



Altérations métaboliques cellulaires : la voie de biosynthèse des acides gras monoinsaturés comme cible thérapeutique

Mélaine Minville

► To cite this version:

Mélaine Minville. Altérations métaboliques cellulaires : la voie de biosynthèse des acides gras monoinsaturés comme cible thérapeutique. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS079 . tel-00682619

HAL Id: tel-00682619

<https://theses.hal.science/tel-00682619>

Submitted on 26 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Présentée

Devant l'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT – SANTÉ

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Spécialité : Sciences de la Vie

Soutenue publiquement le 17 décembre 2010

par

Mélaine MINVILLE-WALZ

TITRE :

*Altérations métaboliques cellulaires : la voie de biosynthèse
des acides gras monoinsaturés comme cible thérapeutique*

Directeurs de thèse : Pr. NARCE Michel - Dr. RIALLAND Mickaël

Membres du Jury :

Mme MORIO Béatrice, Directrice de recherche INRA, Université d'Auvergne, UMR1019

M. CORCOS Laurent, Directeur de recherche INSERM, Université de Bretagne, UMR613

M. BETTAIEB Ali, Directeur d'étude EPHE, Université de Bourgogne, UMR866

Mme GAYET Constance, Directrice de projet, CNIEL

M. RIALLAND Mickaël, Maître de conférences, Université de Bourgogne, UMR866

M. NARCE Michel, Professeur, Université de Bourgogne, UMR866

Merci,

A M. Bettaieb Ali, directeur d'étude, qui a bien voulu accepter la présidence du jury de cette thèse. Je lui exprime ma reconnaissance.

A Mme Morio Béatrice, directrice de recherche et M. Corcos Laurent Directeur de recherche de me faire l'honneur de juger ce travail, ainsi qu'à Mme Gayet Constance d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Au docteur Mickaël Rialland, Maître de conférences à l'Université de Bourgogne, pour sa disponibilité, sa bonne humeur, et la qualité de son encadrement au cours de ce travail de thèse.

Au professeur Michel Narce, professeur à l'Université de Bourgogne, pour son accueil au sein du laboratoire, pour le temps précieux qu'il m'a consacré, et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à l'élaboration de ce travail.

Au CNIEL et à l'ANRT, qui ont permis le financement de ce travail ; et plus particulièrement à Mme Marmonnier Corinne, Mme Gayet Constance et M Duhem Koenraad à qui j'exprime toute ma gratitude.

A Joseph Gresti : grazie mille pour nos manip sans fin, tes grandes qualités humaines, et de m'avoir inculqué quelques "notions culturelles".

A Sandrine Bellenger pour son extrême disponibilité, gentillesse, et sa grande capacité à résoudre l'irrésoluble.

A l'ensemble de l'équipe, Jérôme, Christian, Pascal, Laurent, et Monique pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Louiza, Cécile, Tony, Arnaud, et Mika partenaires de bureau et de bonne entente.

A James Hetfield, pour son accompagnement toutes ces années, l'énergie qu'il m'a fournie et toutes ces émotions.

A ma famille, mes amis, pour leur amour et leur amitié.

Sommaire :

Abréviations :	8
Liste des figures:	10
Liste des tableaux :	12
Préambule :	13
Introduction générale :	16
I. Caractéristiques et synthèses des acides gras insaturés:	17
A. Caractéristiques et synthèse des acides gras trans :	17
1. Définition:	18
2. Origine:	18
B. Synthèse des acides gras insaturés de configuration cis :	23
1. Synthèse des acides gras polyinsaturés des familles en n-3 n-6 :	24
2. Synthèse des acides gras monoinsaturés en C16 et C18: ACC, FAS et SCD	26
II. L'enzyme de biosynthèse des acides gras monoinsaturés en n-9 : la stéaroyl-CoA désaturase	28
A. Généralités :	28
B. Isoformes de la stéaroyl-CoA désaturase :	30
C. Topologie de la protéine stéaroyl-CoA désaturase 1 :	31
D. Les régulations de la stéaroyl-CoA désaturase :	32
1. Régulation transcriptionnelle :	33
2. Régulation de la stabilité de l'ARN:	37
3. Régulation post-traductionnelle de la stéaroyl-CoA :	38
4. Régulation allostérique :	39

Chapitre 1 : Métabolisme des acides gras monoinsaturés et cancer 41

Introduction : 42

I. Généralités : 42

A. Facteurs de risque: 44

B. Oncogenèse : 44

1. Généralités : 44

2. Autosuffisance en facteur de croissance : 46

3. Insensibilité aux signaux anti-croissance : 49

4. Inhibition de l'apoptose : 50

5. Potentiel réplicatif illimité : 52

6. Angiogenèse : 54

7. Invasion tissulaire et métastase: 55

C. Recherche thérapeutique : 57

II. Cancer et altération du métabolisme glucidique et lipidique : 58

1. Effet Warburg : 58

2. Modifications lipidiques et altérations de l'expression des enzymes de la lipogenèse : 60

III. La mort cellulaire par apoptose : la voie du stress du réticulum endoplasmique 62

A. L'apoptose : 62

1. La voie intrinsèque : 64

2. La voie extrinsèque : 66

3. Les caspases : 68

4. Les interactions entre les voies intrinsèques et extrinsèques : 68

5. L'apoptose et le cancer :	69
B. Le Stress du RE :	70
IV. Les enzymes de la lipogenèse comme cible thérapeutique :	74
A. ACC :	74
B. FAS :	75
C. SCD :	76

Publications:	78
---------------------	----

Article 1:	79
------------------	----

Article 2:	93
------------------	----

Conclusion:	111
-------------------	-----

Chapitre 2 : Métabolisme des acides gras monoinsaturés et athérosclérose	115
--	-----

Introduction :	116
----------------------	-----

I. Généralités :	116
A. Facteurs de risques :	118
1. Généralités :	118
2. Les acides gras trans : un facteur de risque ?	118
B. Athérogenèse :	119
1. Structure de la paroi artérielle vasculaire saine :	119
2. Anatomopathologie de la plaque d'athérosclérose :	121
II. Rôle des CML dans l'athérosclérose :	124

Publication:	127
--------------------	-----

Article 3:.....	128
Résultats annexes :	147
Conclusion :	150
Conclusion générale :	154
Références bibliographiques :	158
Publications et communications scientifiques :	177
Annexes :	180
Summary:	208

Abréviations :

AA : acide arachidinique
ACC : acétyl CoA carboxylase
Ac-CoA : acétyl-CoA
ACL : ATP citrate lyase
ADN : acide désoxyribonucléique
AFSSA : agence Française de sécurité sanitaire des aliments
AG : acide gras
AGI : acide gras insaturé
AGMI : acide gras monoinsaturé
AGPI : acide gras polyinsaturé
AGS : acide gras saturé
AGT : acide gras trans
Apaf-1: apoptotic protease activating factor 1
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATF4 : activating transcription factor 4
ATF6 : activating transcription factor 6
AVC: accident vasculaire cerebral
BSA : bovine serum albumine, albumine sérique bovine
CACT : carnitine acyl-carnitine translocase
CAT : carnitine acétyl-transférase
CE : cholesterol ester, ester de cholestérol
CIRC : centre international de recherche sur le cancer
CLA : conjugated linoleic acid, isomère conjugués de l'acide linoléique
CML : cellule musculaire lisse
CPG : chromatographie en phase gazeuse
CPT : carnitine palmitoyl-transférase
DHA : docohexaenoic acid, acide docohexaenoïque
EiF2 α : eukaryotic initiation factor 2 α
ELA : acide trans élaïdique
Elovl: élongase
ENCR : réseau européen des registres des cancers
EPA : acide eicosapentaenoïque
ERAD : ER associated degradation, système de dégradation associé au RE
Fads : désaturase
FAS: fatty acid synthase, Acide gras synthase.
HAD : hydroxyacyl-CoA déshydrogénase

HASMC : human aortic smooth muscular cell, cellule musculaire lisses aortiques

HDL : high density lipoprotein, lipoprotéine de haute densité

IRE1 : inositol-requiring enzyme 1

LDH-A : lactate déshydrogénase A

LDL: low density lipoprotein, lipoprotéine de basse densité

LXR : liver X receptor, récepteur X du foie

LXRE : liver X receptor response element,, élément de réponse au récepteur X du foie

MAL: malate

MAPK: mitogen-activated phosphokinases, phosphokinase active par des mitogènes.

MCV : maladie cardiovasculaire

MDH: malate déshydrogénase

ME: enzyme malique

OAA : oxaloacétate

OL : acide oléique

OMS : organisation mondiale de la santé

PDGF-BB : platelet-derived growth factor

PERK : pancreatic endoplasmic reticulum kinase

PEST : séquence riche en proline, glutamine, sérine et thréonine

PHD : pyruvate déshydrogénase

PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase

PKC: protéine kinase C

PL : phospholipide

PLG : plasminogène

PPAR : peroxisome proliferator activated receptor

PPRE : peroxisome proliferator response element, élément de réponse à PPAR

PUFA-RE : poly-unsaturated fatty acid response element, élément de réponse au AGPI

RE : reticulum endoplasmique

ROS: reactive oxygen species, espèce réactive à l'oxygène

RXR : récepteur X au retinoïde

SCD : stéaroyl-CoA désaturase

SCDAP : SREBP cleavage-activating protein

SRE : sterol response element, élément de réponse au stérol

SREBP : sterol regulatory element-binding protein, protéine liant l'élément régulateur stérol

TG : triglycéride

TNF : tumor necrosis factor

TVA : trans vaccenic acid, acide trans vaccénique

TZD : thiazolidinediones

UPR : unfolded protein response, réponse aux protéines malformées

VLDL: very low density lipoprotein, lipoprotéine de très faible densité

XBP1: X box-binding protein 1

Liste des figures:

<i>Figure 1 : Biohydrogénation ruminale et distribution des AGT dans les glandes mammaires [4].....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 2 : Représentation de l'acide gras trans vaccénique</i>	<i>20</i>
<i>Figure 3 : Isomères conjugués de l'acide linoléique [10].....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 4: Distribution des isomères C18 :1 trans dans trois huiles partiellement hydrogénées [11]</i>	<i>22</i>
<i>Figure 5 : Représentation de l'acide gras trans élaïdique</i>	<i>23</i>
<i>Figure 6: Biosynthèse des AGPI de la série n-3 et n-6 chez les mammifères.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 7 : Conversion de l'acétyl CoA en malonyl CoA par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC)</i>	<i>26</i>
<i>Figure 8 : Séquence de réactions de la biosynthèse des AG [19].....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 9: Biosynthèse des AG à longue chaîne chez les mammifères [13]</i>	<i>28</i>
<i>Figure 10 : Co-facteurs intervenant dans l'activité delta9 désaturase de SCD [23]</i>	<i>29</i>
<i>Figure 11 : Implication de SCD dans la synthèse lipidique [26]</i>	<i>29</i>
<i>Figure 12: Localisation de la SCD dans le RE - Les cellules U2OS sont transfectées avec un plasmide contenant SCD couplés à la molécule fluorescence EGFP.</i>	<i>31</i>
<i>Figure 13 : Topologie membranaire de SCD [41]</i>	<i>31</i>
<i>Figure 14: Localisation des éléments de réponse sur les promoteurs SCD1 et 2 murin et SCD1 humain [43]</i>	<i>33</i>
<i>Figure 15: Régulation de la biosynthèse des AG et du cholestérol par SREBP [46].....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 16: Clivage protéolytique de SREBP par les stérols [46].....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 17 : Estimation en milliers de l'incidence (A) et de la mortalité (B) des différents cancers en Europe [83]</i>	<i>43</i>

<i>Figure 18 : Acquisition des propriétés de la cellule cancéreuse [91].</i>	46
<i>Figure 19: Mécanisme du maintien de la balance prolifération/apoptose d'une cellule de mammifère selon D.Hanahan et Weinberg [91]</i>	49
<i>Figure 20: Interaction entre le métabolisme glucidique et lipidique au cours de la prolifération [164]</i>	59
<i>Figure 21: Modifications morphologiques de l'apoptose – SW480 traitées par CLA2 à 50µM pendant 72h après coloration au Hoeschst</i>	62
<i>Figure 22 : Voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose [200]</i>	63
<i>Figure 23 : Voie intrinsèque de l'apoptose [202]</i>	65
<i>Figure 24 : Voie extrinsèque de l'apoptose [202]</i>	67
<i>Figure 25 : Interactions entre les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose [208]</i>	69
<i>Figure 26: Mécanismes intervenant au cours du stress du RE –UPR [219]</i>	71
<i>Figure 27 : Induction de l'apoptose par le stress du RE</i>	73
<i>Figure 28 : Régulation du métabolisme et des voies de signalisation par SCD1 dans les cellules cancéreuses [233]</i>	77
<i>Figure 29: Plan d'organisation de la paroi artérielle</i>	120
<i>Figure 30: Genèse de la plaque – Classification de Stary 1994</i>	121
<i>Figure 31: Progression d'une lésion d'athérosclérose [246]</i>	123
<i>Figure 32 : Effets des AG sur la mort des HASMC prétraitées 24h en milieu 10% SD, puis traitées par les différents AG à 100µM, 24h, 48h, 72h et 105h</i>	149

Liste des tableaux :

Tableau 1: Composition moyenne en acide gras trans (% AG totaux) de la matière grasse laitière [8]	20
Tableau 2 : AGT produits lors de l'hydrogénation catalytique partielle [4]	22
Tableau 3 : Principaux facteurs régulant SCD	32
Tableau 4: Principales causes de mortalités dans le monde en 2004	117
Tableau 5 : Pourcentage d'incorporation en AG dans les HASMC traitées 48h à 100µM d'AG	148

Préambule :

L'Unesco a classé la gastronomie française au patrimoine de l'Humanité et a jugé qu'elle relevait d'une "pratique sociale coutumière destinée à célébrer les moments les plus importants de la vie des individus et des groupes".

Outre son aspect hédonique, notre alimentation remplit une fonction santé majeure depuis la mise en évidence de l'impact des nutriments sur la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Ainsi, nous assistons au développement de plus en plus d'aliments à effet santé ainsi que de compléments alimentaires pour tenter de prévenir certaines pathologies comme les maladies cardiovasculaires et le cancer.

Dans ce contexte, diverses interrogations ont été soulevées au sujet de l'impact des produits laitiers sur notre santé et plus particulièrement celui des acides gras de configuration trans (AGT) sur la prévention du cancer colique et le risque cardiovasculaire.

Notre étude a porté sur ces deux aspects : nous avons cherché d'une part à déterminer l'effet des AGT sur la biologie de la cellule cancéreuse et d'autre part, à évaluer l'impact des AGT sur les cellules musculaires lisses vasculaires, un des acteurs cellulaires de la pathologie athéromateuse.

Les produits laitiers contiennent des isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) reconnus comme possédant des effets antiprolifératifs, et anti-tumoraux (par exemple, le cancer du sein). Les CLA sont des isomères positionnels et géométriques de l'acide octadécadiénoïque avec deux double liaisons séparées par une simple liaison. Ils sont présents dans divers types d'aliments, principalement dans le lait et les produits dérivés ainsi que la viande de ruminants. Leur contenu dans ces aliments diffère et dépend de nombreux facteurs tels que l'espèce animale, la saison, le mode d'alimentation, et le lieu de pâturage. Les effets bénéfiques des CLA ont d'ailleurs conduit au développement de compléments alimentaires contenant un mélange des deux principaux isomères : le cis9, trans11 CLA et le trans10, cis12 CLA dans des proportions égales.

Pour asseoir scientifiquement les effets observés, ce groupe d'acides gras a été étudié *in vivo et in vitro* dans le cadre de diverses pathologies. Cependant, malgré de nombreuses études, leurs mécanismes d'action demeurent mal compris.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux effets d'une supplémentation en cis9, trans11 CLA et trans10, cis12 CLA sur le devenir de la cellule cancéreuse colique en relation avec le métabolisme des acides gras mono-insaturés et plus particulièrement avec la stearoyl coA désaturase (SCD), enzyme limitante de leur biosynthèse.

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude de l'abolition de la voie de biosynthèse des AGMI par des inhibiteurs naturels -CLA-, synthétiques et des ARN interférant, sur la viabilité de cellules non cancéreuses et cancéreuses coliques. Le but de cette étude est de déterminer le potentiel anti-cancéreux de la voie de biosynthèse des AGMI.

Les produits laitiers contiennent également des AGT mono-insaturés à 18 atomes de carbone dont le principal composant est l'acide *trans* vaccénique (t11 C18 :1)(TVA). Cet AG est également un isomère de l'acide élaïdique (t9C18 :1) qui lui est d'origine industrielle et est présent en grandes proportions dans les produits manufacturés. Des études épidémiologiques ont mis en relation une augmentation du risque cardiovasculaire et la consommation d'acide élaïdique (ELA). En revanche, les effets du TVA restent méconnus, c'est pourquoi les industries laitières s'intéressent à distinguer les effets de ELA et du TVA sur les risques cardio-vasculaires et plus particulièrement dans le contexte de l'athérosclérose. Cette pathologie se caractérise notamment par une altération du métabolisme lipidique conduisant à une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les macrophages et les CML vraisemblablement associée à une lipogenèse accrue régulé par SCD.

La seconde partie de notre travail a été de préciser l'implication possible des acides gras trans en C18 ELA et TVA dans l'athérosclérose en étudiant leurs effets sur le phénotype des CML (prolifération, apoptose, métabolisme lipidique avec un intérêt particulier pour l'enzyme SCD régulatrice de la voie des acides gras monoinsaturés) en comparaison avec l'acide oléique.

Introduction générale :

I. Caractéristiques et synthèses des acides gras insaturés:

Les acides gras (AG) appartiennent à la grande famille des lipides et sont l'élément de base de leur synthèse. Ils interviennent comme pourvoyeurs d'énergie, éléments de structure des membranes biologiques, mais également dans la signalisation cellulaire et la modulation de l'expression de nombreux gènes.

Ils sont apportés à notre organisme par l'alimentation et/ou par une synthèse de *novo*. Le contenu en AG de notre organisme est un équilibre régulé entre l'apport et/ou la production, et le catabolisme de ces AG par β -oxydation.

En fonction de leur degré d'insaturation et de leur longueur de chaîne les AG se répartissent en AG saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI). Ces différences structurales leur confèrent des propriétés biologiques distinctes. De plus, une simple modification de la configuration *cis* ou *trans* d'un AG insaturé (AGI) peut également moduler ces propriétés.

Ce chapitre sera dédié à la description des caractéristiques des AG *trans* (AGT) en C18 :1 d'origine naturelle et technologique, et à la synthèse des AGI chez les mammifères.

A. Caractéristiques et synthèse des acides gras *trans* :

Les AGI présentent généralement des doubles liaisons de configuration *cis*. Cependant, il s'avère que celles-ci peuvent être de configuration *trans* dans de faibles proportions. Les AGT rencontrés dans l'alimentation des mammifères ont deux origines, la première dite "naturelle" issue de la biohydrogénation ruminale, et, la seconde dite "industrielle" issue d'un procédé industriel.

1. Définition:

Du point de vue de la chimie structurale, un acide gras *trans* se définit comme un AGI possédant une ou plusieurs doubles liaisons de configuration géométrique *trans*, c'est-à-dire, dont les substituants ou les atomes d'hydrogène se situent de part et d'autre du plan de la liaison, contrairement à la configuration *cis* pour laquelle les substituants sont situés du même côté du plan.

En alimentation humaine, l'AFSSA cherchait une définition quant à l'origine des AGT. En 2005, il adopte la définition suivante : *“les acides gras trans sont tous les AGMI et AGPI présentant au moins une double liaison de configuration trans”*. Cette définition ne comporte aucune restriction sur l'origine des AG. L'AFSSA établit alors des recommandations : baisser à 1g d'AGT pour 100 g de produit commercialisé, et elle préconise un étiquetage de ces produits. Les industriels ont donc été invités à limiter les teneurs en AGT industriel dans leurs produits.

En 2009, l'assemblée nationale a fait une proposition de loi concernant *“l'étiquetage des produits alimentaires qui doit comporter l'indication de la quantité d'acides gras «trans» d'origine industrielle présents dans les produits préparés industriellement”*.

Dans ce contexte, les industries laitières souhaitent faire une distinction entre les AGT d'origine naturelle et industrielle, sous-entendant des effets différents sur la santé.

2. Origine:

Les AGT présents dans les aliments ont deux principales origines :

a) La biohydrogénation ruminale :

C'est l'origine naturelle de production d'AGT qui se fait par biohydrogénation ruminale. Elle est responsable de la présence d'AGT dans les produits laitiers, et en moindre proportion dans la viande de ruminant. Les réactions enzymatiques qui conduisent à cette production d'AGT, se réalisent sous l'action des enzymes de la flore du rumen (panse).

La biohydrogénation ruminale fait intervenir deux principales voies, qui conduisent à la production d'acide *trans* vaccénique (TVA) à partir des deux précurseurs : l'acide linoléique et l'acide α linoléique (*Figure 1*) [1-3].

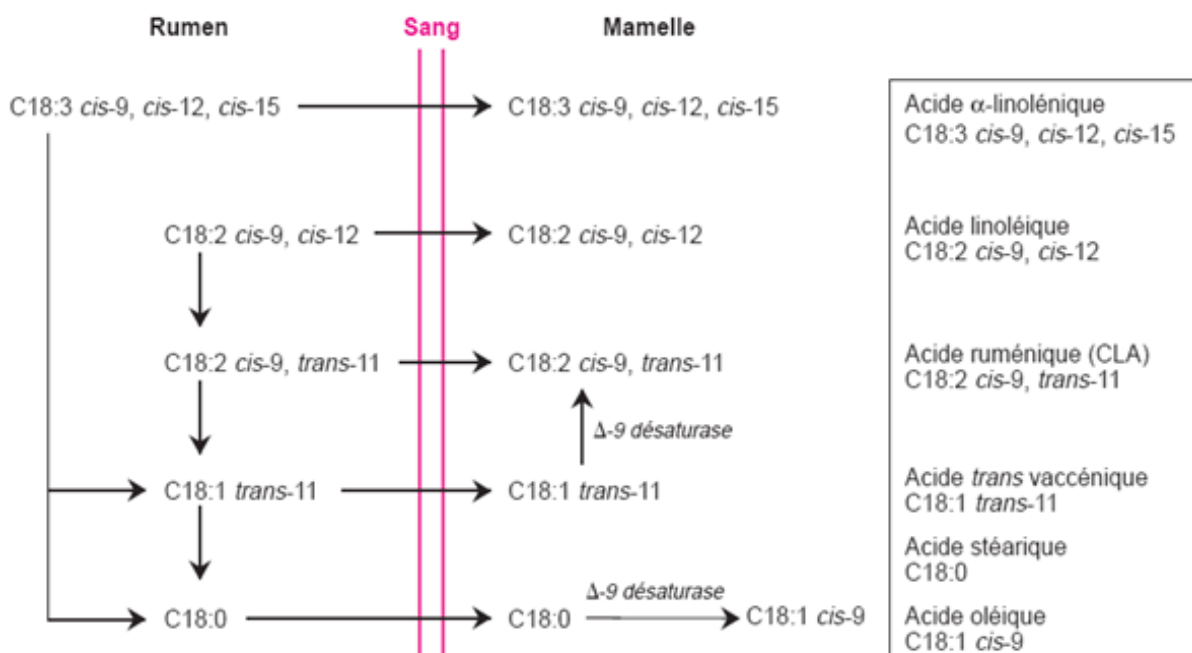


Figure 1 : Biohydrogénation ruminale et distribution des AGT dans les glandes mammaires [4]

Dans le rumen, la conversion du C18:1 *trans* 11 en C18:0 est une étape limitante puisque celle-ci est faible et lente. Il y a donc une accumulation du C18:1 *trans* c'est-à-dire le TVA [4, 5].

Les AGT formés au cours de la biohydrogénation ruminale sont absorbés par le système sanguin et redistribué dans les tissus, notamment dans les glandes mammaires (Figure 1). Ainsi, les AGT formés au niveau du rumen, sont retrouvés dans le lait des ruminants et dans les produits laitiers. Dans les glandes mammaires, sous l'action de la $\Delta 9$ désaturase, l'acide stéarique et le TVA sont convertis respectivement en acide oléique et en acide ruménique (isomère conjugué de l'acide linoléique c9t11CLA ou CLA1) [6].

Hormis leur synthèse par biohydrogénation, les AGT présents dans le lait peuvent également être directement absorbés à partir des végétaux de l'alimentation des ruminants. L'ensemble de ces AGT issus de la biohydrogénation ruminale peuvent être transformé par β -oxydation dans d'autres tissus : il en résulte une grande diversité d'AGT présents dans le lait et les produits laitiers.

Les compositions en AG des matières grasses des produits laitiers sont maintenant bien établies. Des études ont montré que les AGT en C18 :1 représentait 72,36% des AGT totaux des produits laitiers et que l'AGT majoritaire est le TVA puisqu'il représente 30 à 50% des AG *trans* totaux des matières grasses laitières (*Figure 2*) [5, 7].

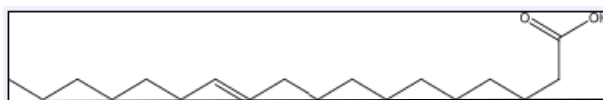


Figure 2 : Représentation de l'acide gras trans vaccénique

L'équipe de Wolff, en 1998, a montré que le lait de brebis possédait la plus forte teneur en AGT en C18 :1, en comparaison avec le lait de vache et de chèvre (Tableau 1) [8].

Tableau 1: Composition moyenne en acide gras trans (% AG totaux) de la matière grasse laitière [8]

	Brebis	Vache	Chèvre
Teneur en C18 :1 trans (%AG totaux)	4,53 - 1,11	3,73 - 0,68	2,68 - 0,88

Le lait et les produits laitiers contiennent également des isomères conjugués de l'acide linoléique, le plus présent étant l'acide ruménique (c9t11CLA ou CLA1) puisqu'il représente 80 à 87% des isomères CLA totaux (*Figure 3*) [9].

L'isomère t10c12CLA n'est présent qu'à l'état de trace (<0,5%) dans les produits laitiers et est apporté dans l'alimentation humaine sous forme de mélange équi pondéral avec le c9t11CLA -acide ruménique- dans des préparations commerciales, obtenues par synthèse, destinées à être incorporées dans les aliments et en particulier les compléments alimentaires (*Figure 3*).

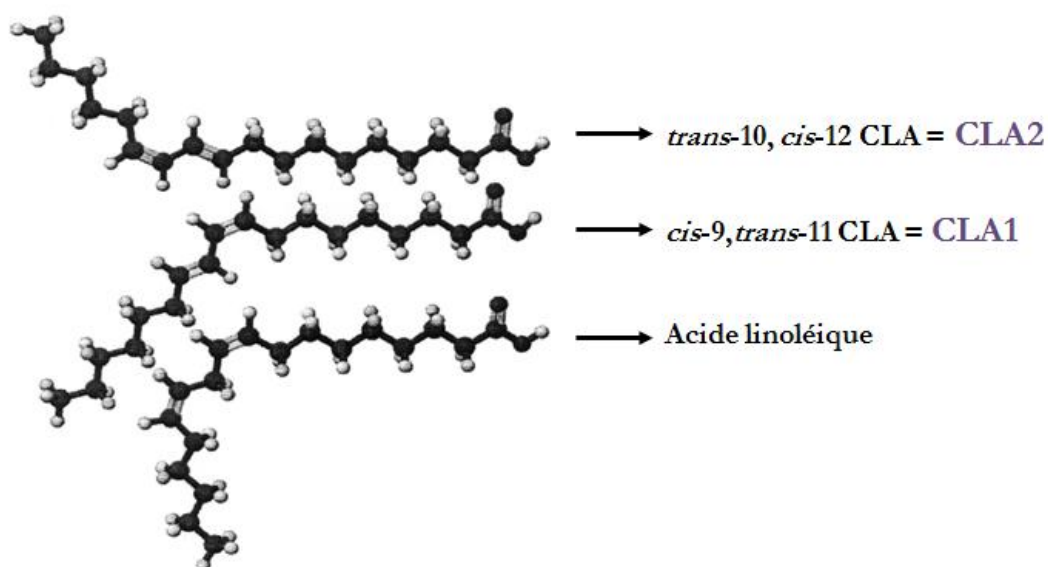


Figure 3 : Isomères conjugués de l'acide linoléique [10]

Le lait et les produits laitiers contiennent donc une grande diversité d'AGT, le TVA étant l'AGMI de configuration *trans* majoritaire et l'acide ruménique (c9t11CLA) l'isomère CLA le plus présent.

