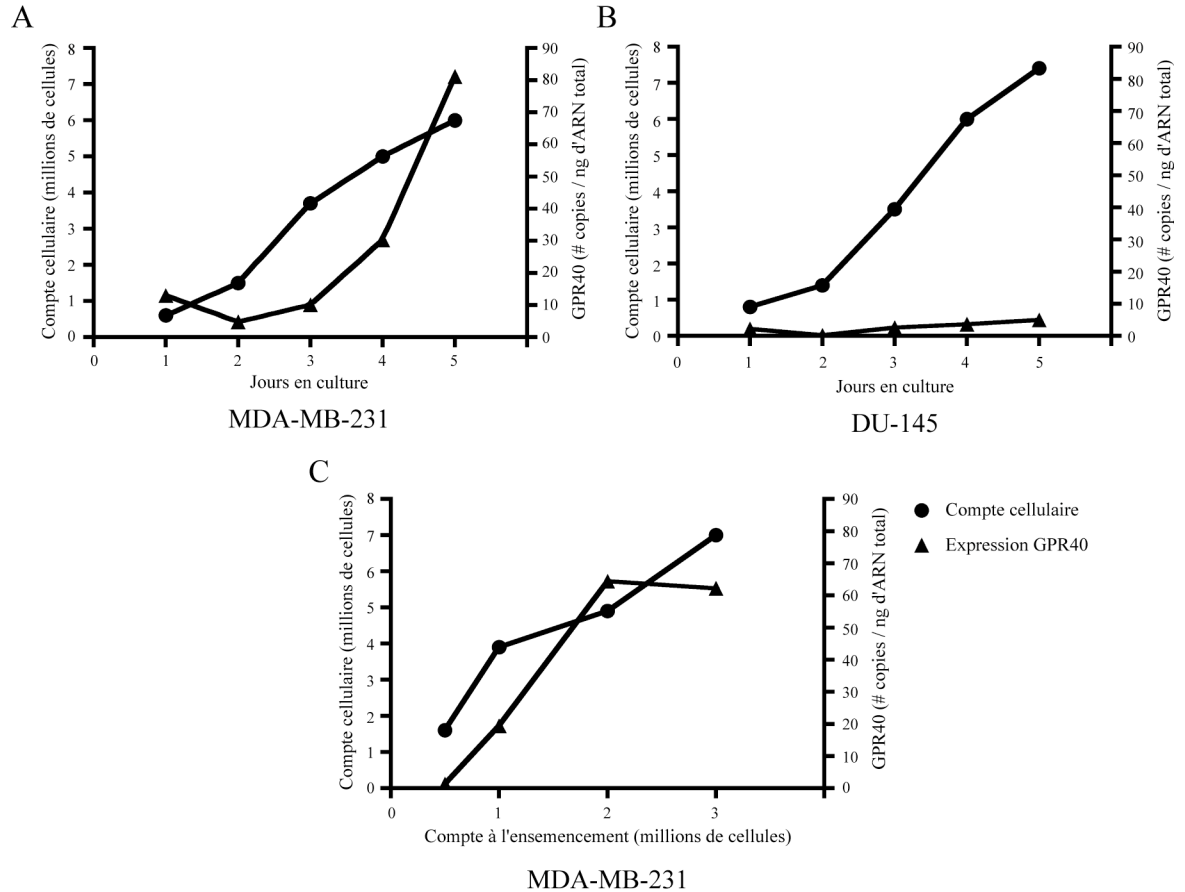
**Figure 9 : Expression des récepteurs GPR40 et GPR120 dans différentes cellules humaines.**

Expression de GPR40 (A) et GPR120 (B) analysée par PCR en temps réel dans quatre lignées du cancer de la prostate (DU145, PC-3, LNCAp et 22Rv1) et trois lignées du cancer du sein (MDA-MB-231, T47D et ZR-75). L'expression des récepteurs a aussi été analysée dans des HMECs, dans des îlots pancréatiques humains ainsi que dans la lignée du cancer du colon HRT-18. Les résultats sont exprimés en nombre de copies par ng d'ARN total et ont été normalisés par rapport à l'expression de GAPDH. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en duplicatas.

## **L'expression du récepteur GPR40 varie en fonction de la confluence des cellules.**

La confluence des cellules peut influencer l'expression ou l'activation de protéines, dont certaines sont impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires (Huguet *et al*, 1995; Lai & Pittelkow, 2004; Su *et al*, 2007). Yonezawa *et al*. ont montré que l'expression de GPR40 change dans les cellules de cancer du sein MCF-7 en fonction du temps en culture (Yonezawa *et al*, 2004). Nous avons voulu vérifier si tel était le cas dans les lignées MDA-MB-231 et DU145. Dans les cellules MDA-MB-231, l'expression de GPR40 augmentait au cours du temps (Fig. 10A). Au jour 5, l'expression de GPR40 était augmentée d'environ 20 fois comparativement au jour 1. Dans les cellules DU145, le temps passé en culture ne semblait pas affecter l'expression du récepteur qui restait à un niveau faible comparativement au niveau d'expression observé dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 10B).

L'augmentation de l'expression de GPR40 dans les cellules MDA-MB-231 pourrait être attribuée à deux facteurs : 1) l'expression du récepteur pourrait augmenter dans les cellules en fonction du temps passé en culture; 2) la confluence des cellules pourrait influencer son expression. Afin de déterminer lequel de ces facteurs causerait l'augmentation de l'expression de GPR40, des cellules MDA-MB-231 ont été ensemencées en diverses quantités (entre 0,5 et 3 millions par boîte) au jour 0 et récoltées au jour 2. Ainsi, les cellules dans les différentes boîtes ont atteint des niveaux de confluence croissants tout en demeurant en culture durant la même période de temps. La figure 10C montre que l'expression de GPR40 augmentait en fonction du nombre de cellules au moment de la récolte (qui augmentait elle-même en fonction du nombre de cellules à l'ensemencement). Il semblerait donc que ce serait la confluence des cellules MDA-MB-231 qui influencerait l'expression du récepteur GPR40.



**Figure 10 : L'expression de GPR40 augmente en fonction de la confluence des cellules du cancer du sein MDA-MB-231.**

A-B, Expression de GPR40 dans des cellules MDA-MB-231 (A) et DU145 (B). Les cellules ont été ensemencées à 500 000 cellules par boîte de 100 mm au jour 0 dans du milieu standard. À partir du jour 1, deux boîtes par lignée ont été récoltées et comptées quotidiennement sur cinq jours. Moyennes  $\pm$  ES de deux expériences réalisées en duplicatas. C, Expression de GPR40 au jour 2 de culture dans un milieu standard dans des cellules MDA-MB-231 ensemencées à différentes quantités. L'expression de GPR40 a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en nombre de copies par ng d'ARN total et ont été normalisés par rapport à l'expression de GAPDH. Moyennes  $\pm$  ES de deux expériences réalisées en duplicatas.

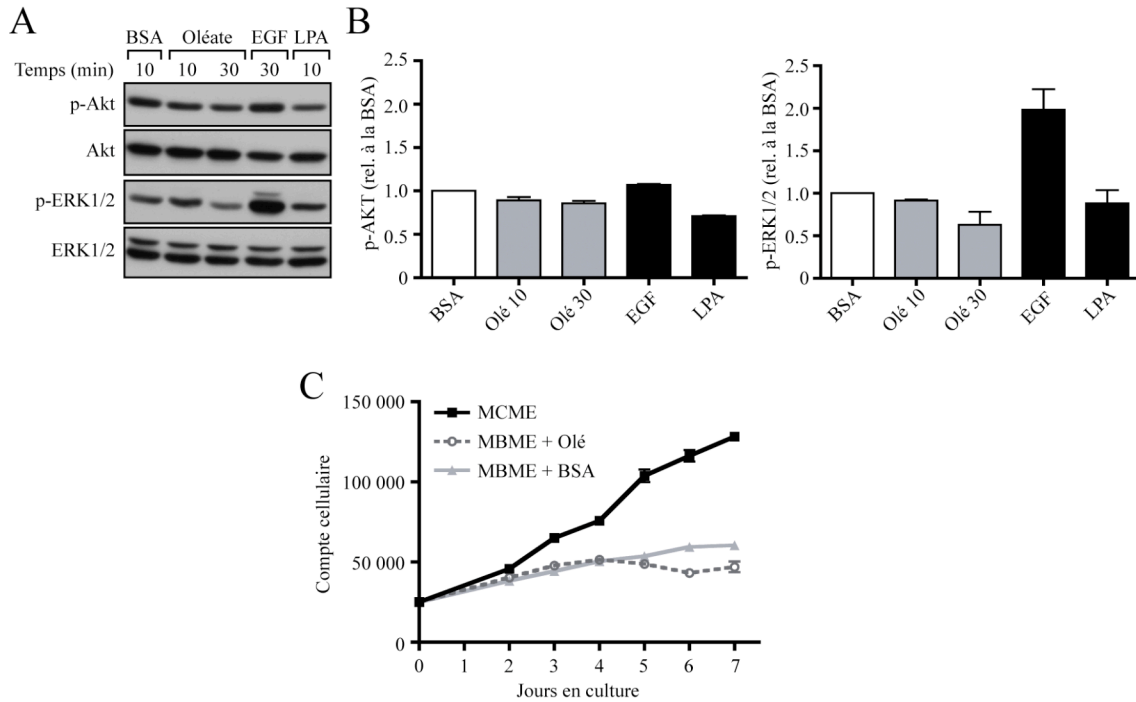
## **Des cellules épithéliales mammaires humaines en culture primaire ne répondent pas à l'oléate.**

Afin de déterminer si des cellules en culture primaire réagiraient de la même façon à l'oléate que les cellules cancéreuses, nous avons étudié l'effet de l'oléate sur la prolifération et la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt dans des cultures primaires de cellules épithéliales mammaires humaines (Human Mammary Epithelial Cells; HMECs). Dans un premier temps, nous avons mesuré si l'oléate pouvait induire l'activation des voies de signalisation d'ERK1/2 et d'Akt dans ces cellules. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions utilisées par Yonezawa *et al.* (2008) dans leur étude de l'effet prolifératif des acides gras insaturés sur des cellules épithéliales mammaires bovines, les HMECs ont été cultivées pendant 24 h dans du milieu de sevrage complet composé de MBME supplémenté en BSA à 0,5 % avant d'effectuer les traitements à l'oléate. L'EGF et le LPA ont été utilisés comme contrôles positifs (Fang *et al.*, 2000; Price *et al.*, 1999). L'oléate à 200  $\mu$ M n'a pas induit une augmentation de la phosphorylation ni d'ERK1/2 ni d'Akt dans ces cellules suite à un traitement de 10 et 30 minutes (Fig. 11A-B).

Puisque les HMECs ont un temps de doublement relativement long (environ trois jours), nous n'avons pas utilisé l'essai d'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine pour étudier la prolifération cellulaire induite par l'oléate. Des comptes cellulaires ont plutôt été effectués sur une période de sept jours. Un jour après l'ensemencement, les cellules ont été placées soit dans un milieu contenant tous les facteurs de croissance (MCME), soit dans du MBME supplémenté de 0,5 % de BSA, soit dans du MBME supplémenté de 0,5 % de BSA et de 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA. Les milieux ont été changés tous les deux jours. Les cellules vivantes adhérentes ont été comptées tous les jours à partir du jour 2 après ensemencement. Les HMECs cultivées dans du MBME ne présentaient pas de signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose, mais leur taux de croissance était faible comparativement aux cellules cultivées dans du MCME qui ont vu leur nombre s'accroître d'environ cinq fois en sept jours (Fig. 11C). Les cellules cultivées dans du MBME supplémenté d'oléate lié à la BSA ont montré le même taux de croissance que les cellules cultivées dans du

MBME avec de la BSA seule. Il est intéressant de noter que nous n'avons pu détecter l'expression ni de GPR40 ni de GPR120 dans les HMECs par PCR en temps réel (Fig. 9). Ces résultats contrastent avec ceux de Yonezawa *et al.* (2008) montrant une expression de GPR40 dans des cellules épithéliales mammaires bovines en culture primaire.

Ces résultats semblent suggérer que l'oléate ne pourrait induire la prolifération cellulaire ni activer les voies de signalisation Akt et ERK1/2 dans les cellules primaires HMECs. Cependant, il est possible que les HMECs soient plus sensibles au sevrage complet que les cellules épithéliales mammaires bovines et donc que celui-ci ait complètement éliminé des composantes essentielles à la prolifération cellulaire, nous empêchant de voir un effet de l'oléate. L'utilisation d'un milieu de sevrage partiel aurait peut-être été préférable. Les cellules en culture primaire ayant un métabolisme bien différent des lignées cellulaires établies, des temps de traitement à l'oléate plus courts et plus longs auraient également pu être effectués afin de s'assurer que nous ne rations pas la fenêtre d'activation des voies Akt et ERK1/2.



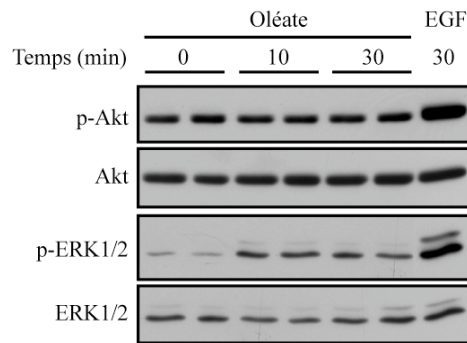
**Figure 11 : L'oléate ne semble avoir aucun effet sur la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 ni sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires humaines.**

A, Immunobuvardage sur lysats de cellules HMECs stimulées avec 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant les temps indiqués. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas. B, Analyse des immunobuvardages par densitométrie effectuée en utilisant le programme Quantity One 1-D Analysis de Bio-Rad. Moyennes  $\pm$  ES de deux expériences réalisées en duplicatas. C, Comptes cellulaires des cellules HMECs cultivées pendant 7 jours dans du MBME supplémenté de 0,5 % de BSA en absence ou en présence de 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou dans du MCME. Des cellules ont été comptées quotidiennement à partir du jour 2. Moyennes  $\pm$  ES d'une expérience réalisée en duplicatas.

## **L'oléate augmente la phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules cancéreuses du colon HRT-18.**

Les cellules tumorales du colon HRT-18 expriment le récepteur GPR120 (Fig. 9) tel qu'attendu puisque ce récepteur est fortement exprimé dans les cellules du système digestif. Nous avons utilisé ces cellules afin de tester si l'oléate était en mesure d'induire la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt en activant le récepteur GPR120 en absence du récepteur GPR40. Ce modèle d'étude exprimant GPR120 en l'absence de GPR40 a également été choisi parce que le cancer du colon est un autre cancer associé à l'obésité tout comme les cancers du sein et de la prostate.

Après 24 h dans du milieu sans sérum, les cellules HRT-18 ont été pré-incubées pendant 2 h dans du PBS supplémenté de glucose à 5 mM et de 0,5 % BSA dans lequel l'oléate a été ajouté. Un traitement à l'oléate entre 10 et 30 minutes entraînait une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 alors que la phosphorylation d'Akt ne semblait pas être affectée par ce traitement (Fig. 12). Étant donné que les cellules MDA-MB-231 expriment le récepteur GPR40 mais non GPR120 et que l'oléate induit la phosphorylation d'Akt mais non d'ERK1/2 dans ces cellules, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une signalisation de l'oléate passant par le récepteur GPR40 activerait de façon préférentielle la voie Akt alors qu'une signalisation passant par GPR120 activerait la voie ERK1/2. Dans les cellules DU145, les deux récepteurs sont exprimés et les deux voies sont activées par un traitement à l'oléate. Cependant, il est aussi possible que l'activation du récepteur GPR40 soit en mesure d'entraîner la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2, puisqu'une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 par l'oléate dans les cellules MDA-MB-231 n'a pu être observée en raison de leur activation constitutive dans ces cellules.



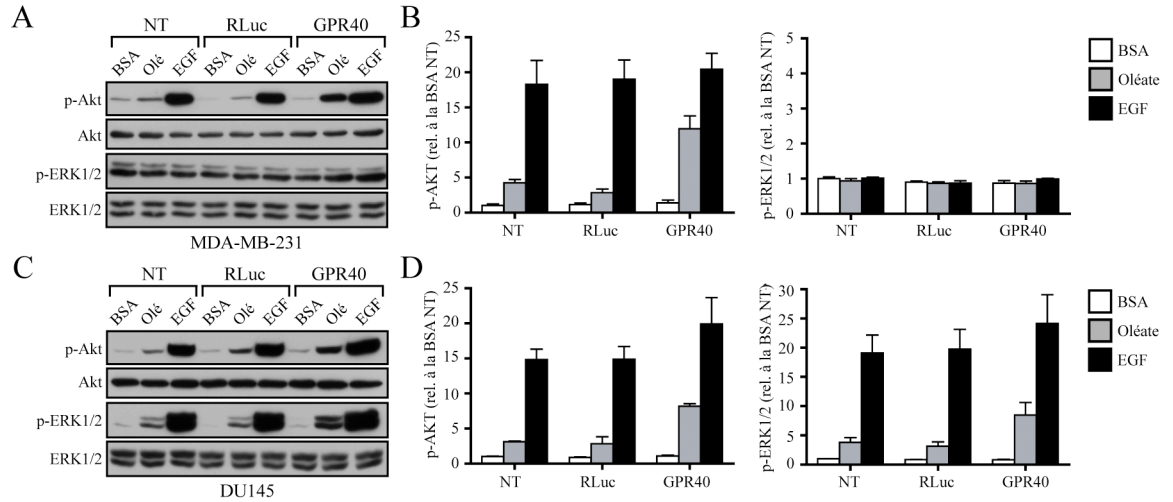
**Figure 12 : L'oléate induit la phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules du cancer du colon HRT-18.**

Immunobuvardage de lysats de cellules HRT-18 stimulées avec 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant les temps indiqués. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de deux expériences réalisées en duplicatas.



## **La surexpression de GPR40 entraîne une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt induite par l'oléate à court terme.**

Afin de déterminer si GPR40 était directement impliqué dans la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt induite par l'oléate, l'effet de la surexpression de GPR40 sur l'activation de ces voies a d'abord été étudié. Après 24 h de culture dans du milieu standard, les cellules transfectées ont été cultivées dans du milieu sans sérum pendant 24 h additionnelles. Des mesures effectuées par PCR en temps réel ont montré que les cellules MDA-MB-231 et DU145 transfectées avec un plasmide exprimant GPR40 avaient des taux respectifs d'expression de GPR40 de  $7310 \pm 550$  et  $5920 \pm 950$  fois plus élevés que les cellules ayant été transfectées avec un plasmide contrôle exprimant la luciférase de la *Rénilla*. Dans les cellules MDA-MB-231, la surexpression de GPR40 a causé une augmentation marquée de la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate d'environ quatre fois (Fig. 13A-B). Le haut taux de phosphorylation basal d'ERK1/2 n'a pas permis d'observer une augmentation de la phosphorylation de ces protéines par l'oléate dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant GPR40. Dans les cellules DU145, la surexpression de GPR40 a causé une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt induite par l'oléate (Fig. 13C-D). Ces résultats montrent qu'une activation du récepteur GPR40 par l'oléate est en mesure d'induire la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt et suggère que la phosphorylation de ces protéines induite par l'oléate dans les cellules non-transfectées pourrait impliquer GPR40.



**Figure 13 : La surexpression de GPR40 augmente la phosphorylation d’Akt et d’ERK1/2 dans les cellules du cancer de la prostate DU145 et la phosphorylation d’Akt dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 induites par l’oléate à court terme.**

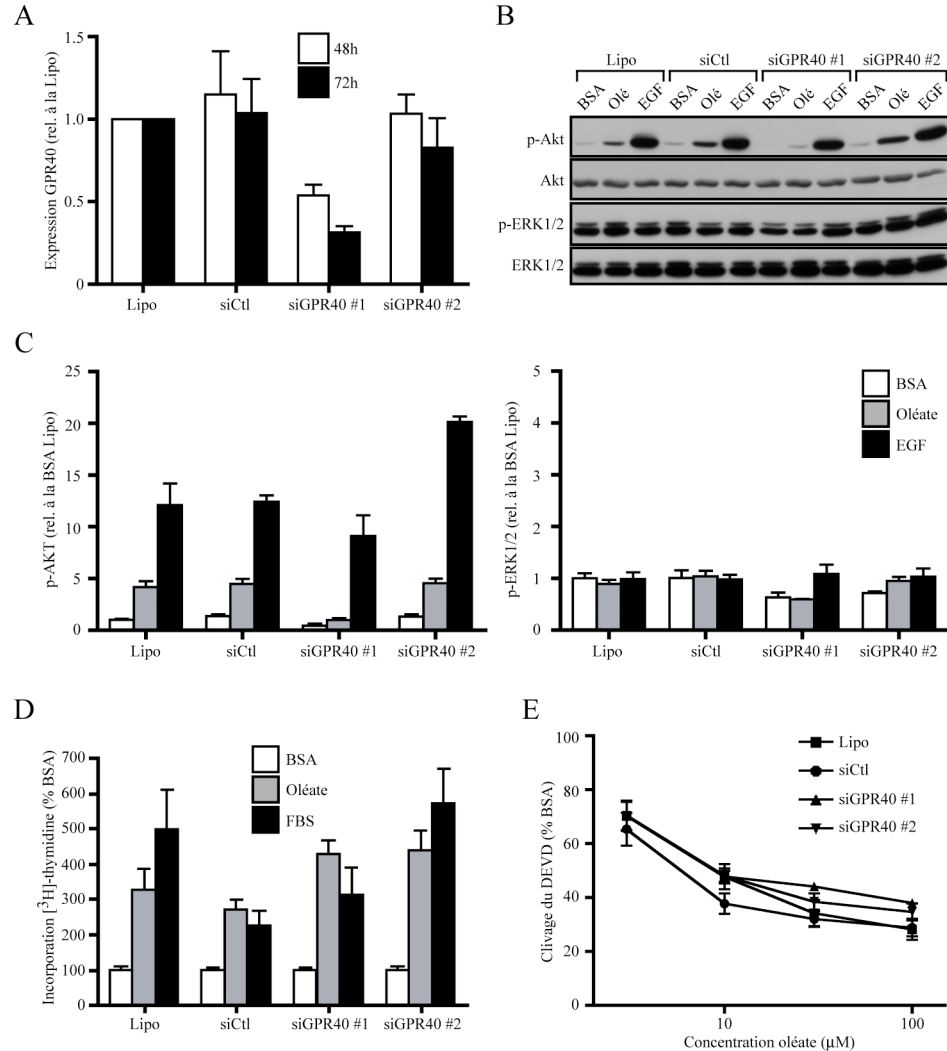
A, C, Immunobuvardage de lysats de cellules MDA-MB-231 (A) et DU145 (C) transfectées avec un plasmide codant pour le récepteur GPR40 ou pour la luciférase de la *Rénilla* (Rluc) et stimulées avec 200  $\mu$ M d’oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d’EGF pendant 30 minutes pour les MDA-MB-231 ou 10 minutes pour les DU145. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas. B, D, Analyse des immunobuvardages par densitométrie effectuée en utilisant le programme Quantity One 1-D Analysis de Bio-Rad. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en duplicatas.

**La diminution de l'expression de GPR40 inhibe la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt dans les cellules DU145 et la phosphorylation d'Akt dans les cellules MDA-MB-231 induites par l'oléate à court terme, mais n'affecte pas la prolifération cellulaire.**

Afin de confirmer le rôle de GPR40 dans la prolifération cellulaire ainsi que dans l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération par l'oléate, l'expression de GPR40 a été diminuée dans les cellules MDA-MB-231 à l'aide d'ARN interférents (siRNAs). Deux siRNAs dirigés contre GPR40 ont été conçus, siGPR40 #1 et siGPR40 #2. L'efficacité des siRNAs a été déterminée par PCR en temps réel. Comparativement aux cellules ayant été mise en contact avec la lipofectamine seule, les cellules transfectées avec le siGPR40 #1 montrent une diminution de son expression de près de 50 % après 48 h de transfection, atteignant 70 % après 72 h de transfection (Fig. 14A). La transfection du siGPR40 #2 ou du siRNA contrôle négatif (siCtl) n'ont pas conduit à une diminution significative de l'expression de GPR40. Les cellules exprimant le siGPR40 #1 ont montré une inhibition presque complète de la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate ainsi qu'une faible diminution de la phosphorylation basale d'ERK1/2 (Fig. 14B-C). En accord avec leur absence d'effet sur l'expression de GPR40, la transfection du siGPR40 #2 ou du siCtl n'ont eu aucun effet sur la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate ou la phosphorylation d'ERK1/2. Ces résultats montrent que le récepteur GPR40 serait impliqué dans l'effet de l'oléate sur la phosphorylation d'Akt dans les cellules MDA-MB-231.

L'effet des siRNAs sur la prolifération induite par l'oléate a ensuite été étudié. L'augmentation de la prolifération induite par l'oléate dans les cellules traitées à la lipofectamine seule n'était pas significativement différente de celle observée dans les cellules transfectées avec le siCtl, le siGPR40 #1 ou #2 (Fig. 14D). L'inhibition de l'expression de GPR40 ne semblait donc pas affecter la capacité de l'oléate à induire la prolifération des cellules MDA-MB-231. L'hypothèse que la diminution de l'expression de

GPR40 pourrait avoir un effet sur la survie cellulaire induite par l'oléate plutôt que sur la prolifération a été émise. Un essai de clivage du DEVD comme mesure de l'apoptose a été effectué afin de mesurer l'effet de la diminution de l'expression de GPR40 engendrée par les siRNAs sur l'inhibition de la mort cellulaire amenée par l'oléate. Après 24 h dans du milieu sans sérum, les cellules ont été cultivées dans du milieu supplémenté de différentes concentrations d'oléate lié à la BSA pour 24 h additionnelles avant d'être récoltées pour l'essai. De façon dose-dépendante, le traitement à l'oléate diminuait l'induction de l'activité de la caspase-3 engendrée par la privation en sérum (Fig. 14E). Aucun des siRNAs contre GPR40 n'a été en mesure d'altérer cette protection contre la mort cellulaire apportée par l'oléate. Ces résultats suggèrent que la prolifération et la survie cellulaires induites par l'oléate n'impliqueraient pas GPR40. Celui-ci ne jouerait un rôle que dans l'activation rapide des voies de signalisation induites par l'oléate, dont les voies Akt et ERK1/2. La fonction de l'activation de ces voies par l'oléate et le récepteur GPR40 reste à déterminer.



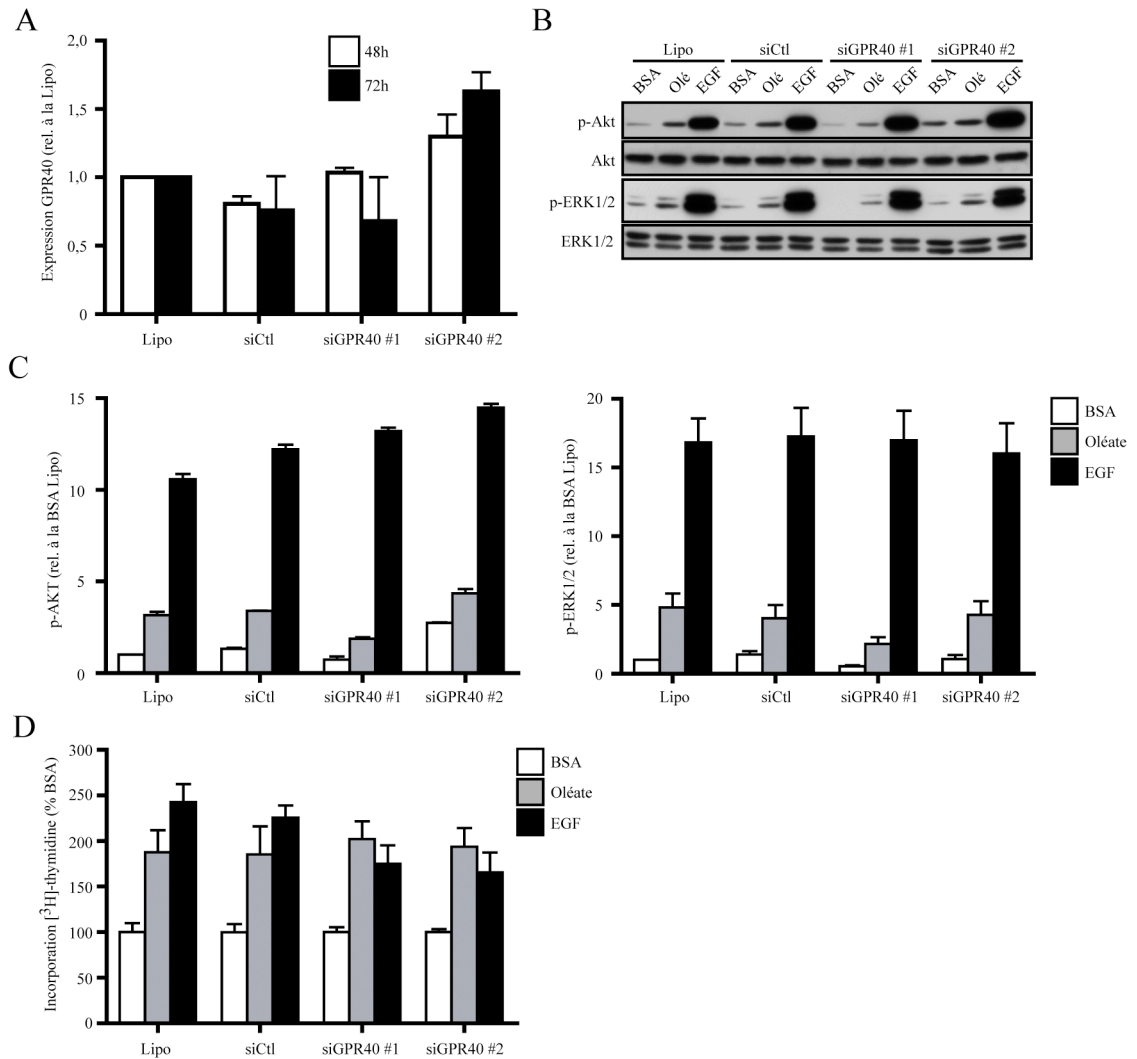
**Figure 14 : La diminution de l'expression de GPR40 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate à court terme, mais n'affecte pas la prolifération cellulaire.**

A, Expression de GPR40 dans les cellules MDA-MB-231 transfectées avec les siRNAs contrôle (siCtl) ou dirigés contre GPR40 (siGPR40 #1 et #2) pendant 48 ou 72 h. L'expression de GPR40 a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés relativement au contrôle négatif de transfection (lipofectamine seule) et ont été normalisés par rapport à l'expression de GAPDH. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en duplicatas. B, Immunobuvardage de lysats de cellules MDA-MB-231 transfectées avec les

siRNAs et stimulées avec 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant 30 minutes. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas. C, Analyse des immunobuvardages par densitométrie effectuée en utilisant le programme Quantity One 1-D Analysis de Bio-Rad. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en duplicatas. D, Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de [ $^3$ H]-thymidine dans les MDA-MB-231 transfectées avec les siRNAs et cultivées dans du milieu supplémenté de 0,5 % BSA, de 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou de 10 % FBS pendant 24 h. Durant les dernières 4 h, les cellules ont été marquées avec de la [ $^3$ H]-thymidine. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en triplicatas. E, Mesure de l'activité de la caspase-3 par un essai de clivage du DEVD dans les cellules MDA-MB-231 transfectées avec les siRNAs et cultivées dans du milieu supplémenté de 0,5 % BSA en absence ou en présence de différentes concentrations d'oléate lié à la BSA pendant 48 h. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en duplicatas.

L'effet des siRNAs dirigés contre GPR40 a aussi été étudié dans les cellules DU145 malgré le fait que l'expression de ce récepteur était plus faible que dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 9A). Cependant, la diminution de l'expression de GPR40 mesurée par PCR en temps réel suite à la transfection du siGPR40 #1 dans les cellules DU145 était beaucoup moins importante que dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 15A). 72 h après la transfection, une diminution moyenne d'environ 30 % de l'expression de GPR40 a été observée. Le manque de reproductibilité entre les différentes expériences pourrait être expliqué en partie par une plus faible efficacité de transfection observée dans les cellules DU145 comparativement aux cellules MDA-MB-231. Le faible effet du siRNA pourrait aussi être expliqué par le bas niveau d'expression endogène du récepteur GPR40 dans les cellules DU145. La technique du PCR en temps réel est très sensible, mais à des niveaux aussi bas d'expression, il est possible que nous soyons à la limite de la détection permise

par cette méthode et donc que nos mesures soient moins précises. Nous avons néanmoins examiné l'impact de ce siRNA dirigé contre GPR40 sur la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite par l'oléate dans les DU145. Les résultats des immunobuvardages ont été aussi inconstants que ceux des PCR en temps réel. La figure 14B montre les résultats d'une expérience au cours de laquelle une diminution de l'expression de GPR40 d'environ 50 % a été obtenue suite à la transfection du siGPR40 #1. Une faible diminution de la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite par l'oléate a été observée en présence du siGPR40 #1, corrélant avec la diminution de l'expression du récepteur dans cette expérience (Fig. 15B-C). Les résultats des expériences d'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine étaient plus stables. Aucun des siRNA ne semblait affecter la prolifération induite par l'oléate dans les DU145 (Fig. 15D). Ces résultats, bien que difficiles à interpréter vu leur faible reproductibilité, semblent vouloir confirmer les résultats obtenus avec les siRNA dirigés contre GPR40 dans les cellules MDA-MB-231.



**Figure 15 : La diminution de l'expression de GPR40 dans les cellules du cancer de la prostate DU145 semble réduire la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite par l'oléate à court terme, mais n'affecte pas la prolifération cellulaire.**

A, Expression de GPR40 dans les cellules DU145 transfectées avec les siRNAs contrôle (siCtl) ou dirigés contre GPR40 (siGPR40 #1 et #2) pendant 48 ou 72 h. L'expression de GPR40 a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés relativement au contrôle négatif de transfection (lipofectamine seule) et ont été normalisés par rapport à l'expression de GAPDH. Moyennes  $\pm$  ES de deux expériences réalisées en duplicatas. B,



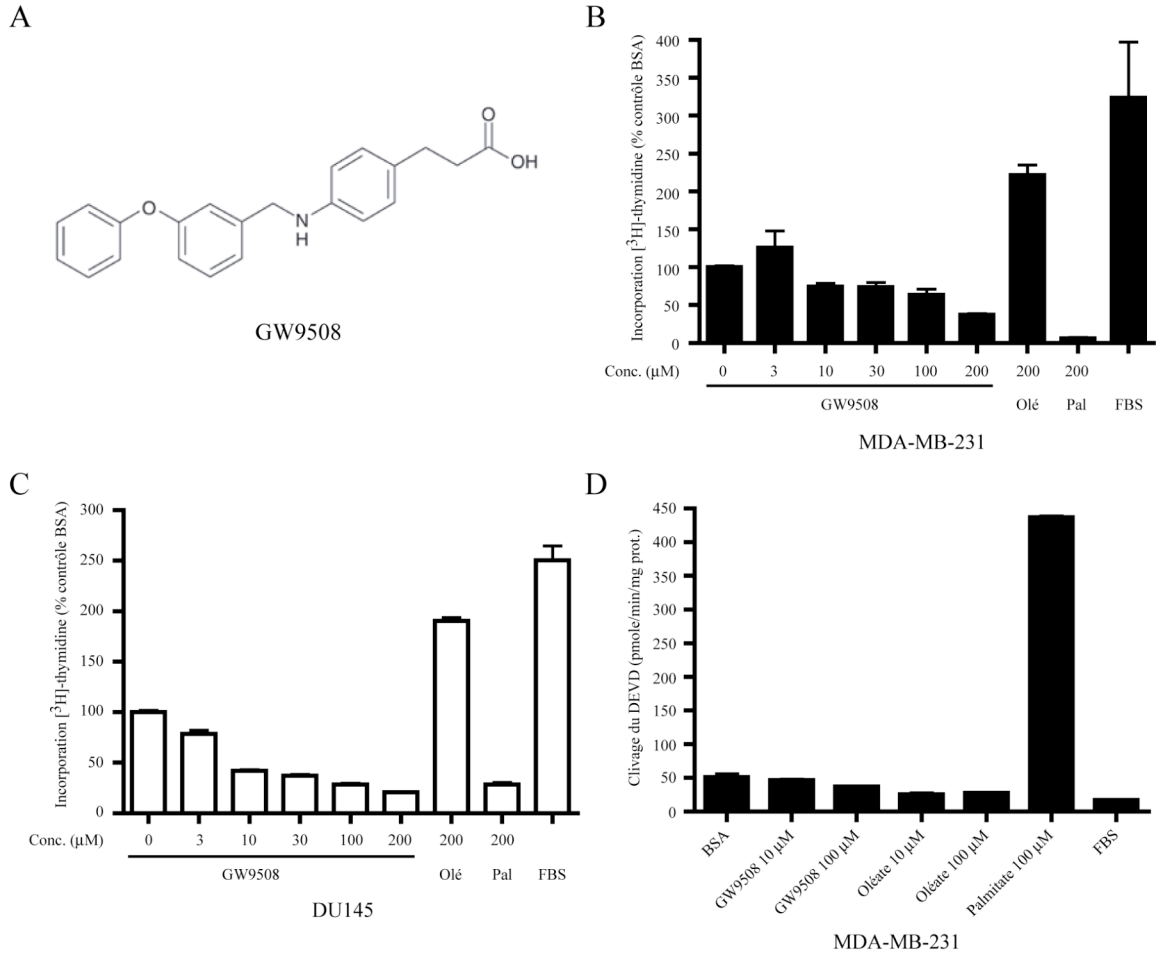
Immunobuvardage de lysats de cellules DU145 transfectées avec les siRNAs et stimulées avec 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant 10 minutes. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas. C, Analyse des immunobuvardages par densitométrie effectuée en utilisant le programme Quantity One 1-D Analysis de Bio-Rad. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en duplicatas. D, Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de [ $^3$ H]-thymidine dans les DU145 transfectées avec les siRNAs et cultivées dans du milieu supplémenté de 0,5 % BSA, de 200  $\mu$ M d'oléate lié à la BSA ou de 10 % FBS pendant 24 h. Durant les dernières 4 h, les cellules ont été marquées avec de la [ $^3$ H]-thymidine. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en triplicatas.