Il existe une autre source de production d'AGT : l'hydrogénation catalytique.

b) Hydrogénation catalytique :

Les matières grasses incorporées dans les aliments doivent répondre à certains critères tels que la stabilité à l'oxydation et la texture (croustillant, croquant ou fondant). L'hydrogénation catalytique est un procédé industriel qui permet de répondre à plusieurs critères nécessaire à la fabrication de produit manufacturés. Ce procédé permet l'hydrogénation des huiles afin de modifier la texture et rendre celles-ci plus malléables et moins sensibles à l'oxydation. Il est responsable de la formation d'AGT qui rentre dans la composition des margarines. Leur taux diffère de 1% pour les nouvelles margarines ménagères à 60% pour les margarines industrielles rentrant dans la composition des produits manufacturés. Ces AGT rentrent ainsi dans la composition de nombreux produits tels que les viennoiseries (croissants, cookies, biscuits,...), les confiseries (bonbons, barres chocolatées...), et les potages en poudres.

Les taux et la composition en AGT dépendent de plusieurs paramètres : la nature et la composition en AG des huiles, la nature du catalyseur, les conditions d'hydrogénation (température, pression, agitation), et la texture de la matière grasse souhaitée.

Lors de l'hydrogénation catalytique partielle des huiles végétales, les principaux AGT formés sont les isomères de l'acide oléique (Tableau 2) [4].

Tableau 2 : AGT produits lors de l'hydrogénation catalytique partielle [4]

Acide gras trans	Taux (% en AGT)
Trans 18 :1	85-95%
Trans 18 :2	5-15%
Trans 18 :3	<1%
Trans 16 :1	0,04%

Une étude de l'équipe d'Aro, en 1998 a mis en évidence que les AGT en C18 :1 formés au cours de l'hydrogénation catalytique partielle ont principalement leurs doubles liaisons *trans* en position 9, ce qui correspond à l'acide élaïdique (ELA) (Figure 4) [11].

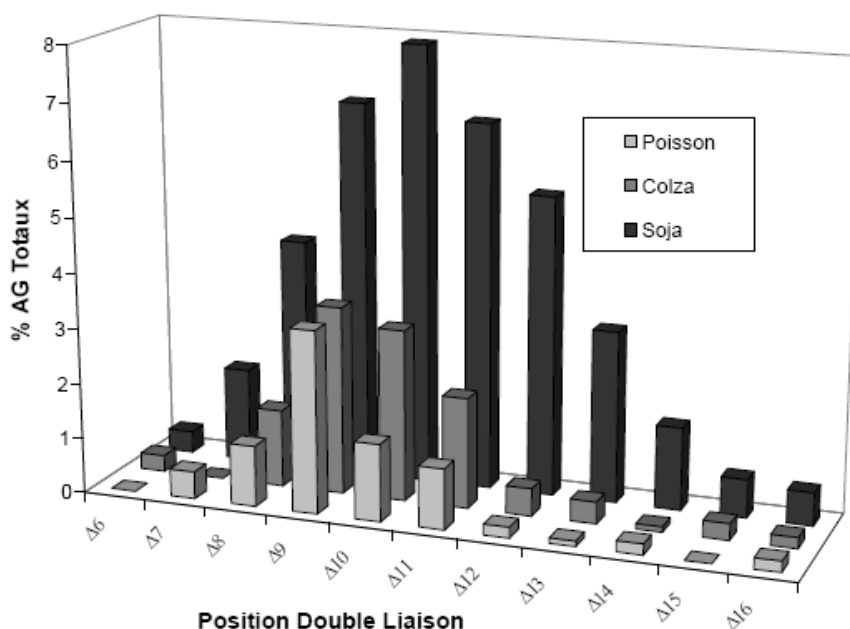


Figure 4: Distribution des isomères C18 :1 trans dans trois huiles partiellement hydrogénées [11]

Il apparaît donc clairement que dans les huiles partiellement hydrogénées, les AGT les plus présents sont ceux en C18 :1 et plus particulièrement en position 9, c'est-à-dire l'acide élaïdique (*Figure 5*).

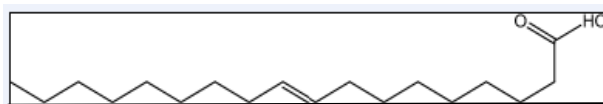


Figure 5 : Représentation de l'acide gras trans élaïdique

Ces AGT se retrouvent dans notre organisme et interfèrent avec le métabolisme de lipides. Ainsi il a notamment été montré que la cellule hépatique incorporait préférentiellement l'acide oléique dans les structures lipidiques plus complexes plutôt que l'ELA et que celui-ci est préférentiellement dégradé par β -oxydation [12].

L'organisme est donc susceptible d'incorporés des AGT d'origine naturelle ou industrielle issu de l'alimentation. Cependant, il est également capable de synthétiser certains AG.

B. Synthèse des acides gras insaturés de configuration cis :

Chez l'homme, la synthèse *de novo* des AG se déroule principalement dans les tissus lipogéniques tels que le foie, le tissu adipeux, les glandes mammaires et les reins. Dans certaines maladies telles que le cancer, une lipogenèse accrue est également observée dans les tissus touchés par la pathologie.

La biosynthèse des AGI à longue et très longue chaîne est initiée à partir de différents précurseurs synthétisés *de novo* (acétyl-CoA et malonyl-CoA) ou alimentaires pour les AGPI des familles en n-3 et n-6 - n étant le nombre d'atomes de carbone compris entre le groupement méthyl terminal et le premier atome de carbone impliqué dans une double liaison. Par exemple, pour le C18 :2 n-6, cet AG est formé de 18 atomes de carbone, comprenant deux double liaisons à compter du sixième carbone à partir de l'extrémité méthyl terminale.

1. Synthèse des acides gras polyinsaturés des familles en n-3 n-6 :

Les mammifères n'ont pas la capacité de produire les précurseurs des AGPI des familles en n-3 et n-6 qui sont respectivement les acides α -linoléique et linoléique [13, 14] . La seule source de ces précurseurs est l'alimentation. Ces AG sont dits indispensables.

Ces AG à 2 et 3 doubles liaisons sont alors pris en charge par la machinerie enzymatique (désaturases et/ou élongases) de notre organisme pour produire les différents AGPI des familles n-3 et n-6 (*Figure 6*) [13, 15].

Ainsi, l'acide linoléique (LA) (C18:2 n-6) peut être converti en acide γ -linoléique (GLA)(C18:3 n-6) par une $\Delta 6$ désaturase. L'acide dihomog γ -linoléique (DGLA) (C20:3 n-6) est issu de l'élongation de l'acide γ -linoléique (C18:3 n-6) par élongase. Le DGLA (C20:3 n-6) est substrat d'une $\Delta 5$ désaturase ayant pour produit l'acide arachidonique (AA) (C20:4 n-6) qui sous l'action d'élongase va aboutir à la formation de l'acide adrénique (C22:4 n-6). Ce dernier peut être converti en C24:4 n-6 par une étape d'élongation. La désaturation du C24:4 n-6 par une $\Delta 6$ désaturase permet la formation de C24:5 n-6 (*Figure 6*) [13, 15].

L'acide α -linoléique (ALA) (C18:3 n-3) peut être converti par une $\Delta 6$ désaturase en acide stéaridonique (SDA) (C18:4 n-3) qui sous l'action d'une élongase est converti en acide eicosatetraénoïque (C20:4 n-3). Ce dernier peut alors être substrat d'une $\Delta 5$ désaturase formant l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (C20:5 n-3), lui-même pouvant être converti en acide docosapentaénoïque (DPA) (C22:5 n-3) par une élongase. Ce dernier est converti en acide tetracosapentaénoïque (C24:5 n-3), qui peut alors subir une $\Delta 6$ désaturation pour fournir l'acide tetracosahexaénoïque (C24:6 n-3) (*Figure 6*) [13, 15].

Les C24:5 n-6 et C24:6 n-3 peuvent alors entrer dans la voie de β -oxydation peroxisomale pour fournir respectivement les 22:5 n-6 et 22:6 n-3 (DHA) (*Figure 6*) [13, 15].

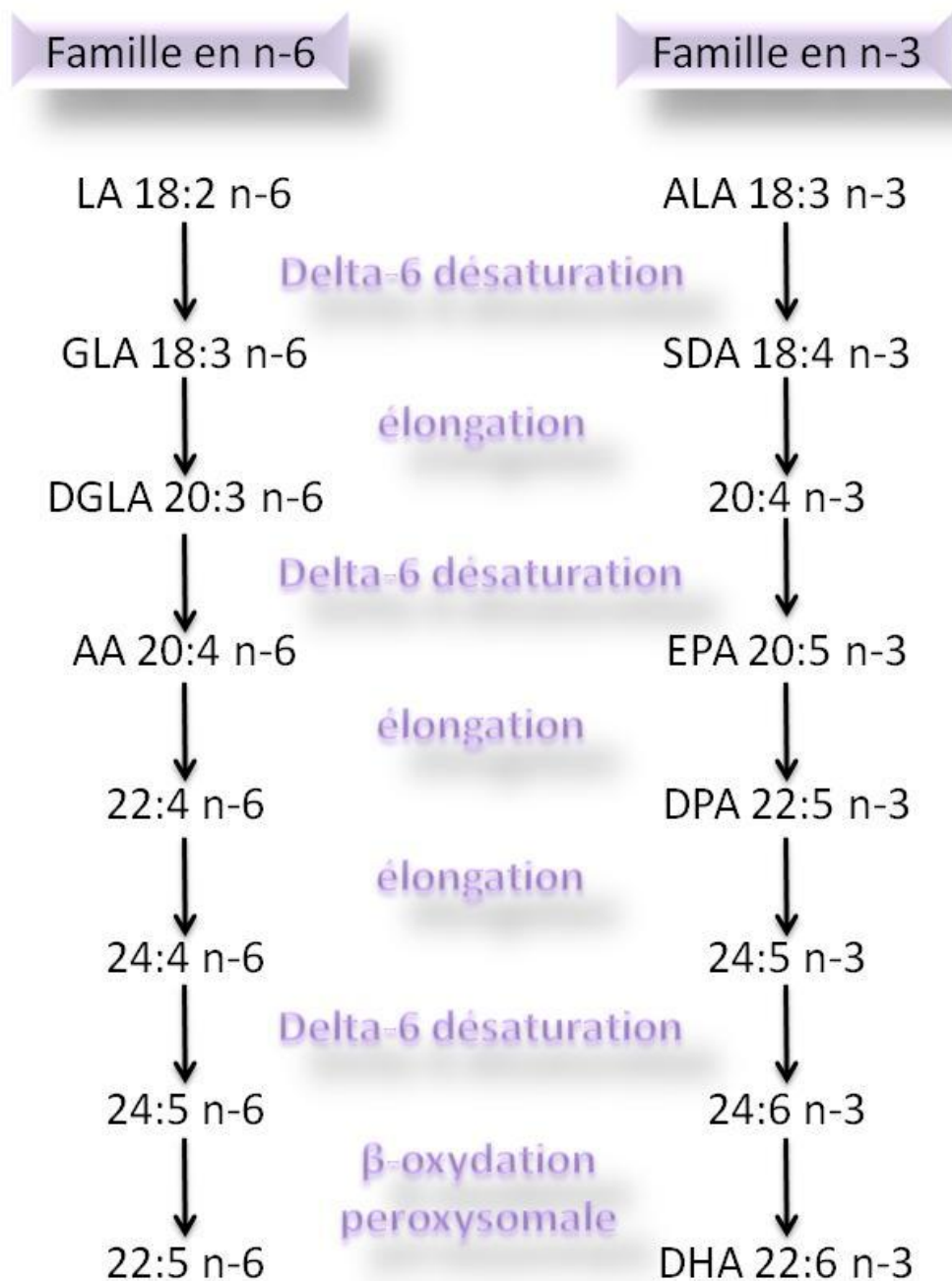


Figure 6: Biosynthèse des AGPI de la série n-3 et n-6 chez les mammifères

LA : l'acide linoléique, GLA : acide γ -linolénique, DGLA : acide dihomog γ -linolénique, AA : l'acide arachidonique, ALA : acide α -linolénique, SDA : acide stéaridonique, EPA : acide eicosapentaénoïque, DPA : acide docosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque

2. Synthèse des acides gras monoinsaturés en C16 et C18: ACC, FAS et SCD

La synthèse des AGMI à moyenne et longue chaîne (C16 et C18) débute par la formation d'acide palmitique qui est obtenu par l'action successive de deux enzymes : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS).

ACC catalyse la première étape de la biosynthèse des AG. Elle convertit l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, intermédiaire métabolique qui d'une part participe à la biosynthèse des AG et d'autre part inhibe leur transport vers le site de la β -oxydation (*Figure 7*) [16].

Il existe deux isoformes d'ACC (ACC1 et ACC2) se distinguant par une extension de 146 acides aminés en NH₂ terminal [17]. Les deux isoformes présentent plus de 70% d'homologie de séquence et une activité enzymatique similaire [17].

Les deux isoformes d'ACC sont localisées dans le tissu adipeux brun, le foie et le cerveau, tandis que le tissu adipeux blanc n'exprime que l'isoforme ACC1. ACC2 est prédominant dans le muscle squelettique et cardiaque [17, 18].

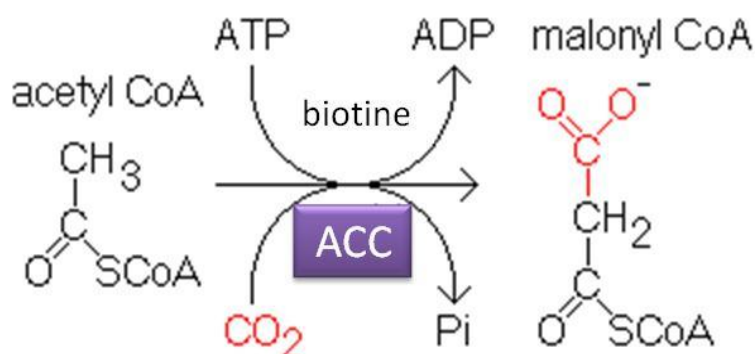


Figure 7 : Conversion de l'acétyl CoA en malonyl CoA par l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC)

Le malonyl-CoA synthétisé par l'action d'ACC est ensuite pris en charge par FAS qui est une enzyme multifonctionnelle constituée de deux chaînes polypeptidiques avec sept activités enzymatiques nécessaires à la biosynthèse des AG (*Figure 8*) [16]. Ces activités sont l'acétyl/malonyl-CoA transferase, β -cétoacyl synthase, β -cétoacyl reductase, β -hydroxyacyl déshydratase, enoyl reductase, ACP et thioesterase. Le nombre de cycles réactionnels peut varier de deux à huit aboutissant à la formation de tous les AG intermédiaires entre les AG à très courte chaîne (C4 :0) et l'acide stéarique (C18 :0). L'activité de FAS conduit principalement par la succession de sept cycles à la formation de l'acide palmitique (C16 :0) (*Figure 8*) [16].

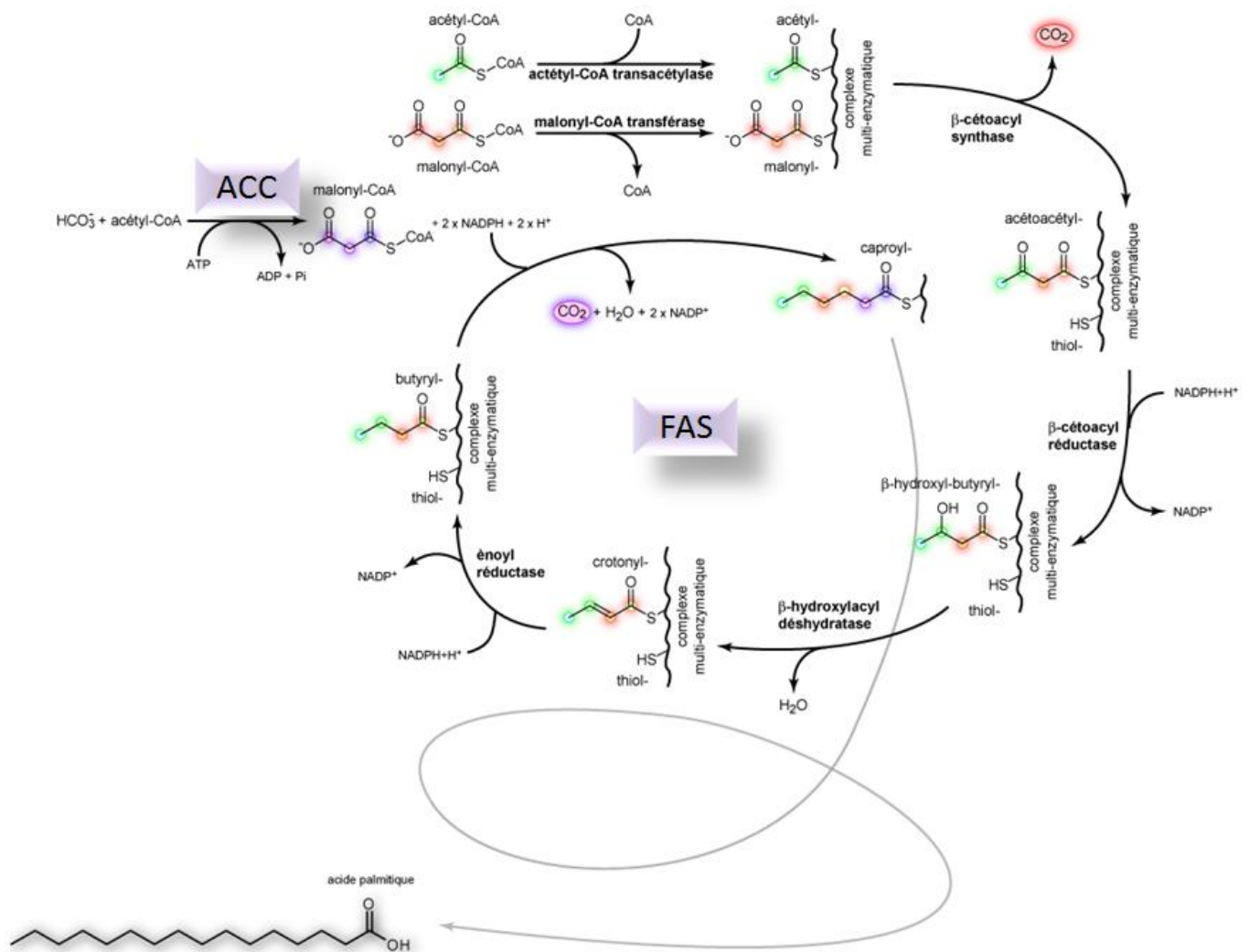


Figure 8 : Séquence de réactions de la biosynthèse des AG [19]

L'acide palmitique synthétisé à partir de l'action d'ACC et de FAS pourra ensuite être prise en charge par des enzymes modifiant sa longueur de chaîne et/ou insérant une double liaison. Nous nous intéresserons tout particulièrement à l'enzyme stearoyl-CoA désaturase (SCD) qui introduit une double liaison *cis* en position Δ⁹ de l'acide palmitique (C16 :0) et de l'acide stéarique (C18 :0) obtenu suite à une élongation de l'acide palmitique (Figure 9) [13]. Il en résulte la formation des AGMI C16 :1 n-7 (acide palmitoléique) et C18 :1 n-9 (acide oléique) (Figure 9) [13].

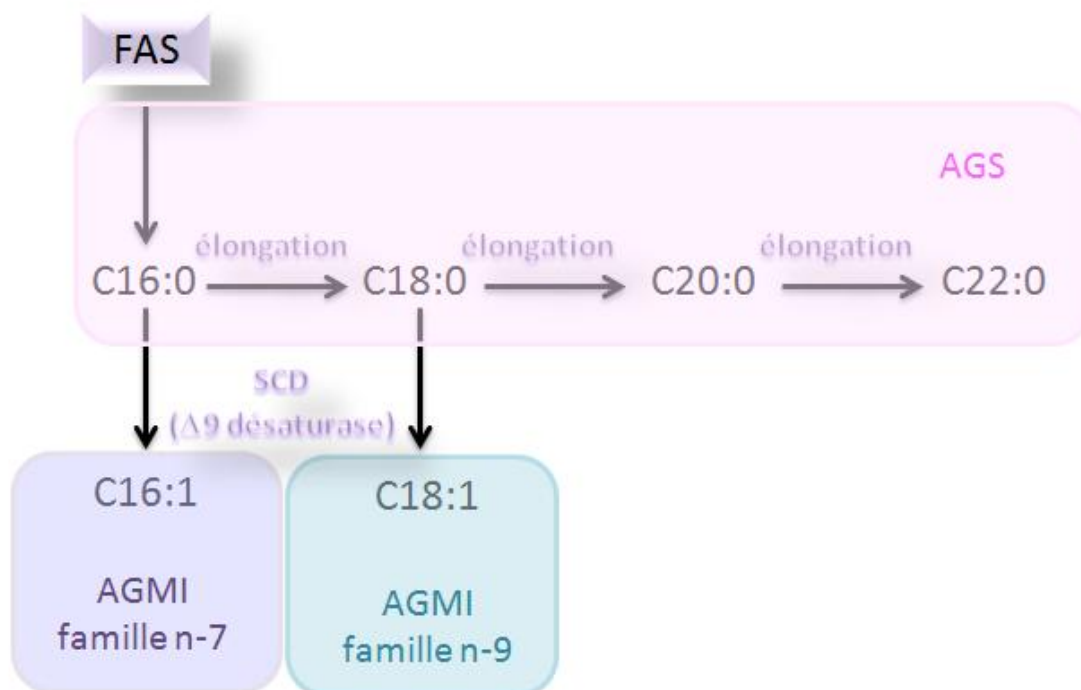


Figure 9: Biosynthèse des AG à longue chaîne chez les mammifères [13]

II. L'enzyme de biosynthèse des acides gras monoinsaturés en n-9 : la stéaroyl-CoA désaturase

A. Généralités :

L'enzyme responsable de la désaturation des AG en n-9 et le processus enzymatique à l'origine de l'addition de cette double liaison, ont été décrits pour la première fois chez la levure en 1960 par Bloomfield et Bloch [20]. L'enzyme responsable, la stéaroyl-CoA désaturase (SCD) a été purifiée en 1977 par l'équipe de James dans le foie de rat et en 1982 par l'équipe de Stumpf dans le carthame [21, 22]. La purification de l'enzyme est cependant partielle puisqu'*in vitro*, l'enzyme et ses différents cofacteurs n'induisent pas de réaction de désaturation ; la présence de microsomes reste indispensable.

SCD est une enzyme au carrefour de la synthèse lipidique et apparaît comme un élément clé du métabolisme lipidique.

L'activité SCD est dépendante de la présence de cofacteurs NADPH et de deux autres protéines, l'accepteur d'électrons cytochrome b5 et la flavoprotéine cytochrome b5 reductase.

SCD qui possède une activité $\Delta 9$ désaturase, introduit une double liaison *cis* en position 9 des acyl-CoA saturés (Figure 10) [4-6].

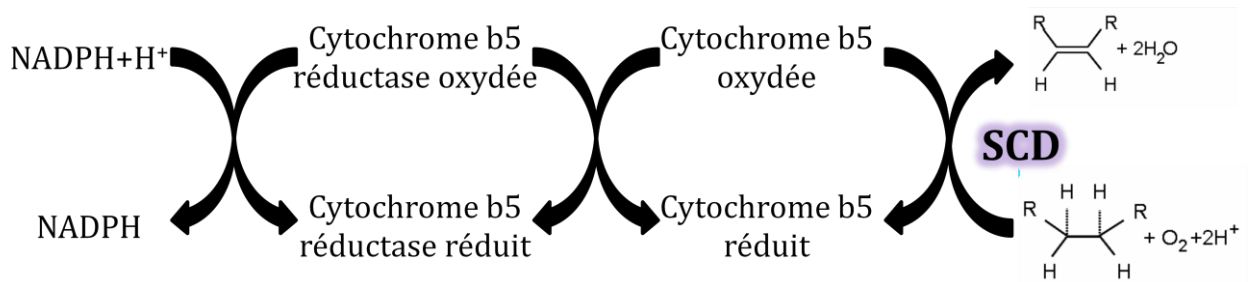


Figure 10 : Co-facteurs intervenant dans l'activité delta9 désaturase de SCD [23]

Ses substrats préférentiels sont le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA qu'elle convertit respectivement en palmitoleoyl-CoA et oléoyl-CoA [24, 25]. Les AGMI ainsi synthétisés entrent dans la composition de plusieurs classes lipidiques majeures, telles que les phospholipides (PL) - composants majoritaires des membranes biologiques-, les triglycérides (TG) et des esters de cholestérol (CE) (Figure 11) [23].

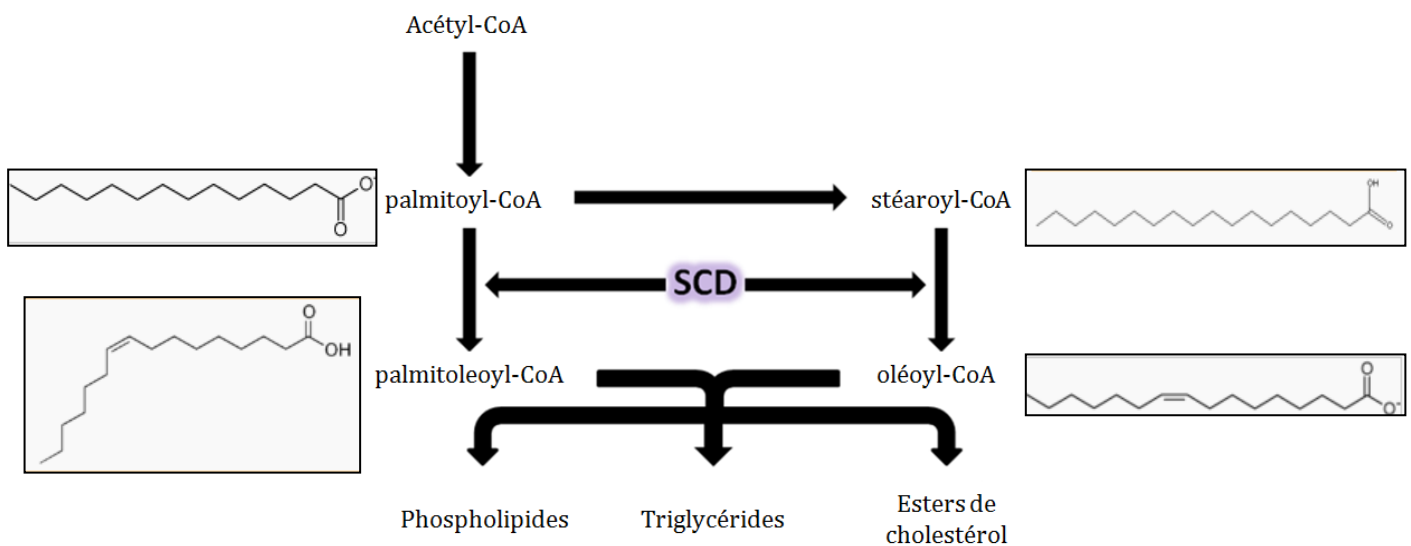


Figure 11 : Implication de SCD dans la synthèse lipidique [26]

B. Isoformes de la stéaroyl-CoA désaturase :

SCD a été clonée dans différentes espèces telles que la levure, *C.elegans*, le mouton, le hamster, le rat, la souris et l'Homme et existe sous plusieurs isoformes [27-36].