### **Étude d'un agoniste de GPR40 et GPR120.**

Afin de déterminer l'apport réel d'une signalisation passant par GPR40 dans l'effet de l'oléate sur la prolifération et l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, il est important de séparer le rôle de l'oléate en tant que ligand pour GPR40 de son rôle dans le métabolisme des acides gras. Pour ce faire, nous avons utilisé la molécule GW9508, un agoniste spécifique des récepteurs GPR40 et GPR120, caractérisée par Briscoe *et al.* (Fig. 16A) (Briscoe *et al.*, 2006). Le potentiel du GW9508 en tant que ligand de GPR40 est 10 fois plus élevé que celui des acides gras à longues chaînes dans une expérience d'influx de calcium effectuée dans des cellules HEK-293 transfectées avec un plasmide exprimant GPR40 (Briscoe *et al.*, 2006). Il est également un agoniste du récepteur GPR120, malgré une efficacité inférieure à celle des acides gras à longues chaînes. L'avantage de l'utilisation d'un agoniste est qu'il activera les récepteurs aux acides gras GPR40 et GPR120, mais n'induera pas les effets métaboliques engendrés par l'oléate lorsque celui-ci pénétrera dans les cellules.

Briscoe *et al.* (2006) ayant dilué le GW9508 dans du DMSO en absence de BSA, nous avons tenté de reproduire ces conditions. Bien que le produit se solubilise parfaitement dans le DMSO, il précipitait lorsque mélangé au milieu de culture à une concentration finale de 10  $\mu\text{M}$  ou plus. L'ajout de 0,5 % de BSA au milieu de culture n'empêchait pas la formation de précipités. Nous avons ensuite dilué l'agoniste dans de l'eau à laquelle nous avons ajouté quelques gouttes de NaOH jusqu'à l'obtention d'un pH de 9,5. Dans ce solvant basique, le carboxylate est ionisé, ce qui permet à la molécule de se solubiliser plus facilement. Une fois le GW9508 dilué à sa concentration finale, cela n'affectait pas le pH du milieu de culture des cellules. Cependant, lorsque le GW9508 était dilué à une concentration finale de l'ordre de 100  $\mu\text{M}$  ou plus dans du milieu de culture, il formait de petits précipités qui se déposaient au fond des puits. La formation de ces précipités était inhibée par l'ajout de 0,5 % de BSA dans le milieu, même à une concentration finale de 200  $\mu\text{M}$  de GW9508. Nous avons donc utilisé le GW9508 dilué dans un solvant basique, ajouté à du milieu de culture supplémenté en 0,5 % de BSA pour nos expériences.

Des courbes de dose-réponse d'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-thymidine ont été effectuées avec le GW9508. Le GW9508 semblait avoir un léger effet inhibiteur dose-dépendant sur la prolifération dans les cellules MDA-MB-231 et DU145 (Fig. 16B-C). Ces dernières ne proliféraient pas en présence de GW9508, mais elles ne semblaient pas entrer en apoptose comme c'est le cas lors d'un traitement au palmitate par exemple. Nous avons effectué un essai de clivage du DEVD pour quantifier l'activité de la caspase-3 afin de mesurer la mort cellulaire potentiellement induite par un traitement au GW9508 dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 16D). Après 24 h dans du milieu sans sérum, les cellules ont été cultivées dans du milieu supplémenté de différentes concentrations de l'agoniste, en présence de BSA, d'oléate ou de palmitate liés à la BSA pour 24 h additionnelles avant d'être récoltées pour l'essai. Le GW9508 n'induisait pas d'augmentation de l'activité de la caspase-3 dans les cellules MDA-MB-231 (Fig. 16D). L'agoniste ne semble donc pas toxique pour les cellules malgré qu'il induise un léger ralentissement de leur prolifération.

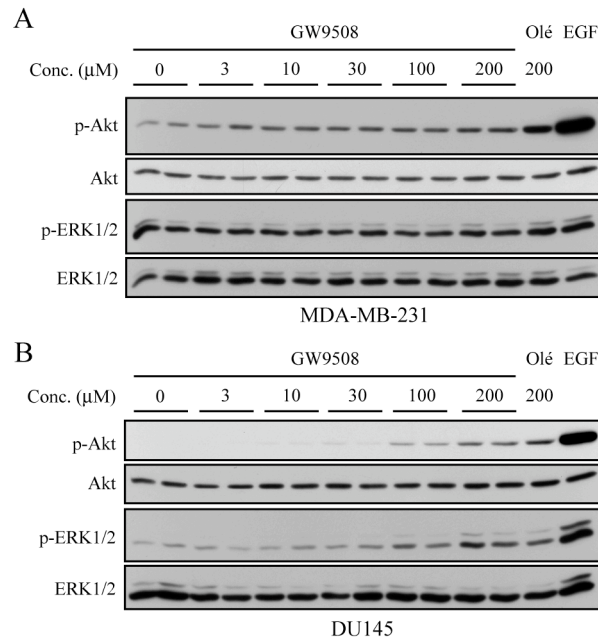


**Figure 16 : L'agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120 n'induit pas la prolifération des cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145.**

A, Structure biochimique de l'agoniste GW9508. B-C, Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de  $[^3\text{H}]$ -thymidine dans les MDA-MB-231 (B) et DU145 (C) cultivées dans du milieu en présence de 0,5 % BSA supplémenté de différentes concentrations de GW9508, de 200  $\mu\text{M}$  d'oléate ou de palmitate liés à la BSA ou de 10 % FBS pendant 24 h. Durant les dernières 4 h, les cellules ont été marquées avec de la  $[^3\text{H}]$ -thymidine. Moyennes  $\pm$  ES de trois expériences réalisées en triplicatas. D, Mesure de l'activité de la caspase-3 par un essai de clivage du DEVD dans les cellules MDA-MB-231 cultivées dans du milieu en présence de 0,5 % BSA supplémenté de différentes concentrations de GW9508, d'oléate ou

de palmitate liés à la BSA ou de 10 % FBS pendant 48 h. Moyennes  $\pm$  ES de deux expériences réalisées en duplicatas.

Nous nous sommes ensuite penchés sur l'effet de l'agoniste sur l'activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2. Nous avons effectué une courbe de dose-réponse avec le GW9508 dilué à pH basique en présence de BSA sur les cellules MDA-MB-231 et DU145 afin de déterminer son effet sur la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2. Dans les cellules MDA-MB-231, le GW9508 augmentait la phosphorylation d'Akt de façon dose-dépendante à partir de 10  $\mu$ M et n'affectait pas la phosphorylation d'ERK1/2 (Fig. 17A). Dans les cellules DU145, le GW9508 augmentait aussi la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 à partir de 100  $\mu$ M (Fig. 17B). Cette différence au niveau de la dose de GW9508 nécessaire pour induire la phosphorylation de ces protéines dans les cellules MDA-MB-231 et DU145 corrèle avec leurs niveaux respectifs d'expression du récepteur GPR40. Ces résultats montrent que l'agoniste GW9508 serait en mesure d'induire une augmentation de la phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2, mais n'induirait pas la prolifération cellulaire.



**Figure 17 : L'agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120 induit la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145.**

A-B, Immunobuvardage de lysats de cellules MDA-MB-231 (A) et DU145 (B) stimulées par différentes concentrations de GW9508 en présence de BSA, 200 μM d'oléate lié à la BSA ou 100 ng/ml d'EGF pendant 30 minutes pour les MDA-MB-231 ou 10 minutes pour les DU145. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Akt total ou Akt phosphorylée sur la Ser-473 (p-Akt) et ERK1/2 totales ou ERK1/2 phosphorylées sur la Thr-202 et la Tyr-204 (p-ERK1/2). La figure montre une expérience représentative de trois expériences réalisées en duplicatas.

## Discussion

Des études épidémiologiques et sur des modèles animaux ont suggéré une corrélation entre une diète riche en gras et une augmentation de l'incidence, du développement ou du taux de métastases des cancers du sein et de la prostate. Cependant, une corrélation n'a pu être montrée avec certitude en raison du grand nombre d'études contradictoires et seule une tendance positive entre une diète riche en gras et le taux de développement des cancers du sein et de la prostate se dessine. Les études concernant l'impact de types précis d'acides gras dans la diète sur l'incidence des cancers sont encore moins concluantes, ceci étant principalement dû à l'imprécision des données ou la trop grande similitude des diètes entre les patients. C'est pourquoi des études approfondies au niveau moléculaire pour comprendre le mécanisme d'action des différents types d'acides gras sur le métabolisme des cellules cancéreuses pourraient mieux orienter de futures études épidémiologiques.

### **L'effet prolifératif de l'oléate est observé dans plus d'un type de cancer.**

Dans le laboratoire, il a été montré que les acides gras insaturés (oléate, linoléate, arachidonate) induisent la prolifération tandis que les acides gras saturés (palmitate, myristate, stéarate) induisent l'apoptose de cellules du cancer du sein *in vitro* (Hardy *et al*, 2003). Plusieurs études *in vitro* ont montré ce double effet des acides gras sur le devenir des cellules du cancer du sein, mais très peu d'études ont été effectuées sur des lignées cellulaires d'autres types de cancers. Afin de déterminer si l'effet prolifératif de l'oléate pouvait s'appliquer à d'autres types de cancers, nous avons effectué un traitement à l'oléate sur des cellules du cancer de la prostate. Ce cancer a été choisi comme deuxième modèle d'étude en raison de la tendance corrélationnelle entre l'obésité et son incidence. Nous avons montré que l'oléate induit la prolifération des cellules du cancer de la prostate DU145 et PC-3 tandis que le palmitate entraîne leur mort cellulaire. L'effet prolifératif de l'oléate serait donc un phénomène répandu affectant plusieurs types de cancers. Les

cellules du sein et de la prostate étant stéroïdogéniques, il est possible qu'une caractéristique propre à ce type de cellules les rendent sensibles à la prolifération induite par l'oléate, comme par exemple leur capacité élevée à entreposer des acides gras. L'effet de l'oléate sur la prolifération devrait donc être examiné sur des cellules de cancers non-stéroïdogéniques, mais affectés par l'obésité, afin de vérifier si l'oléate serait également en mesure d'induire la prolifération de ces cellules. Nos expériences préliminaires dans les cellules de cancer du colon HRT-18, un autre cancer associé à l'obésité, montrent que ces cellules exprimant le récepteur GPR120 répondent à l'oléate par une augmentation de la phosphorylation des protéines ERK1/2. D'autres lignées de cancer du colon devraient être testées ainsi que l'effet prolifératif de l'oléate par des expériences d'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine. L'étude devrait également être étendue à des cellules de cancers semblant moins affectés par l'obésité tels que les cancers de la vessie, du cerveau ou les mélanomes (Calle *et al*, 2003). Ces types de cellules ne présentant possiblement pas les caractéristiques physiologiques nécessaires pour répondre à l'effet prolifératif engendré par les acides gras insaturés, cela pourrait expliquer que leur développement ne soit pas affecté par un taux circulant élevé d'acides gras. De plus, les cellules en culture primaire HMECs n'expriment pas les récepteurs GPR40 et GPR120 et ne semblent pas être en mesure de répondre à l'effet de l'oléate sur la prolifération. Il est à noter qu'un groupe a observé l'expression de GPR40 dans des cellules épithéliales mammaires bovines lesquelles montraient une augmentation de leur prolifération en présence d'oléate (Yonezawa *et al*, 2008). Cette différence pourrait provenir de l'origine bovine des cellules comparativement aux cellules humaines. Cependant, nos résultats dans les HMECs rejoignent les observations dans les cellules de la lignée épithéliale mammaire humaine non-transformée MCF-10A qui ne répondent pas à l'effet prolifératif de l'oléate (Przybytkowski *et al*, 2007). Ces résultats nous porteraient à croire que l'oléate induirait la prolifération des cellules humaines cancéreuses, mais non des cellules humaines « normales ». L'établissement d'un tel principe général nécessiterait évidemment des études dans plusieurs autres types de cellules primaires et de lignées cellulaires cancéreuses.

## **L'oléate induit l'activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2.**

Il existe plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'induction de la prolifération et la survie cellulaires. Les voies Akt et ERK1/2 sont parmi les plus étudiées et les plus importantes pour la survie, la croissance et la prolifération cellulaires. Nous avons précédemment obtenu des évidences en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de MEK1/2 et PI3K que ces deux voies pourraient être impliquées dans la prolifération induite par l'oléate sur les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 (Hardy *et al*, 2005). Dans la présente étude, nous avons déterminé, toujours à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, que ces voies étaient également impliquées dans la prolifération induite par l'oléate dans les cellules du cancer de la prostate DU145. Ces observations de l'implication des voies Akt et ERK1/2 dans l'effet prolifératif de l'oléate restent indirectes puisque ces deux voies sont très importantes pour la survie des cellules et leur inhibition pourrait certainement entraîner une perte de la prolifération cellulaire indépendamment de leur implication dans l'effet de l'oléate.

Nous avons également montré qu'un court traitement à l'oléate induit la phosphorylation d'Akt dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 ainsi que la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 dans les cellules du cancer de la prostate DU145. L'oléate est donc en mesure d'induire l'activation de ces voies de signalisation dans ces deux lignées cellulaires. Afin d'agir sur la prolifération cellulaire, l'activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2 doit se maintenir jusqu'à l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire (Jones & Kazlauskas, 2001; Yamamoto *et al*, 2006). L'activation de ces voies sur une période plus étendue est donc nécessaire. Un traitement à l'oléate sur les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 induit une double vague d'activation de la protéine Akt. Cette double vague d'activation d'Akt est aussi présente dans les cellules du cancer de la prostate DU145 et affecte également ERK1/2 de façon encore plus marquée. La première vague rapide de phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2, environ 10-30 minutes après le début du traitement à l'oléate, est caractéristique d'une signalisation passant par un



récepteur membranaire (revu dans Rozengurt, 2007). L'activation d'un récepteur par son ligand et l'induction de la signalisation en aval de celui-ci s'effectue en effet sur des temps très courts. La deuxième vague de phosphorylation, plus lente et soutenue, pourrait nécessiter l'entrée de l'oléate dans la cellule puis sa métabolisation d'où un temps de réponse beaucoup plus long. Le maintien de l'activation de ces deux voies de signalisation pendant au moins 10 h suite à un traitement à l'oléate pourrait être suffisant pour déclencher la prolifération cellulaire.

### **L'oléate induit l'activation des voies Akt et ERK1/2 via GPR40.**

L'oléate semble induire l'activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2, au moins sur des temps courts, via un ou des récepteurs membranaires. Entre 2003 et 2005, deux GPCRs jusqu'alors orphelins, GPR40 et GPR120, ont été identifiés comme récepteurs des acides gras à moyennes et longues chaînes dont l'oléate. Il existe plusieurs méthodes pour confirmer l'implication d'un GPCR dans l'activation de la cellule. La toxine de pertussis est un inhibiteur pharmacologique bloquant spécifiquement la signalisation passant par un des partenaires possibles des GPCRs, les protéines  $G\alpha_{i/o}$ . Nous avons montré que cette toxine inhibe la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145. De plus, un influx rapide de calcium dans le cytosol suite à une stimulation des cellules peut être engendré par certains types de récepteurs membranaires, dont des GPCRs couplés  $G\alpha_q$  (revu dans Clapham, 1995). Nous avons montré que l'oléate induit un influx rapide de calcium dans le cytosol des cellules MDA-MB-231 (Hardy *et al*, 2005) et DU145 après seulement quelques secondes de traitement. Ces résultats suggèrent que l'oléate induit l'activation d'un ou de GPCR(s) couplé(s)  $G\alpha_{i/o}$  et/ou  $G\alpha_q$ . GPR40 et GPR120, deux GPCRs activés par des acides gras à moyennes et longues chaînes pouvant être couplés à la fois  $G\alpha_{i/o}$  et  $G\alpha_q$ , sont donc deux candidats possibles. La liaison de l'oléate à ce ou ces récepteur(s) serait essentielle à son activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2.

La détection de l'expression de GPCRs dans des cellules n'est pas aisée vu leur nombre et leur grande homologie de séquence. La synthèse d'anticorps dirigés spécifiquement contre un GPCR n'est pas toujours possible, ceux-ci reconnaissant souvent plusieurs membres de la famille des GPCRs de façon non-spécifique. Le manque de spécificité des anticorps dirigés contre GPR40 et GPR120 testés et de reproductibilité des résultats nous ont obligés à trouver un moyen alternatif pour quantifier l'expression de ces récepteurs. De plus, leur expression endogène dans les cellules MDA-MB-231 et DU145 semblant relativement faible, un moyen de détection plus sensible était nécessaire afin de quantifier d'éventuelles diminutions de leur expression lors des expériences impliquant des siRNAs dirigés contre ces récepteurs. L'expression d'un gène au niveau de l'ARN ne reflète pas toujours son expression au niveau de la protéine. Tenter de quantifier l'expression d'une protéine en utilisant le PCR en temps réel n'est donc pas idéal. Cependant, il s'agit d'une méthode très sensible et reproductible dont les résultats peuvent être aisément comparés entre les différents échantillons. Nous avons analysé l'expression de GPR40 et GPR120 par PCR en temps réel dans les lignées du cancer de la prostate DU145 et du cancer du sein MDA-MB-231. GPR40 est exprimé de façon semblable dans toutes les lignées du cancer de la prostate et du sein analysées. Par contre, l'expression de GPR120 est quasi-inexistante dans la plupart de ces lignées à l'exception des cellules DU145 et T47D. À noter l'expression importante de GPR120 dans des îlots de pancréas humains, qui a été récemment décrite par deux autres groupes (Kebede *et al*, 2009; Morgan & Dhayal, 2009). Le taux d'expression faible dans la lignée DU145 et non-déTECTABLE dans la lignée MDA-MB-231 de GPR120 nous a incité à concentrer nos travaux sur GPR40 en tant que candidat potentiellement responsable de la signalisation de l'oléate dans ces cellules.