Chez l'Homme, deux isoformes ont été identifiées : SCD1 et SCD5. Le gène SCD1 est porté par le chromosome 10. Sa transcription donne lieu à la synthèse de deux ARNm de taille différente (3,9 et 5,2kb), conséquence de deux signaux de polyadénylation [36]. La protéine SCD1 est ubiquitaire mais présente à des taux variables selon le tissu considéré. Elle est fortement exprimée dans le foie. Un pseudogène SCD1, transcriptionnellement inactif, a également été découvert sur le chromosome 17. L'isoforme SCD5, découverte plus récemment, est codée par le gène ACOD4 du chromosome 4 [37]. Chez le fœtus, l'expression de SCD5 est exclusivement cérébrale. Chez l'adulte, la protéine SCD5 est présente dans le cerveau et le pancréas. Les protéines SCD1 et SCD5 possèdent une homologie de séquence de 58% [37].

Chez la souris, il existe 4 isoformes de SCD codées par 4 gènes distincts portés par le chromosome 19. Ces différentes isoformes possèdent une homologie de séquence en acides aminés comprise entre 85 et 88% [37]. La distribution tissulaire de chacune des isoformes dépend de la région 5' des gènes correspondants [37]. La protéine SCD1 est la plus exprimée. Elle est retrouvée à des taux variables dans l'ensemble des tissus. Le foie présente la plus forte expression de SCD1, la seule isoforme dans cet organe. SCD1 est également présente dans les reins, les poumons, l'estomac, les muscles et la peau. La protéine SCD2 est détectée au niveau du cerveau, des reins, des poumons, de la rate, de la peau, des testicules, et du tissu adipeux. Les isoformes SCD3 et SCD4 sont quant à elles exclusivement présentes dans la peau et le cœur respectivement [32, 38, 39]. Les différentes isoformes de SCD ne possèdent pas la même capacité à désaturer les substrats acides palmitique et stéarique. En effet, les deux AG sont substrats de SCD1, SCD2, et SCD4 tandis que SCD3 utilise préférentiellement l'acide palmitique [38].

Chez le rat, seules deux isoformes ont pour l'instant été identifiées : SCD1 et SCD2. Ces deux isoformes possèdent une répartition tissulaire et une homologie de séquence avec les isoformes SCD1 et SCD2 de la souris [31, 40].

C. Topologie de la protéine stéaroyl-CoA désaturase 1 :

La protéine SCD1 a une taille de 37kDa. C'est une enzyme ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Figure 12).

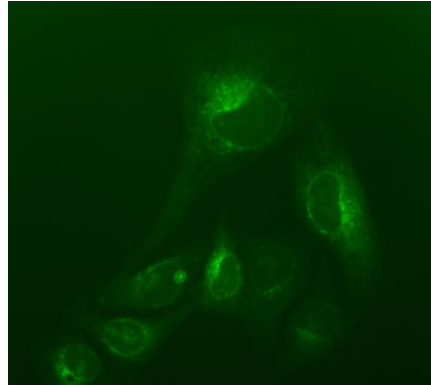


Figure 12: Localisation de la SCD dans le RE - Les cellules U2OS sont transfectées avec un plasmide contenant SCD couplés à la molécule fluorescence EGFP.

Elle contient quatre domaines transmembranaires avec les extrémités NH₂ et COOH situées dans le cytoplasme (Figure 13). Les deux boucles présentes au niveau de la lumière du RE sont assez courtes. L'unique boucle cytosolique est plus longue et contient deux domaines riches en histidine, chacun formant une boîte His. Ces deux boîtes associées à une troisième située du côté C-terminal forment le site catalytique de l'enzyme [41].

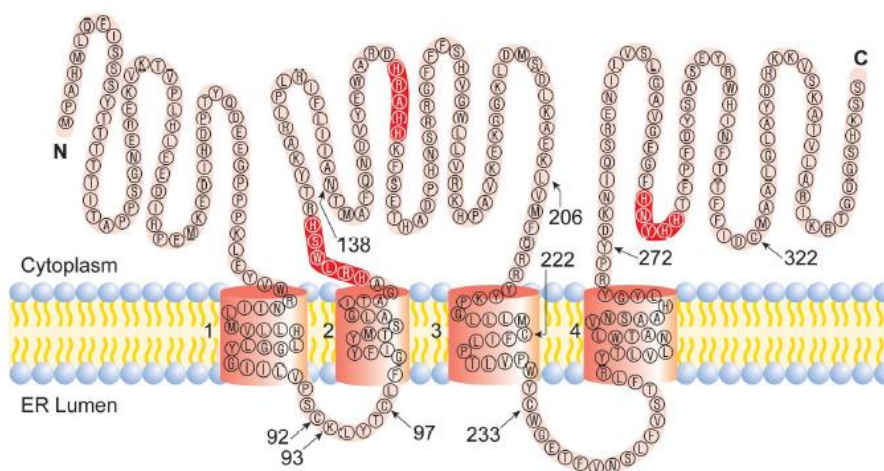


Figure 13 : Topologie membranaire de SCD [41]

D. Les régulations de la stéaroyl-CoA désaturase :

SCD possède un rôle clé dans la synthèse des AGMI et participe indirectement au renouvellement des membranes cellulaires, et au stockage des lipides excédentaires issus d'un surplus d'absorption lipidique et glucidique. De nombreux facteurs hormonaux et alimentaires régulent SCD (Tableau 3)[26]. Les régimes hyper-glucidiques, l'insuline, le glucose, le fructose, et le cholestérol par exemple induisent une augmentation de l'expression hépatique de SCD1. Tandis que les AGPI alimentaires, les isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA), les hormones thyroïdiennes et TNF- α inhibent l'expression hépatique de SCD1 (Tableau 3)[26].

Tableau 3 : Principaux facteurs régulant SCD

Facteurs alimentaires	Facteurs hormonaux	Autres
▼ Glucose	▲ Insuline	▲ Peroxysome
▲ Fructose A	▲ Hormones de croissances	▲ Température
▲ Vitamine A	▲ Estrogènes	▲ Fer
▲ Cholestérol	▲ Androgènes	▲ Agoniste LXR
▲ Vitamine D	▼ Leptine	▲ TGF-B
▼ AGPI	▼ Glucagon	▲ Lumière
▼ ▲ Alcool	▼ Hormones thyroïdiennes	▲ b-amiloid
▲ ▼ CLA	▲ ▼ Dehydroepiandrosterone	▼ Thiazolidinediones
		▼ Cadmium
		▼ TNF- α

L'expression du gène SCD est finement régulée. Une dérégulation de l'expression de SCD possède de nombreuses conséquences et aboutissent généralement au développement de pathologies tels que l'obésité, les dyslipidémies, le cancer ou les maladies cardiovasculaires.

Des études ont montré que la transcription de ce gène était finement contrôlée [26]. L'analyse informatique du promoteur de SCD1 humain et de souris montre la présence d'éléments de réponse à des facteurs de transcription connus pour leurs implications dans la régulation du métabolisme lipidique et qui pour certains se sont avérés réguler l'expression génique de SCD1 [36, 42].

1. Régulation transcriptionnelle :

Le promoteur SCD1 a été initialement décrit comme contenant un élément de réponse aux AGPI (PUFA-RE). Cet élément fut par la suite plus précisément caractérisé comme un élément de réponse au stérol (SRE) (Figure 14) [43].

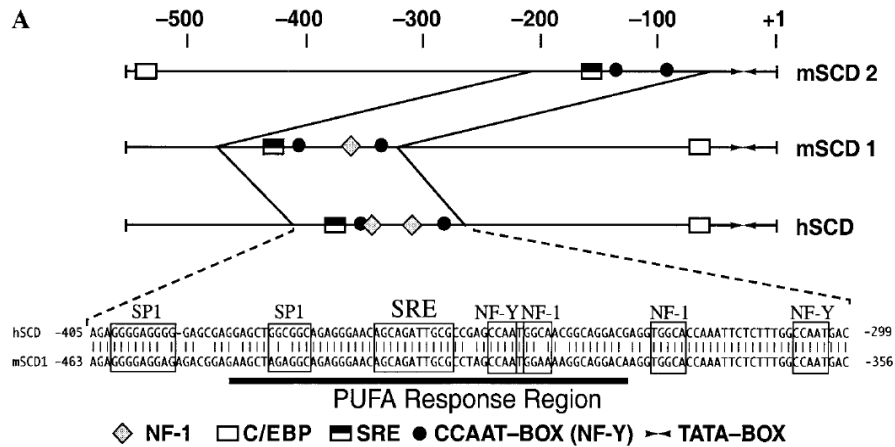


Figure 14: Localisation des éléments de réponse sur les promoteurs SCD1 et 2 murin et SCD1 humain [43]

a) SREBP :

Le facteur de transcription SREBP, est connu comme étant un régulateur important de SCD en se fixant sur le SRE situé en amont du site d'initiation de la transcription à -422pb pour SCD1 de souris et à -364pb pour SCD1 humain.

SREBP fait partie de la famille des leucine zipper hélice-boucle-hélice. Il fût initialement identifié comme un facteur liant le SRE sur le promoteur du gène des récepteurs aux LDL [44]. Il existe deux isoformes : SREBP-1 et SREBP-2 issues de la transcription de deux gènes différents. SREBP-1 possède deux isoformes : SREBP-1a et SREBP-1c issues de la transcription du même gène mais par deux sites d'initiation de transcription différents [45]. SREBP-2 est plus particulièrement impliquée dans la régulation du métabolisme du cholestérol. SREBP-1c cible les enzymes de synthèse des AG tandis que SREBP-1a cible à la fois les enzymes de la synthèse du cholestérol et des AG (Figure 15) [46].

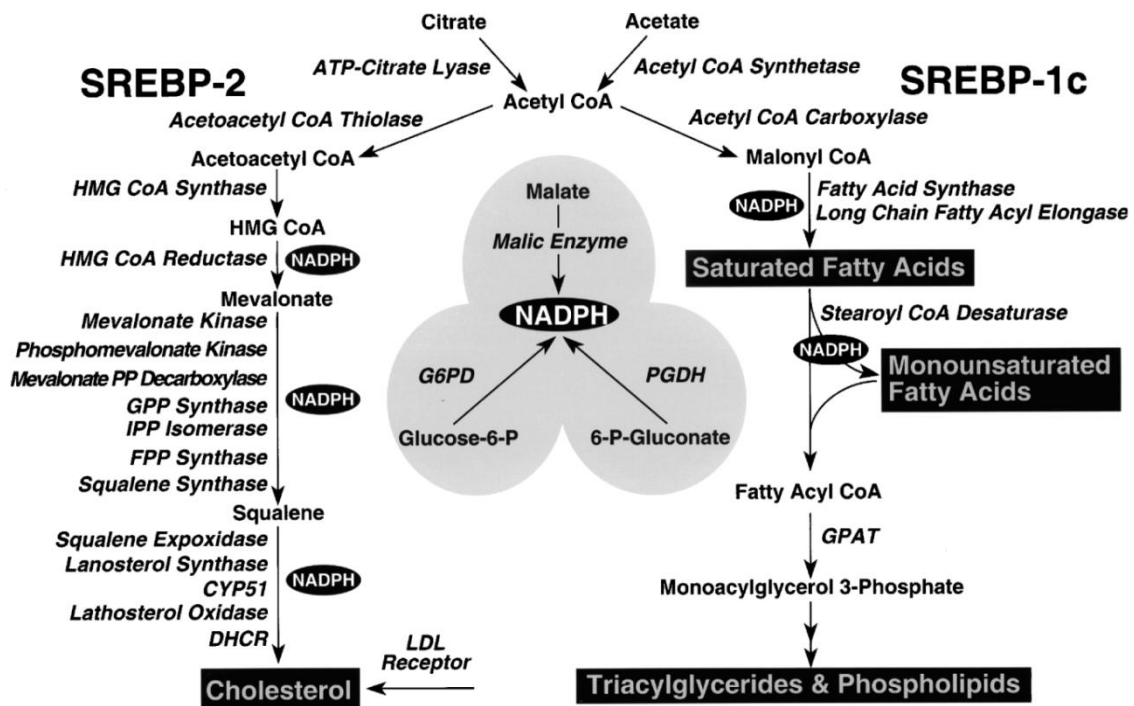


Figure 15: Régulation de la biosynthèse des AG et du cholestérol par SREBP [46]

Les gènes régulés par SREBP sont en italique -CYP51, lanosterol 14 α -demethylase; DHCR, 7-dehydrocholesterol reductase; FPP, farnesyl diphosphate; G6PD, glucose 6-phosphate dehydrogenase; GPAT, glycerol 3-phosphate acyltransferase ; GPP, geranylgeranyl pyrophosphate synthase ; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA ; IPP, isopentenyl pyrophosphate; LDL, low density lipoprotein ; PGDH, 6-phosphogluconate dehydrogenase.

SREBP est synthétisé sous forme de précurseurs d'environ 1150 acide aminés accrochés au RE. Les précurseurs de SREBP sont organisés en différents domaines : le domaine N-terminal d'environ 500 acides aminés contenant la région bHLH-Zip; deux segments transmembranaires hydrophobes interrompus par un court segment d'environ 30 acides aminés dans le lumen du RE; et le domaine C terminal d'approximativement 590 acides aminés. Pour être activé, le précurseur SREBP doit être libéré de la membrane afin d'être transloqué au noyau cellulaire [46].

Cette activation est réalisée par clivage protéolytique qui se déroule en deux temps et fait intervenir trois autres protéines (Figure 16) [46]. La protéine SCAP (SREBP cleavage-activating protein) sert à la fois d'escorte et de senseur de stérol. La protéine SCAP est ancrée dans le RE par huit domaines transmembranaires, dont cinq d'entre eux sont importants dans la perception aux stérols. Le domaine C-terminal de SCAP contient des régions hydrophiles qui médient l'interaction avec le domaine C terminal de SREBP.

Lorsque la demande cellulaire en lipides est augmentée, SCAP perçoit ces besoins et escorte SREBP du RE à l'appareil de Golgi. La protéase Site-1 clive alors SREBP au niveau de la boucle luminale hydrophile (*Figure 16*).

Le second clivage protéolytique est réalisé par la protéase Site-2, qui clive SREBP dans le premier segment transmembranaire, libérant ainsi le segment N-terminal de la membrane.

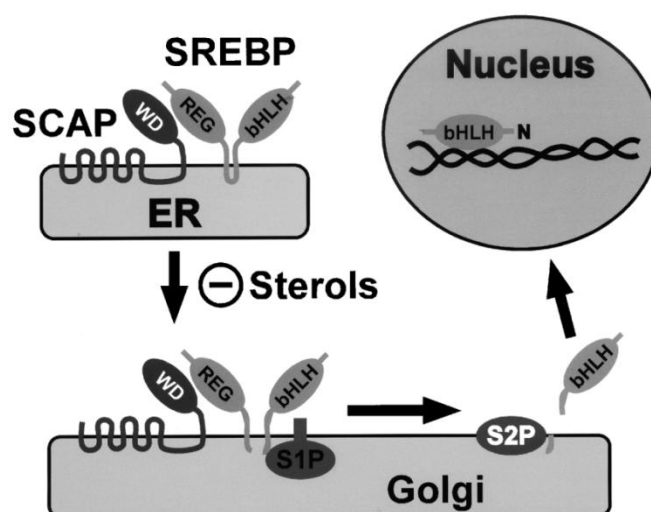


Figure 16: Clivage protéolytique de SREBP par les stérols [46]

bHLH, basic-helix-loop-helix-leucine zipper domain of SREBP; *REG*, regulatory domain of SREBP; *WD*, WD-repeat domain of SCAP; *S1P*, Site-1 protease; *S2P*, Site-2 protease.

Les facteurs de transcription de la famille SREBP mature peuvent alors se fixer sur l'élément *cis* du promoteur de SCD1 et ainsi réguler son expression.

Il a été montré que la répression de l'expression de SCD1 par les AGPI et le cholestérol est régulée par une inhibition de la maturation de SREBP1 et SREBP2 [23]. En effet, l'équipe de Ntambi a mis en évidence une répression de l'activité du promoteur de SCD1 lors de traitement par le cholestérol et les AGPI docohexahénoïque (DHA), arachidonique (AA) et eicosapentaénoïque (EPA) dans des cellules d'hépatocarcinomes. L'acide oléique ne semble pas modifier l'activité du promoteur SCD dans ces cellules [43].

Par ailleurs, l'induction de la prolifération cellulaire à partir de cellules quiescentes par l'ajout d'un facteur de croissance (PDGF-BB, KGF) est corrélée à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique - dont SCD1- via l'induction de la voie PI3K et JNK/SREBP dans des cellules fibroblastiques et de cancer du poumon [47, 48].

b) *LXR* :

La transcription de SCD1 est également régulée par le récepteur X hépatique (LXR) via son élément de réponse sur le promoteur (LXRE) [49]. LXR appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones et forme des hétérodimères avec les récepteurs X aux rétinoïds (RXR). Il en existe deux isoformes : LXR α et LXR β . Lorsque qu'un ligand tel que les oxysterols, se fixe sur LXR, le complexe régule des gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol et dans le métabolisme lipidique [49-51]. Des traitements avec le ligand synthétique agoniste de LXR (T0901317) augmentent l'expression de SCD1 dans le foie de souris et dans les cellules endothéliales humaines, les protégeant ainsi de la lipotoxicité des AGS [49, 52]. Il a également été démontré qu'une activation du facteur de transcription LXR participait à l'installation d'une hypertriglycéridémie, via une induction de SCD1 par des voies SREBP dépendantes et indépendantes [49, 53].

c) *PPAR* :

Le promoteur de SCD1 contient également des éléments de réponse aux PPAR (PPRE). Les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) se fixent sur les PPRE en association avec RXR. Les PPARs sont également des facteurs de transcription pouvant réguler l'expression de SCD1. Trois gènes de PPAR (α, β, γ) ont été clonés et séquencés dans différentes espèces : la xénope, la souris, le rat et l'humain [54]. Les différents tissus d'un organisme expriment préférentiellement l'une des trois isoformes de PPAR. Ainsi PPAR α est exprimé dans le foie, le tissu adipeux brun, le cœur, et les reins et est plus particulièrement responsable de l'induction des gènes du catabolisme lipidique. Chez les souris PPAR α $-/-$, la capacité d'induire SCD1 est fortement diminuée [55]. PPAR β est ubiquitaire et régule les gènes impliqués dans la β -oxydation. L'agoniste GW0742 de PPAR β inhibe également l'expression de SCD1 *in vitro* [56]. PPAR γ , exprimé préférentiellement dans le tissu adipeux, est impliqué dans la différenciation adipocytaire et régule les gènes impliqués dans le stockage lipidique. Une délétion des deux allèles de PPAR γ est létale dès le stade embryonnaire. Cependant une délétion d'un seul allèle induit une augmentation de la sensibilité à l'insuline et diminue l'impact des régimes induisant l'obésité [57, 58]. Les conséquences de la délétion de PPAR γ peuvent

être mis en relation avec le fait que PPAR γ augmente la transcription du gène SCD1 dans le foie de souris [59, 60].

Des médicaments anti-diabétiques comme le thiazolidinediones (TZD) agissent comme des ligands synthétiques de PPAR γ . Parmi trois formes de TZD que sont la troglitazone, rosiglitazone et la pioglitazone, la pioglitazone n'induit aucune modification de l'expression de SCD1 dans le sérum et le foie de rat Zucker [61]. En revanche, la rosiglitazone et la troglitazone ont des effets inverses puisque la rosiglitazone induit l'expression de SCD1 dans le tissu adipeux humain tandis que la troglitazone réprime le gène de SCD1 [62, 63]. Les mécanismes d'action des trois TZD sur SCD1 restent indéterminés.

d) Les récepteurs aux œstrogènes:

Les récepteurs aux œstrogènes constituent une autre classe de récepteurs nucléaires pouvant réguler l'expression de SCD. Ils existent sous deux formes : α et β . Lorsqu'un ligand s'y fixe, ils forment des homodimères ou des hétérodimères entre eux afin de réguler transcriptionnellement un certain nombre de gènes impliqués notamment dans le métabolisme lipidique. Chez les souris, dépourvues en récepteur, il a été montré une forte augmentation des enzymes de la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux. Plus particulièrement, une augmentation de SCD1 a été reliée à une augmentation de l'adiposité et de la résistance à l'insuline [64, 65]. L'équipe de Dahlman-Wright a montré la répression directe de l'activité du promoteur de SCD1 en présence d'œstrogènes, permettant chez des souris sous régime hyper-lipidique de réduire l'expression de SCD1 d'environ 80% [64].

2. Régulation de la stabilité de l'ARN:

La modulation de l'expression de SCD1 peut également avoir lieu au niveau post transcriptionnel. En effet, l'équipe de Ntambi montre une régulation de SCD1 au niveau de la stabilité de l'ARNm [66]. Dans des pré-adypocytes de souris 3T3-L1, la stabilité de l'ARNm de SCD1 est fortement réduite lors de traitements par l'acide arachidonique et conduit à une répression de l'activité de SCD1 d'environ 60% [66]. En effet, la demi-vie

de l'ARNm est réduite de 25h10 à 8h30. Des traitements par les AGPI linoléique et linolénique induisent également une inhibition de l'expression en ARNm de SCD1 tandis que l'acide oléique – un AGMI- et l'acide stéarique – un AGS- n'induisent aucune modification de l'expression en ARNm de SCD1 dans les adipocytes. Les AGPI répriment donc l'expression de SCD1 en diminuant la stabilité de son ARNm [66]. Une seconde étude conduite chez la levure conforte ces résultats. En effet, la demi-vie de l'ARNm de l'ole1 –gène codant la $\Delta 9$ désaturase chez la levure- est fortement diminuée lors de traitements par l'AGPI linoléique passant de 10min à moins de 2,5min. Les AGS en revanche ne régulent pas la stabilité de l'ARNm ole1 [67].

Ces résultats sont observés pour d'autres ARNm codant des facteurs liés au métabolisme lipidique telle que FAS. L'étude de la demi-vie de l'ARNm de la FAS dans des cellules pulmonaires fœtales lors de traitements par des glucocorticoïdes révèle une augmentation de la stabilité de l'ARNm de FAS –la demi-vie de l'ARNm passant de 4h à 7h21 [68].

3. Régulation post-traductionnelle de la stéaroyl-CoA :

Depuis déjà plus d'une quarantaine d'années, la régulation post-traductionnelle de SCD1 est envisagée. En effet, des souris soumises à un régime restreint en matière grasse présentent une augmentation de l'expression protéique de SCD1 de plus de 50 fois. Cette surexpression diminue rapidement, après un retour à une alimentation standard jusqu'à des niveaux indétectables suggérant une dégradation rapide de la protéine SCD1, indépendamment d'une régulation transcriptionnelle [69].

SCD1 est une protéine à demi-vie courte d'environ 3h30 dont la dégradation peut être à la fois dépendante et indépendante du protéasome [70-72].

Il a tout d'abord été montré que dans le foie, SCD1 est dégradée par une voie indépendante du protéasome [70]. L'équipe d'Ozols a caractérisé et purifié une protéase de type ER plasminogène (PLG) responsable de la dégradation de SCD dans des microsomes de foie de rat [70, 71, 73, 74]. Ils mettent en évidence l'importance d'un résidu lysine en N-terminal dans la dégradation de la protéine SCD1. Une mutation de ce résidu par un résidu alanine induit une augmentation de la stabilité de la protéine SCD1 sans modifier son activité [75].

Une seconde étude a démontré l'implication du protéasome dans la dégradation de SCD1. L'équipe de Kato décrit que la dégradation SCD1 peut être réduite par des inhibiteurs du protéasome et que la protéine SCD1 avec l'étiquette de polyubiquitine s'accumule dans le RE [72]. Ils ont montré que la modification post-traductionnelle de SCD1 était corrélée avec son interaction avec AAA-ATPase p97. Cette dernière est recrutée par la voie proteasome-dependant ER associated degradation (ERAD), indiquant une possible implication de cette voie dans la régulation du taux de SCD1, dans les cellules de mammifère. De plus, cette équipe démontre l'importance de la séquence PEST - riche en proline, glutamine, sérine et thréonine - et plus particulièrement du résidu 66 du segment N-terminal de SCD1, dans la régulation de sa dégradation par le protéasome dans le RE [72, 76].

4. Régulation allostérique :

Depuis quelques années, nous assistons au développement de nouveaux outils moléculaires qui permettent une meilleure compréhension des fonctions biologiques de SCD1 tels que les souris SCD1-/- ou asebia (qui possèdent une mutation naturelle de SCD1), les oligonucléotides antisens et les inhibiteurs de l'activité SCD.

Des inhibiteurs de SCD1 ont été rapportés initialement, tels que l'acide 9-thiastéarique, l'acide sterculique et l'isomère conjugué de l'acide linoléique (t10c12CLA) [77]. Leur manque de spécificité ne permet pas de les utiliser comme inhibiteurs de SCD et le développement d'outils plus appropriés était nécessaire.

De grands groupes pharmaceutiques ont pris l'initiative de développer des inhibiteurs synthétiques de SCD, afin de déterminer son implication dans des pathologies tels que l'obésité, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Les enjeux commerciaux sont importants et une véritable compétition s'est installée. En effet, plus de 70 inhibiteurs de SCD1 ont été recensés ces 5 dernières années [77, 78].

La localisation membranaire de SCD rend difficile l'obtention d'une structure cristallographique de cette protéine, qui permettrait de guider la conception de médicaments basés sur sa structure. Ainsi, la découverte de molécules inhibant SCD est fondée sur le dépistage à haut débit de dérivés moléculaires. Il existe plusieurs familles d'inhibiteurs. Nous pouvons citer par exemple les dérivés de la famille azine (pyridazine,

pyrazine, piperidine), d'acides tétrazoleacétique, de pteridione, de pyrazolyl, d'azolanone et les bicyclique pyrrolopyrrolodiamine.

Tous ces dérivés sont des inhibiteurs de SCD mais les effets biologiques *in vivo* de ces composés demeurent pour la plupart inconnus. Les données dont on dispose actuellement sur ces inhibiteurs concernent essentiellement ceux de la famille des azines. En effet, des souris ob/ob traitées par un dérivé pyridazine-piperidine-urée pendant 4 jours présentent un index de désaturation (ratio C16:0/C16:1 et C18:0/C18:1) plus faible dans leurs triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol (sans effet secondaire apparent). Une seconde étude portant sur des souris sous régime induisant l'obésité pendant trois semaines met en évidence que ce même composé, induit comme précédemment une diminution des index de désaturation dans les triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol. Cependant, cette étude met également en évidence des effets secondaires importants -développement de problèmes de peau, alopécie.

Plus récemment, l'équipe de Zablocki a mis au point un certain nombre d'inhibiteurs de SCD1 dérivés de pyrazine acetamide [79-81]. Le plus prometteur d'entre eux, le CVT-11127, testé sur des microsomes de foie de rat et des cellules humaines HepG2, inhibe spécifiquement SCD sans inhiber les $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases. De plus, des dosages aux niveaux de différents organes et du plasma montrent une bonne biodisponibilité de la molécule et une bonne incorporation au niveau du foie – principal organe impliqué dans la biosynthèse lipidique. L'équipe d'Igal a décrit plus spécifiquement les effets biologiques de cet inhibiteur - le composé CVT-11127 - sur trois lignées de cancers pulmonaires (H1299, H460, et A549). Ils ont montré une inhibition spécifique de SCD1 dans les trois lignées ainsi qu'une diminution du ratio AGMI sur AGS [82].

Ces composés fournissent de nouveaux outils et molécules pharmacologiques de pointe afin d'appréhender le rôle de SCD1. Malheureusement, de nombreuses molécules inhibant SCD sont soumises à des brevets ne permettant pas de connaître l'état d'avancement des données *in vivo*.

Néanmoins, des progrès importants dans la découverte et la caractérisation de nouveaux inhibiteurs de SCD1 apportent de nouvelles données sur les mécanismes d'action, la gamme d'index chimique de désaturation et à l'optimisation chimique de ces composés. Ces avancées aideront à fournir les informations nécessaires pour développer la prochaine génération des inhibiteurs de SCD1 plus spécifiques nécessaires en thérapie.

Chapitre 1 : Métabolisme des acides gras monoinsaturés et cancer

Introduction :

I. Généralités :

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) décrit le cancer comme *“un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases. De nombreux cancers peuvent être prévenus en évitant les principaux facteurs de risque, comme le tabagisme. Un nombre significatif de cancers peuvent être soignés par la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie surtout s'ils sont détectés suffisamment tôt.”*

En 1965, l'OMS a créé un centre épidémiologique propre à l'étude de l'incidence des cancers. Le département d'épidémiologie descriptive du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a permis de réaliser des estimations sur l'incidence du cancer dans le monde. Ces données ont été récoltées dans le cadre du projet GLOBOCAN 2002.

L'union Européenne a mis à disposition des chercheurs un réseau européen des registres des cancers (ENCR) chargé depuis 1989 de rassembler les données sur les cancers européens et de les homogénéiser. Ces organismes ont permis de dresser un état des lieux de l'incidence des cancers dans le monde et plus particulièrement en Europe.

Le cancer touche environ 10 millions de personnes dans le monde. Plus de 4,4 millions des cas proviennent d'Asie, dont 2,5 millions d'Asie Orientale qui a l'incidence la plus élevée. Le nombre de cas diagnostiqués en Amérique du Nord est estimé à 1,4 millions, en Afrique à 630 000 et en Europe à 3,2 millions. Au niveau de l'Europe, l'équipe de Ferlay a d'ailleurs publié en 2007 l'incidence -nombre de nouveaux cas diagnostiqués - et la mortalité des cancers (*Figure 17*) [83].

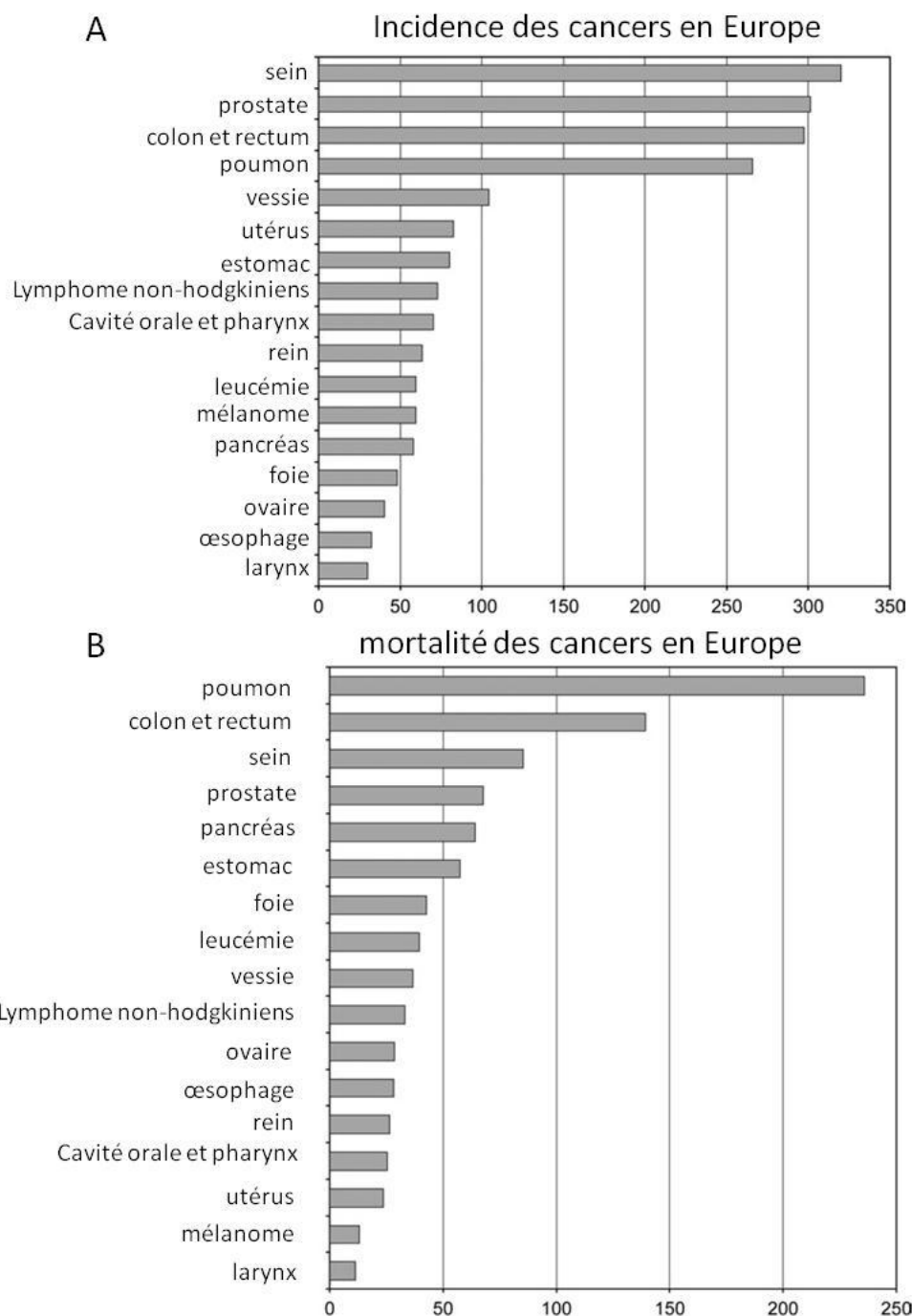


Figure 17 : Estimation en milliers de l'incidence (A) et de la mortalité (B) des différents cancers en Europe [83]

En 2006 en Europe, l'estimation du nombre de cancers diagnostiqués est de 2 288 100 et l'estimation de mort par cancer est de 1 165 500.

Le cancer est donc un problème de santé publique majeur et particulièrement dans les pays industrialisés. Les efforts engagés dans les domaines de la recherche, de la prévention et du soin ont néanmoins permis de réduire les taux de mortalité.

A. Facteurs de risque:

Les principaux facteurs de risque sont d'une part héréditaires (en particulier pour le cancer du sein et du côlon) et d'autre part environnementaux. Le développement de cancer suite à une exposition environnementale est estimé à 70% des cas. La transmission héréditaire de mutations aboutissant au cancer représente cinq à dix pourcents des cas. Vingt à vingt cinq pourcents des cas restant sont dus à des mutations touchant des cellules somatiques suite à une absence de réparation (système de contrôle du cycle cellulaire ou machinerie de réparation défectueuse). Le risque de développer un cancer augmente également considérablement avec l'âge. En effet, de nombreuses mutations sont nécessaires à l'aboutissement d'une tumeur, et son apparition nécessite souvent de nombreuses années.

Parmi les facteurs environnementaux, nous pouvons citer le tabac, la pollution –forte incidence sur les cancers du poumon et des voies aériennes-, l'alcool – fortement impliqué dans les cancers du foie, bouche, gorge et œsophage. De plus en plus d'études tendent à démontrer l'importance de l'alimentation comme facteur de risque dans le développement de cancers. Celle-ci a notamment été mise en cause dans les cancers du foie, du sein, de la prostate et du colon. De plus, plusieurs études ont montré un rôle chimioprotecteur de certains aliments qui pourraient interrompre l'évolution de cancer à différent stade [84-86].

B. Oncogenèse :

1. Généralités :

La prolifération, la différenciation, et la survie des différentes cellules sont ajustées en conformité avec les besoins de l'organisme. Au cours du développement normal et tout au long de la vie, des mécanismes cellulaires régulent l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire en réponse aux signaux environnants et à la différenciation. Dans un organisme "sain", la prolifération des cellules différenciées d'un tissu varie en fonction du besoin de renouvellement cellulaire. Par exemple, les cellules épithéliales intestinales ont une durée de vie courte -3 à 4 jours- et prolifèrent rapidement. En revanche, les cellules de nombreux tissus adultes normaux –tels que les cellules musculaires lisses

vasculaires - prolifèrent très peu. Ces cellules restent fonctionnelles pendant de longues périodes. Elles prolifèrent surtout pendant les processus de réparations tissulaires [87, 88].

La perte de la régulation cellulaire orchestrée par des mutations, conduit à la plupart des cancers. Les mutations aboutissant aux cancers sont principalement dues à des expositions à des agents cancérigènes, ou à l'irradiation par des ultra-violets. De telles mutations interviennent surtout au niveau des cellules somatiques et plus rarement au niveau des cellules germinales, et ne sera transmis au descendant qu'en cas de mutation sur les cellules germinales.

La mutation d'un seul gène conduit rarement à un cancer. C'est la succession de plusieurs mutations dans la cellule qui lui confère un avantage prolifératif et de survie entraînant l'apparition d'une cellule cancéreuse, qui va alors se multiplier de façon anarchique formant une tumeur.

Des mutations de deux grandes classes de gènes sont impliquées dans la formation de cancer : les proto-oncogènes et les gènes suppresseur de tumeur. Suite à une mutation, les proto-oncogènes deviennent des oncogènes qui amplifient de manière excessive leur activité inductrice de prolifération. Les gènes suppresseurs de tumeur inhibent la croissance cellulaire. Leur déficience entraîne une prolifération accrue et le développement de la tumeur [89, 90].

Le passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse, - processus appelé transformation-, correspond à l'acquisition de propriétés caractéristiques : prolifération incontrôlée, envahissement des tissus adjacents, colonisation d'organes à distance, instabilité génétique, etc. La transformation passe par l'acquisition de six propriétés : indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération, insensibilité aux signaux inhibiteurs, abolition de l'apoptose, capacité proliférative illimitée, capacité de susciter l'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux sanguins), acquisition d'un pouvoir invasif (*Figure 18*) [91].

L'apparition des sites secondaires de cancer ont un impact plus lourd sur la santé. Le processus métastatique est complexe et comprend plusieurs étapes. L'invasion de nouveaux tissus n'est pas aléatoire. Elle dépend de la cellule qui métastase et du tissu envahi. La dissémination est favorisée par la production de facteurs de croissances et d'agents favorisant l'angiogenèse [92].

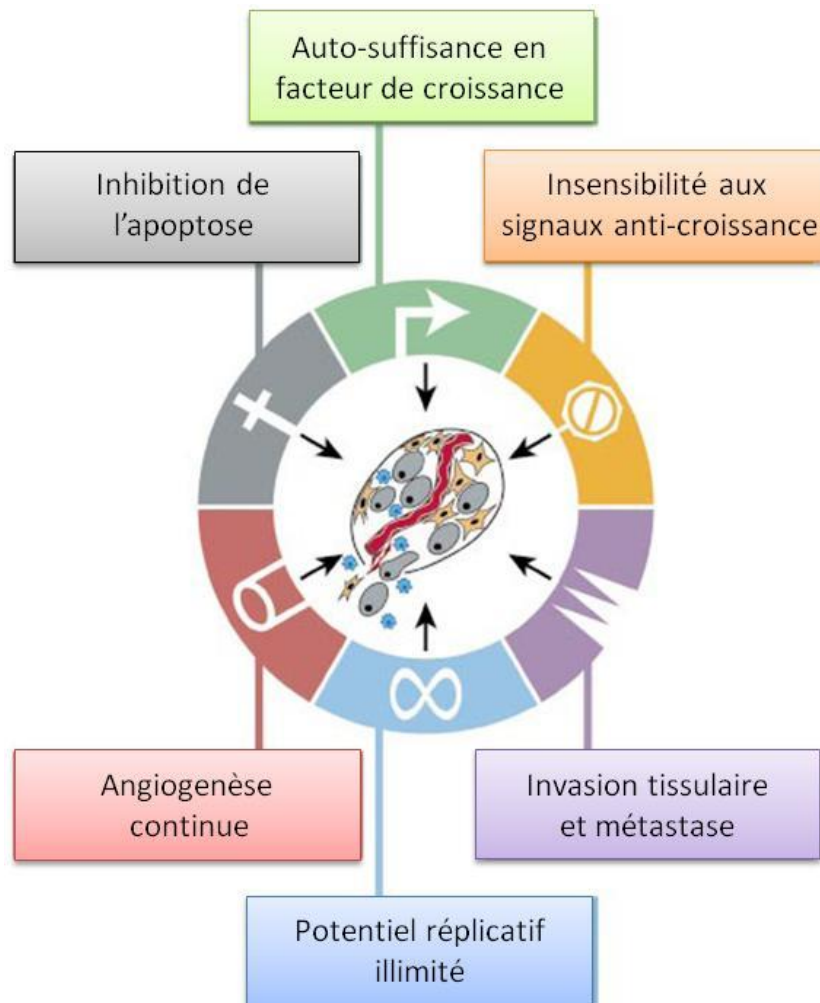


Figure 18 : Acquisition des propriétés de la cellule cancéreuse [91].

Au cours de la cancérogenèse, les propriétés cellulaires fondamentales représentées sont fortement altérées.

2. Autosuffisance en facteur de croissance :

Une cellule normale requiert des signaux de croissance mitogénique afin de rentrer dans le cycle cellulaire (passage de la phase G0 à G1) et pouvoir se diviser. Ces signaux sont transmis à la cellule par des récepteurs transmembranaires qui fixent différentes classes de molécules de signalisation : des facteurs de croissances, des composants de matrice extracellulaire et des molécules d'interaction (adhésion) de cellules à cellules. Aucune cellule normale ne peut proliférer sans de tels signaux. De nombreux oncogènes agissent en mimant des signaux de croissance normaux. Les cellules tumorales génèrent ainsi leurs propres signaux de croissances, réduisant ainsi leurs dépendances aux stimulations micro-environnementales du tissu sain.

La libération de cette dépendance perturbe gravement les mécanismes homéostatiques opérant normalement pour assurer un comportement approprié aux différentes cellules constituant un tissu.

L'acquisition de l'autonomie au facteur de croissance est la première étape du processus de transformation d'une cellule cancéreuse.

Trois stratégies moléculaires pour acquérir cette autonomie sont mises en place : l'altération des signaux extracellulaires de croissances, la transmission trans-cellulaire de signaux de croissance ou de signaux intracellulaires. Comme la plupart des facteurs de croissance sont fabriqués par un type cellulaire pour promouvoir la prolifération d'autre type de cellules – processus hétérotypique de signalisation-, de nombreuses cellules cancéreuses sont capables de synthétiser des facteurs de croissances auxquels elles sont sensibles créant un rétrocontrôle positif – stimulation autocrine. La production de facteur de croissance par les cellules cancéreuses leur permet de s'affranchir des facteurs de croissances des autres cellules formant le tissu. Par exemple, les glioblastomes et les sarcomes secrètent respectivement du PDGF et du TGF α [93, 94]. Pendant le développement de la pathologie, les récepteurs de surfaces qui transmettent les signaux de croissances sont également dérégulés. Dans de nombreux cancers, les récepteurs aux facteurs de croissances –qui possèdent la plupart du temps une activité tyrosine kinase dans leurs domaines cytoplasmiques- sont surexprimés. Cette surexpression de récepteurs permettrait aux cellules de devenir plus sensible aux facteurs de croissances présents dans l'environnement qui en temps normal n'induirait pas de prolifération cellulaire. Par exemple, les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques EGF-R/erbB et HER/neu sont surexprimés dans les tumeurs de l'estomac et du sein [95, 96].

De plus, une surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance peut provoquer des signaux indépendamment de la fixation d'un ligand [97]. Les signaux indépendants des ligands peuvent également être obtenus par des modifications de structure aux récepteurs. Par exemple, dans des versions tronquées aux récepteurs EGF, une partie du domaine cytoplasmique est manquante [98].

Les cellules cancéreuses expriment différentes intégrines – récepteur hétérodimérique reliant la cellule cancéreuse à la matrice extracellulaire (MEC) - et elles peuvent favoriser l'expression des intégrines induisant des signaux de prolifération [99, 100]. La fixation de ligand de la MEC aux intégrines des cellules cancéreuses, est capable de

transduire le signal dans le cytoplasme et influencer le comportement cellulaire tels que l'entrée en prolifération, la résistance à l'apoptose, et la motilité cellulaire. Inversement, un dysfonctionnement des intégrines conduit la cellule à la perte de mobilité, la mort par apoptose ou un arrêt de la prolifération [100]. Les ligands des récepteurs aux facteurs de croissance et aux intégrines pro-prolifératives peuvent également activer les voies de signalisation SOS-Ras-Raf-MAP kinase (*Figure 19*) [100, 101].

La cascade de SOS-Ras-Raf-MAPK joue un rôle central dans l'indépendance des signaux de croissance. Dans environ 25% des tumeurs chez l'homme, la protéine Ras est présente sous la forme de sa structure altérée, permettant de libérer un flux de signaux mitogéniques dans les cellules [102].

Une dérégulation des voies de signalisation induite par les facteurs de croissance est soupçonnée dans toutes les tumeurs humaines. Bien qu'il soit difficile de le prouver rigoureusement, il existe de nombreux indices pouvant suggérer cette hypothèse [103]. Par exemple, dans les carcinomes coliques humains, environ la moitié des tumeurs présente des mutations au niveau de l'oncogène *ras* [104]. Des mutations au niveau d'autres éléments des voies de signalisation sont suspectées dans l'autre moitié des cas.

Les études des 20 dernières années ont permis de mieux définir les mécanismes de prolifération des cellules de mammifère (*Figure 19*). La voie de signalisation principale est la voie SOS-Ras-Raf-MAPK, mais chaque effecteur de cette voie peut induire d'autres voies – qui restent minoritaires – et qui expliquent les multiples effets biologiques observés (*Figure 19*) [103, 105].

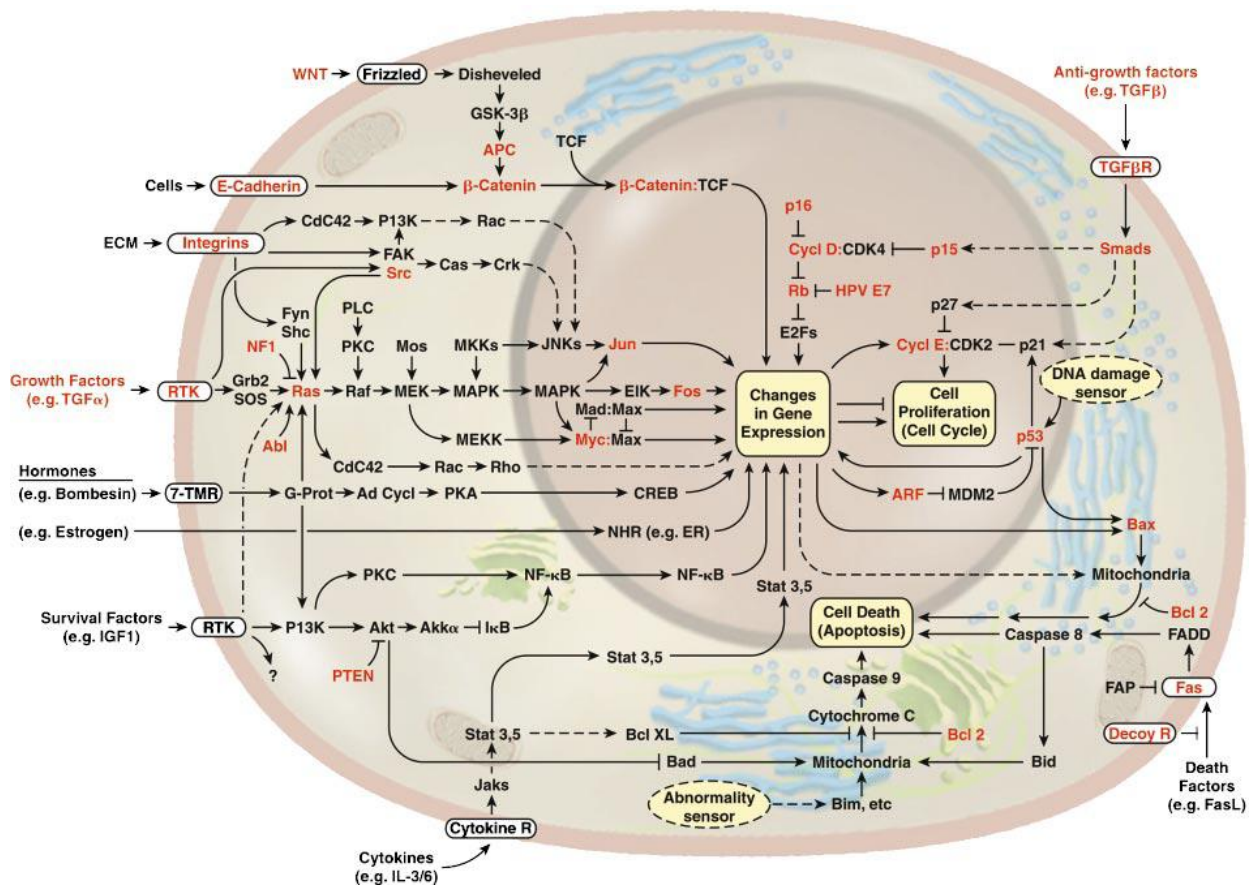


Figure 19: Mécanisme du maintien de la balance prolifération/apoptose d'une cellule de mammifère selon D.Hanahan et Weinberg [91]

3. Insensibilité aux signaux anti-croissance :

Dans un tissu normal, de multiples signaux antiprolifératifs permettent un maintien des cellules en quiescence. Ces signaux sont issus à la fois d'inhibiteurs de croissance solubles et d'inhibiteurs d'immobilité incorporés dans la MEC et sur les surfaces des cellules voisines. Ces signaux d'inhibition de la croissance, tout comme les facteurs de croissance, sont des ligands des récepteurs transmembranaires.

Les signaux anti-prolifératifs peuvent contraindre les cellules à quitter le cycle cellulaire et de rentrer en phase de quiescence G0. Les cellules cancéreuses naissantes doivent se soustraire à ces signaux antiprolifératifs si elles veulent se développer pour former des tumeurs.

Dans une cellule saine, l'entrée dans le cycle cellulaire par la phase G1 est étroitement corrélée aux signaux environnant la cellule. Un point de passage permet d'indiquer à la

cellule si elle peut se diviser, ou si elle doit rester en phase de quiescence G0. Cette étape est donc très contrôlée et peut-être régulée au niveau moléculaire par les protéines du rétinoblastome (pRb), p107 et p130. Lorsque la protéine pRb n'est pas phosphorylée, elle bloque la prolifération en séquestrant et en altérant la fonction du facteur de transcription E2F – qui contrôle l'expression de nombreux gènes essentiel à la cellule pour le passage de la phase G1 à S (*Figure 19*) [106].

Dans les cellules cancéreuses, la perturbation de la voie pRb libère E2F et permet ainsi la prolifération cellulaire. Les cellules deviennent alors insensibles aux facteurs anti-croissance qui opèrent en utilisant cette voie pour bloquer la progression des cellules dans le cycle cellulaire à travers la phase G1.

Parmi les facteurs anti-croissance, TGF β agit en prévenant la phosphorylation de pRb – sa forme inactive- et bloquant ainsi le cycle cellulaire.

Dans certains types de cellules, TGF β réprime l'expression du gène c-myc - régulant le cycle cellulaire au niveau de la phase G1- par des voies encore inconnues [107].

Plus directement, TGF β est responsable de la synthèse des protéines p21 et p15^{INK4B}, qui bloquent les complexes cycline/CDK responsables de la phosphorylation de pRb (*Figure 19*) [108, 109].

Dans différents types de tumeurs humaines, il a été retrouvé des perturbations des voies de signalisation empruntées par les facteurs anti-croissance et notamment TGF β [110].

Ainsi, la signalisation des facteurs anti-croissance converge sur Rb et le cycle cellulaire qui sont altérés dans la majorité des cancers humains.

4. Inhibition de l'apoptose :

Les cellules tumorales possèdent également la capacité de résister à la mort cellulaire programmée : l'apoptose.

Le consensus selon lequel l'apoptose serait une barrière au développement du cancer a été énoncé la première fois en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie [111]. Ils décrivent une apoptose massive dans les cellules en croissance rapide dans des tumeurs hormono-dépendantes.

De plus, chez les souris transgéniques où le suppresseur de tumeur pRb a été inactivé dans le plexus choroïde, les tumeurs sont à croissance lente, présentent une forme massive d'apoptose, et la protéine p53 suppresseur tumeur est inactive[112].

Des souris transgéniques délétères de l'expression du gène IGF-2 sont sujettes aux tumeurs des îlots pancréatiques. La croissance et la progression tumorale est affaiblies, comme en témoigne l'apparition de tumeurs bénignes relativement petite, avec des taux élevés d'apoptose [113]. Dans ces cellules, l'absence de l'IGF-2 n'a pas d'incidence sur les taux de prolifération cellulaire, clairement identifié comme un facteur de survie anti-apoptotiques.

La résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses peut-être acquise à travers une variété de stratégies.

La plus fréquente est la perte de fonctionnalité du gène suppresseur de tumeur p53. Sa perte de fonctionnalité est considérée responsable de plus de 50% des cancers chez l'homme. Au cours de stress de cellules saines tels que l'hypoxie ou l'hypertension, celles-ci meurt par apoptose via un mécanisme p53 dépendant. En cas de perte de la fonctionnalité de p53, les cellules ne vont pas mourir par apoptose, et ainsi continuer leur prolifération en ayant des dommages à l'ADN, pouvant aboutir au développement d'une tumeur [114].

De plus, la voie PI3 kinase-AKT/PKB, qui transmet des signaux de survie anti-apoptotiques, est vraisemblablement impliquée dans l'apoptose et atténuée dans la plupart des tumeurs humaines. Cette voie de signalisation de survie peut être activée par des facteurs extracellulaires tels que l'IGF-1 / 2 ou d'IL-3, par des signaux intracellulaires émanant de Ras, ou par la perte du suppresseur de tumeur PTEN, [115-117].

De même, dans de nombreuses lignées de cancer du poumon et du côlon, il a été montré que le signal initiateur d'apoptose FAS était inactif [118]. Un récepteur mimant FAS mais n'induisant aucun signal, est surexprimé dans ces cellules, rendant le récepteur de mort FAS inactif.

Toutes ces stratégies ont pour but ultime de contourner les effets de l'apoptose et de permettre à la cellule cancéreuse de poursuivre sa propagation.

5. Potentiel répliatif illimité :

L'acquisition des trois capacités autosuffisance en facteur de croissance, insensibilité aux signaux anti-croissances, et résistance à l'apoptose crée un microenvironnement propice à la croissance cellulaire. Toutes ces perturbations cellulaires ne sont en général, pas suffisantes à la génération de la majorité des populations de cellules qui constituent les tumeurs macroscopiques et ne garantissent pas une croissance tumorale expansive.