Nous avons étudié l'implication de GPR40 dans la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite par l'oléate dans des cellules MDA-MB-231 et DU145 en surexprimant ce récepteur. L'augmentation substantielle de l'expression du gène détECTÉE par PCR en temps réel ne reflète peut-être pas directement son expression au niveau de la protéine,

mais un tel niveau de transcription de l'ARN devrait être en mesure d'augmenter la concentration intracellulaire de la protéine. Comparativement aux cellules non-transfectées ou transfectées avec le plasmide contrôle, la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate est environ trois fois plus élevée dans les cellules MDA-MB-231 et DU145 surexprimant GPR40. La transfection de GPR40 dans les DU145 entraîne également une augmentation d'environ deux fois de la phosphorylation d'ERK1/2 induite par l'oléate. Ces résultats suggèrent que le récepteur GPR40 pourrait être impliqué dans la phosphorylation rapide des protéines Akt et ERK1/2.

Nous avons également inhibé l'expression du récepteur GPR40 à l'aide de siRNAs spécifiques dans les lignées cellulaires du cancer du sein et du cancer de la prostate. La diminution plus accentuée de l'expression de GPR40 dans les MDA-MB-231 peut s'expliquer par un taux d'efficacité de transfection plus élevé dans ces cellules que dans les DU145. De plus, puisque le récepteur GPR40 est plus exprimé dans les MDA-MB-231, il est possible qu'il soit plus aisé d'observer une inhibition significative de son expression comparativement aux cellules DU145. Dans les cellules MDA-MB-231, la transfection du siGPR40 #1 inhibe presque totalement la phosphorylation d'Akt induite par l'oléate. Dans les cellules DU145, la diminution de l'expression de GPR40 par siRNA inhibe partiellement la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 induite par l'oléate. L'effet moindre sur les cellules DU145 pourrait s'expliquer par la plus faible diminution de l'expression du récepteur GPR40 par le siRNA ou encore par la présence du récepteur GPR120 dans ces cellules, lequel pourrait suppléer au moins partiellement à la perte de GPR40.

L'oléate étant un acide gras, il est en mesure d'entrer librement dans la cellule par diffusion ou transport assisté. Une fois à l'intérieur de la cellule, il peut activer directement des voies de signalisation ou encore être métabolisé. Toutes ces actions engendrent des signaux qui sont indépendants de l'activation des récepteurs aux acides gras. Afin de dissocier les effets liés à l'activation de GPR40 de ceux liés au métabolisme de l'oléate, nous avons utilisé un agoniste des récepteurs GPR40 et GPR120 caractérisé par Briscoe *et al.* (Briscoe *et al.*, 2006). Cet agoniste, le GW9508, se lie aux récepteurs et entraîne leur

activation, mais n'est pas en mesure d'entrer dans la cellule. Dans les cellules MDA-MB-231, le GW9508 induit la phosphorylation d'Akt. Il induit également l'activation d'Akt et d'ERK1/2 dans les DU145. Dans des cellules HEK-293 exprimant GPR40 de façon inducible, le GW9508 induit également la phosphorylation d'ERK1/2 (Smith *et al*, 2009). Ces résultats, qui montrent que la liaison du récepteur GPR40 par son ligand, que ce soit l'oléate ou l'agoniste GW9508, entraîne l'activation rapide des voies de signalisation Akt et ERK1/2 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145, suggèrent que l'activation par l'oléate ne requière pas sa métabolisation.

### **L'oléate induit la prolifération cellulaire par un mécanisme indépendant de GPR40.**

Dans un premier temps, nous avons pensé que l'activation de GPR40 serait impliquée dans l'augmentation de la prolifération induite par l'oléate puisque celle-ci était sensible à un traitement à la toxine de pertussis, un inhibiteur des petites protéines  $G\alpha_{i/o}$ . Cependant, la transfection d'un siRNA qui diminuait l'expression de GPR40 dans les cellules et l'activation des protéines Akt et ERK1/2 n'affecta pas la prolifération induite par l'oléate. N'observant pas d'effet du siGPR40 #1 sur la prolifération cellulaire malgré la diminution de l'expression du récepteur dans les cellules, nous avons alors pensé que GPR40 pourrait être impliqué dans l'effet protecteur de l'oléate sur l'apoptose induite par l'absence de sérum. Nous avons donc mesuré l'activité de la caspase-3 en fonction de la concentration en oléate dans des cellules MDA-MB-231 transfectées avec le siGPR40 #1. Tout comme pour la prolifération, la diminution de l'expression de GPR40 par siRNA n'affecta pas l'effet anti-apoptotique de l'oléate. De plus, l'agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120, lorsqu'il est utilisé dans un essai d'incorporation de [ $^3$ H]-thymidine, n'entraîne pas la prolifération des cellules MDA-MB-231 et DU145. Ces deux résultats suggèrent que la prolifération induite par l'oléate dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145 n'impliquerait pas l'activation de GPR40. Le léger effet

négatif sur la prolifération induite par l'oléate dans les cellules MDA-MB-231 observé préalablement dans notre laboratoire suite à un traitement des cellules avec un shRNA (*short hairpin RNA*) dirigé contre GPR40 pourrait être un effet non-spécifique occasionné par la métabolisation du shRNA ou encore par le tri des cellules par FACS (Hardy *et al*, 2005). Nous ne pouvons évidemment pas exclure l'implication d'un effet non-spécifique dans l'incapacité du siGPR40 #1 à affecter la prolifération induite par l'oléate. Il est important aussi de se rappeler que l'efficacité des deux moyens utilisés pour diminuer l'expression du récepteur a été mesurée à l'aide du PCR en temps réel et il nous est impossible pour l'instant de déterminer leur efficacité réelle au niveau de l'expression protéique de GPR40. Une troisième méthode d'inhibition de l'expression ainsi qu'un anticorps spécifique pour GPR40 seront nécessaires pour définir avec plus de certitude son implication dans la prolifération cellulaire induite par l'oléate.

Une étude dans des cellules épithéliales bronchiales humaines a suggéré que la rosiglitazone et la troglitazone, des agonistes du récepteur PPAR $\gamma$ , induiraient la prolifération de ces cellules par un mécanisme impliquant GPR40 (Gras *et al*, 2009). Le contraste entre cette étude et nos résultats pourrait s'expliquer de diverses façons. D'abord, le type cellulaire utilisé est différent. Certains GPCRs pouvant se lier à plusieurs types de petites protéines G, des variations au niveau du couplage récepteur/protéine G entre les types cellulaires pourrait entraîner des différences dans l'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs. Ensuite, des mutations dans le gène GPR40 ou des polymorphismes (Ogawa *et al*, 2005) spécifiques à certains types cellulaires pourraient entraîner une modification du couplage et donc potentiellement l'activation de différentes voies de signalisation (revu dans Hermans, 2003; revu dans Perez & Karnik, 2005). Enfin, l'utilisation de la rosiglitazone et de la troglitazone comme agonistes de GPR40 pourrait également entraîner des différences au niveau de l'activation du récepteur comparativement à l'oléate. L'activation d'un GPCR par divers ligands peut entraîner un changement de conformation du récepteur propre à chaque ligand et ainsi favoriser la liaison de protéines

signalétiques distinctes, entraînant l'activation de différentes voies de signalisation (revu dans Hermans, 2003; revu dans Perez & Karnik, 2005).

Puisque GPR40 ne semble pas essentiel à l'induction de la prolifération induite par l'oléate, la sensibilité de cet effet prolifératif à la toxine de pertussis devient alors un résultat à expliquer. La toxine de pertussis étant un inhibiteur très spécifique, la possibilité d'un effet secondaire associé à l'utilisation de cet inhibiteur est pratiquement à exclure (Murayama & Ui, 1983). Nous pourrions penser à l'implication d'un autre GPCR que GPR40. Malgré sa faible expression dans les DU145 et les MDA-MB-231, GPR120 pourrait être un GPCR candidat. Cependant, le fait que l'agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120 ne soit pas en mesure d'induire la prolifération semble éliminer ce récepteur également. Nous ne pouvons écarter la possibilité d'un autre GPCR non-identifié qui aurait comme ligands des acides gras à longues chaînes dont l'oléate. Avec l'avancée des méthodes d'identification de ligands à haut débit, il existe de moins en moins de récepteurs orphelins et donc de candidats pour cette hypothèse. Néanmoins, GPR84, un récepteur aux acides gras à moyennes chaînes exprimé dans plusieurs tissus dont le cerveau, le colon et les intestins, a été identifié récemment (Wang *et al*, 2006). GPR119, exprimé principalement dans le pancréas et les intestins, a été identifié comme ayant pour ligand un dérivé de l'oléate, l'oléoyléthanolamide (Overton *et al*, 2006). Il n'est donc pas impossible que d'autres récepteurs aux acides gras, à un de leurs dérivés ou métabolites, soient identifiés dans le futur puisque plus d'une centaine de GPCRs seraient toujours orphelins (Heilker *et al*, 2009).

Puisque GPR40 ne semble pas impliqué dans la prolifération induite par l'oléate, quel rôle pourrait-il jouer dans les cellules de cancer du sein et de la prostate ? L'augmentation de l'expression de GPR40 avec la confluence des cellules pourrait nous donner un indice sur un rôle potentiel de ce récepteur. Lorsque des cellules en culture arrivent à confluence, elles ont tendance à ralentir leur prolifération et à entamer leur différenciation. La hausse du taux d'expression de GPR40 à ce moment pourrait suggérer l'implication de ce récepteur dans la différenciation des cellules. Un groupe a d'ailleurs

montré dans des cellules mammaires bovines que l'expression de GPR40 était maximale lors du pic de lactation (Yonezawa *et al*, 2008). Des expériences plus poussées dans ce domaine seront nécessaires pour tirer des conclusions.

### **Les effets prolifératif et anti-apoptotique de l'oléate pourraient être engendrés par le métabolisme de l'oléate.**

Les voies de signalisation Akt et ERK1/2 sont importantes pour la prolifération et la survie des cellules. Elles sont impliquées dans l'effet de l'oléate sur la prolifération puisque leur inhibition diminue l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine induite par l'oléate dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et du cancer de la prostate DU145. La voie Akt est également impliquée dans le métabolisme des lipides. L'activation d'Akt augmente la transcription de FAS, l'enzyme centrale de la lipogenèse (revu dans Bengoechea-Alonso & Ericsson, 2007). L'inhibition de FAS par siRNA inhibe en retour l'activation d'Akt par un mécanisme inconnu (Wang *et al*, 2005). Akt serait donc activée directement ou indirectement par FAS ou un des métabolites de la lipogenèse en aval de cette enzyme. FAS est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses dont celles des cancers du sein et de la prostate (revu dans Kuhajda, 2000) et l'inhibition de son expression par siRNA ou à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques induit la mort des cellules par apoptose (De Schrijver *et al*, 2003; Pizer *et al*, 1996). Des siRNAs dirigés contre ACC- $\alpha$  ou ACL induisent également la mort cellulaire (Bauer *et al*, 2005; Brusselmans *et al*, 2005). Ceci montre qu'une dérégulation de la lipogenèse dans les cellules cancéreuses entraîne une réaction pro-apoptotique. D'ailleurs, la lipogenèse est augmentée dans les lignées cellulaires de plusieurs types de cancers incluant les cancers du sein et de la prostate (revu dans Swinnen *et al*, 2006).

L'augmentation de la lipogenèse par les cellules cancéreuses leur permet d'accroître la synthèse d'acides gras à longues chaînes qui sont ensuite transformés, entre autres, en

phospholipides pour la synthèse des membranes et en triglycérides afin de servir de réserve d'énergie. L'incubation de cellules du cancer du sein dans un milieu supplémenté en oléate entraîne une augmentation de la synthèse des triglycérides et la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme *in vitro* (Hardy *et al*, 2003). L'entrée massive d'oléate dans les cellules imite donc une stimulation de la lipogenèse en favorisant le métabolisme des lipides. Przybytkowski *et al.* (2007) ont montré que, dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231, un traitement de 24 h à l'oléate induit une forte accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des cellules sous forme de gouttelettes lipidiques et entraîne la survie des cellules sur 10 jours dans un milieu de sevrage complet. La faculté de diverses lignées cellulaires du sein à accumuler des triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques est en corrélation directe avec la capacité de l'oléate à inhiber l'apoptose induite par un retrait du sérum dans ces cellules (Przybytkowski *et al*, 2007). L'accumulation de gouttelettes lipidiques joue donc un rôle primordial dans l'effet anti-apoptotique de l'oléate et possiblement dans son effet prolifératif indépendant des récepteurs aux acides gras. Des études ont examiné la fonction des gouttelettes dans les cellules et leur composition (Brasaemle *et al*, 2004; Fujimoto & Ohsaki, 2006; Fujimoto *et al*, 2004). La majorité des protéines associées aux gouttelettes lipidiques sont impliquées dans le métabolisme des acides gras, mais elles incluent également des protéines signalétiques. Yu *et al.* (1998; 2000) ont montré qu'ERK1/2 et la PI3K co-localisent avec les gouttelettes lipidiques dans les leucocytes et les macrophages. Leur niveau d'activation lors de cette co-localisation et leur fonction potentiellement associée à cet organelle restent à découvrir.

Les résultats présentés dans cette thèse nous amènent à proposer un modèle de travail (Figure 18) selon lequel l'oléate agirait sur les cellules via deux voies complémentaires. D'un côté, en activant le récepteur aux acides gras GPR40, l'oléate induirait la phosphorylation rapide des voies de signalisation ERK1/2 et Akt. La protéine Akt, en activant le complexe mTORC1 et les SREBPs, augmenterait la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides tels que ACL, ACC- $\alpha$ , FAS et GPAT, préparant les cellules à une hausse de la lipogenèse. De l'autre côté, l'oléate entrerait dans



les cellules, stimulant la production et l'entreposage de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques. Cette accumulation de triglycérides dans les cellules constituerait le noyau du mécanisme par lequel l'oléate entraînerait la prolifération et la survie cellulaires. Nous savons qu'un traitement de 3 h à l'oléate est suffisant pour induire l'inhibition complète de l'activité de la caspase-3 engendrée par le retrait du sérum dans les cellules MDA-MB-231 (Przybytkowski *et al*, 2007). Une accumulation visible des gouttelettes lipidiques dans les cellules MDA-MB-231 incubées dans un milieu supplémenté en oléate débute environ 2 h après le début du traitement (observations non-montrées). Cette accumulation corrèle avec le début de la deuxième vague de phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2 dans les cellules MDA-MB-231 et DU145 induite par l'oléate. L'entrée de l'oléate dans la cellule stimulerait l'accumulation de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques, entraînant la deuxième vague d'activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2. Des études complémentaires seront nécessaires afin de mieux comprendre comment la métabolisation de l'oléate et son entreposage dans les gouttelettes lipidiques sous forme de triglycérides pourrait induire l'activation de ces voies de signalisation. Ce modèle attribuerait un rôle direct au métabolisme des lipides et à la formation des gouttelettes lipidiques dans l'activation d'une signalisation menant à la survie et à la prolifération cellulaires induites par l'oléate.

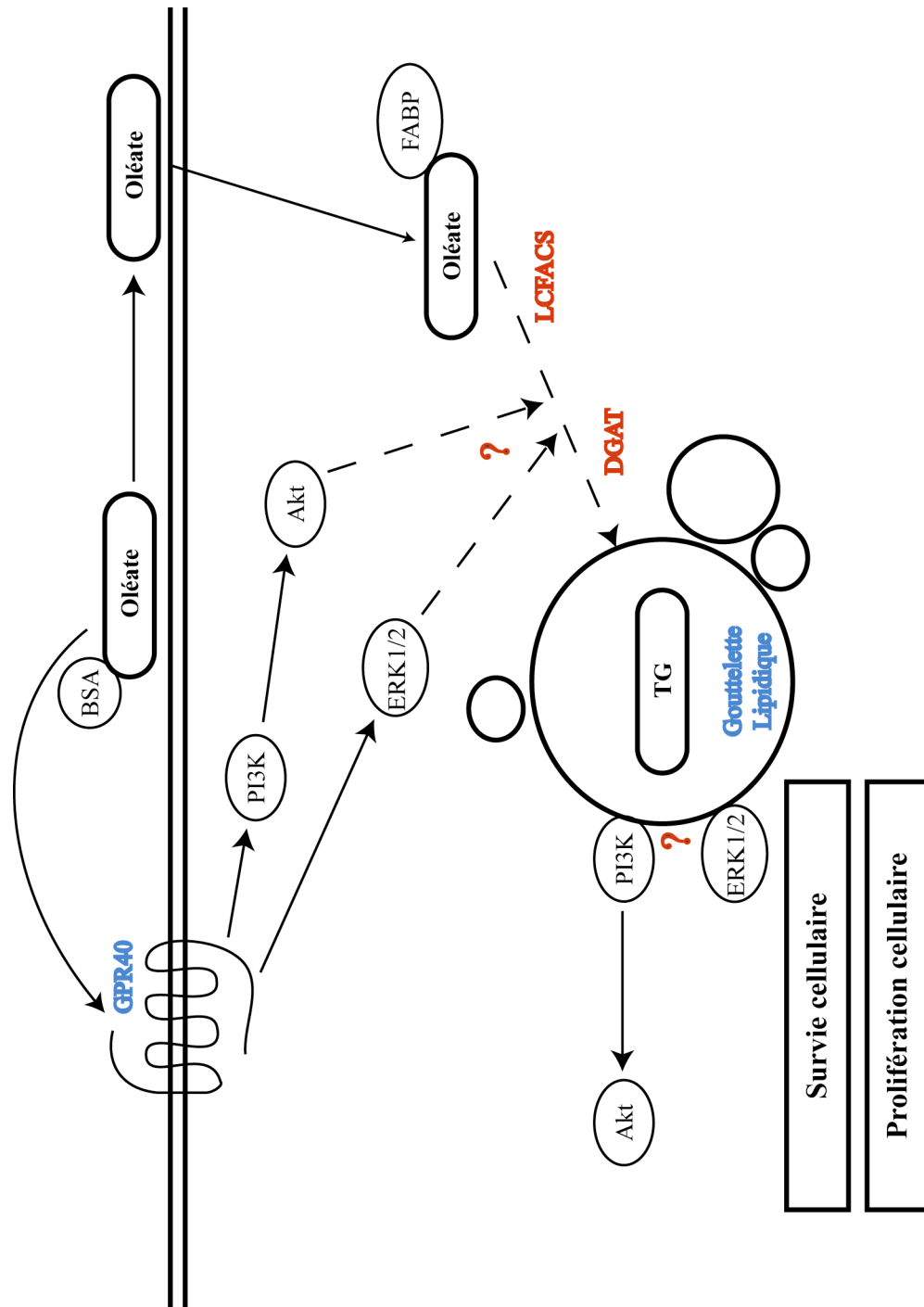


Figure 18 : Modèle de travail.