Les premiers travaux de Hayflick démontrent que les cellules en culture ont un potentiel répliatif déterminé [119]. Une fois que les populations cellulaires ont progressé à travers un certain nombre de doublements, elles cessent de croître, ce processus est appelé la sénescence. La sénescence des fibroblastes humains en culture peut être contournée en désactivant leur pRb et des protéines suppresseur de tumeur p53, permettant à ces cellules de continuer à se multiplier pour les générations supplémentaires jusqu'à ce qu'elles entrent dans un second état qualifié de crise. L'état de crise se caractérise par une mort cellulaire massive, un désordre caryotypiques associés à la fusion de bout en bout des chromosomes, et à l'émergence de cellule immortalisée, qui ont acquis la capacité à se multiplier sans limite, une variante occasionnelle [120].

La plupart des types de cellules tumorales en culture semblent être immortalisées, ce qui suggère que le potentiel répliatif illimité est un phénotype qui a été acquise in vivo au cours de la progression tumorale et a été essentiel pour le développement de leur état de croissance maligne [119]. Ce résultat suggère que, à un moment donné au cours de la progression tumorale en plusieurs étapes, l'évolution des populations de cellules précancéreuses ont épuisé leurs nombres de doublements permis et ne peuvent remplir leur fonction tumorigènes que par le franchissement de la barrière de mortalité et l'acquisition d'un potentiel de réplication illimité.

Les observations de cellules cultivées indiquent que divers types de cellules normales de l'homme ont une capacité de 60-70 doublements. À première vue, ces chiffres ont peu de sens lorsque l'on tente d'invoquer la mortalité cellulaire comme un obstacle à la formation du cancer: 60-70 doublements devraient permettre à des clones de cellules tumorales de l'étendre à des chiffres qui dépassent largement le nombre de cellules dans le corps humain. Le dispositif de comptage pour les générations de cellules a été découvert au cours de la dernière décennie: les extrémités des chromosomes, les

télomères, qui sont composées de plusieurs milliers de répétitions d'un court 6 élément pb. Les générations répliquative sont comptées par la perte 50-100 pb de l'ADN télomérique aux extrémités de chaque chromosome au cours de chaque cycle cellulaire. Ce raccourcissement progressif a été attribué à l'incapacité des ADN polymérases à répliquer complètement l'extrémité 3' de l'ADN chromosomique au cours de chaque phase S. L'érosion progressive des télomères par des cycles successifs de réplication provoque la perte de leur capacité de protection des extrémités chromosomiques. Les extrémités chromosomiques non protégées participent au désordre caryotypique associées à la crise et entraînant, presque inévitablement, la mort de la cellule affectée [121]. Le maintien des télomères est effectif dans presque tous les types de cellules malignes [122]; 85% -90% d'entre eux réussissent à le faire en stimulant l'expression de la télomérase, une enzyme qui ajoute les répétitions d'hexanucléotides sur les extrémités de l'ADN télomérique [123], tandis que les autres ont inventé un moyen d'activer un mécanisme, appelé ALT, qui maintient les télomères par recombinaison basé sur des échanges d'informations de séquence interchromosomique [124]. Par ces deux mécanismes, les télomères sont maintenus à une longueur supérieure à un seuil critique, ce qui permet à son tour la multiplication illimitée des cellules filles. Les deux mécanismes semblent être fortement réduits dans la plupart des cellules humaines normales, afin de leur refuser un potentiel de réplication illimité. Le rôle de la télomérase dans les cellules immortalisées peut être démontré directement par l'expression ectopique de l'enzyme dans les cellules normales presenescent, qui peuvent alors exprimer un potentiel réplicatif illimité, in vitro [125, 126]. En outre, le passage des cellules prêtes à entrer en crise continuent de proliférer sans donner aucun signe de crise lorsqu'elles surexpriment cette enzyme [127-129]. Des indices supplémentaires sur l'importance du maintien des télomères dans le cancer proviennent de l'analyse de souris dépourvues de la fonction télomérase. Par exemple, des souris homozygotes knock-out pour un inhibiteur du cycle cellulaire p16INK4a sont sujettes aux développements tumoraux, en particulier lorsqu'elles sont exposées à des agents cancérigènes; les tumeurs se développant montrant une activité télomérase relativement élevée. Lorsque des agents cancérigènes ont été appliquées à des souris p16INK4a nulles à qui il manque également la télomérase, l'incidence des tumeurs a été réduite, phénomène concomitant avec le raccourcissement des télomères et le désordre caryotypique dans les tumeurs [130].

6. Angiogenèse :

Les nutriments et l'oxygène apportés par le système sanguin sont cruciaux à la fonction et à la survie cellulaire, obligeant chaque cellule d'un tissu à se trouver théoriquement à moins de 100µm d'un apport sanguin. Pendant l'organogenèse, cette proximité est assurée par la croissance coordonnée de vaisseaux et de parenchyme. Lorsque les tissus sont formés, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins –processus d'angiogenèse– est transitoire et très régulée. Du fait de la nécessité de vaisseau sanguin à proximité, il semblerait que les cellules en prolifération auraient la capacité intrinsèque d'induire la croissance de vaisseaux.

Le manque de capacité angiogénique d'une tumeur, ne permet pas leur expansion. Afin de progresser vers une plus grande taille, les néoplasies naissantes doivent développer une capacité angiogénique [131-133].

L'angiogenèse est régulée par des signaux positifs ou négatifs. Une classe de ces signaux est transmise par des facteurs solubles et leurs récepteurs, qui sont présents sur la membrane externe des cellules endothéliales. Les intégrines et les molécules d'adhésion cellule-matrice jouent également un rôle important.

L'angiogenèse peut-être activée par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF1 / 2), qui lient les récepteurs transmembranaires à tyrosine kinase des cellules endothéliales [134].

L'angiogenèse peut également être inhibée par la thrombospondine-1, qui se lie à CD36, un récepteur transmembranaire des cellules endothéliales couplé à un récepteur intracellulaire Src-like tyrosine kinases [135].

Il existe actuellement plus d'une dizaine de molécules connues comme activatrices ou inhibitrices de l'angiogenèse.

La signalisation des intégrines contribue également à la régulation de cette balance. Les vaisseaux expriment une classe d'intégrine tandis que les capillaires en expriment une autre. Des interférences dans la signalisation des intégrines peuvent inhiber l'angiogenèse, soulignant l'importance de la contribution de l'adhérence cellulaire au programme angiogénique [100, 136]. Les protéases extracellulaires sont physiquement et fonctionnellement reliées aux intégrines pro-angiogéniques, et permettent de définir la capacité invasive des cellules endothéliales angiogéniques [137].

L'importance du rôle de l'angiogenèse dans le développement des tumeurs est étudiée depuis de nombreuses années. L'équipe de Folkman, a démontré *in vivo* la nécessité de l'angiogenèse pour la croissance d'explants de tumeurs et que l'ajout d'anticorps anti-VEGF inhibe la néovascularisation et la croissance des tumeurs sous-cutanées chez la souris [137-139]. Ces résultats ont motivé le développement d'inhibiteurs spécifiques VEGF VEGF-R / en cours d'essais cliniques de stade avancé.

La capacité à induire et à maintenir l'angiogenèse semble être acquise dans une étape distincte au cours du développement tumoral, via un "changement angiogénique" de quiescence vasculaire. Dans trois modèles de souris transgéniques, de l'angiogenèse a été détectée dans les lésions précancéreuses telles que le col, le sein et la peau (mélanocytes). Ces observations indiquent que la néovascularisation est une condition préalable à l'expansion rapide de clones associés à la formation de tumeurs macroscopiques.

7. Invasion tissulaire et métastase:

Tôt ou tard, au cours du développement de la plupart des types de cancer chez l'homme, des masses tumorales primaires colonisent et envahissent les tissus adjacents. Les cellules tumorales peuvent également emprunter les systèmes sanguins et lymphatique pour coloniser des endroits éloignés de la tumeur primaire. La formation d'une nouvelle colonie est appelée métastase. Celles-ci sont responsables de 90% des décès par cancer de l'homme [140].

La capacité de l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses permet d'échapper à la tumeur primitive et de coloniser de nouveaux terrains dans le corps où, au moins au début, les nutriments et l'espace ne sont pas limitatifs. Les métastases – ou foyer secondaire de tumeur- sont des amalgames de cellules cancéreuses et les cellules normales qui sont incorporées à partir de tissus de l'hôte. Le développement des métastases répond aux mêmes critères qu'au développement de la tumeur primaire, c'est-à-dire, l'autosuffisance aux facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-croissance, l'insensibilité à l'apoptose, l'angiogenèse continue, et un potentiel réplicatif illimité.

Cependant, l'invasion et les métastases sont issues de processus extrêmement complexes, et leurs déterminants génétiques et biochimiques sont encore mal compris.

Les cellules aux capacités métastatiques possèdent des modifications aux niveaux de leurs interactions avec l'environnement. Les principales modifications observées sont aux niveaux des molécules d'adhérence cellule-cellule (CAM) et plus particulièrement elles touchent les membres des familles des immunoglobulines et de la cadhérine calcium-dépendante - intervenant dans les interactions cellule à cellule- et les intégrines - reliant les cellules à la MEC via des substrats [101].

Il a notamment été montré dans le cancer des modifications de l'E-cadhérine -impliquée dans les interactions de cellule à l'environnement -, une molécule exprimée de façon ubiquitaire sur les cellules épithéliales. La transmission des signaux aux facteurs anti-croissance passe d'une cellule à une autre cellule avoisinante via les ponts E-cadhérine. La fonction de l'E-cadhérine est apparemment perdue dans la majorité des cancers épithéliaux, par des mécanismes qui comprennent l'inactivation par mutation de l'E-cadhérine ou des gènes β -caténine, la répression de la transcription ou la protéolyse du domaine extracellulaire cadhérine [141]. Une surexpression de l'E-cadhérine dans un modèle de culture in vitro et un modèle de souris transgénique diminue les phénotypes invasifs et métastatiques [141]. Ainsi, l'E-cadhérine sert comme un suppresseur de l'invasion et les métastases des cancers épithéliaux. La perte de la fonctionnalité de l'E-cadhérine représente une étape clé dans l'acquisition de cette capacité.

Les changements dans l'expression des CAM de la superfamille des immunoglobulines semblent également jouer un rôle crucial dans le processus d'invasion et de métastase [142]. Le cas le plus étudié implique N-CAM, qui subit une modification dans ses propriétés passant d'une forme très adhérente à très peu adhérente dans les neuroblastomes et le cancer du poumon [142, 143]. Une réduction d'expression de N-CAM est également retrouvée au niveau des cancers invasifs du pancréas et le cancer colorectal [144]. La capacité acquise par l'invasion et la métastase représente la dernière grande frontière de recherche sur le cancer. L'évolution des techniques d'analyse permettra bientôt de construire des profils complets de l'expression et des activités fonctionnelles des CAM dans une grande variété de types de cancer, à la fois avant et après qu'ils acquièrent les capacités invasives et métastatiques. Le défi sera alors d'appliquer les nouvelles connaissances moléculaires sur l'envahissement des tissus et des métastases au développement de stratégies thérapeutiques efficaces.

C. Recherche thérapeutique :

Le traitement des cancers varie en fonction de la tumeur et de son d'évolution. Plusieurs techniques peuvent être combinées pour éradiquer les cellules tumorales de l'organisme : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

La chirurgie a pour but de retirer la tumeur et d'évaluer sa gravité et son étendue. Une intervention chirurgicale est le plus souvent suivie d'autres traitements comme la chimiothérapie ou la radiothérapie afin de prévenir les récives et l'apparition ou le développement des métastases.

Le traitement des cancers repose donc principalement sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces méthodes sont lourdes et invasives. Les traitements médicamenteux tels que la chimiothérapie sont des traitements qui visent principalement les cellules en prolifération et non les cellules cancéreuses. De ce fait, de nombreuses cellules normales sont touchées et les effets secondaires de tels traitements sont importants. C'est pourquoi il est important de chercher de nouveaux agents thérapeutiques.

Certaines recherches s'orientent sur l'effet anticancéreux de certains aliments/nutriments parmi lesquels les AG alimentaires. Parmi les AG alimentaires, les acides linoléique conjugué (CLA), retrouvés principalement dans les produits laitiers, dans les huiles hydrogénés et dans compléments alimentaires présentent des propriétés anticancéreuses intéressantes [145].

En effet, une étude épidémiologique indique que la consommation à long terme de CLA est inversement corrélée à l'incidence du cancer colorectal [146]. Par ailleurs, les isomères c9,t11 et t10,c12 CLA incorporés à un régime comme nutriments purifiés exercent des effets anti-cancérigènes dans des modèles de tumeur (induite chimiquement ou greffes de cellule tumorales) chez le rongeurs [147-152]. La suppression de la croissance tumorale lors de traitement par les isomères CLA peut être attribuée à une induction de l'apoptose et/ou une inhibition de la prolifération ou de l'angiogenèse [153-156]. Selon le modèle de cellules cancéreuses, les isomères c9,t11 et t10,c12 CLA possèdent des modes d'action différents sur la mort des cellules cancéreuses [157]. Dans les cellules de cancer colique, l'isomère t10, c12 CLA déclenche des effets cytotoxiques plus prononcé que l'isomère c9, t11 CLA [158].

Toutefois, il a été rapporté que la mort cellulaire médiée par l'isomère t10, c12 CLA est une apoptose caspase dépendante via l'activation des caspases 9 et 3 en association avec des événements tels que l'altération du potentiel de membrane mitochondriale et la libération de cytochrome C [159]. La relation entre l'apport alimentaire en CLA et l'incidence de la tumeur reste à être vérifiée chez l'homme [160, 161].

II. Cancer et altération du métabolisme glucidique et lipidique :

Une cible très prometteuse dans la recherche contre le cancer est l'abolition des substrats énergétiques de la cellule cancéreuse.

La cellule cancéreuse présente un métabolisme modifié qui la distingue d'une cellule normale, agir sur ce métabolisme pourrait s'avérer un agent thérapeutique efficace et spécifique.

1. Effet Warburg :

Au cours du développement tumoral, la réplication illimitée des cellules cancéreuses entraîne des besoins accrus en glucides et en lipides entraînant des altérations importantes du métabolisme glucidique et lipidique [162-165].

En effet, en 1956, Warburg a été le premier à montrer que les tumeurs cancéreuses utilisaient rapidement et à des taux élevés, le glucose [163]. Depuis, de nombreuses études reconnaissent que l'augmentation du métabolisme glucidique est un marqueur de cellules en prolifération, corrélé au phénotype de transformation des cellules cancéreuses [162].

L'augmentation de la glycolyse permet de fournir de nombreux facteurs –tels que le pyruvate, l'ATP et le NADPH- nécessaires également à la biosynthèse lipidique. Il existe donc des relations étroites entre la glycolyse et la biosynthèse des AG au cours de la prolifération (*Figure 20*) [164].

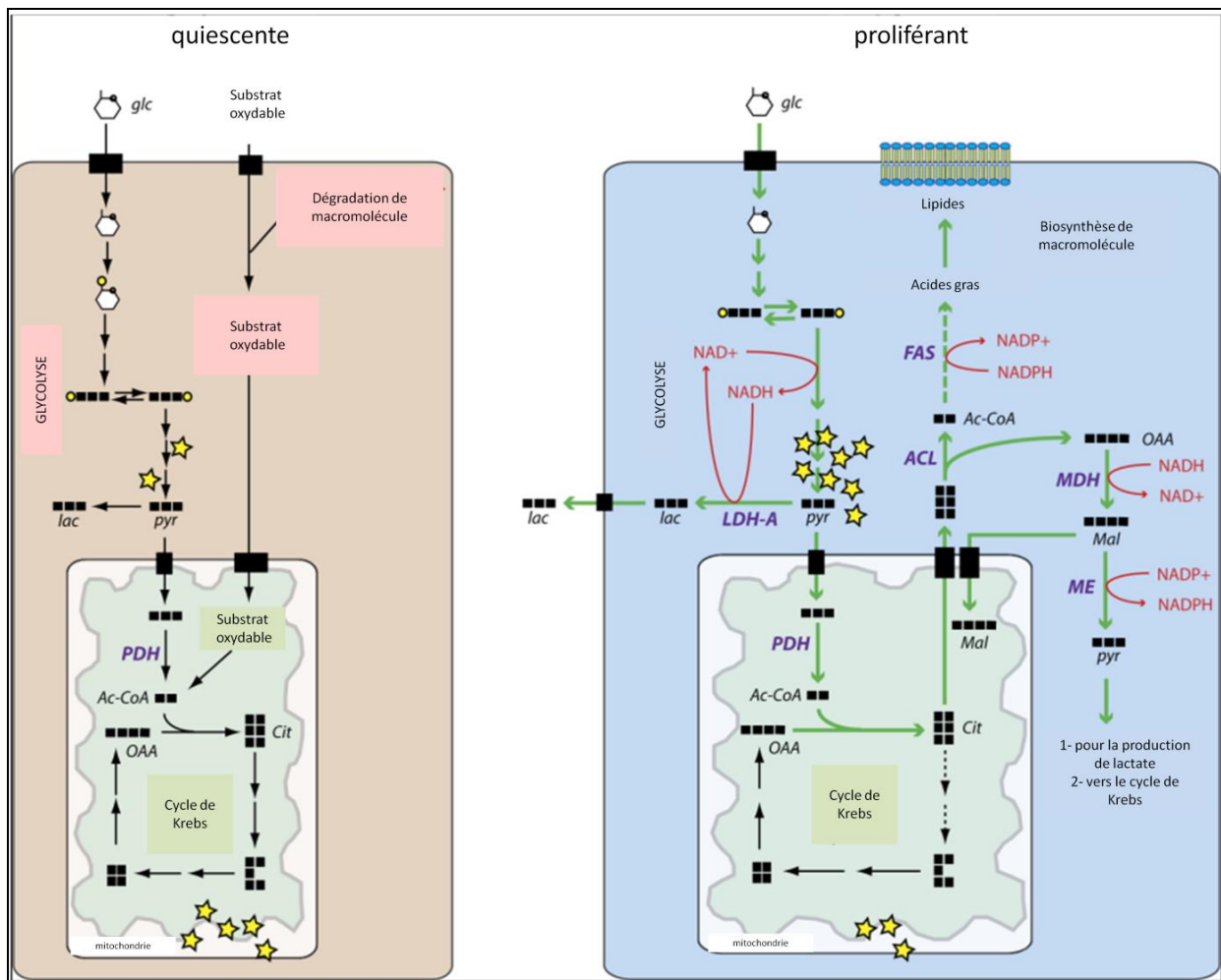


Figure 20: Interaction entre le métabolisme glucidique et lipidique au cours de la prolifération [164]

La Figure 20 montre, que les cellules quiescentes (à gauche) convertissent le glucose en pyruvate, qui est ensuite pris en charge par le cycle de Krebs. Dans des cellules saines quiescentes, la majeure partie de l'ATP (étoile jaune) provient essentiellement de la phosphorylation mitochondriale.

En cas de prolifération des cellules cancéreuses (à droite), l'augmentation massive de la glycolyse génère rapidement de l'ATP dans le cytoplasme, réduisant le ratio $NAD^+/NADH$. La plupart du pyruvate est alors converti en lactate (lac) par la lactate déshydrogénase A (LDH-A) qui régénère alors le NAD^+ en NADH.

Le NAD^+ permet le maintien de la glycolyse et le lactate est excrété par les cellules. Une partie du pyruvate est convertie en acétyl-CoA (Ac-CoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH) et entre dans le cycle de Krebs où il est converti en intermédiaire citrate utilisé pour la biosynthèse des AG et du cholestérol. Dans le cytoplasme, l'ATP citrate lyase

(ACL) clive le citrate en acétyl-CoA - précurseur de la voie de biosynthèse des AG, et substrat de l'ACC- et en oxaloacétate (OAA) qui est converti en malate (mal) par la malate déshydrogénase (MDH). Le malate retourne dans la mitochondrie pour alimenter le cycle de Krebs, où il est converti en pyruvate par l'enzyme malique (ME) dans le cytoplasme afin de générer du NADPH nécessaire à la biosynthèse des AG.

Au cours du développement tumoral, la cellule cancéreuse utilise la voie de glycolyse conduisant à la formation du lactate, même en condition aérobie, tandis que dans les cellules saines, cette voie ne se met en place qu'en condition d'anaérobie. Ce phénomène est appelé effet Warburg [166-168].

Cependant, l'augmentation de la teneur en pyruvate entraîne également une augmentation de la formation d'acétyl-CoA. Ce dernier va permettre une augmentation de la lipogenèse [164, 165, 167].

2. Modifications lipidiques et altérations de l'expression des enzymes de la lipogenèse :

Les cellules cancéreuses présentent à la fois une modification qualitative et quantitative du métabolisme lipidique, pouvant affecter la fluidité, la transduction de signaux et l'expression de certains gènes [169, 170].

De nombreux cancers présentent des modifications de composition lipidiques avec pour principale caractéristique une accumulation d'AGS, d'AGMI et de certains AGPI.

En effet, au niveau des cancers de l'ovaire et du côlon, il a été mis en évidence une accumulation des acides palmitique, oléique et arachidonique [171-173].

De plus, des études nutritionnelles montrent que les AGS -palmitique et stéarique- et les AGPI de la famille n-6 - acide linoléique et arachidonique- ont tendance à augmenter le volume tumoral tandis que les AGPI de la famille n-3 tendraient à le diminuer [173].

Cependant, l'accumulation cellulaire d'AGS et AGMI est principalement liée à une synthèse lipidique accrue plutôt qu'à un captage des AG circulants [171-178].

En effet, ces modifications du contenu en AGS et en AGMI au sein des tumeurs sont associées à une modulation de l'expression d'enzyme de la lipogenèse. Certains cancers présentent d'ailleurs une augmentation de l'expression des trois enzymes-clé du métabolisme des AG : ACC, FAS et SCD qui catalysent à partir d'acétyl-CoA, la formation d'AGMI [179-184].

Le métabolisme lipidique des cellules cancéreuses apparaît modifié par rapport aux cellules “saines”. Cette altération est intéressante d’un point de vue thérapeutique. En effet, la recherche est désormais de plus en plus tournée vers des thérapies ciblant des caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses – l’altération du métabolisme lipidique par exemple - n’étant pas affectées dans les cellules saines.

Les modifications de l’expression des enzymes essentielles à la synthèse des AGMI confèrent sans aucun doute un avantage à la cellule cancéreuse et lui donne une autonomie vis-à-vis du microenvironnement.

Une augmentation de l’expression d’ACC a notamment été mise en évidence dans les cancers de la prostate, du foie et du sein [185].

Il a également été montré une augmentation de l’expression de FAS dans de nombreux cancers tels que la prostate, le sein, le colon, les ovaires, l’endomètre, les poumons, la vessie, les mélanomes, les rétinoblastomes, les sarcomes et les néphroblastomes [186-188] ainsi que dans le sang et les métastases de patientes atteintes d’un cancer du sein, suggérant également le rôle de cette enzyme dans l’invasion tumorale [189, 190]. L’augmentation de l’expression d’ACC et FAS aboutit à une augmentation de la teneur en AGS dans les cellules cancéreuses qui peuvent être convertis en AGMI sous l’action de SCD [191-193].

SCD est également fortement augmentée dans les cellules transformées de nombreux cancers [194-198]. En effet, une augmentation en ARNm de SCD1 est présente dans les cancers de l’œsophage, du colon, hépatique ou dans les tumeurs induites chimiquement [194-196]. En ce qui concerne la prostate, deux études montrent à la fois une augmentation ou une diminution de l’expression de SCD1 [197, 198]. La transformation des cellules cancéreuses est corrélée à une induction de SCD1 et une modification de la composition en AG. Cette altération métabolique est associée à une augmentation de l’expression du facteur de transcription PPAR γ . Il en résulte une augmentation d’AGMI corrélée à une augmentation de la fluidité membranaire [191].

De plus, l’induction de la prolifération par des facteurs de croissance tels PDGF-BB stimule la biosynthèse lipidique en augmentant l’expression de SCD1 dans des fibroblastes normaux [47].

La surexpression des enzymes de la lipogenèse (ACC, FAS et SCD) est associée aux changements métaboliques corrélés avec la transformation cellulaire. Inhiber ces voies de lipogenèse semblent donc des cibles thérapeutiques possibles.

III. La mort cellulaire par apoptose : la voie du stress du réticulum endoplasmique

A. L'apoptose :

L'apoptose est une mort cellulaire génétiquement programmée et un processus physiologique très régulé. Elle est retrouvée dans des régulations non pathologiques telles que la morphogenèse des doigts, la régulation du système immunitaire et le renouvellement cellulaire. Dans le cas de stress, l'apoptose est caractérisée par des changements morphologiques tels qu'une exposition de phosphatidyl-sérine à la surface externe de la membrane plasmique, une condensation puis une fragmentation de la chromatine entraînant la formation de corps apoptotiques (*Figure 21*).

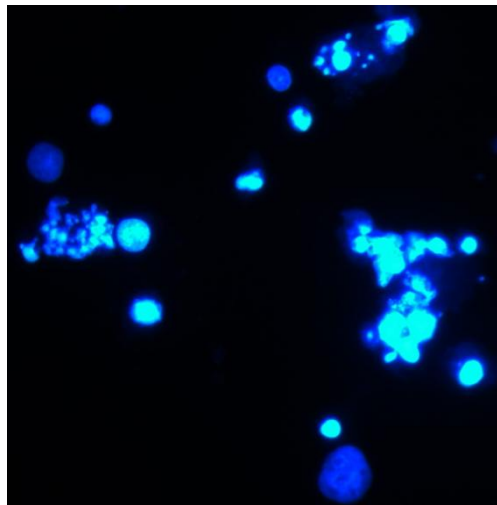


Figure 21: Modifications morphologiques de l'apoptose – SW480 traitées par CLA2 à 50 μ M pendant 72h après coloration au Hoeschst

L'apoptose suit un scénario bien établi : perte de la fonction mitochondriale, condensation de la chromatine, dégradation de l'ADN par des nucléases -échelle de fragments d'ADN -, perte de l'intégrité de la membrane plasmique - signal de reconnaissance de la phagocytose. Elle peut-être déclenchée par des signaux issus de la voie intrinsèque ou extrinsèque (*Figure 22*) [199].

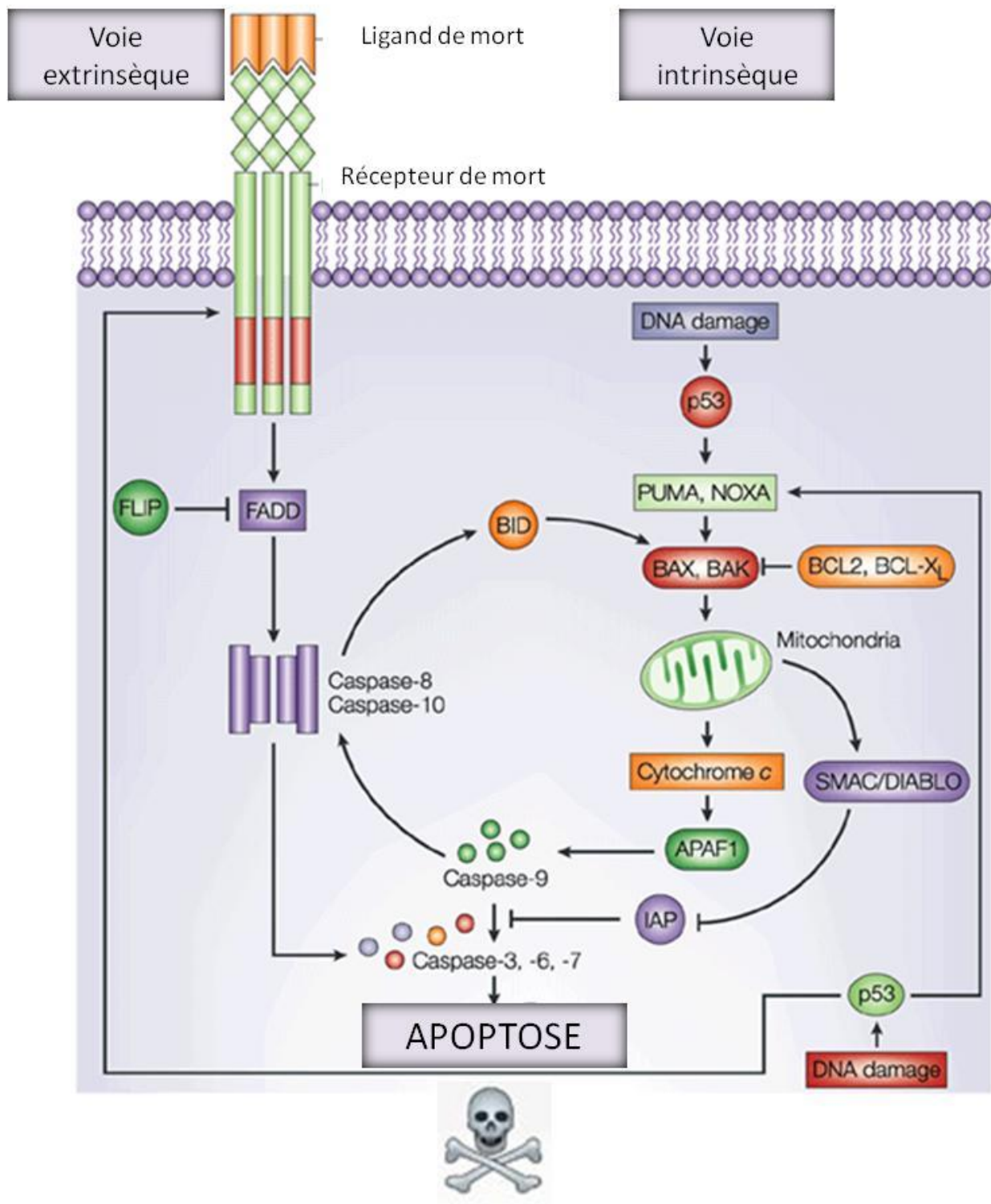


Figure 22 : Voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose [200]

1. La voie intrinsèque :

La voie intrinsèque ou mitochondriale, peut-être activée par une perte d'homéostasie tels que des perturbations internes du fonctionnement de la mitochondrie, du RE, de la synthèse d'ADN, l'activation de facteurs oncogènes ou des signaux externes tels que le rayonnement UV, des radiations γ (*Figure 23*) [200-202]. Ces signaux protègent de la néoplasie, et de l'infection virale en induisant la mort des cellules dérégulées ou infectées. La voie intrinsèque peut aussi être activée par la perte de signaux de survie générés par les récepteurs de cytokines ou par les intégrines [200, 203].

Un déclenchement possible de cette voie est initié par la liaison de la molécule adaptatrice Apaf-1 (apoptotic protéase activating factor 1) au cytochrome C dont le relargage par la mitochondrie est un événement précoce du déclenchement de l'apoptose via la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale qui laisse alors diffuser des protéines de l'espace intermembranaire, dont le cytochrome C. L'association de la procaspase 9 initiateur à un heptamère d'Apaf-cytochrome C est appelé apoptosome et permet la maturation de la caspase 9 qui peut alors activer les caspase effectrices (*Figure 23*) [204]. Parmi les régulations possibles de l'apoptose, il y a celle de la famille Bcl-2 –impliqués dans la perméabilisation de la mitochondrie- qui inhibe la voie intrinsèque en inhibant les membres de la famille BAX, BAK, des protéines pro-apoptotiques (*Figure 23*) [204, 205].

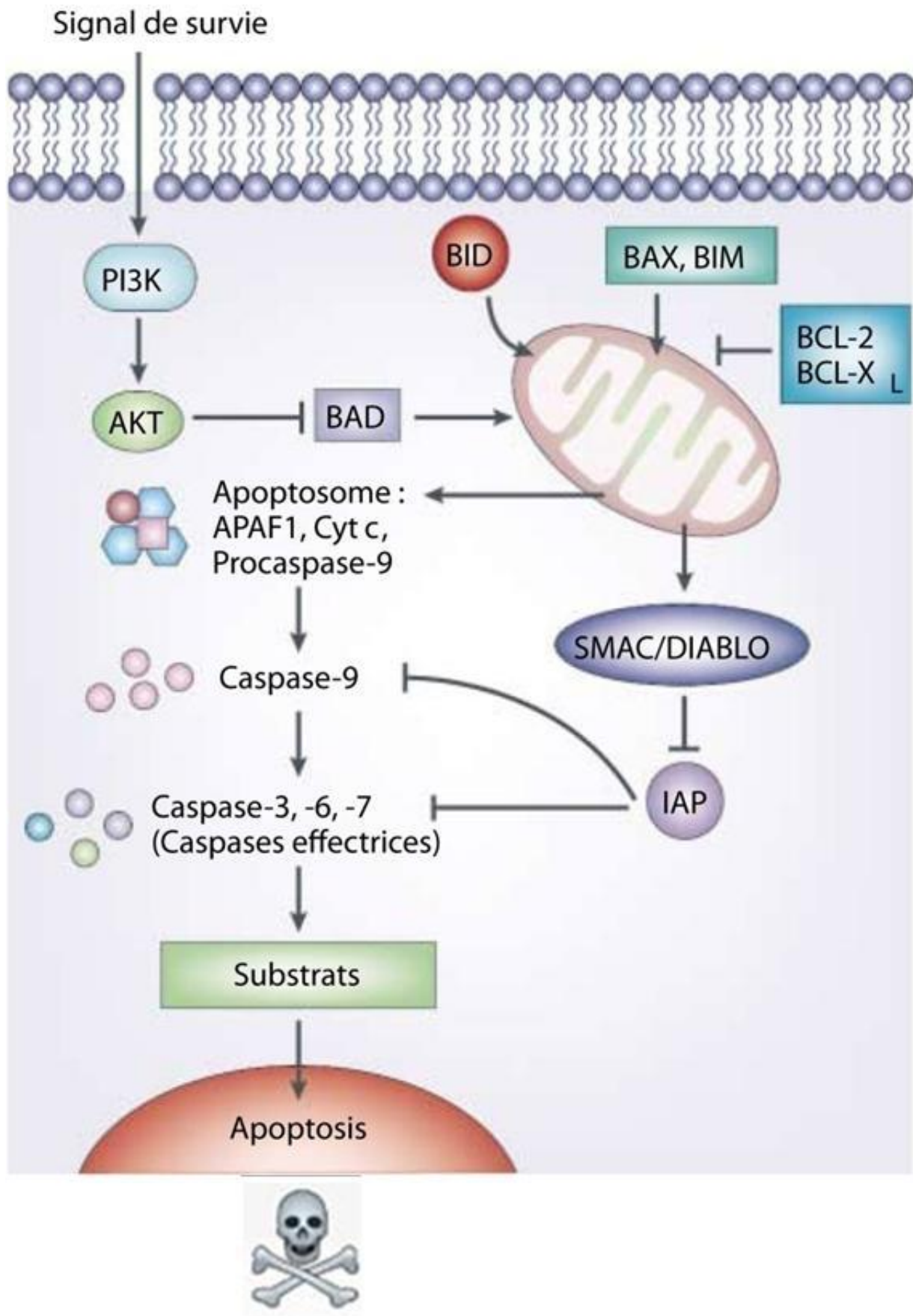


Figure 23 : Voie intrinsèque de l'apoptose [202]

2. La voie extrinsèque :

Au cours de l'activation de la voie extrinsèque (ou voie à domaine de mort), le signal est déclenché par des membres de la famille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) tels que Fas (APO-1, CD95), DR4, et DR5, qui contiennent des domaines de mort dans leur région cytoplasmique (*Figure 24*) [202, 206]. La fixation du ligand tels que FasL, le TNF, et TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand) induit leur aggrégation et la formation du DISC (death inducing signaling complex) qui comprend les molécules adaptatrices FADD (Fas associated death domain) et les procaspase 8 et 10 [202].

Ces procaspases ont une activité faible, mais suffisante pour cliver des procaspases en caspases et les activer. Les caspases 8 et/ou 10 matures vont activer par protéolyse les procaspases effectrices, déclenchant une cascade amplificatrice conduisant à l'apoptose [202, 203, 207]. La voie extrinsèque peut être régulée par la protéine FLIP (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme like proteases) qui entre en compétition avec les caspases 8 et 10 en se liant à FADD et inhibant la maturation des procaspases 8 et 10 et de par ce fait l'apoptose via la voie extrinsèque (*Figure 24*) [202].

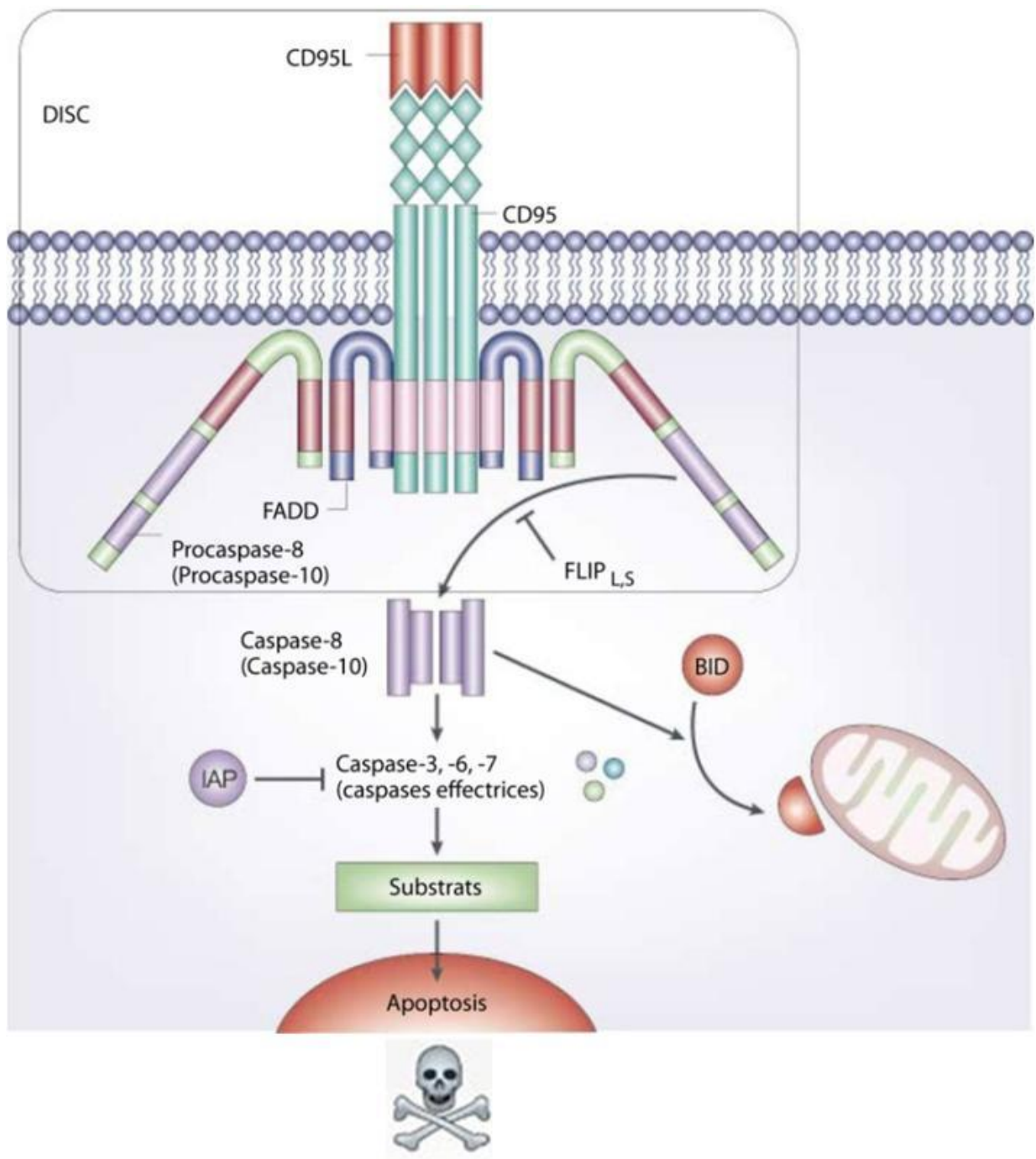


Figure 24 : Voie extrinsèque de l'apoptose [202]

3. Les caspases :

Les signaux d'initiation issus des voies intrinsèque et extrinsèque convergent ensuite pour activer une cascade protéolytique caspase dépendante. Les caspases sont des protéases contenant des cystéines dans leur site actif, clivant leur substrat au niveau de résidu acide aspartique. Les signaux d'initiation de l'apoptose activent une cascade de caspases : la caspase initiateur active par clivage des caspases effectrices (3 et 7) qui effectuent des clivages conduisant aux manifestations de l'apoptose [208]. La caspase 3 et 7 inhibe également par clivage la protéine PARP (polyADP-ribose polymérase) responsable des réparations à l'ADN [199].

Les caspases sont donc les effecteurs principaux de l'apoptose, même si des phénomènes de mort morphologiquement comparable à de l'apoptose sont caspases indépendantes [209] . Elles sont la cible de nombreux mécanismes de régulation. La voie intrinsèque peut être régulée plus en aval par des protéines de la famille des IAP (inhibitor of apoptosis proteins) qui se lient directement aux caspases effectrices 3, 7 et 9.

4. Les interactions entre les voies intrinsèques et extrinsèques :

Il existe également des interactions entre les voies intrinsèque et extrinsèque (*Figure 25*) [208]. La fixation d'un ligand sur le récepteur de mort a pour conséquence le recrutement des procaspases 8 et 10 sur des récepteurs complexes. Les procaspases s'auto-activent dans ce complexe et activent directement la caspase exécuteur 3 ou clive Bid, une protéine de la famille Bcl2 pour générer la protéine tronquée Bid (t-Bid) qui induit alors des dysfonctionnements mitochondriaux aboutissant à l'activation de la caspase initiateur 9. Cette dernière va à son tour clivée les caspases effectrices 3,6 et 7 (*Figure 25*) [202, 208].

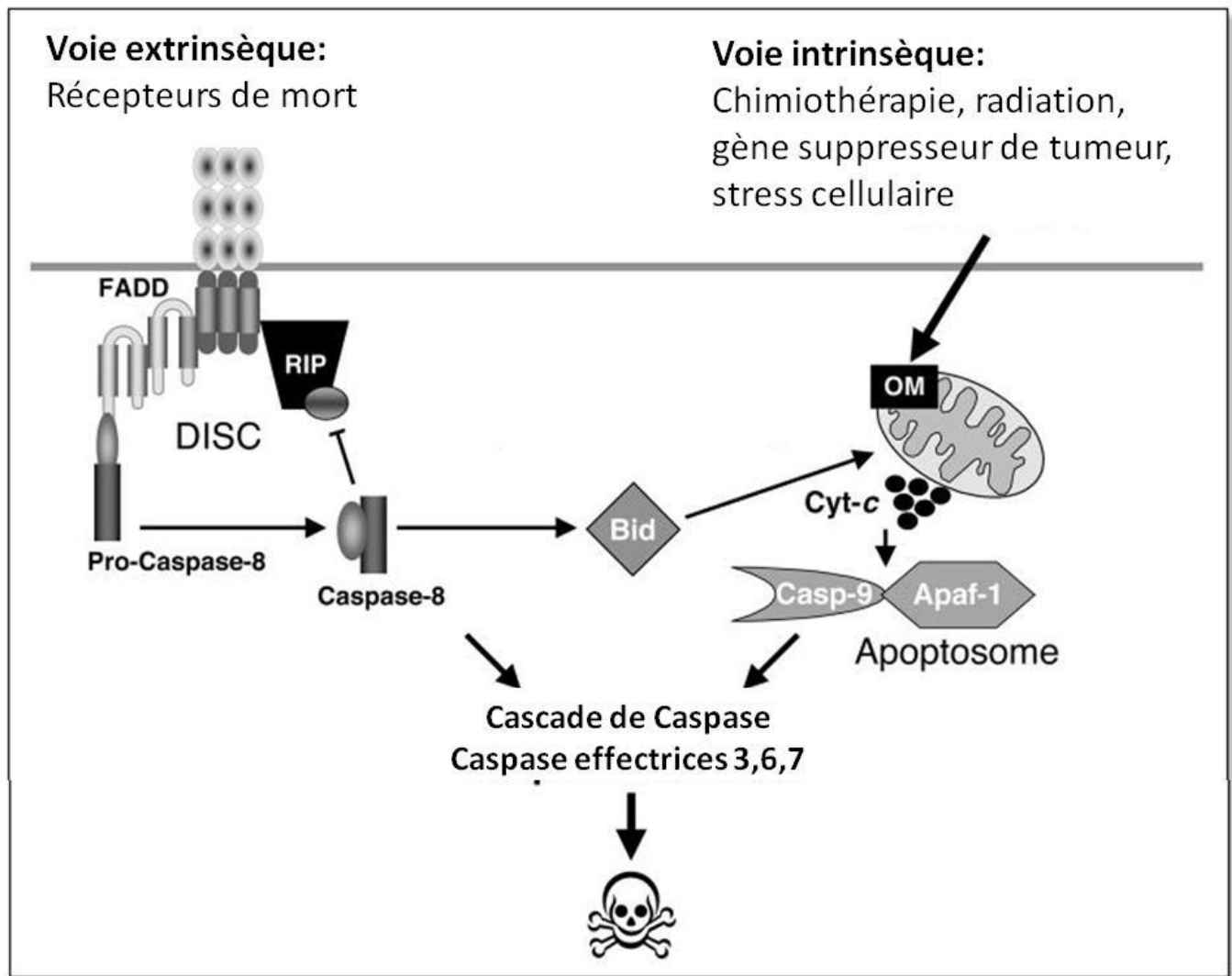


Figure 25 : Interactions entre les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose [208]

5. [L'apoptose et le cancer :](#)

L'apoptose est un mécanisme complexe qui fait intervenir de nombreuses voies et niveaux de régulation. Celles-ci sont indispensables au maintien de l'équilibre survie/mort cellulaire dans les tissus sains. Une dérégulation des mécanismes apoptotiques peut être à l'origine de la carcinogenèse.

En effet, des altérations de l'expression de plusieurs protéines régulatrices de l'apoptose ont été identifiées dans certains cancers [205, 210-214].

Au niveau de la voie intrinsèque, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-X) associé à une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotique de la famille Bax et Bak dans de nombreux cancer [205]. De plus, la régulation de la voie intrinsèque au cours de la carcinogenèse peut être altérée au niveau des IAP qui sont surexprimés dans certains cancers [211].

Des altérations de la régulation de la voie extrinsèque de l'apoptose est essentiellement du à une augmentation de l'expression de FLIP, s'associant au DISC et inhibant l'apoptose [212].

Plus de 50% des tumeurs présentent des défauts dans leur machinerie apoptotique qui proviennent généralement d'anomalies de la famille Bcl-2 ou de P53 – une protéine suppresseur de tumeur. P53 - appelée “gardien du génome” – est responsable de la prévention d'une prolifération aberrantes, et de la préservation de l'intégrité du génome en activant la réparation à l'ADN ou en initiant l'apoptose en réponse principalement à des dommages à l'ADN par des radiations, des agents chimiques, du stress oxydatif, et d'autres agents [213].

P53 induit l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (PUMA, NOXA, et BAX) impliqués dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Elle peut également interagir avec les récepteurs à domaines de mort (Fas, DR4, DR5) [213].

De nombreux cancers présentent des mutations au niveau de P53. C'est le cas des cancers du poulmons, du colon, de l'estomac et du foie [214].

B. Le Stress du RE :

Récemment, une nouvelle voie intrinsèque de l'apoptose a été décrite impliquant le RE [215-221]. C'est le stress du réticulum endoplasmique (RE) qui emprunte la voie UPR (unfolded protein response).

En condition non stressée, la protéine chaperonne GRP78 est liée aux effecteurs PERK (pancreatic ER kinase), ATF6 (activating transcription factor 6), et IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), inactivant la voie de stress du RE (*Figure 26*) [219].

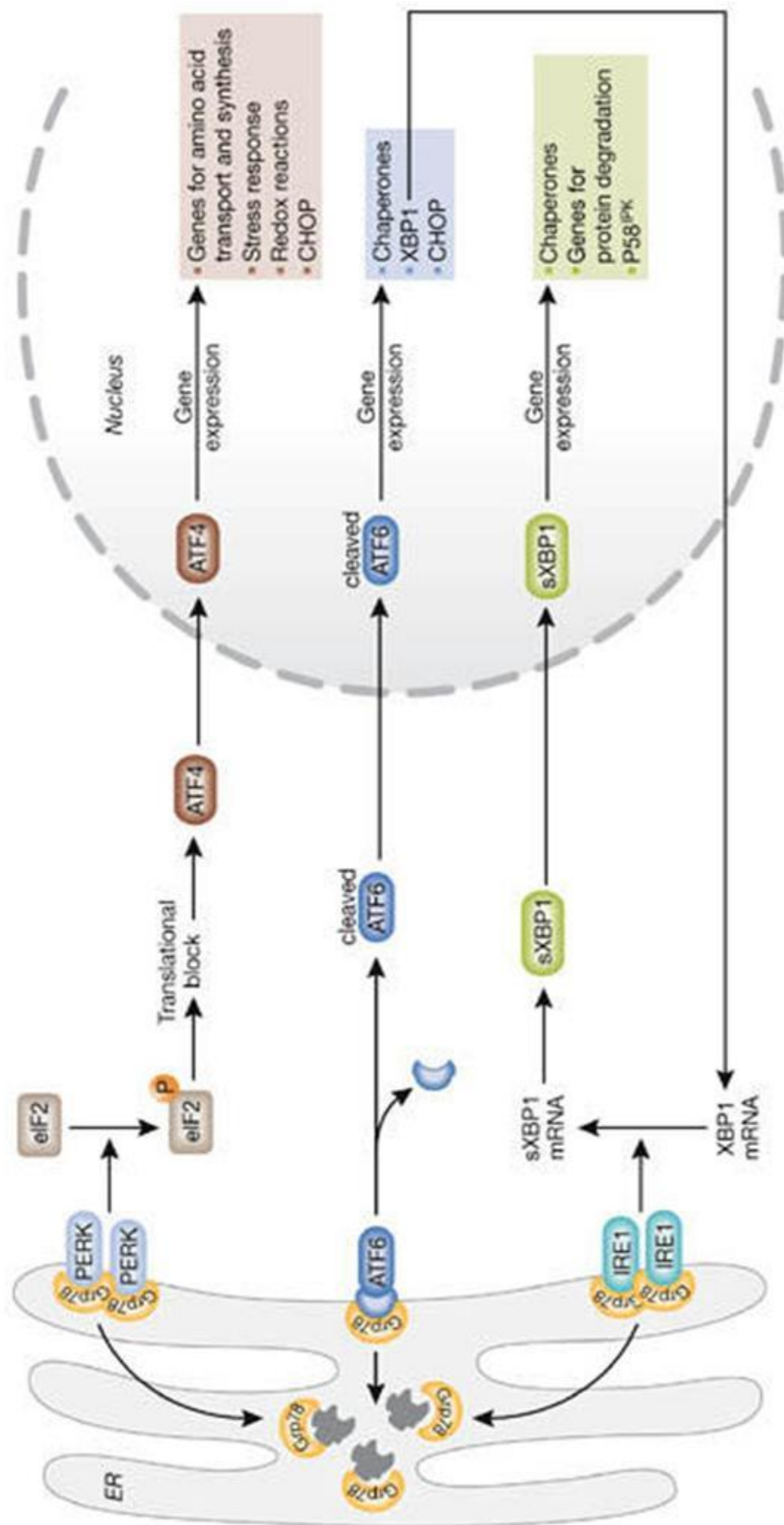


Figure 26: Mécanismes intervenant au cours du stress du RE –UPR [219]

En cas de modification de l'homéostasie du RE, GRP78 se dissocie de PERK, d'ATF6 et d'IRE1 – protéines initiatrices des différentes voies du stress du RE – pour s'associer aux protéines avec un défaut de conformation. Cette dissociation conduit à l'activation de PERK, d'ATF6 et d'IRE1, initiant la voie du stress du RE.

L'activation des trois voies s'effectue de façon séquentielle [219]. La voie PERK est initialement activée, puis la voie ATF6 et enfin, la voie IRE1 [219].

L'activation de PERK bloque la synthèse protéique en phosphorylant eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α). Cette phosphorylation favorise la traduction d'ATF4 (activating transcription factor 4) qui peut également être activée d'une manière indépendante d'eIF2 α . Le facteur de transcription ATF4 migre alors vers le noyau et induit la transcription de gènes impliqués dans la restauration de l'homéostasie du RE.

Si le stress est trop important et que la voie PERK ne parvient pas à rétablir l'homéostasie du RE, la voie ATF6 va alors s'activer. ATF6 clivée va être transloquée dans le noyau pour induire la transcription de protéines chaperonnes et de XBP1 (X box-binding protein 1), un autre facteur de transcription. L'ARNm de ce dernier nécessite d'être épissé par IRE1 pour être actif. XBP1 épissé est alors transloqué dans le noyau et contrôle la transcription de protéines chaperonnes, de P58^{IPK} - l'inhibiteur de PERK, et des gènes impliqués dans la dégradation des protéines. Ces actions concertées visent à restaurer les fonctions du RE en bloquant l'accumulation et en améliorant la dégradation de protéines de mauvaise conformation (*Figure 26*) [215-221].

Lors de perturbations de l'homéostasie du RE, par fuite calcique, par une production de protéines anormales, ou par une altération du métabolisme lipidique, la voie du stress du RE se met en place. Dans un premier temps, les mécanismes décrit précédemment tentent de rétablir l'homéostasie du RE. Si ce stress est trop important ou trop prolongé, les cellules se dirigent alors vers une mort programmée via le facteur de transcription CHOP qui va jouer son rôle de pro-apoptotique en diminuant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2, activant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose (*Figure 27*).

Dans le même temps, la mort par apoptose peut également être induite par la caspase 12. En effet, en condition non stressée, la procaspase 12 -non active- est associée à une molécule adaptatrice TRAF2, elle-même associée à IRE1 α . Lors du stress du RE, l'activation d'IRE1 α va permettre la dissociation de TRAF2 et de la procaspase 12. Celle-ci va alors être clivée par la protéine m-calpain, issue de la fuite calcique observée lors de la perturbation de l'homéostasie du RE. La caspase 12 activée clive la caspase 9, elle-même responsable de l'activation de la caspase effectrice 3 et de la mort par apoptose (Figure 27) [222].