## Perspectives

### Rôle du métabolisme des acides gras dans les effets de l'oléate.

#### Implication du métabolisme de l'oléate dans son effet prolifératif.

L'oléate pouvant entrer directement dans les cellules par diffusion passive, sa métabolisation pourrait jouer un rôle dans l'activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2 et dans la prolifération cellulaire. Nous savons qu'une accumulation importante de triglycérides dans le cytoplasme des cellules est un facteur essentiel pour l'induction de l'effet protecteur de l'oléate sur les cellules de cancer du sein (Przybytkowski *et al*, 2007). Afin de déterminer si l'accumulation de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques jouerait également un rôle dans la prolifération induite par l'oléate, nous utiliserons des inhibiteurs des enzymes LCFACS et DGAT, lesquelles sont impliquées dans le métabolisme de l'oléate. Le triacsin C, un inhibiteur de LCFACS, empêche la conversion des acides gras en AG-CoA, la première étape dans la métabolisation de l'oléate (Tomoda *et al*, 1987). La DGAT, enzyme responsable de la conversion des diglycérides en triglycérides, pour laquelle divers inhibiteurs ont été récemment caractérisés, sera également inhibée (Lee *et al*, 2008; Zhao *et al*, 2008). Nous examinerons l'effet de ces inhibiteurs sur la formation des gouttelettes lipidiques, sur la deuxième vague de phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 et sur la prolifération cellulaire induites par un traitement à l'oléate. La deuxième vague d'activation des voies Akt et ERK1/2, observée entre 2 et 4 h après le début du traitement et soutenue dans le temps, corrèle avec l'apparition des gouttelettes lipidiques et pourrait être liée au métabolisme de l'oléate. L'inhibition du métabolisme de l'oléate par ces inhibiteurs pharmacologiques devrait réduire la synthèse des triglycérides et donc diminuer la formation des gouttelettes lipidiques, principalement constituées de triglycérides. Une diminution de la deuxième vague d'activation des voies Akt et ERK1/2 et de la prolifération en réponse à l'oléate et suite à l'utilisation des inhibiteurs de LCFACS et de DGAT signifierait l'implication du métabolisme de l'oléate dans ces effets.

### **Translocation des principales protéines des voies de signalisation Akt et ERK1/2 aux gouttelettes lipidiques.**

Une association positive entre la formation des gouttelettes lipidiques et l'induction de la deuxième vague de phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 par l'oléate nous amènerait à étudier la co-localisation de ces protéines avec les gouttelettes. Yu et al. (1998; 2000) ont montré que PI3K et ERK1/2 peuvent co-localiser avec ces organelles. L'oléate induit la formation d'un sous-groupe de gouttelettes lipidiques présentant un schéma d'expression protéique différent des gouttelettes préexistantes (Ohsaki *et al*, 2006; Wolins *et al*, 2005; Wolins *et al*, 2003); ERK1/2, PI3K et possiblement Akt pourraient être présentes à la surface de ces gouttelettes lipidiques. Nous effectuerons une courbe de suivi temps-réponse par immunofluorescence sur des cellules MDA-MB-231 et DU145 ayant reçu un traitement à l'oléate entre 10 minutes et 10 heures. Nous suivrons la localisation de PI3K, Akt, phospho-Akt, ERK1/2, phospho-ERK1/2, adipophiline et TIP47, une protéine de la famille des périlipines habituellement associée aux gouttelettes lipidiques formées suite à un traitement aux acides gras à longues chaînes (Ohsaki *et al*, 2006). Cet essai nous permettra de déterminer la localisation subcellulaire des protéines des voies de signalisation Akt et ERK1/2 par rapport aux gouttelettes lors d'un traitement à l'oléate et le moment de leur recrutement éventuel. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines phosphorylées et totales nous permettra de connaître leur statut d'activation au moment de ce recrutement afin de déterminer si leur phosphorylation pourrait être la cause ou encore la conséquence de leur co-localisation aux gouttelettes lipidiques.

## **Rôle de GPR40 dans les effets de l'oléate.**

### **Implication de GPR40 dans la deuxième vague de phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2 induite par l'oléate.**

Un traitement à l'oléate entraîne deux vagues d'activation des voies Akt et ERK1/2. Afin de déterminer si GPR40 serait impliqué dans la deuxième vague d'activation d'Akt et d'ERK1/2, nous examinerons l'effet de la toxine de pertussis et du siGPR40 #1 sur la phosphorylation des protéines Akt et ERK1/2 induite par un traitement à l'oléate sur une durée de 10 heures. Nous utiliserons également l'agoniste GW9508 de GPR40 et GPR120 pour un traitement prolongé, de 10 minutes à 10 heures, afin d'examiner son effet sur la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 à plus long terme. L'incapacité de la toxine de pertussis et du siGPR40 #1 à inhiber et du GW9508 à induire la deuxième vague de phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 indiqueraient que GPR40 ne serait pas impliqué dans cet effet de l'oléate.

### **Implication de GPR40 dans la promotion de la lipogénèse.**

L'activation rapide des voies de signalisation Akt et ERK1/2 par GPR40 ne semble pas nécessaire à l'induction de la prolifération par l'oléate. En effet, l'utilisation du siGPR40 #1 ne semble pas moduler l'effet de l'oléate sur la prolifération. La phosphorylation rapide d'Akt et d'ERK1/2 lors de l'activation de GPR40 pourrait néanmoins préparer les cellules à l'augmentation de la lipogénèse en activant certaines enzymes du métabolisme de l'oléate, comme proposé dans la discussion, et ainsi faciliter l'induction de la prolifération par l'oléate. L'expression des enzymes ACL, ACC- $\alpha$ , FAS et GPAT sera étudiée par PCR en temps réel ainsi que par immunobuvardage de type Western, suite à un traitement à l'oléate, sur une courbe de suivi temps-réponse allant de 10 minutes à 4 heures, dans des cellules surexprimant GPR40 ou transfectées avec le siGPR40 #1. Cet essai nous permettra de déterminer si l'activation de GPR40 par l'oléate induit une modification de l'expression de ces enzymes impliquées dans le métabolisme des acides

gras et à quel moment celle-ci survient. Le recrutement des protéines ERK1/2, PI3K et Akt aux gouttelettes lipidiques pourrait également être influencé par l'activation de GPR40, en particulier si nous montrons que la relocalisation d'ERK1/2 et de PI3K/Akt aux gouttelettes lipidiques nécessiterait leur activation. Nous étudierons la localisation de ces protéines suite à la surexpression ou à la diminution de l'expression de GPR40.

L'activation de GPR40 par l'oléate pourrait également avoir d'autres rôles en rapport avec la lipogenèse. Un traitement de 24 h à l'oléate stimule la formation de gouttelettes lipidiques, principalement constituées de triglycérides (Przybytkowski *et al*, 2007). Une grande capacité d'entreposage des triglycérides dans les cellules est un pré-requis pour l'effet d'un traitement à l'oléate sur la survie pendant plusieurs jours en absence de sérum. GPR40, en modifiant l'expression de certaines enzymes du métabolisme de l'oléate, pourrait altérer le partitionnement des lipides dans la cellule, favorisant la synthèse de triglycérides au détriment d'autres types de lipides. Nous examinerons le partitionnement lipidique dans les cellules MDA-MB-231 et DU145 traitées à l'oléate suite à la surexpression de GPR40 et à sa diminution par siRNA afin de déterminer l'implication de GPR40 dans ce processus. Nous étudierons également la capacité de l'oléate à induire la survie à sept jours des cellules transfectées avec le siGPR40 #1 en absence de sérum. Ces expériences nous permettront de déterminer si l'effet d'un traitement à l'oléate sur la survie à long terme des cellules dans un milieu sans sérum passe par l'activation de GPR40.

### **Implication de GPR40 dans la migration, la différenciation et la progression tumorale.**

Le récepteur GPR40 pourrait être impliqué dans d'autres processus ou voies métaboliques. Un groupe a montré que l'oléate stimule la migration des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 (Navarro-Tito *et al*, 2009). Cette étude ayant été réalisée en absence de BSA, il serait important de vérifier cette information dans des conditions plus physiologiques. L'utilisation du siGPR40 #1 et de l'agoniste GW9508 dans des essais de recouvrement de blessures (« *Wound-Healing Assay* »), ainsi que dans des essais de

migration chimiotactique en chambre de Boyden, nous permettraient de déterminer si GPR40 est impliqué dans la migration induite par l'oléate.

L'augmentation du taux d'expression de GPR40 en fonction de la confluence des cellules pourrait indiquer un rôle pour ce récepteur dans la différenciation cellulaire ou encore dans la progression tumorale. Afin de déterminer si la surexpression de GPR40 serait une conséquence ou une cause de la différenciation des cellules épithéliales mammaires comme le suggère l'étude de Yonezawa *et al.* (2008), nous produirons des clones stables exprimant GPR40 à divers degrés en utilisant le vecteur d'expression pIRESpuro-GPR40 et sélectionnés à l'aide de la puromicine. Ces clones seront mis en culture dans des boîtes de Pétri recouvertes de Matrigel. En se différenciant, les cellules épithéliales mammaires changent de morphologie. Les cellules différenciées cultivées dans le Matrigel forment des sphéroïdes ressemblant à la structure glandulaire de la glande mammaire tandis que les cellules non-différenciées conservent une morphologie hétérogène et étalée (Wang *et al.*, 2000). Les cellules MDA-MB-231 possédant un phénotype de cellules non-différenciées lorsqu'elles sont cultivées dans le Matrigel, nous pourrions observer l'effet de la surexpression de GPR40 sur la différenciation de ces cellules.

Brièvement, afin d'étudier l'implication de GPR40 dans la promotion de la carcinogenèse *in vivo*, nous utiliserons des souris nues sur lesquelles nous implanterons des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 ou DU145, non-transfectées ou surexprimant le récepteur GPR40. Nous comparerons la promotion de la charge tumorale de ces groupes ainsi que l'apparition de métastases (nombre, grosseur, localisation). Nous soumettrons également les différents groupes de souris à des diètes contenant une proportion croissante d'acides gras insaturés afin de déterminer si un haut taux de ces acides gras dans la diète, et donc une forte activation du récepteur GPR40, serait nécessaire au rôle de GPR40 dans la promotion de la carcinogenèse.

## Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur les effets des différents types d'acides gras sur la prolifération et la survie cellulaires. Dans le laboratoire, nous avons montré que les acides gras insaturés induisent la prolifération des cellules de cancer du sein et de la prostate tandis que les acides gras saturés provoquent la mort de ces cellules. L'oléate, l'acide gras insaturé le plus abondant dans la diète, entraîne l'activation rapide des voies de signalisation Akt et ERK1/2 par un mécanisme impliquant le récepteur aux acides gras GPR40. La prolifération cellulaire induite par l'oléate se ferait par un processus indépendant de GPR40 impliquant le métabolisme des acides gras et la formation de gouttelettes lipidiques.

L'une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses est une prolifération incontrôlée. Plusieurs voies de signalisation responsables de la prolifération ou de la survie sont suractivées dans les cellules cancéreuses et ce, par de nombreux moyens complémentaires afin d'assurer le développement rapide des cancers. La lipogenèse et le métabolisme des acides gras sont également suractivés dans certains cancers, dont les cancers du sein et de la prostate. Il n'est pas étonnant de découvrir un mécanisme reliant ces deux phénomènes dans les cancers : les acides gras sécrétés par les cellules cancéreuses possédant une lipogenèse surabondante servent à la stimulation de récepteurs membranaires ce qui entraîne l'activation de voies de signalisation nécessaires à la prolifération. De telles interactions entre plusieurs voies métaboliques sont courantes dans les cancers, et parfois propre à un type particulier de cancer, ce qui rend la recherche complexe dans ce domaine. Chaque découverte nous rapproche d'une compréhension globale qui sera nécessaire à l'élaboration d'une stratégie visant à vaincre les différentes formes de cette terrible maladie.



## Bibliographie

Altomare DA, Testa JR (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**: 7455-64

An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ (1998) Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **273**: 7906-10

An S, Zheng Y, Bleu T (2000) Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem* **275**: 288-96

Arikawa K, Takawa N, Yamaguchi H, Sugimoto N, Kitayama J, Nagawa H, Takehara K, Takawa Y (2003) Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem* **278**: 32841-51

Balakrishnan A, Cramer S, Bandyopadhyay GK, Imagawa W, Yang J, Elias J, Beattie CW, Das Gupta TK, Nandi S (1989) Differential proliferative response to linoleate in cultures of epithelial cells from normal human breast and fibroadenomas. *Cancer Res* **49**: 857-62

Ballard-Barbash R, Swanson CA (1996) Body weight: estimation of risk for breast and endometrial cancers. *Am J Clin Nutr* **63**: 437S-41S

Balmano K, Cook SJ (1999) Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* **18**: 3085-97

Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (1999) Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **274**: 27776-85

Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Gross SC, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Saito K, Markwell SJ, Wang Y, Huggenvik J, Pauza ME, Iizumi M, Watabe K (2005) FAS

expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis. *Oncogene* **24**: 5389-95

Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JP, Jr., Roth RA (1999) Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem* **274**: 20281-6

Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F, Andreadis C, Thompson CB (2005) ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* **24**: 6314-22

Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J (2007) SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 215-22

Bergelin N, Blom T, Heikkila J, Lof C, Alam C, Balthasar S, Slotte JP, Hinkkanen A, Tornquist K (2009) Sphingosine kinase as an oncogene: autocrine sphingosine 1-phosphate modulates ML-1 thyroid carcinoma cell migration by a mechanism dependent on protein kinase C-alpha and ERK1/2. *Endocrinology* **150**: 2055-63

Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ (1997) Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* **17**: 277-303

Berwick DC, Hers I, Heesom KJ, Moule SK, Tavares JM (2002) The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J Biol Chem* **277**: 33895-900

Binns D, Januszewski T, Chen Y, Hill J, Markin VS, Zhao Y, Gilpin C, Chapman KD, Anderson RG, Goodman JM (2006) An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol* **173**: 719-31

Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, Rondinone CM, Theodorakis JL, Greenberg AS, Londos C (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* **36**: 1211-26

Bostrom P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, Fernandez-Rodriguez J, Ericson J, Nilsson T, Boren J, Olofsson SO (2007) SNARE proteins mediate

fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* **9**: 1286-93

Bostrom P, Rutberg M, Ericsson J, Holmdahl P, Andersson L, Frohman MA, Boren J, Olofsson SO (2005) Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 1945-51

Boucharaba A, Guillet B, Mena F, Hneino M, van Wijnen AJ, Philippe C, Oliver P (2009) Bioactive lipids lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate mediate breast cancer cell biological functions through distinct mechanisms. *Oncol Res* **18**: 173-84

Boyd NF, Stone J, Vogt KN, Connelly BS, Martin LJ, Minkin S (2003) Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *Br J Cancer* **89**: 1672-85

Boyer JL, Waldo GL, Harden TK (1992) Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J Biol Chem* **267**: 25451-6

Bradley EW, Ruan MM, Vrable A, Oursler MJ (2008) Pathway crosstalk between Ras/Raf and PI3K in promotion of M-CSF-induced MEK/ERK-mediated osteoclast survival. *J Cell Biochem* **104**: 1439-51

Brandt DR, Ross EM (1985) GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates. *J Biol Chem* **260**: 266-72

Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R (2004) Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **279**: 46835-42

Brasaemle DL, Levin DM, Adler-Wailes DC, Londos C (2000a) The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta* **1483**: 251-62

Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C (2000b) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* **275**: 38486-93

Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, McCoy DC, Kenakin TP, Andrews JL, Ammala C, Fornwald JA, Ignar DM, Jenkinson S (2006) Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol* **148**: 619-28

Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr., Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* **278**: 11303-11

Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ (2003) The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* **278**: 11312-9

Brunelle JK, Letai A (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* **122**: 437-41

Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV (2005) RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* **65**: 6719-25

Calle EE, Kaaks R (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* **4**: 579-91

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* **348**: 1625-38

Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. (1999) Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* **341**: 1097-105

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**: 1318-21

Carmen GY, Victor SM (2006) Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* **18**: 401-8

Carmichael AR (2006) Obesity and prognosis of breast cancer. *Obes Rev* **7**: 333-40

Carroll KK, Hopkins GJ (1979) Dietary polyunsaturated fat versus saturated fat in relation to mammary carcinogenesis. *Lipids* **14**: 155-8

Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC (2003) Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci* **73**: 1683-90

Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D (1998) Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* **18**: 1429-34

Chan AM, Fleming TP, McGovern ES, Chedid M, Miki T, Aaronson SA (1993) Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G alpha 12 gene product. *Mol Cell Biol* **13**: 762-8

Chan PC, Ferguson KA, Dao TL (1983) Effects of different dietary fats on mammary carcinogenesis. *Cancer Res* **43**: 1079-83

Chang BH, Li L, Paul A, Taniguchi S, Nannegari V, Heird WC, Chan L (2006) Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol* **26**: 1063-76

Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-68

Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 167-203

Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG (2001) Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* **50**: 1771-7

Cohen LA, Thompson DO, Maeura Y, Choi K, Blank ME, Rose DP (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

Connolly JM, Coleman M, Rose DP (1997) Effects of dietary fatty acids on DU145 human prostate cancer cell growth in athymic nude mice. *Nutr Cancer* **29**: 114-9

Coso OA, Teramoto H, Simonds WF, Gutkind JS (1996) Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J Biol Chem* **271**: 3963-6

Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369**: 418-20

Dalen KT, Dahl T, Holter E, Arntsen B, Londos C, Sztalryd C, Nebb HI (2007) LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 210-27

Daniels C, Noy N, Zakim D (1985) Rates of hydration of fatty acids bound to unilamellar vesicles of phosphatidylcholine or to albumin. *Biochemistry* **24**: 3286-92

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-41

Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* **6**: 41-51

Dayton S, Hashimoto S, Wollman J (1977) Effect of high-oleic and high-linoleic safflower oils on mammary tumors induced in rats by 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene. *J Nutr* **107**: 1353-60

De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV (2003) RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* **63**: 3799-804

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**: 3499-511

Dogan S, Hu X, Zhang Y, Maihle NJ, Grande JP, Cleary MP (2007) Effects of high-fat diet and/or body weight on mammary tumor leptin and apoptosis signaling pathways in MMTV-TGF-alpha mice. *Breast Cancer Res* **9**: R91

Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR, Craig RW (2004) MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* **23**: 5301-15

Dommels YE, Haring MM, Keestra NG, Alink GM, van Bladeren PJ, van Ommen B (2003) The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE(2) synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* **24**: 385-92

Doshi LS, Brahma MK, Sayyed SG, Dixit AV, Chandak PG, Pamidiboina V, Motiwala HF, Sharma SD, Nemmani KV (2009) Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. *Metabolism* **58**: 333-43

Downward J (1998) Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 49-54

du Toit PJ, van Aswegen CH, du Plessis DJ (1996) The effect of essential fatty acids on growth and urokinase-type plasminogen activator production in human prostate DU-145 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **55**: 173-7