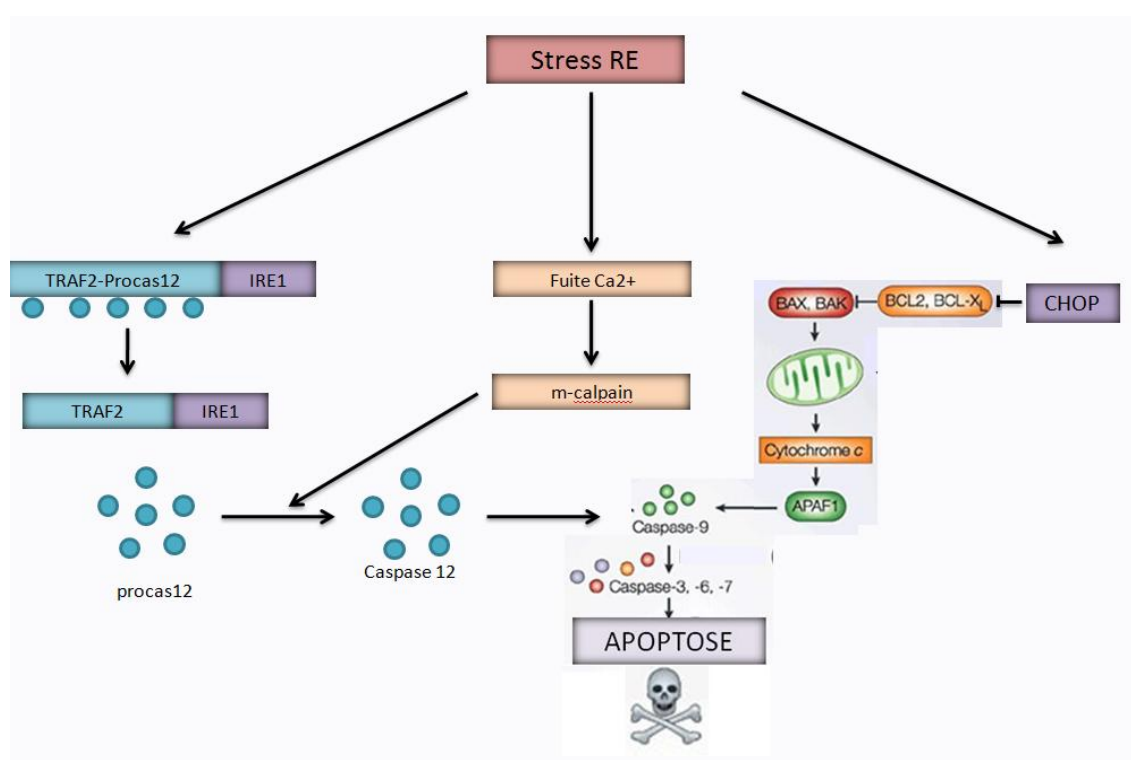


Figure 27 : Induction de l'apoptose par le stress du RE

IV. Les enzymes de la lipogenèse comme cible thérapeutique :

Comme nous l'avons vu précédemment, au cours de la transformation de la cellule cancéreuse, il survient une altération importante du métabolisme lipidique et plus particulièrement une augmentation de l'expression des enzymes de biosynthèse des AG. Quelques études portent actuellement sur une diminution de l'expression des enzymes ACC, FAS, et SCD au cours du développement tumoral [191, 223-233].

A. ACC :

La diminution de l'activité d'ACC semble être un moyen de réduire la viabilité de la cellule tumorale. L'inhibition d'ACC par une technique de siRNA a été testée sur des cellules de cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate, de poumons. Les premiers résultats apparaissent encourageants [223, 224, 234].

En effet, ces études montrent qu'une extinction de l'activité d'ACC induit une inhibition de la prolifération cellulaire, de la mort cellulaire par apoptose [223, 224, 234].

Ce phénomène concomitant avec l'augmentation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) lors de l'inhibition d'ACC ou de FAS par siRNA [224].

La supplémentation avec de l'acide palmitique, de l'acide oléique restaure complètement la viabilité cellulaire [223, 224, 234].

Ces résultats apparaissent d'autant plus encourageants qu'aucun effet cytotoxique de l'extinction d'ACC n'a été observé sur des cellules normales fibroblastiques, ou d'épithélium mammaire, ce qui conforte l'hypothèse qu'ACC pourrait être une bonne cible thérapeutique spécifique des cellules cancéreuses [223, 224].

B. FAS :

La surexpression de FAS suggère son rôle important dans le développement tumoral. Des programmes de recherche sont en cours pour développer des inhibiteurs de FAS. L'utilisation d'inhibiteurs naturels de FAS -tels que les quercétine et les taxifoline- en thérapeutique cancéreuse a rapidement été écartée du fait de leur faible biodisponibilité. Le manque d'efficacité de ces inhibiteurs a conduit au développement de molécules synthétiques qui possèdent une meilleure biodisponibilité.

Parmi les inhibiteurs synthétiques actuels, deux sont actuellement commercialisés : la cerulenin – un antibiotique - et le C75 – un analogue de la thiolactomycine [225, 226]. Les inhibiteurs de FAS semblent agir sur divers cancers. En effet, une étude à grande échelle sur différentes lignées cellulaires cancéreuses a permis de démontrer l'efficacité des inhibiteurs de FAS -cerulenin et C75- sur la diminution de la viabilité des cellules d'hépatocarcinome, de mélanome malin, de cancer du poumon, d'adénocarcinome colorectaux, de cancer du col de l'utérus, de cancer de la prostate, et de cancer du sein [235].

Des modèles *in vitro* utilisant une technique de siRNA dirigé contre FAS permettent de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette diminution de la viabilité des cellules cancéreuses [223, 229]. Une voie paraît impliquée dans l'induction de la mort par apoptose de cellule de cancer de la prostate lors de l'extinction de FAS. En effet, l'inhibition de FAS –par siRNA et molécule synthétique- induit l'activation de nombreux marqueurs du stress du RE [230].

L'inhibition de la FAS a été testée sur des modèles *in vivo* et les résultats de ces différentes études mettent en évidence une diminution du développement tumoral induit chez des souris [227, 228].

Des souris transgéniques neu-N développent naturellement des tumeurs mammaires dans les 300 premiers jours de leur existence. Des traitements avec l'inhibiteur de l'activité de FAS -C75- pendant dix semaines montrent une diminution du volume tumoral. Vingt pour cent des souris traitées par l'inhibiteur ne développeront jamais de tumeur [227].

L'utilisation d'inhibiteurs de FAS comme cible thérapeutique semble également être prometteuse étant donné qu'ils ne présentent pas d'effets toxiques sur les cellules saines [223, 229].

C. SCD :

De récentes études mettent également en évidence que la voie de synthèse des AGMI peut être une bonne cible thérapeutique. Ces études mettent en corrélation la diminution de l'expression de SCD1 et la mort cellulaire par apoptose [191, 232-235].

En effet, l'équipe d'Igal a montré qu'au cours de la mort par apoptose induite par des céramides, l'activité SCD1 diminuait dans des fibroblastes pulmonaires transformés [191].

Des études *in vivo* montrent que lors de l'injection de cellules cancéreuses pulmonaires déplétées en SCD1 à des souris, celles-ci développent des tumeurs plus petites et mettent plus de temps à se développer que lors d'injection de cellules cancéreuses non délétées en SCD1 [232]. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces observations commencent à être décrits. En effet, il semblerait d'une part que la délétion en SCD1 de cellules cancéreuses pulmonaires induise un blocage du cycle cellulaire en phase G1/S et d'autre part, induirait de la mort cellulaire par apoptose [234]. D'autres études sur des lignées de cancer du sein et du côlon, mettent en évidence qu'une inhibition de l'expression de SCD induit de la mort par apoptose caspase 3 dépendante [231-234]. Les effets de la délétion de SCD1 sur la mort cellulaire seraient médié par la voie AKT [232].

L'ajout exogène des AGMI, acide oléique, acide palmitique et acide *cis*-vaccénique restaure complètement la mort cellulaire induite par la délétion en SCD1 montrant que les AGMI de configuration *cis* ont un rôle clé dans la prolifération des cellules cancéreuses [234]. Une étude contradictoire met en évidence que la prolifération cellulaire n'est pas restaurée lors de l'ajout d'acide oléique, le principal produit de SCD1 [232].

Une délétion en SCD1 entraîne donc une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses, comme l'extinction d'ACC et FAS. Cependant, une inactivation concomittante de l'expression d'ACC et de SCD1 ne potentialise pas l'effet d'inhibition de prolifération, suggérant qu'ACC et SCD induisent celle-ci via la même cible [234].

L'utilisation d'un inhibiteur synthétique de SCD1 sur des cellules de cancer du poumon et du sein, mettent en évidence que la mort cellulaire observée est corrélée à une phosphorylation de l'AMPK, inhibant l'ACC et bloquant ainsi la voie de synthèse de novo lipidique à partir du glucose [82]. La *Figure 28* résume les différents effets d'une délétion en SCD1 dans les cellules cancéreuses[233].

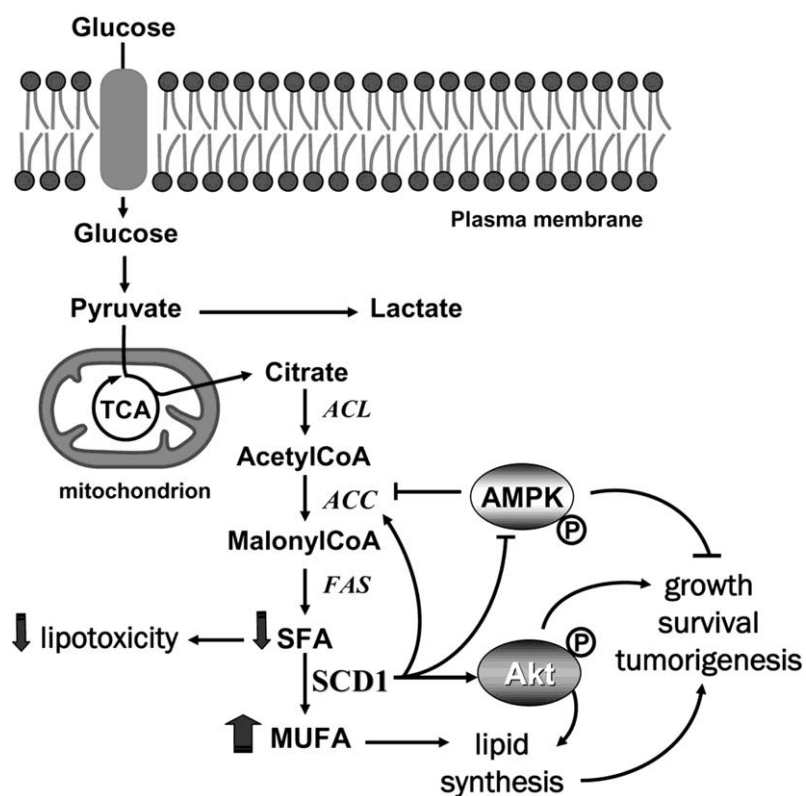


Figure 28 : Régulation du métabolisme et des voies de signalisation par SCD1 dans les cellules cancéreuses [233]

SCD semble être une cible de choix dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. Toutefois, les mécanismes à l'origine de la mort par apoptose lors d'une délétion en SCD1 restent à être élucidés.

Publications:

Le stress du RE et l'inhibition de la voie de synthèse des acides gras monoinsaturés :

Les données développées ci-dessus mettent en évidence que, parmi les modifications métaboliques qui apparaissent au cours de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse, les altérations du métabolisme lipidique sont particulièrement importantes.

Au niveau tumoral, une augmentation de la teneur en AGMI associée à une surexpression des enzymes de la lipogenèse (ACC, FAS et SCD) est observée.

Une inhibition de l'expression de ces enzymes de la lipogenèse induit une diminution du volume tumorale.

L'objectif de ce chapitre est la caractérisation du phénotype des cellules cancéreuses deletées en SCD1 et la mise en évidence des voies de signalisations impliquées.

Pour mener à bien ces recherches, l'expression et l'activité de SCD ont été modulées par des techniques mettant en œuvre des ARNs interférents ou des inhibiteurs (naturels et pharmacologiques). L'utilisation des deux inhibiteurs naturels c9t11 et t10c12 CLA nous permettra également de comparer leur efficacité respective sur l'inhibition de SCD1 dans des cellules cancéreuses.

Afin d'étayer nos résultats, les expérimentations ont été menées sur deux lignées cellulaires d'origine colique (HCT116 et SW480) et d'un ostéosarcome (U2OS).

Article 1:

Publié le 16 décembre 2010 dans PlosOne

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

Mélaïne Minville-Walz[‡], Anne-Sophie Pierre[‡], Laurent Pichon, Sandrine Bellenger, Cécile Fèvre, Jérôme Bellenger, Christian Tessier, Michel Narce, Mickaël Rialland*

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

‡ These authors contributed equally to this work.

Introduction

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

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

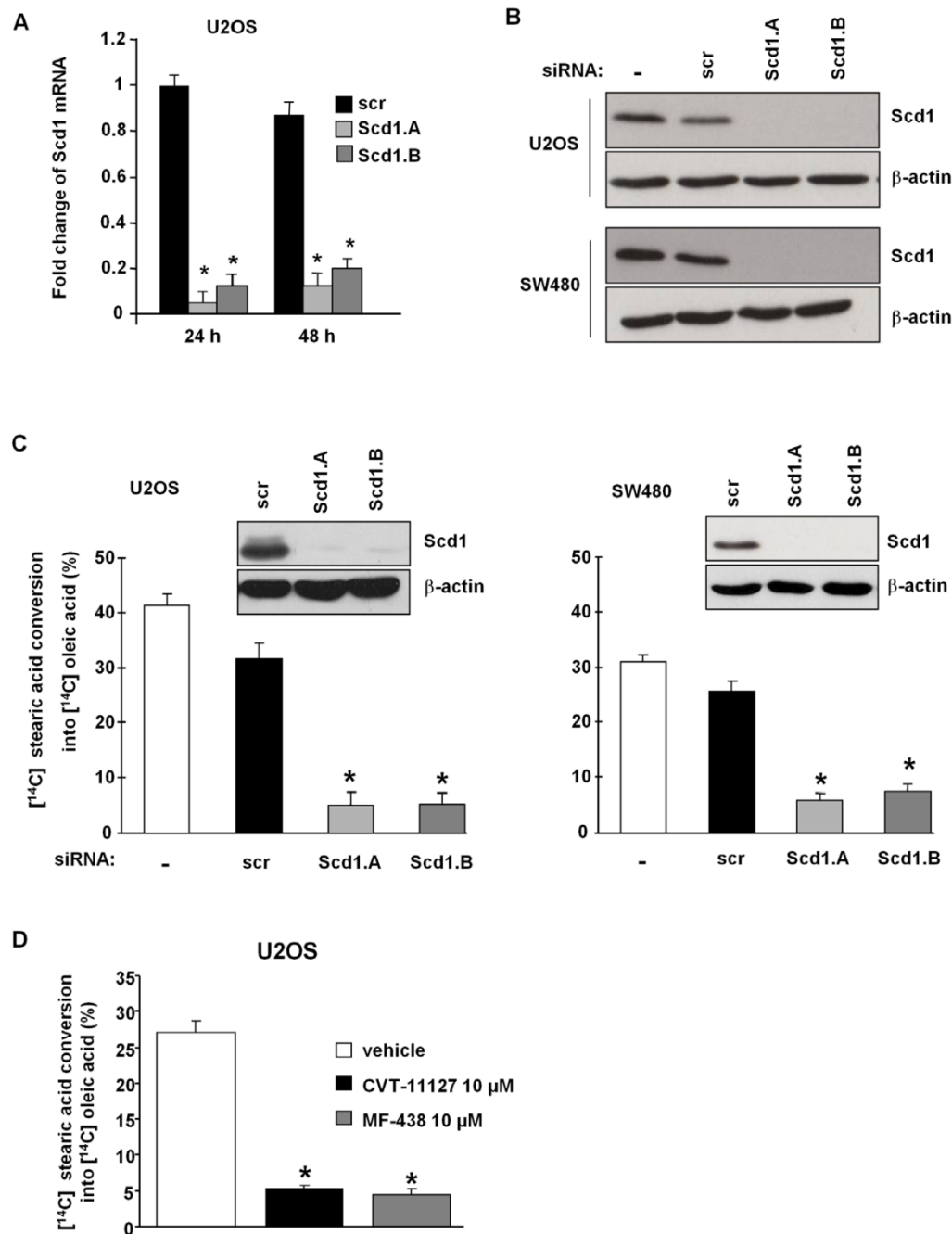


Figure 1. Efficient suppression of Scd1 expression and activity by siRNA targeting Scd1. **A)** U2OS cells were transfected with siRNA control (scr) or with siRNA against Scd1 (Scd1.A and Scd1.B) and collected 24 and 48 h post-transfection for Scd1 mRNA expression by real time RT-PCR. Scd1 mRNA expression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

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

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

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

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

Results

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

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

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

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

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

Scd1 extinction promotes apoptosis-cell death

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

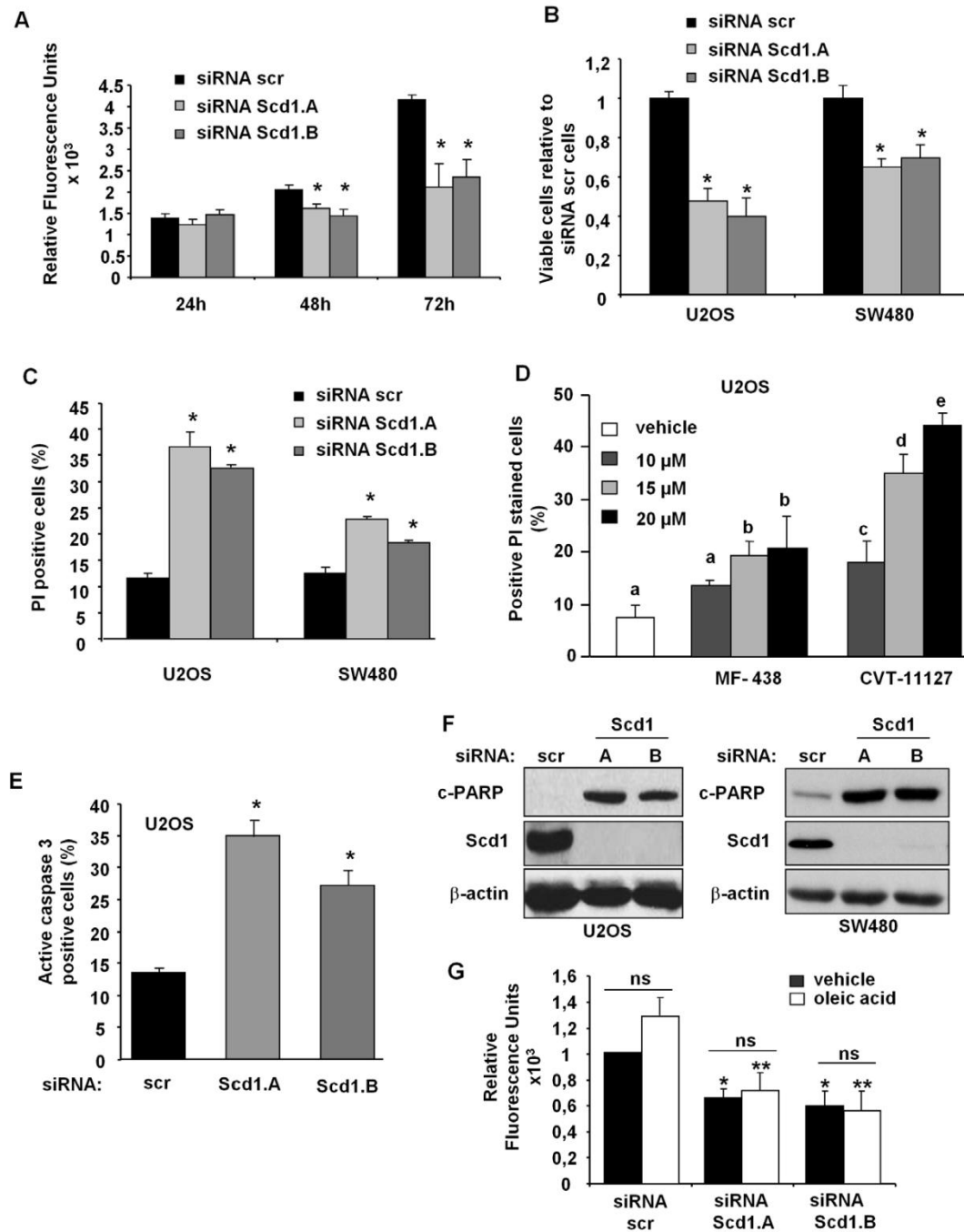


Figure 2. Scd1 knockdown promoted apoptosis-cell death. A) U2OS cells were treated with siRNA scr (control) and targeting Scd1 (Scd1.A and Scd1.B), and collected 24 h, 48 h or 72 h post-transfection. Proliferation status was determined by the CyQuant® proliferation assay. Each value is the mean of relative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

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

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

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

Inhibition of Scd1 expression activates partially unfolded protein response

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

CHOP participates to Scd1 depletion-induced cell death

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

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

CHOP extinction partially alleviates Scd1 depletion-induced apoptosis

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

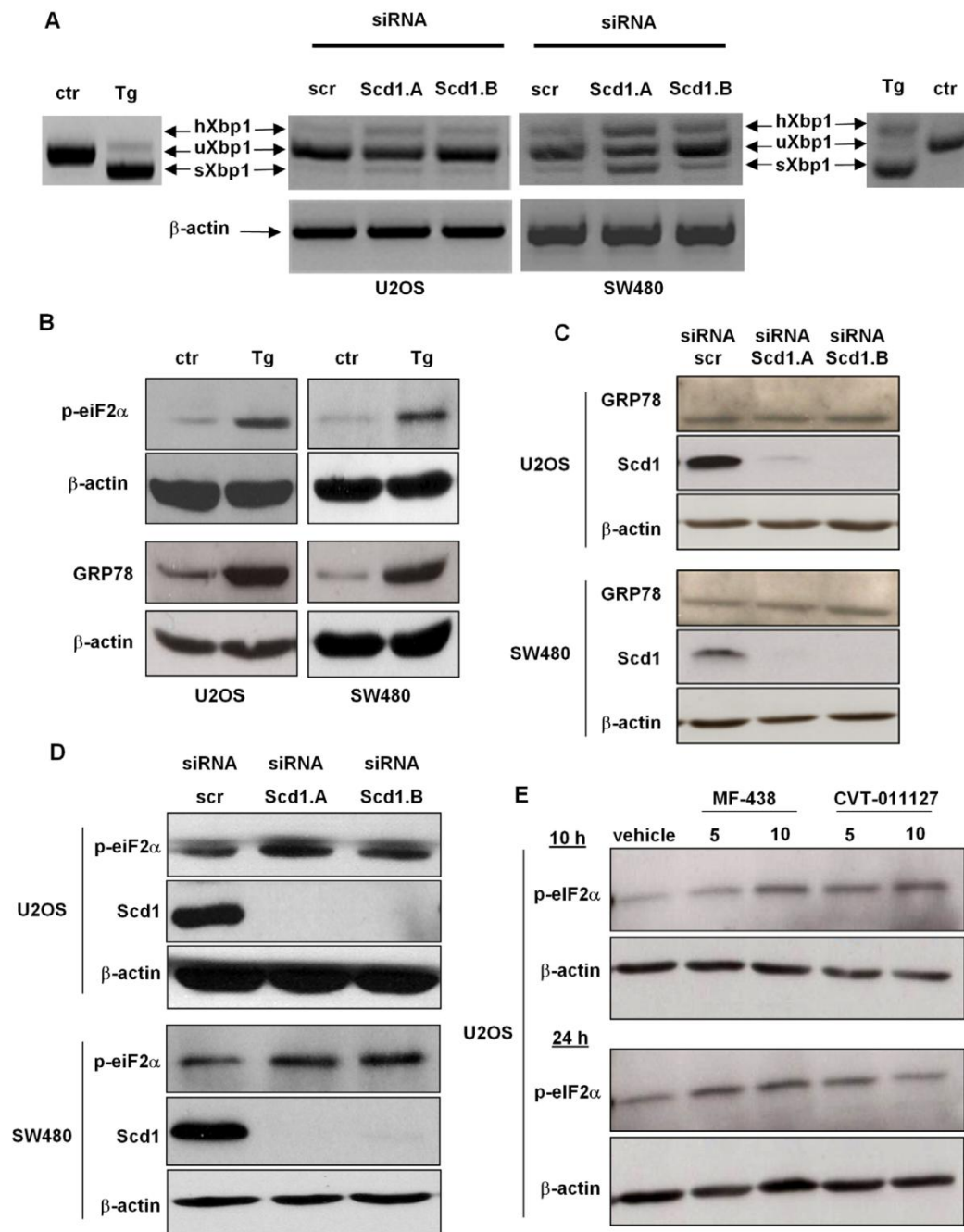


Figure 3. Inhibition of Scd1 partially induced UPR markers. U2OS and SW480 cells were treated with siRNA control (scr) and siRNA against Scd1 for 72h. **A**) Samples were prepared for mRNA analyses of Xbp1 processing by semi-quantitative RT-PCR. The PCR products were run on a 3% agarose gel and the spliced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

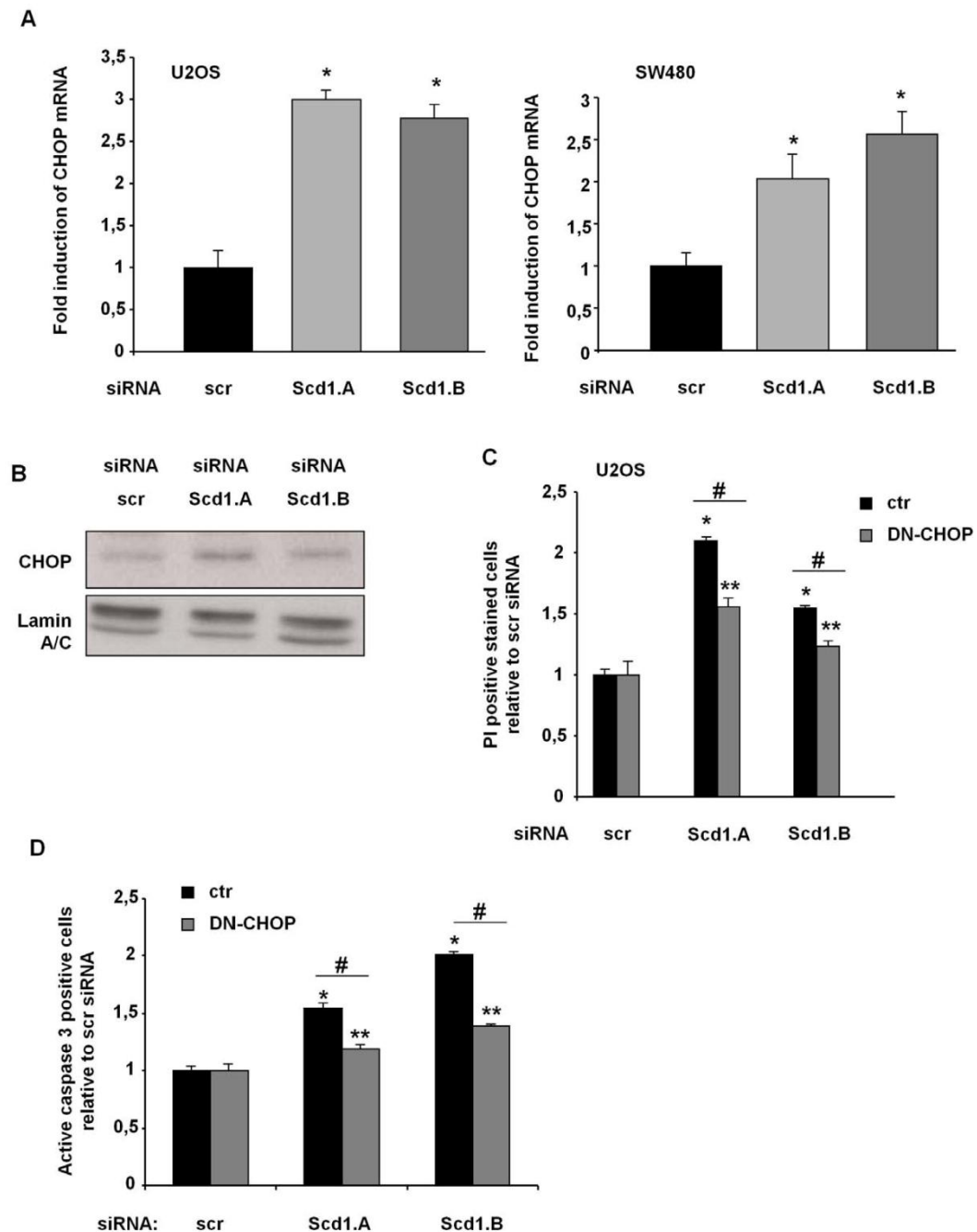


Figure 4. Inhibition of CHOP activity reduced siRNA Scd1-mediated U2OS cell death. **A)** U2OS and SW480 cells were treated with siRNA control (scr) and siRNA against Scd1 for 72h. Total RNA was isolated and CHOP mRNA expression normalized to β -actin mRNA expression was quantified by real time RT-PCR.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