Ducharme NA, Bickel PE (2008) Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* **149**: 942-9

Duroudier NP, Tulah AS, Sayers I (2009) Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy* **64**: 823-39

Edfalk S, Steneberg P, Edlund H (2008) Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* **57**: 2280-7

Efstathiou JA, Bae K, Shipley WU, Hanks GE, Pilepich MV, Sandler HM, Smith MR (2007) Obesity and mortality in men with locally advanced prostate cancer: analysis of RTOG 85-31. *Cancer* **110**: 2691-9

Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C (1992) Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8537-41

El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roudit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M (2003) Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* **144**: 4154-63

Erhardt P, Schremser EJ, Cooper GM (1999) B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol* **19**: 5308-15

Evans LM, Toline EC, Desmond R, Siegal GP, Hashim AI, Hardy RW (2009) Dietary stearate reduces human breast cancer metastasis burden in athymic nude mice. *Clin Exp Metastasis* **26**: 415-24

Ewertz M, Gill C (1990) Dietary factors and breast-cancer risk in Denmark. *Int J Cancer* **46**: 779-84



Ewings KE, Hadfield-Moorhouse K, Wiggins CM, Wickenden JA, Balmanno K, Gilley R, Degenhardt K, White E, Cook SJ (2007) ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J* **26**: 2856-67

Fang X, Yu S, LaPushin R, Lu Y, Furui T, Penn LZ, Stokoe D, Erickson JR, Bast RC, Jr., Mills GB (2000) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* **352 Pt 1**: 135-43

Fay MP, Freedman LS, Clifford CK, Midthune DN (1997) Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res* **57**: 3979-88

Feigelson HS, Jonas CR, Teras LR, Thun MJ, Calle EE (2004) Weight gain, body mass index, hormone replacement therapy, and postmenopausal breast cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**: 220-4

Ferre P (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* **53 Suppl 1**: S43-50

Fischer W, Krugel U (2007) P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem* **14**: 2429-55

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL (2002) Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* **288**: 1723-7

Fletcher JE, Lindorfer MA, DeFilippo JM, Yasuda H, Guilnard M, Garrison JC (1998) The G protein beta5 subunit interacts selectively with the Gq alpha subunit. *J Biol Chem* **273**: 636-44

Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* **280**: 1271-4

Fu Z, Tindall DJ (2008) FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* **27**: 2312-9

Fueller J, Becker M, Sienerth AR, Fischer A, Hotz C, Galmiche A (2008) C-RAF activation promotes BAD poly-ubiquitylation and turn-over by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **370**: 552-6

Fujimoto T, Ohsaki Y (2006) Cytoplasmic lipid droplets: rediscovery of an old structure as a unique platform. *Ann N Y Acad Sci* **1086**: 104-15

Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, Higashi Y, Kojima S, Takano T (2004) Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta* **1644**: 47-59

Fujiwara K, Maekawa F, Yada T (2005) Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca<sup>2+</sup> signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca<sup>2+</sup> channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**: E670-7

Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, Gutkind JS (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* **274**: 5868-79

Galanis DJ, Kolonel LN, Lee J, Le Marchand L (1998) Anthropometric predictors of breast cancer incidence and survival in a multi-ethnic cohort of female residents of Hawaii, United States. *Cancer Causes Control* **9**: 217-24

Garton AJ, Yeaman SJ (1990) Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *Eur J Biochem* **191**: 245-50

Gibbs TC, Rubio MV, Zhang Z, Xie Y, Kipp KR, Meier KE (2009) Signal transduction responses to lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in human prostate cancer cells. *Prostate* **69**: 1493-506

Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC (1993) A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**: 1571-9

Glatz JF, Borchers T, Spener F, van der Vusse GJ (1995) Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **52**: 121-7

Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK, Yeung RS, Walker CL, Noonan D, Kwiatkowski DJ, Chou MM, Panettieri RA, Jr., Krymskaya VP (2002) Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM). *J Biol Chem* **277**: 30958-67

Gong Z, Agalliu I, Lin DW, Stanford JL, Kristal AR (2007) Obesity is associated with increased risks of prostate cancer metastasis and death after initial cancer diagnosis in middle-aged men. *Cancer* **109**: 1192-202

Gotoh C, Hong YH, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song SH, Choi KC, Adachi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Sasaki S, Roh SG (2007) The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 591-7

Grammatikos SI, Subbaiah PV, Victor TA, Miller WM (1994) n-3 and n-6 fatty acid processing and growth effects in neoplastic and non-cancerous human mammary epithelial cell lines. *Br J Cancer* **70**: 219-27

Gras D, Chanez P, Urbach V, Vachier I, Godard P, Bonnans C (2009) Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**: L970-8

Greenberg AS, Shen WJ, Muliro K, Patel S, Souza SC, Roth RA, Kraemer FB (2001) Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* **276**: 45456-61

Hamilton JA (1998) Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* **39**: 467-81

Hamilton JA (2007) New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**: 355-61

- Hamilton JA, Guo W, Kamp F (2002) Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? *Mol Cell Biochem* **239**: 17-23
- Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y (2003) Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* **278**: 31861-70
- Hardy S, Langelier Y, Prentki M (2000) Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* **60**: 6353-8
- Hardy S, St-Onge GG, Joly E, Langelier Y, Prentki M (2005) Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* **280**: 13285-91
- Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB (2005) ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* **8**: 311-21
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* **135**: 1071-83
- Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M (2009) G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov Today* **14**: 231-40
- Heitmann BL, Frederiksen P (2007) Imprecise methods may both obscure and aggravate a relation between fat and breast cancer. *Eur J Clin Nutr* **61**: 925-7
- Hermans E (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**: 25-44
- Hertz R, Magenheim J, Berman I, Bar-Tana J (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* **392**: 512-6

Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD, Gilman AG (1987) Effects of Mg<sup>2+</sup> and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J Biol Chem* **262**: 762-6

Hildebrandt JD, Sekura RD, Codina J, Iyengar R, Manclark CR, Birnbaumer L (1983) Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* **302**: 706-9

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **11**: 90-4

Hong YH, Nishimura Y, Hishikawa D, Tsuzuki H, Miyahara H, Gotoh C, Choi KC, Feng DD, Chen C, Lee HG, Katoh K, Roh SG, Sasaki S (2005) Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* **146**: 5092-9

Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, Iscovich JM, Yuan JM, Katsouyanni K, Lubin F, Marubini E, Modan B, Rohan T, et al. (1990) Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* **82**: 561-9

Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S (1990) Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* **46**: 796-800

Hsing AW, Deng J, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Stanczyk FZ, Benichou J, Xie T, Gao YT (2000) Body size and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**: 1335-41

Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M, Margolskee RF (1999) Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci* **2**: 1055-62

Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE, Willett WC (1997) Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA* **278**: 1407-11

Huguet EL, Smith K, Bicknell R, Harris AL (1995) Regulation of Wnt5a mRNA expression in human mammary epithelial cells by cell shape, confluence, and hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* **270**: 12851-6

Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR, et al. (1996) Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N Engl J Med* **334**: 356-61

Hurst JH, Hooks SB (2009) Lysophosphatidic acid stimulates cell growth by different mechanisms in SKOV-3 and Caov-3 ovarian cancer cells: distinct roles for Gi- and Rho-dependent pathways. *Pharmacology* **83**: 333-47

Hussain MM, Shi J, Dreizen P (2003) Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* **44**: 22-32

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**: 648-57

Ip C, Carter CA, Ip MM (1985) Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* **45**: 1997-2001

Ishii S, Noguchi K, Yanagida K (2009) Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **89**: 57-65

Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* **422**: 173-6

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6**: 1122-8

Jones SM, Kazlauskas A (2001) Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nat Cell Biol* **3**: 165-72

Kahan C, Seuwen K, Meloche S, Pouyssegur J (1992) Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J Biol Chem* **267**: 13369-75

Karmali RA, Reichel P, Cohen LA, Terano T, Hirai A, Tamura Y, Yoshida S (1987) The effects of dietary omega-3 fatty acids on the DU-145 transplantable human prostatic tumor. *Anticancer Res* **7**: 1173-9

Katsouyanni K, Trichopoulou A, Stuver S, Garas Y, Kritselis A, Kyriakou G, Stoikidou M, Boyle P, Trichopoulos D (1994) The association of fat and other macronutrients with breast cancer: a case-control study from Greece. *Br J Cancer* **70**: 537-41

Katsuma S, Hatae N, Yano T, Ruike Y, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto G (2005) Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem* **280**: 19507-15

Katz EB, Boylan ES (1989) Effect of the quality of dietary fat on tumor growth and metastasis from a rat mammary adenocarcinoma. *Nutr Cancer* **12**: 343-50

Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V (2008) The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes* **57**: 2432-7

Kebede MA, Alquier T, Latour MG, Poitout V (2009) Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes Obes Metab* **11 Suppl 4**: 10-20

Kelavkar UP, Hutzley J, Dhir R, Kim P, Allen KG, McHugh K (2006) Prostate tumor growth and recurrence can be modulated by the omega-6:omega-3 ratio in diet: athymic mouse xenograft model simulating radical prostatectomy. *Neoplasia* **8**: 112-24

Kinoshita T, Shirouzu M, Kamiya A, Hashimoto K, Yokoyama S, Miyajima A (1997) Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic function of p21Ras in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Oncogene* **15**: 619-27

Knowles LM, Yang C, Osterman A, Smith JW (2008) Inhibition of fatty-acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4. *J Biol Chem* **283**: 31378-84

Kobayashi N, Barnard RJ, Said J, Hong-Gonzalez J, Corman DM, Ku M, Doan NB, Gui D, Elashoff D, Cohen P, Aronson WJ (2008) Effect of low-fat diet on development of prostate cancer and Akt phosphorylation in the Hi-Myc transgenic mouse model. *Cancer Res* **68**: 3066-73

Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ (2005) Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* **128**: 2054-65

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* **271**: 31372-8

Kolonel LN, Nomura AM, Hinds MW, Hirohata T, Hankin JH, Lee J (1983) Role of diet in cancer incidence in Hawaii. *Cancer Res* **43**: 2397s-2402s

Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B (2003) A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 406-10

Kuhajda FP (2000) Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* **16**: 202-8

Kushi L, Giovannucci E (2002) Dietary fat and cancer. *Am J Med* **113 Suppl 9B**: 63S-70S

Ladas S, Arapakis G, Malamou-Ladas H, Palikaris G, Arseni A (1979) Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography. *J Clin Pathol* **32**: 1163-7



Lai JY, Pittelkow MR (2004) Culture confluence regulates gene expression of normal human keratinocytes. *Wound Repair Regen* **12**: 613-7

Lan H, Hoos LM, Liu L, Tetzloff G, Hu W, Abbondanzo SJ, Vassileva G, Gustafson EL, Hedrick JA, Davis HR (2008) Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes* **57**: 2999-3006

Lasekan JB, Clayton MK, Gendron-Fitzpatrick A, Ney DM (1990) Dietary olive and safflower oils in promotion of DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats. *Nutr Cancer* **13**: 153-63

Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G, Zechner R (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* **3**: 309-19

Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V (2007) GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* **56**: 1087-94

Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G, Pouyssegur J (1996) A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res* **2**: 49-58

Le Gall M, Chambard JC, Breitmayer JP, Grall D, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E (2000) The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol Biol Cell* **11**: 1103-12

Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* **278**: 25481-9

Lee MM, Wang RT, Hsing AW, Gu FL, Wang T, Spitz M (1998) Case-control study of diet and prostate cancer in China. *Cancer Causes Control* **9**: 545-52

- Lee SW, Rho MC, Choi JH, Kim K, Choi YS, Lee HS, Kim YK (2008) Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by phenylpyropenes produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. *J Microbiol Biotechnol* **18**: 1785-8
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH (1994) Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10878-82
- Lehner R, Cui Z, Vance DE (1999) Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochem J* **338** ( Pt 3): 761-8
- LeMarchand L, Kolonel LN, Nomura AM (1985) Breast cancer survival among Hawaii Japanese and Caucasian women. Ten-year rates and survival by place of birth. *Am J Epidemiol* **122**: 571-8
- Levine T (2004) Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends Cell Biol* **14**: 483-90
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139
- Li MH, Sanchez T, Yamase H, Hla T, Oo ML, Pappalardo A, Lynch KR, Lin CY, Ferrer F (2009) S1P/S1P1 signaling stimulates cell migration and invasion in Wilms tumor. *Cancer Lett* **276**: 171-9
- Li Y, Sternweis PM, Charnecki S, Smith TF, Gilman AG, Neer EJ, Kozasa T (1998) Sites for Galpha binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase Cbeta and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **273**: 16265-72
- Lindsted KD, Singh PN (1998) Body mass and 26 y risk of mortality among men who never smoked: a re-analysis among men from the Adventist Mortality Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* **22**: 544-8

Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3077-82

Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE (2001) Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem* **276**: 14890-5

Liu P, Bartz R, Zehmer JK, Ying YS, Zhu M, Serrero G, Anderson RG (2007) Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 784-93

Lizcano JM, Morrice N, Cohen P (2000) Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J* **349**: 547-57

Lof M, Sandin S, Lagiou P, Hilakivi-Clarke L, Trichopoulos D, Adami HO, Weiderpass E (2007) Dietary fat and breast cancer risk in the Swedish women's lifestyle and health cohort. *Br J Cancer* **97**: 1570-6

Lof M, Weiderpass E (2009) Impact of diet on breast cancer risk. *Curr Opin Obstet Gynecol* **21**: 80-5

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* **325**: 321-6

Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Adler-Wailes DC, Levin DM, Kimmel AR, Rondinone CM (1999) On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci* **892**: 155-68

Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR (2005) Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie* **87**: 45-9

Ma D, Lu L, Boneva NB, Warashina S, Kaplamadzhiev DB, Mori Y, Nakaya MA, Kikuchi M, Tonchev AB, Okano H, Yamashima T (2008a) Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus. *Hippocampus* **18**: 326-33

Ma D, Tao B, Warashina S, Kotani S, Lu L, Kaplamadzhiev DB, Mori Y, Tonchev AB, Yamashima T (2007) Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the central nervous system of adult monkeys. *Neurosci Res* **58**: 394-401

Ma J, Li H, Giovannucci E, Mucci L, Qiu W, Nguyen PL, Gaziano JM, Pollak M, Stampfer MJ (2008b) Prediagnostic body-mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality in men with prostate cancer: a long-term survival analysis. *Lancet Oncol* **9**: 1039-47

Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**: 179-93

MacInnis RJ, English DR (2006) Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes Control* **17**: 989-1003

Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY (2001) Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* **50**: 69-76

Malek RL, Toman RE, Edsall LC, Wong S, Chiu J, Letterle CA, Van Brocklyn JR, Milstien S, Spiegel S, Lee NH (2001) Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J Biol Chem* **276**: 5692-9

Manning BD, Cantley LC (2003) Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* **28**: 573-6

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC (2002) Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* **10**: 151-62

Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, Speizer FE (1995) Body weight and mortality among women. *N Engl J Med* **333**: 677-85

Marchesan D, Rutberg M, Andersson L, Asp L, Larsson T, Boren J, Johansson BR, Olofsson SO (2003) A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. *J Biol Chem* **278**: 27293-300

Marshall JR, Qu Y, Chen J, Parpia B, Campbell TC (1992) Additional ecological evidence: lipids and breast cancer mortality among women aged 55 and over in China. *Eur J Cancer* **28A**: 1720-7

Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* **21**: 749-60

Mavropoulos JC, Buschemeyer WC, 3rd, Tewari AK, Rokhfeld D, Pollak M, Zhao Y, Febbo PG, Cohen P, Hwang D, Devi G, Demark-Wahnefried W, Westman EC, Peterson BL, Pizzo SV, Freedland SJ (2009) The effects of varying dietary carbohydrate and fat content on survival in a murine LNCaP prostate cancer xenograft model. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* **2**: 557-65

McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F (1999) Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res* **40**: 1371-83

McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 131-6

McTiernan A (2003) Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist* **8**: 326-34

Meloche S (1995) Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J Cell Physiol* **163**: 577-88

Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J (1992) Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* **6**: 845-54

Mettlin C, Selenskas S, Natarajan N, Huben R (1989) Beta-carotene and animal fats and their relationship to prostate cancer risk. A case-control study. *Cancer* **64**: 605-12

Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH (2007) Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 923-40

Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB (2007) Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Cancer* **109**: 2712-49

Mills GB, Moolenaar WH (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 582-91

Mills PK, Beeson WL, Phillips RL, Fraser GE (1989) Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in Adventist men. *Cancer* **64**: 598-604

Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, Oliver B, Kimmel AR (2002) Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, Drosophila, and Dictyostelium. *J Biol Chem* **277**: 32253-7

Miyauchi S, Hirasawa A, Iga T, Liu N, Itsubo C, Sadakane K, Hara T, Tsujimoto G (2009) Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**: 427-34

Mizuno N, Itoh H (2009) Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals* **17**: 42-54

Moorehead RA, Fata JE, Johnson MB, Khokha R (2001) Inhibition of mammary epithelial apoptosis and sustained phosphorylation of Akt/PKB in MMTV-IGF-II transgenic mice. *Cell Death Differ* **8**: 16-29

Morgan NG, Dhayal S (2009) G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell. *Biochem Pharmacol* **78**: 1419-27

Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC, Stefanick ML, McTiernan A (2002) Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* **13**: 741-51

Motaung E, Prinsloo SE, van Aswegen CH, du Toit PJ, Becker PJ, du Plessis DJ (1999) Cytotoxicity of combined essential fatty acids on a human prostate cancer cell line. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **61**: 331-7

Muir CS, Nectoux J, Staszewski J (1991) The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol* **30**: 133-40

Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N (2008) Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **371**: 707-12

Murayama T, Ui M (1983) Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem* **258**: 3319-26

Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, Nakata M, Yano T, Shimakawa K, Taketomi S, Takeuchi K, Odaka H, Kaisho Y (2009) Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes* **58**: 1067-76

Nakao S, Fujii A, Niederman R (1992) Alteration of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in resting and stimulated human neutrophils by short-chain carboxylic acids at neutral pH. *Infect Immun* **60**: 5307-11

Navarro-Tito N, Soto-Guzman A, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Salazar EP (2009) Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol*

Newmark HL (1997) Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**: 1101-3

Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C, Olde B (2003) Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 1047-52

Nyunoya T, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Hunninghake GW (2005) Macrophages survive hyperoxia via prolonged ERK activation due to phosphatase down-regulation. *J Biol Chem* **280**: 26295-302

Ogawa T, Hirose H, Miyashita K, Saito I, Saruta T (2005) GPR40 gene Arg211His polymorphism may contribute to the variation of insulin secretory capacity in Japanese men. *Metabolism* **54**: 296-9

Ohsaki Y, Maeda T, Maeda M, Tauchi-Sato K, Fujimoto T (2006) Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft. *Biochem Biophys Res Commun* **347**: 279-87

Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Okazaki H, Chang K, Yatomi Y, Shigematsu H, Takuwa Y (1998) EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* **273**: 27104-10

Olofsson SO, Bostrom P, Andersson L, Rutberg M, Levin M, Perman J, Boren J (2008) Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Curr Opin Lipidol* **19**: 441-7

Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypohagic agents. *Cell Metab* **3**: 167-75



Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T (2005) Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci* **118**: 2601-11

Park Y, Allen KG, Shultz TD (2000) Modulation of MCF-7 breast cancer cell signal transduction by linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res* **20**: 669-76

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153-83

Perez DM, Karnik SS (2005) Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* **57**: 147-61

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP (1996) Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res* **56**: 2745-7

Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A (2005) PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**: 6465-81

Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* **8**: 224-36

Potischman N, Swanson CA, Siiteri P, Hoover RN (1996) Reversal of relation between body mass and endogenous estrogen concentrations with menopausal status. *J Natl Cancer Inst* **88**: 756-8

Prentice RL, Pepe M, Self SG (1989) Dietary fat and breast cancer: a quantitative assessment of the epidemiological literature and a discussion of methodological issues. *Cancer Res* **49**: 3147-56

Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* **51 Suppl 3**: S405-13

Price JT, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D, Thompson EW (1999) Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res* **59**: 5475-8

Przybytkowski E, Joly E, Nolan CJ, Hardy S, Francoeur AM, Langelier Y, Prentki M (2007) Upregulation of cellular triacylglycerol - free fatty acid cycling by oleate is associated with long-term serum-free survival of human breast cancer cells. *Biochem Cell Biol* **85**: 301-10

Ray K, Kunsch C, Bonner LM, Robishaw JD (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J Biol Chem* **270**: 21765-71

Reyes N, Reyes I, Tiwari R, Geliebter J (2004) Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett* **209**: 25-35

Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**: 281-312

Robenek H, Hofnagel O, Buers I, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ (2006) Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci* **119**: 4215-24

Robillard L, Ethier N, Lachance M, Hebert TE (2000) Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cell Signal* **12**: 673-82

Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacobs EJ, Chao A, Thun MJ (2001) Body mass index, height, and prostate cancer mortality in two large cohorts of adult men in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**: 345-53

Rohan TE, Howe GR, Burch JD, Jain M (1995) Dietary factors and risk of prostate cancer: a case-control study in Ontario, Canada. *Cancer Causes Control* **6**: 145-54

Rohan TE, McMichael AJ, Baghurst PA (1988) A population-based case-control study of diet and breast cancer in Australia. *Am J Epidemiol* **128**: 478-89

Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* **286**: 1738-41

Rose DP, Boyar AP, Wynder EL (1986) International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption. *Cancer* **58**: 2363-71

Rose DP, Connolly JM (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**: 7139-44

Rose DP, Connolly JM (1991) Effects of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors on the growth of two human prostate cancer cell lines. *Prostate* **18**: 243-54

Rose DP, Connolly JM (1997) Dietary fat and breast cancer metastasis by human tumor xenografts. *Breast Cancer Res Treat* **46**: 225-37

Rose DP, Connolly JM, Liu XH (1994) Effects of linoleic acid on the growth and metastasis of two human breast cancer cell lines in nude mice and the invasive capacity of these cell lines in vitro. *Cancer Res* **54**: 6557-62

Rose DP, Hatala MA, Connolly JM, Rayburn J (1993) Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res* **53**: 4686-90

Ross EM, Gilman AG (1977) Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* **252**: 6966-9

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13489-94

Rozengurt E (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* **213**: 589-602

Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P (2004) Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 168-75

Sabatini DM (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* **6**: 729-34

Salehi A, Flodgren E, Nilsson NE, Jimenez-Feltstrom J, Miyazaki J, Owman C, Olde B (2005) Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res* **322**: 207-15

Sanchez T, Hla T (2004) Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem* **92**: 913-22

Sanchez T, Thangada S, Wu MT, Kontos CD, Wu D, Wu H, Hla T (2005) PTEN as an effector in the signaling of antimigratory G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4312-7

Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF (1997) A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 543-7

Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R (2000) Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* **283**: 485-91

Schmitt JM, Stork PJ (2002) PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell* **9**: 85-94

Schnell S, Schaefer M, Schofl C (2007) Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol* **263**: 173-80

Schuurman AG, van den Brandt PA, Dorant E, Brants HA, Goldbohm RA (1999) Association of energy and fat intake with prostate carcinoma risk: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer* **86**: 1019-27

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**: 2501-14

Sebolt-Leopold JS, Herrera R (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 937-47

Sekimoto T, Fukumoto M, Yoneda Y (2004) 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J* **23**: 1934-42

Senzaki H, Iwamoto S, Ogura E, Kiyozuka Y, Arita S, Kurebayashi J, Takada H, Hioki K, Tsubura A (1998) Dietary effects of fatty acids on growth and metastasis of KPL-1 human breast cancer cells in vivo and in vitro. *Anticancer Res* **18**: 1621-7

Severson RK, Nomura AM, Grove JS, Stemmermann GN (1989) A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res* **49**: 1857-60

Seyffert WA, Jr., Madison LL (1967) Physiologic effects of metabolic fuels on carbohydrate metabolism. I. Acute effect of elevation of plasma free fatty acids on hepatic glucose output, peripheral glucose utilization, serum insulin, and plasma glucagon levels. *Diabetes* **16**: 765-76

Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD (2005) Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 97-104

Shaw CS, Jones DA, Wagenmakers AJ (2008) Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres. *Histochem Cell Biol* **129**: 65-72

Shen WJ, Sridhar K, Bernlohr DA, Kraemer FB (1999) Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5528-32

Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* **63**: 963-6

Sieri S, Krogh V, Ferrari P, Berrino F, Pala V, Thiebaut AC, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Jakobsen MU, Clavel-Chapelon F, Chajes V, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nothlings U, Trichopoulou A, Naska A, Lagiou P, Panico S, Palli D, Vineis P, Tumino R, Lund E, Kumle M, Skeie G, Gonzalez CA, Ardanaz E, Amiano P, Tormo MJ, Martinez-Garcia C, Quiros JR, Berglund G, Gullberg B, Hallmans G, Lenner P, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Peeters PH, van Gils CH, Key TJ, Crowe FL, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Slimani N, Jenab M, Norat T, Riboli E (2008) Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* **88**: 1304-12

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802-8

Smith-Warner SA, Spiegelman D, Adami HO, Beeson WL, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldbohm RA, Graham S, Kushi LH, Miller AB, Rohan TE, Speizer FE, Toniolo P, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Hunter DJ (2001) Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Cancer* **92**: 767-74

Smith NJ, Stoddart LA, Devine NM, Jenkins L, Milligan G (2009) The action and mode of binding of thiazolidinedione ligands at free fatty acid receptor 1. *J Biol Chem* **284**: 17527-39

Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* **253**: 688-97

Smith SK, Limbird LE (1982) Evidence that human platelet alpha-adrenergic receptors coupled to inhibition of adenylate cyclase are not associated with the subunit of adenylate cyclase ADP-ribosylated by cholera toxin. *J Biol Chem* **257**: 10471-8

Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* **379**: 369-74

Soto-Guzman A, Robledo T, Lopez-Perez M, Salazar EP (2008) Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **294**: 81-91

Souza SC, Muliro KV, Liscum L, Lien P, Yamamoto MT, Schaffer JE, Dallal GE, Wang X, Kraemer FB, Obin M, Greenberg AS (2002) Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J Biol Chem* **277**: 8267-72

Souza SC, Palmer HJ, Kang YH, Yamamoto MT, Muliro KV, Paulson KE, Greenberg AS (2003) TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* **89**: 1077-86

Sprang SR (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* **66**: 639-78

Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T (2001) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* **8**: 1063-73

Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD (1996) Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* **97**: 2728-35

Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD (1997) The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* **100**: 398-403

Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H (2005) The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* **1**: 245-58

Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* **77**: 83-93

Stoll BA (2002) Upper abdominal obesity, insulin resistance and breast cancer risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**: 747-53

Su HW, Yeh HH, Wang SW, Shen MR, Chen TL, Kiela PR, Ghishan FK, Tang MJ (2007) Cell confluence-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) triggers epithelial dome formation via augmentation of sodium hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression. *J Biol Chem* **282**: 9883-94

Sugimoto Y, Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* **282**: 11613-7

Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, Jin J, Harper JW, Ericsson J (2005) Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* **1**: 379-91

Sutherland C, Leighton IA, Cohen P (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* **296 ( Pt 1)**: 15-9

Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G (2006) Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**: 358-65



Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgamal AA, Eelen M, Vercaeren I, Joniau S, Van Poppel H, Baert L, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G (2000) Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer* **88**: 176-9

Tabata K, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N (2007) The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **363**: 861-6

Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, Hayashi K, Kobori M (2004) A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem* **279**: 47438-45

Tan CP, Feng Y, Zhou YP, Eiermann GJ, Petrov A, Zhou C, Lin S, Salituro G, Meinke P, Mosley R, Akiyama TE, Einstein M, Kumar S, Berger JP, Mills SG, Thornberry NA, Yang L, Howard AD (2008) Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes* **57**: 2211-9

Tang WJ, Gilman AG (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* **254**: 1500-3

Tansey JT, Huml AM, Vogt R, Davis KE, Jones JM, Fraser KA, Brasaemle DL, Kimmel AR, Londos C (2003) Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J Biol Chem* **278**: 8401-6

Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR, Londos C (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6494-9

Targett-Adams P, Chambers D, Gledhill S, Hope RG, Coy JF, Girod A, McLauchlan J (2003) Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein. *J Biol Chem* **278**: 15998-6007

Thiebaut AC, Kipnis V, Chang SC, Subar AF, Thompson FE, Rosenberg PS, Hollenbeck AR, Leitzmann M, Schatzkin A (2007) Dietary fat and postmenopausal invasive breast

cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *J Natl Cancer Inst* **99**: 451-62

Thompson HJ, Zhu Z, Jiang W (2003) Dietary energy restriction in breast cancer prevention. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**: 133-42

Tinsley IJ, Schmitz JA, Pierce DA (1981) Influence of dietary fatty acids on the incidence of mammary tumors in the C3H mouse. *Cancer Res* **41**: 1460-5

Tomoda H, Igarashi K, Omura S (1987) Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacins. *Biochim Biophys Acta* **921**: 595-8

Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME (2003) The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* **2003**: RE5

Treinius I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R, Marshall CJ (1999) Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **19**: 321-9

Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Baron J, Greenberg ER, Willett WC (1997) Body size and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* **145**: 1011-9

Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R (2004) Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* **24**: 6539-49

Van Brocklyn J, Letterle C, Snyder P, Prior T (2002) Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta. *Cancer Lett* **181**: 195-204

Van de Sande T, Roskams T, Lerut E, Joniau S, Van Poppel H, Verhoeven G, Swinnen JV (2005) High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol* **206**: 214-9

Vinciguerra M, Carrozzino F, Peyrou M, Carlone S, Montesano R, Benelli R, Foti M (2009) Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN. *J Hepatol* **50**: 1132-41

Virdee K, Parone PA, Tolkovsky AM (2000) Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival. *Curr Biol* **10**: 1151-4

Voelker DR (2003) New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res* **44**: 441-9

Wall MA, Posner BA, Sprang SR (1998) Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure* **6**: 1169-83

Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR (2005) Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene* **24**: 3574-82

Wang J, John EM, Horn-Ross PL, Ingles SA (2008) Dietary fat, cooking fat, and breast cancer risk in a multiethnic population. *Nutr Cancer* **60**: 492-504

Wang J, Wu X, Simonavicius N, Tian H, Ling L (2006) Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem* **281**: 34457-64

Wang M, Liu YE, Ni J, Aygun B, Goldberg ID, Shi YE (2000) Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an omega-3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. *Cancer Res* **60**: 6482-7

Wang Y, Corr JG, Thaler HT, Tao Y, Fair WR, Heston WD (1995) Decreased growth of established human prostate LNCaP tumors in nude mice fed a low-fat diet. *J Natl Cancer Inst* **87**: 1456-62

Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA (1999) Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* **19**: 1871-80

Waterman E, Lockwood B (2007) Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev* **12**: 331-42

Wei W, Jin J, Schlisio S, Harper JW, Kaelin WG, Jr. (2005) The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **8**: 25-33

Weisiger RA (1985) Dissociation from albumin: a potentially rate-limiting step in the clearance of substances by the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1563-7

Weisiger RA, Ma WL (1987) Uptake of oleate from albumin solutions by rat liver. Failure to detect catalysis of the dissociation of oleate from albumin by an albumin receptor. *J Clin Invest* **79**: 1070-7

Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman BE, Roberts JM (2003) Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* **12**: 381-92

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

Welte MA, Gross SP, Postner M, Block SM, Wieschaus EF (1998) Developmental regulation of vesicle transport in Drosophila embryos: forces and kinetics. *Cell* **92**: 547-57

Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, et al. (1995) Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* **87**: 652-61

Wicha MS, Liotta LA, Kidwell WR (1979) Effects of free fatty acids on the growth of normal and neoplastic rat mammary epithelial cells. *Cancer Res* **39**: 426-35

Wickramasinghe NS, Jo H, McDonald JM, Hardy RW (1996) Stearate inhibition of breast cancer cell proliferation. A mechanism involving epidermal growth factor receptor and G-proteins. *Am J Pathol* **148**: 987-95

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-80

Willett WC (2001) Diet and breast cancer. *J Intern Med* **249**: 395-411

Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1995) Weight, weight change, and coronary heart disease in women. Risk within the 'normal' weight range. *JAMA* **273**: 461-5

Witte JS, Ursin G, Siemiatycki J, Thompson WD, Paganini-Hill A, Haile RW (1997) Diet and premenopausal bilateral breast cancer: a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* **42**: 243-51

Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE (2006) A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett* **580**: 5484-91

Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bickel PE (2005) S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem* **280**: 19146-55

Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel PE (2003) Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem* **278**: 37713-21

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-84

Wymann MP, Schneider R (2008) Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 162-76

Xie Y, Gibbs TC, Mukhin YV, Meier KE (2002) Role for 18:1 lysophosphatidic acid as an autocrine mediator in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **277**: 32516-26

Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM, Yanagisawa M (2004) Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1045-50

Xu Y, Fang XJ, Casey G, Mills GB (1995) Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells. *Biochem J* **309 ( Pt 3)**: 933-40

Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E (2006) Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* **16**: 1171-82

Yamauchi J, Nagao M, Kaziro Y, Itoh H (1997) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J Biol Chem* **272**: 27771-7

Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, Lang JY, Lai CC, Chang CJ, Huang WC, Huang H, Kuo HP, Lee DF, Li LY, Lien HC, Cheng X, Chang KJ, Hsiao CD, Tsai FJ, Tsai CH, Sahin AA, Muller WJ, Mills GB, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* **10**: 138-48

Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR, Sears R (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* **6**: 308-18

Yonezawa T, Haga S, Kobayashi Y, Katoh K, Obara Y (2008) Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **367**: 729-35

Yonezawa T, Katoh K, Obara Y (2004) Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 805-9

Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, Weller PF (1998) Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* **152**: 759-69

Yu W, Cassara J, Weller PF (2000) Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood* **95**: 1078-85

Zang M, Hayne C, Luo Z (2002) Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1. *J Biol Chem* **277**: 4395-405

Zang M, Waelde CA, Xiang X, Rana A, Wen R, Luo Z (2001) Microtubule integrity regulates Pak leading to Ras-independent activation of Raf-1. insights into mechanisms of Raf-1 activation. *J Biol Chem* **276**: 25157-65

Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R (2005) Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* **16**: 333-40

Zhao G, Souers AJ, Voorbach M, Falls HD, Droz B, Brodjian S, Lau YY, Iyengar RR, Gao J, Judd AS, Wagaw SH, Ravn MM, Engstrom KM, Lynch JK, Mulhern MM, Freeman J, Dayton BD, Wang X, Grihalde N, Fry D, Beno DW, Marsh KC, Su Z, Diaz GJ, Collins CA, Sham H, Reilly RM, Brune ME, Kym PR (2008) Validation of diacyl glycerolacyltransferase I as a novel target for the treatment of obesity and dyslipidemia using a potent and selective small molecule inhibitor. *J Med Chem* **51**: 380-3

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**: 245-52

Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, Pinn ML, Ronnett GV, Kuhajda FP (2003) Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res* **63**: 7330-7

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**: 1383-6

Zimmermann S, Moelling K (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* **286**: 1741-4

## Annexe 1

### Références des études répertoriées dans le tableau 1

- **Études épidémiologiques sur une diète riche en gras**

- **Études cas-contrôles**

- **Cancer du sein : Association directe**

1. Blackburn GL, Wang KA (2007) Dietary fat reduction and breast cancer outcome: results from the Women's Intervention Nutrition Study (WINS). *Am J Clin Nutr* **86**: s878-81
2. Datta K, Biswas J (2009) Influence of dietary habits, physical activity and affluence factors on breast cancer in East India: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev* **10**: 219-22
3. Ewertz M, Gill C (1990) Dietary factors and breast-cancer risk in Denmark. *Int J Cancer* **46**: 779-84
4. Ingram DM, Nottage E, Roberts T (1991) The role of diet in the development of breast cancer: a case-control study of patients with breast cancer, benign epithelial hyperplasia and fibrocystic disease of the breast. *Br J Cancer* **64**: 187-91
5. Kamarudin R, Shah SA, Hidayah N (2006) Lifestyle factors and breast cancer: a case-control study in Kuala Lumpur, Malaysia. *Asian Pac J Cancer Prev* **7**: 51-4
6. Levi F, La Vecchia C, Gulie C, Negri E (1993) Dietary factors and breast cancer risk in Vaud, Switzerland. *Nutr Cancer* **19**: 327-35
7. Miller AB, Kelly A, Choi NW, Matthews V, Morgan RW, Munan L, Burch JD, Feather J, Howe GR, Jain M (1978) A study of diet and breast cancer. *Am J Epidemiol* **107**: 499-509
8. Nunez C, Carbajal A, Belmonte S, Moreiras O, Varela G (1996) [A case control study of the relationship between diet and breast cancer in a sample from 3 Spanish



hospital populations. Effects of food, energy and nutrient intake]. *Rev Clin Esp* **196**: 75-81

9. Richardson S, Gerber M, Cenee S (1991) The role of fat, animal protein and some vitamin consumption in breast cancer: a case control study in southern France. *Int J Cancer* **48**: 1-9
10. Toniolo P, Riboli E, Protta F, Charrel M, Cappa AP (1989) Calorie-providing nutrients and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **81**: 278-86
11. Van't Veer P, Kok FJ, Brants HA, Ockhuizen T, Sturmans F, Hermus RJ (1990) Dietary fat and the risk of breast cancer. *Int J Epidemiol* **19**: 12-8
12. Van 't Veer P, van Leer EM, Rietdijk A, Kok FJ, Schouten EG, Hermus RJ, Sturmans F (1991) Combination of dietary factors in relation to breast-cancer occurrence. *Int J Cancer* **47**: 649-53
13. Wakai K, Dillon DS, Ohno Y, Prihartono J, Budiningsih S, Ramli M, Darwis I, Tjindarbumi D, Tjahjadi G, Soetrisno E, Roostini ES, Sakamoto G, Herman S, Cornain S (2000) Fat intake and breast cancer risk in an area where fat intake is low: a case-control study in Indonesia. *Int J Epidemiol* **29**: 20-8
14. Wang J, John EM, Horn-Ross PL, Ingles SA (2008) Dietary fat, cooking fat, and breast cancer risk in a multiethnic population. *Nutr Cancer* **60**: 492-504
15. Yu SZ, Lu RF, Xu DD, Howe GR (1990) A case-control study of dietary and nondietary risk factors for breast cancer in Shanghai. *Cancer Res* **50**: 5017-21
16. Yuan JM, Wang QS, Ross RK, Henderson BE, Yu MC (1995) Diet and breast cancer in Shanghai and Tianjin, China. *Br J Cancer* **71**: 1353-8

- **Études cas-contrôles**

- **Cancer du sein : Association nulle**

1. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Ronco A (1998) Essential fatty acids and breast cancer: a case-control study in Uruguay. *Int J Cancer* **76**: 491-

2. Graham S, Hellmann R, Marshall J, Freudenheim J, Vena J, Swanson M, Zielezny M, Nemoto T, Stubbe N, Raimondo T (1991) Nutritional epidemiology of postmenopausal breast cancer in western New York. *Am J Epidemiol* **134**: 552-66
3. Graham S, Marshall J, Mettlin C, Rzepka T, Nemoto T, Byers T (1982) Diet in the epidemiology of breast cancer. *Am J Epidemiol* **116**: 68-75
4. Hirohata T, Nomura AM, Hankin JH, Kolonel LN, Lee J (1987) An epidemiologic study on the association between diet and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **78**: 595-600
5. Hirohata T, Shigematsu T, Nomura AM, Nomura Y, Horie A, Hirohata I (1985) Occurrence of breast cancer in relation to diet and reproductive history: a case-control study in Fukuoka, Japan. *Natl Cancer Inst Monogr* **69**: 187-90
6. Katsouyanni K, Trichopoulou A, Stuver S, Garas Y, Kritselis A, Kyriakou G, Stoikidou M, Boyle P, Trichopoulos D (1994) The association of fat and other macronutrients with breast cancer: a case-control study from Greece. *Br J Cancer* **70**: 537-41
7. Katsouyanni K, Willett W, Trichopoulos D, Boyle P, Trichopoulou A, Vasilaros S, Papadiamantis J, MacMahon B (1988) Risk of breast cancer among Greek women in relation to nutrient intake. *Cancer* **61**: 181-5
8. Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE (1991) Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* **337**: 1197-200
9. Mannisto S, Pietinen P, Virtanen M, Kataja V, Uusitupa M (1999) Diet and the risk of breast cancer in a case-control study: does the threat of disease have an influence on recall bias? *J Clin Epidemiol* **52**: 429-39
10. Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, Maisonneuve P, Boyle P (1994) Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer* **58**: 774-80
11. Potischman N, Weiss HA, Swanson CA, Coates RJ, Gammon MD, Malone KE, Brogan D, Stanford JL, Hoover RN, Brinton LA (1998) Diet during adolescence and risk of breast cancer among young women. *J Natl Cancer Inst* **90**: 226-33

12. Pryor M, Slattery ML, Robison LM, Egger M (1989) Adolescent diet and breast cancer in Utah. *Cancer Res* **49**: 2161-7
13. Rohan TE, McMichael AJ, Baghurst PA (1988) A population-based case-control study of diet and breast cancer in Australia. *Am J Epidemiol* **128**: 478-89
14. Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E, Trichopoulos D (1995) Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst* **87**: 110-6
15. Zaridze D, Lifanova Y, Maximovitch D, Day NE, Duffy SW (1991) Diet, alcohol consumption and reproductive factors in a case-control study of breast cancer in Moscow. *Int J Cancer* **48**: 493-501

- **Études cas-contrôles**

- **Cancer du sein : Association inverse**

1. Franceschi S, Favero A, Decarli A, Negri E, La Vecchia C, Ferraroni M, Russo A, Salvini S, Amadori D, Conti E, Montella M, Giacosa A (1996) Intake of macronutrients and risk of breast cancer. *Lancet* 347: 1351-6
2. Landa MC, Frago N, Tres A (1994) Diet and the risk of breast cancer in Spain. *Eur J Cancer Prev* 3: 313-20
3. Witte JS, Ursin G, Siemiatycki J, Thompson WD, Paganini-Hill A, Haile RW (1997) Diet and premenopausal bilateral breast cancer: a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* 42: 243-51

- **Études cas-contrôles**

- **Cancer de la prostate : Association directe**

1. Fradet Y, Meyer F, Bairati I, Shadmani R, Moore L (1999) Dietary fat and prostate cancer progression and survival. *Eur Urol* 35: 388-91

2. Graham S, Haughey B, Marshall J, Priore R, Byers T, Rzepka T, Mettlin C, Pontes JE (1983) Diet in the epidemiology of carcinoma of the prostate gland. *J Natl Cancer Inst* 70: 687-92
3. Hayes RB, Ziegler RG, Gridley G, Swanson C, Greenberg RS, Swanson GM, Schoenberg JB, Silverman DT, Brown LM, Potters LM, Liff J, Schwartz AG, Fraumeni JF, Jr., Hoover RN (1999) Dietary factors and risks for prostate cancer among blacks and whites in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 25-34
4. Heshmat MY, Kaul L, Kovi J, Jackson MA, Jackson AG, Jones GW, Edson M, Enterline JP, Worrell RG, Perry SL (1985) Nutrition and prostate cancer: a case-control study. *Prostate* 6: 7-17
5. Kolonel LN, Yoshizawa CN, Hankin JH (1988) Diet and prostatic cancer: a case-control study in Hawaii. *Am J Epidemiol* 127: 999-1012
6. Lee MM, Wang RT, Hsing AW, Gu FL, Wang T, Spitz M (1998) Case-control study of diet and prostate cancer in China. *Cancer Causes Control* 9: 545-52
7. Mishina T, Watanabe H, Araki H, Nakao M (1985) Epidemiological study of prostatic cancer by matched-pair analysis. *Prostate* 6: 423-36
8. Ross RK, Shimizu H, Paganini-Hill A, Honda G, Henderson BE (1987) Case-control studies of prostate cancer in blacks and whites in southern California. *J Natl Cancer Inst* 78: 869-74
9. Rotkin ID (1977) Studies in the epidemiology of prostatic cancer: expanded sampling. *Cancer Treat Rep* 61: 173-80
10. Walker AR, Walker BF, Tsotetsi NG, Sebitso C, Siwedi D, Walker AJ (1992) Case-control study of prostate cancer in black patients in Soweto, South Africa. *Br J Cancer* 65: 438-41
11. West DW, Slattery ML, Robison LM, French TK, Mahoney AW (1991) Adult dietary intake and prostate cancer risk in Utah: a case-control study with special emphasis on aggressive tumors. *Cancer Causes Control* 2: 85-94
12. Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, et al. (1995) Prostate cancer in relation

to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87: 652-61

- **Études cas-contrôles**

- **Cancer de la prostate : Association nulle**

1. Fincham SM, Hill GB, Hanson J, Wijayasinghe C (1990) Epidemiology of prostatic cancer: a case-control study. *Prostate* 17: 189-206
2. Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Drouin G, Perrault JP, Beland G, Rohan TE, Howe GR (1996) Nutritional factors and prostate cancer: a case-control study of French Canadians in Montreal, Canada. *Cancer Causes Control* 7: 428-36
3. Mettlin C, Selenskas S, Natarajan N, Huben R (1989) Beta-carotene and animal fats and their relationship to prostate cancer risk. A case-control study. *Cancer* 64: 605-12
4. Ohno Y, Yoshida O, Oishi K, Okada K, Yamabe H, Schroeder FH (1988) Dietary beta-carotene and cancer of the prostate: a case-control study in Kyoto, Japan. *Cancer Res* 48: 1331-6
5. Rohan TE, Howe GR, Burch JD, Jain M (1995) Dietary factors and risk of prostate cancer: a case-control study in Ontario, Canada. *Cancer Causes Control* 6: 145-54

- **Études cas-contrôles**

- **Cancer de la prostate : Association inverse**

1. Kaul L, Heshmat MY, Kovi J, Jackson MA, Jackson AG, Jones GW, Edson M, Enterline JP, Worrell RG, Perry SL (1987) The role of diet in prostate cancer. *Nutr Cancer* 9: 123-8

- **Études cohortes**

- **Cancer du sein : Association directe**

1. Bingham SA, Luben R, Welch A, Wareham N, Khaw KT, Day N (2003) Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet* 362: 212-4
2. Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, Chen WY, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC (2003) Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 1079-85
3. Gaard M, Tretli S, Loken EB (1995) Dietary fat and the risk of breast cancer: a prospective study of 25,892 Norwegian women. *Int J Cancer* 63: 13-7
4. Howe GR, Friedenreich CM, Jain M, Miller AB (1991) A cohort study of fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 83: 336-40
5. Knekt P, Albanes D, Seppanen R, Aromaa A, Jarvinen R, Hyvonen L, Teppo L, Pukkala E (1990) Dietary fat and risk of breast cancer. *Am J Clin Nutr* 52: 903-8
6. Kushi LH, Sellers TA, Potter JD, Nelson CL, Munger RG, Kaye SA, Folsom AR (1992) Dietary fat and postmenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 84: 1092-9
7. Thiebaut AC, Clavel-Chapelon F (2001) [Fat consumption and breast cancer: preliminary results from the E3N-Epic cohort]. *Bull Cancer* 88: 954-8
8. Thiebaut AC, Kipnis V, Chang SC, Subar AF, Thompson FE, Rosenberg PS, Hollenbeck AR, Leitzmann M, Schatzkin A (2007) Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *J Natl Cancer Inst* 99: 451-62
9. Toniolo P, Riboli E, Shore RE, Pasternack BS (1994) Consumption of meat, animal products, protein, and fat and risk of breast cancer: a prospective cohort study in New York. *Epidemiology* 5: 391-7

- **Études cohortes**

- **Cancer du sein : Association nulle**

1. Graham S, Zielezny M, Marshall J, Priore R, Freudenheim J, Brasure J, Haughey B, Nasca P, Zdeb M (1992) Diet in the epidemiology of postmenopausal breast cancer in the New York State Cohort. *Am J Epidemiol* 136: 1327-37
2. Holmes MD, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Hankinson SE, Speizer FE, Rosner B, Willett WC (1999) Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *JAMA* 281: 914-20
3. Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, Patterson R, Kuller LH, Ockene JK, Margolis KL, Limacher MC, Manson JE, Parker LM, Paskett E, Phillips L, Robbins J, Rossouw JE, Sarto GE, Shikany JM, Stefanick ML, Thomson CA, Van Horn L, Vitolins MZ, Wactawski-Wende J, Wallace RB, Wassertheil-Smoller S, Whitlock E, Yano K, Adams-Campbell L, Anderson GL, Assaf AR, Beresford SA, Black HR, Brunner RL, Brzyski RG, Ford L, Gass M, Hays J, Heber D, Heiss G, Hendrix SL, Hsia J, Hubbell FA, Jackson RD, Johnson KC, Kotchen JM, LaCroix AZ, Lane DS, Langer RD, Lasser NL, Henderson MM (2006) Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 295: 629-42
4. Sieri S, Krogh V, Ferrari P, Berrino F, Pala V, Thiebaut AC, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Jakobsen MU, Clavel-Chapelon F, Chajes V, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nothlings U, Trichopoulou A, Naska A, Lagiou P, Panico S, Palli D, Vineis P, Tumino R, Lund E, Kumle M, Skeie G, Gonzalez CA, Ardanaz E, Amiano P, Tormo MJ, Martinez-Garcia C, Quiros JR, Berglund G, Gullberg B, Hallmans G, Lenner P, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Peeters PH, van Gils CH, Key TJ, Crowe FL, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Slimani N, Jenab M, Norat T, Riboli E (2008) Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 88: 1304-12

5. Thiebaut AC, Chajes V, Gerber M, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir G, Berrino F, Riboli E, Benichou J, Clavel-Chapelon F (2009) Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* 124: 924-31
6. van den Brandt PA, van't Veer P, Goldbohm RA, Dorant E, Volovics A, Hermus RJ, Sturmans F (1993) A prospective cohort study on dietary fat and the risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Res* 53: 75-82
7. Velie E, Kulldorff M, Schairer C, Block G, Albanes D, Schatzkin A (2000) Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer in postmenopausal women: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 92: 833-9
8. Wolk A, Bergstrom R, Hunter D, Willett W, Ljung H, Holmberg L, Bergkvist L, Bruce A, Adami HO (1998) A prospective study of association of monounsaturated fat and other types of fat with risk of breast cancer. *Arch Intern Med* 158: 41-5

- **Études cohortes**

- **Cancer du sein : Association inverse**

1. Jones DY, Schatzkin A, Green SB, Block G, Brinton LA, Ziegler RG, Hoover R, Taylor PR (1987) Dietary fat and breast cancer in the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst* 79: 465-71
2. Lof M, Sandin S, Lagiou P, Hilakivi-Clarke L, Trichopoulos D, Adami HO, Weiderpass E (2007) Dietary fat and breast cancer risk in the Swedish women's lifestyle and health cohort. *Br J Cancer* 97: 1570-6

- **Études cohortes**

- **Cancer de la prostate : Association directe**



1. Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC (1993) A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 1571-9

- **Études cohortes**

- **Cancer de la prostate : Association nulle**

1. Schuurman AG, van den Brandt PA, Dorant E, Brants HA, Goldbohm RA (1999) Association of energy and fat intake with prostate carcinoma risk: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer* 86: 1019-27
2. Severson RK, Nomura AM, Grove JS, Stemmermann GN (1989) A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res* 49: 1857-60
3. Veierod MB, Laake P, Thelle DS (1997) Dietary fat intake and risk of prostate cancer: a prospective study of 25,708 Norwegian men. *Int J Cancer* 73: 634-8

## ▪ **Études épidémiologiques sur l'obésité**

### • **Études cas-contrôles**

#### ○ **Cancer du sein : Association directe**

1. Dal Maso L, Zucchetto A, Talamini R, Serraino D, Stocco CF, Vercelli M, Falcini F, Franceschi S (2008) Effect of obesity and other lifestyle factors on mortality in women with breast cancer. *Int J Cancer* 123: 2188-94
2. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S (1990) Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* 46: 796-800
3. Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Baron J, Greenberg ER, Willett WC (1997) Body size and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 145: 1011-9

### • **Études cas-contrôles**

#### ○ **Cancer de la prostate : Association directe**

1. Dal Maso L, Zucchetto A, La Vecchia C, Montella M, Conti E, Canzonieri V, Talamini R, Tavani A, Negri E, Garbeglio A, Franceschi S (2004) Prostate cancer and body size at different ages: an Italian multicentre case-control study. *Br J Cancer* 90: 2176-80
2. Efstathiou JA, Bae K, Shipley WU, Hanks GE, Pilepich MV, Sandler HM, Smith MR (2007) Obesity and mortality in men with locally advanced prostate cancer: analysis of RTOG 85-31. *Cancer* 110: 2691-9
3. Gong Z, Agalliu I, Lin DW, Stanford JL, Kristal AR (2007) Obesity is associated with increased risks of prostate cancer metastasis and death after initial cancer diagnosis in middle-aged men. *Cancer* 109: 1192-202

4. Gronberg H, Damber L, Damber JE (1996) Total food consumption and body mass index in relation to prostate cancer risk: a case-control study in Sweden with prospectively collected exposure data. *J Urol* 155: 969-74
5. Ilic M, Vlajinac H, Marinkovic J (1996) Case-control study of risk factors for prostate cancer. *Br J Cancer* 74: 1682-6
6. Irani J, Lefebvre O, Murat F, Dahmani L, Dore B (2003) Obesity in relation to prostate cancer risk: comparison with a population having benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 91: 482-4
7. Key TJ, Silcocks PB, Davey GK, Appleby PN, Bishop DT (1997) A case-control study of diet and prostate cancer. *Br J Cancer* 76: 678-87
8. Lopez Fontana CM, Recalde Rincon GM, Messina Lombino D, Uvilla Recupero AL, Perez Elizalde RF, Lopez Laur JD (2009) [Body mass index and diet affect prostate cancer development]. *Actas Urol Esp* 33: 741-6
9. Sharpe CR, Siemiatycki J (2001) Joint effects of smoking and body mass index on prostate cancer risk. *Epidemiology* 12: 546-51
10. Talamini R, La Vecchia C, Decarli A, Negri E, Franceschi S (1986) Nutrition, social factors and prostatic cancer in a Northern Italian population. *Br J Cancer* 53: 817-21

- **Études cas-contrôles**

- **Cancer de la prostate : Association nulle**

1. Andersson SO, Baron J, Bergstrom R, Lindgren C, Wolk A, Adami HO (1996) Lifestyle factors and prostate cancer risk: a case-control study in Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 509-13
2. Friedenreich CM, McGregor SE, Courneya KS, Angyalfi SJ, Elliott FG (2004) Case-control study of anthropometric measures and prostate cancer risk. *Int J Cancer* 110: 278-83

3. Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Drouin G, Perrault JP, Beland G, Rohan TE, Howe GR (1996) Nutritional factors and prostate cancer: a case-control study of French Canadians in Montreal, Canada. *Cancer Causes Control* 7: 428-36
4. Giles GG, Severi G, English DR, McCredie MR, MacInnis R, Boyle P, Hopper JL (2003) Early growth, adult body size and prostate cancer risk. *Int J Cancer* 103: 241-5
5. Hayes RB, Ziegler RG, Gridley G, Swanson C, Greenberg RS, Swanson GM, Schoenberg JB, Silverman DT, Brown LM, Pottern LM, Liff J, Schwartz AG, Fraumeni JF, Jr., Hoover RN (1999) Dietary factors and risks for prostate cancer among blacks and whites in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 25-34
6. Hsieh CC, Thanos A, Mitropoulos D, Deliveliotis C, Mantzoros CS, Trichopoulos D (1999) Risk factors for prostate cancer: a case-control study in Greece. *Int J Cancer* 80: 699-703
7. Hsing AW, Deng J, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Stanczyk FZ, Benichou J, Xie T, Gao YT (2000) Body size and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1335-41
8. Kolonel LN, Yoshizawa CN, Hankin JH (1988) Diet and prostatic cancer: a case-control study in Hawaii. *Am J Epidemiol* 127: 999-1012
9. Rohan TE, Howe GR, Burch JD, Jain M (1995) Dietary factors and risk of prostate cancer: a case-control study in Ontario, Canada. *Cancer Causes Control* 6: 145-54
10. Villeneuve PJ, Johnson KC, Kreiger N, Mao Y (1999) Risk factors for prostate cancer: results from the Canadian National Enhanced Cancer Surveillance System. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Cancer Causes Control* 10: 355-67
11. Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, et al. (1995) Prostate cancer in relation

to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87: 652-61