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

Scd1 depletion did not affect the viability of non cancer cells

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

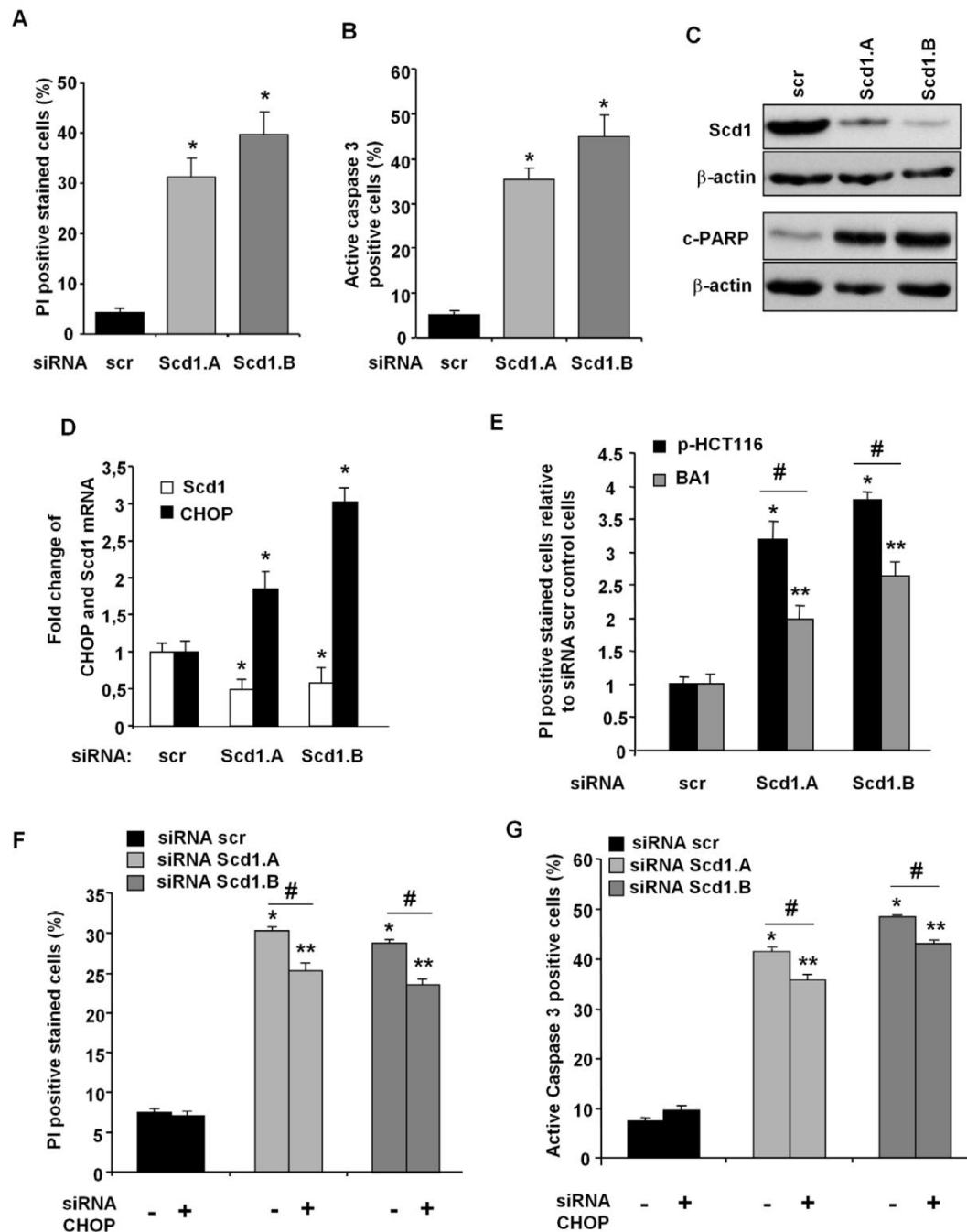


Figure 5. Extinction of CHOP expression reduced Scd1 knockdown-mediated HCT116 apoptosis. **A)** HCT116 cells treated 72 h with siRNA control (scr) or targeting Scd1 (Scd1.A and Scd1.B) were collected and total cell death was analysed by flow cytometry after staining with propidium iodide. Results were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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Materials

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

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

Cell culture and transfections

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

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

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

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

Cell proliferation, viability and death analyses

Cell proliferation analysis was carried out using CyQuant[®] NF cell proliferation assay (Invitrogen). Adherent cells were washed and frozen at 80°C. Cells were thawed and treated with CyQuant GR dye, which binds stoichiometrically to nucleic acids and, thus, measures cell number. Fluorescence quantification was measured using a microtiter plate fluorimeter (VICTOR³V[™], PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA) with excitation at 485 nm and detection at 535 nm.

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

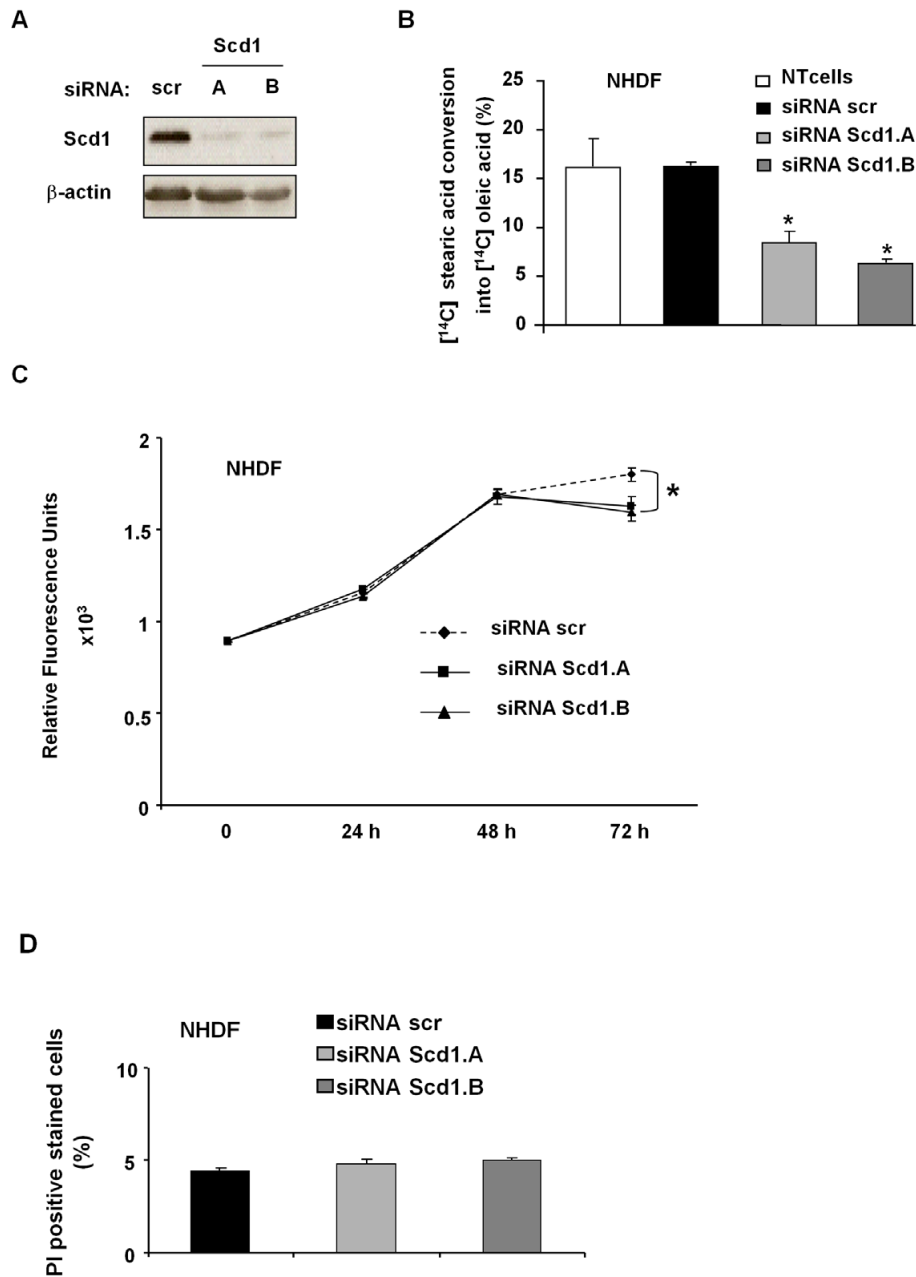


Figure 6. Scd1 depletion did not affect viability of non cancer cells. Normal human dermal fibroblasts (NHDF) were transfected with siRNA control (scr) and siRNA targeting Scd1 (Scd1.A and Scd1.B). NHDF cells were harvested after 72 h siRNA treatment and harvested for further analyses. **A)** Total proteins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

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

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

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

RNA purification and RT-PCR

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

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

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

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

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

Western Blotting

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

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

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

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

Determination of Scd activity

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

Statistical analysis

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

Acknowledgments

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

Author Contributions

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

References

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

12. Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP (1997) Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in *in situ* breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 3: 2115–2120.
13. Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgamel AA, Eelen M, Vercaeren I, et al. (2000) Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer* 88: 176–179.
14. Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, et al. (1994) Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6379–6383.
15. Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, et al. (2002) Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 98: 19–22.
16. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, et al. (2000) The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 31: 1068–1073.
17. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, et al. (1997) Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 150: 201–208.
18. Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, et al. (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearoyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 735–742.
19. Falvella FS, Pascale RM, Gariboldi M, Manenti G, De Miglio MR, et al. (2002) Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis* 23: 1933–1936.
20. Griffiths J, Tesiram Y, Reid GE, Saunders D, Floyd RA, et al. (2009) *In vivo* MRS assessment of altered fatty acyl unsaturation in liver tumor formation of a TGF α /c-myc transgenic mouse model. *J Lipid Res* 50: 611–622.
21. Li J, Ding SF, Habib NA, Fernor BF, Wood CB, et al. (1994) Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 57: 348–352.
22. Fritz V, Benfodda Z, Rodier G, Henriquet C, Iborra F, et al. (2010) Abrogation of *de novo* lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol Cancer Ther* 9: 1740–1754.
23. Moore S, Knudsen B, True LD, Hawley S, Etzioni R, et al. (2005) Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 114: 563–571.
24. Scaglia N, Chisholm JW, Igal RA (2009) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One* 4: e6812.
25. Morgan-Lappe SE, Tucker LA, Huang X, Zhang Q, Sarthy AV, et al. (2007) Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearoyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res* 67: 4390–4398.
26. Scaglia N, Caviglia JM, Igal RA (2005) High stearoyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1687: 141–151.
27. Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H (2010) Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem*.
28. Scaglia N, Igal RA (2008) Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol* 33: 839–850.
29. Hardy S, Langelier Y, Prentki M (2000) Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 60: 6353–6358.
30. van der Sanden MH, Houweling M, van Golde LM, Vaandrager AB (2003) Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein GCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem J* 369: 643–650.
31. van der Sanden MH, Meems H, Houweling M, Helms JB, Vaandrager AB (2004) Induction of GCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible protein 153 expression during inhibition of phosphatidylcholine synthesis is mediated via activation of a C/EBP-activating transcription factor-responsive element. *J Biol Chem* 279: 52007–52015.
32. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519–529.
33. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, et al. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099–1108.
34. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, et al. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129: 1337–1349.
35. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, et al. (2002) Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109: 525–532.
36. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, et al. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12: 982–995.
37. Thomas KC, Sabnis AS, Johansen ME, Lanza DL, Moos PJ, et al. (2007) Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 830–838.
38. Qiao D, Im E, Qi W, Martinez JD (2002) Activator protein-1 and GCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1583: 108–116.
39. Scaglia N, Igal RA (2005) Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem* 280: 25339–25349.
40. Almaguel FG, Liu JW, Pacheco FJ, Casiano CA, De Leon M (2009) Activation and reversal of lipotoxicity in PC12 and rat cortical cells following exposure to palmitic acid. *J Neurosci Res* 87: 1207–1218.
41. Hardy S, El-Asaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, et al. (2003) Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* 278: 31861–31870.
42. Peter A, Weigert C, Staiger H, Rittig K, Cegan A, et al. (2008) Induction of stearoyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E339–349.
43. Wei Y, Wang D, Pagliassotti MJ (2007) Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells. *Mol Cell Biochem* 303: 105–113.
44. Vinciguerra M, Carrozzino F, Peyrou M, Carlone S, Montesano R, et al. (2009) Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN. *J Hepatol* 50: 1132–1141.
45. Hess D, Chisholm JW, Igal RA (2010) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLoS One* 5: e11394.
46. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., et al. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077–3082.
47. Jackowski S (1996) Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem* 271: 20219–20222.
48. Siperstein MD (1984) Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res* 25: 1462–1468.
49. Baburina I, Jackowski S (1998) Apoptosis triggered by 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycerol-3-phosphocholine is prevented by increased expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem* 273: 2169–2173.
50. Cui Z, Houweling M, Chen MH, Record M, Chap H, et al. (1996) A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 271: 14668–14671.
51. Yeung BH, Kwan BW, He QY, Lee AS, Liu J, et al. (2008) Glucose-regulated protein 78 as a novel effector of BRCA1 for inhibiting stress-induced apoptosis. *Oncogene* 27: 6782–6789.
52. Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Wang YF, Kiejda KA, et al. (2007) Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res* 67: 9750–9761.
53. Jiang CC, Mao ZG, Avery-Kiejda KA, Wade M, Hersey P, et al. (2009) Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 30: 197–204.
54. Pytko P, Schonthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 67: 9809–9816.
55. Karasikov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, et al. (2006) Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 147: 3398–3407.
56. Ou L, Wu Y, Ip C, Meng X, Hsu YC, et al. (2008) Apoptosis induced by t10,c12-conjugated linoleic acid is mediated by an atypical endoplasmic reticulum stress response. *J Lipid Res* 49: 985–994.
57. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107: 881–891.
58. Lin JH, Li H, Zhang Y, Ron D, Walter P (2009) Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One* 4: e4170.
59. Jiang HY, Wek RC (2005) Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 α) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J Biol Chem* 280: 14189–14202.
60. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21: 1249–1259.
61. Rasheva VI, Domingos PM (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14: 996–1007.
62. Koltun DO, Parkhill EQ, Vasilevich NI, Glushkov AI, Zilbershtein TM, et al. (2009) Novel, potent, selective, and metabolically stable stearoyl-CoA desaturase (SCD) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 2048–2052.
63. Leger S, Black WC, Deschenes D, Dolman S, Falgout JP, et al. (2010) Synthesis and biological activity of a potent and orally bioavailable SCD inhibitor (MF-438). *Bioorg Med Chem Lett* 20: 499–502.

Article 2:

Article en révision dans le Journal of Biological Chemistry

Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through eIF2 α and GADD153/CHOP: protective effect of oleic acid

Mélaine Minville-Walz¹, Anne-Sophie Pierre¹, Joseph Gresti¹, Cécile Fèvre¹, Laurent Pichon¹, Sandrine Bellenger¹, Jérôme Bellenger¹, Christian Tessier¹, Michel Narce¹ and Mickaël Rialland^{1,2}

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

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

Adress correspondence to :
Mickaël Rialland, Université de Bourgogne,
Centre de Recherche INSERM UMR866,
6 boulevard Gabriel,
21000 Dijon- France ; Fax : +33 3 80 39 63 30 ;
e-mail : mickael.rialland@u-bourgogne.fr

Dietary conjugated linoleic acids (CLA) are fatty acid isomers with anti-cancer activities produced naturally in ruminants or from vegetable oil processing. The anti-cancer effects of CLA differ upon the cancer origin and the CLA isomers. In this study, we carried out to precise the effects of CLA isomers, c9,t11 and t10,c12 CLA, on mechanisms of cell death induction in colon cancer cells (SW480 and HCT116). We showed that t10,c12 CLA treatment (50 μ M) drastically induced cell death with apoptotic hallmarks (DNA condensation and PARP cleavage) whereas c9,t11 CLA treatment (50 μ M) led to a modest apoptosis-independent cell death. Treatment of colon cancer cell lines with t10,c12 CLA triggered activation of ER stress characterised by induction of eIF2 α phosphorylation, splicing of Xbp1 mRNA and CHOP expression. Furthermore, we demonstrated that t10,c12 CLA-mediated apoptosis was dependent on eIF2 α phosphorylation status and induction of CHOP expression. Moreover, we evidenced that oleic acid supplementation alleviated CHOP induction and apoptosis associated with inhibition of Stearoyl-CoA desaturase activity.

These results highlight that t10,c12 CLA exert its cytotoxic effect through ER stress-dependent apoptosis in colon cancer cells. It remains now to evaluate the therapeutic potential for a dietary intervention with t10,c12 CLA in patients with colon cancer.

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

Anticancer properties have been recently attributed to CLA. Indeed, an epidemiologic study indicates that long-term consumption of CLA is inversely correlated with colorectal cancer incidence (2). Furthermore, when incorporated at once or individually in the diet as purified nutrients, c9,t11 and t10,c12 CLA exert notable anti-carcinogenic effects in rodent models of grafted tumor cells or chemically-induced cancers (3-8). Nevertheless, the relationship between dietary

intake of CLA and tumor incidence remains to be ascertained in humans (9,10). Suppression of tumor growth under CLA treatment can be attributed either to induction of apoptosis or inhibition of proliferation and angiogenesis (11-14). c9,t11 and t10,c12 CLA present different potency for cancer cell death induction according to the cancer cell model (15). In colon cancer cells, t10,c12 CLA triggers a more pronounced cytotoxic effect than c9,t11 CLA without defined mechanisms (16-18). However, it has been reported that cell death mediated by t10,c12 CLA is a caspase-dependent apoptosis through activation of caspases 9 and 3 in association with mitochondrial events such as alteration of mitochondria membrane potential and release of cytochrome C (18-20).

In addition to its potential anti-carcinogenic properties, t10,c12 CLA has been reported to inhibit monounsaturated fatty acids (MUFA) synthesis by down-regulation of Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) activity (21,22). Scd is the rate-limiting enzyme catalyzing the bioconversion of saturated palmitic and stearic fatty acids into monounsaturated palmitoleic and oleic acids, respectively. High activity of Scd has been associated with prevention of endoplasmic reticulum (ER) stress and of lipotoxicity induced by saturated fatty acids in different cell types (23-26). In contrast, abolition of Scd activity by siRNA or pharmacological inhibitors leads to induction of ER stress and apoptosis in cancer cells (27,28). ER stress first triggers an adaptive program, known as the unfolded protein response (UPR), to reestablish ER equilibrium (29,30). Activation of the canonical UPR engages three distinct concerted signalling branches mediated by ER membrane anchored sensors: RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α). PERK phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor (eIF)2 α , thereby inhibiting global protein synthesis. Active ATF6 translocates to the Golgi and is cleaved from the membrane by site-1 and -2 proteases. Cleaved ATF6 localises to the nucleus and induces transcription of Xbp1 and ER chaperones such as GRP78 (31,32). IRE1 α disposes of an endoribonuclease activity that alternatively splices the Xbp1 mRNA (sXbp1), which is translated into an active transcription

factor [29-30]. In severe or prolonged ER stress, the UPR switches from a cytoprotective to a pro-apoptotic signal through transcriptional activation of the transcription factor C/EBP homologous protein (GADD153/CHOP) (33,34). The pro-apoptotic program involving CHOP has been recently described during abrogation of Scd activity in cancer cells (27,28).

Given that Scd activity is associated with ER stress activation and CHOP-mediated apoptosis, we hypothesized that CLA treatment could induce ER stress and apoptosis through Scd activity repression. Therefore, we evaluated the effect of both c9,t11 and t10,c12 CLA on cell death induction and ER stress activation in colon cancer cells. In this context, we also analysed in CLA-treated cells the effect of oleic acid, product of Scd activity, on apoptosis and regulation of GADD153/CHOP, the pro-apoptotic ER stress factor. We found that t10,c12 CLA induced apoptosis and inhibition of Scd activity more potently than c9,t11 CLA. We also demonstrated that regulation of eIF2 α post-translational status and of CHOP expression were involved in apoptosis triggered by t10,c12 CLA during ER stress. Furthermore, we showed that a supplementation of oleic acid counteracting the inhibition of de novo MUFA synthesis alleviated t10,c12 CLA-induced apoptosis in colon cancer cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

SW480 and HCT116 human colorectal cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cell culture supplies were from Dutscher (France). All fatty acids were purchased from Sigma-Aldrich (France). SiRNA against CHOP and unrelated human mRNA were purchased from Dharmacon Research Inc (Lafayette, CO). Anti-Scd1, anti-CHOP and anti-GRP78 were purchased by Santa-Cruz biotechnologies, anti- β -actin by Sigma, anti-phospho eIF2 α and anti-cleaved PARP by Cell Signaling Technology. [14C] stearic acid was purchased by Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). The eIF2 α expression vectors, wild-type (WT) and dominant negative (DN) harbouring S51A mutation, were a generous gift from Dr. Reilly.

Cell culture. SW480 and HCT116 cells were maintained in DMEM supplemented with 10 %

heat inactivated foetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), L-glutamine (2 mM). For experiments, cells were treated with fatty acids bound to fatty acid free-bovine serum albumin (BSA) (ratio 4:1).

Cell proliferation assay. Cell proliferation analysis was carried out using CyQuant® NF cell proliferation assay (Invitrogen). Adherent cells were harvested at indicated times and frozen at -80°C. Cells were thawed and treated with CyQuant GR dye, which binds stoichiometrically to nucleic acids and, thus, quantifies cell number. Fluorescence quantification was measured using a microtiter plate fluorimeter (VICTOR3V™, PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA) with excitation at 485 nm and detection at 535 nm.

Total cell death and apoptosis assessment. Total cell death was determined by propidium iodide (PI) staining using flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson). Cells were collected 72 hours after treatment and PI (1 μ g/ml) was added to SW480 cells. Positive PI stained cells were considered as dead cells (necrosis and apoptosis).

For apoptosis detection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33258 (1 μ g/ml). At least 200 nuclei per sample were counted under microscope (Zeiss).

Cell transfections. SW480 cells were transfected with WT-eIF2 α and DN-eIF2 α pcDNA3.1 expression vectors with lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Transfected SW480 were selected in G418 (400 μ g/ml) for at least three weeks before experiments. Stably transfected cells were then treated with fatty acids as described above.

SW480 were transfected with 50 nM siRNA directed against unrelated human mRNA (siRNA scr, against luciferase sequence) and CHOP (siRNA CHOP) using Oligofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations.

Sequences of siRNA were: siRNA scr: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAUU-3' and 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGUU-3'; siRNA CHOP: 5'-CAAUUGUUCAUGCUUGGUGUU-3' and 5'-CACCAAGCAUGAACAAUUGUU-3'.

SW480 cells transfected with siRNA were next day treated with fatty acids for further 72 hours.

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

5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3' and 5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'.

Real-time RT-qPCR was performed for GRP78 and CHOP mRNA expression with iQSYBR Green supermix (Bio-Rad) using a Bio-Rad iCycler iQ with the following primers:

GRP78: 5'-GGAACACAGTGGTGCCTACCAA-3' and 5'-GGAGCAGGAGGAATTCAGTCA-3', CHOP: 5'-

ACACAGATGAAAATGGGGGTACCT-3' and 5'-AGAAGCAGGATCAAGAGTGGT-3', and β-actin: 5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3' and 5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'. The relative amount of GRP78 and CHOP expression was determined using $\Delta\Delta C_t$ method. The normalized delta cycle threshold (ΔC_t) was calculated by subtracting the GRP78 and CHOP cycle threshold value from the β-actin cycle threshold value ($\Delta C_t = C_{t\beta\text{-actin}} - C_{t\text{gene}}$). Comparative gene expression between two independent samples, or $\Delta\Delta C_t$, was obtained by subtracting the vehicle delta cycle threshold from the sample delta cycle threshold ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{sample}} - \Delta C_{t\text{control}}$). Fold change expression was defined with $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$.

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

Immunoblotting was performed with antibodies raised against phospho-eIF2α,

Scd1, cleaved PARP, GRP78, CHOP and β-actin.

Determination of Scd activity. Conversion of [14C] stearic acid into [14C] oleic acid was used to measure Scd activity after 72 hours of fatty acid treatment as previously described (28). SW480 cells were incubated with 3 µM (0.25 µCi/dish of [14C] stearic acid) for further 6 hours at 37°C in 5 % CO₂ incubator. Cells were collected and total lipids were extracted according to Bligh and Dyer method. Lipids were saponified with potassium hydroxyl/methanol and esterified with boron trifluoride (14% in methanol). Radiolabelled fatty acid methyl esters were separated by RP-HPLC and detected on line by a radioisotope detector (Packard Flow Scintillation Analyser, PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA) using two Chromolith™ Performance RP-18e (100 mm × 4.6 mm i.d.) connected in series both purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and acetonitrile as mobile phase. The [14C] oleic acid / ([14C] oleic and stearic acids) ratio was defined as Scd activity.

Statistical analysis. Results are presented as means ± standard error mean (SEM). Statistical significance of results was determined by OneWay Anova analysis followed by Tuckey HSD test if not indicated. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Apoptosis is induced by t10,c12 CLA in SW480 cells.

We first determined the effect of c9,t11 and t10,c12 CLA on SW480 proliferation using Cyquant assay™. The treatment with increase concentration of CLA (25 and 50 µM) showed a marked difference in cell number between c9,t11 and t10,c12 CLA after 72 hours. Indeed, t10,c12 CLA treatment reduced cell number at 25 and 50 µM compared to control cells and c9,t11 CLA (Fig. 1A). In order to determine the cell death rate, we carried out analysis by PI staining. Three days of treatment with t10,c12 CLA induced a dose-dependent increase in total SW480 cell death while viability of cells treated with c9,t11 CLA was not or modestly (15% of PI positive cells) affected at 25 and 50 µM, respectively (Fig.

1B). The PI staining assay does not discriminate between apoptosis and necrosis. Thus, we defined apoptosis contribution in cell death induced by t10,c12 CLA with Hoechst nuclei staining and PARP cleavage at 72 hours. We did not observe apoptosis induction with 25 and 50 μ M c9,t11 CLA treatment whereas t10,c12 CLA already triggered apoptosis at 12.5 μ M to raise at 25 μ M as shown in Figures 1C and 1D.

Exposure to t10,c12 CLA represses de novo MUFA production.

CLAs are described as regulators of MUFA synthesis by regulating stearoyl-CoA desaturase (Scd1) expression and/or activity (21,22). However, c9,t11 and t10,c12 CLA can exert different regulation of Scd1 activity depending on the cell type. Thus, we undertook to define the regulation of Scd activity by both CLA in SW480 colon cancer cells. We analysed Scd1 protein content by western-blotting and Scd activity through the desaturation rate of [14C] stearic acid into [14C] oleic acid by RP-HPLC. We first observed that t10,c12 CLA only at the concentration of 50 μ M slightly decreased Scd1 protein expression in SW480 cells (Fig. 2A). We were then interested in Scd activity, which represents de novo MUFA synthesis. The basal desaturation rate of SW480 cells was approximately 35% (Fig. 2B). In presence of 50 μ M c9,t11 CLA, the desaturation rate remained at more than 20%. For t10,c12 CLA-treated cells, the desaturation rate was approximately of 5% at 25 and 50 μ M. This result highlighted that SW480 cells lose their capability to produce de novo MUFA (e.g. oleic acid) by inhibition of Scd activity by t10,c12 CLA at 25 μ M.

ER stress pathway is activated by t10,c12 CLA.

We recently reported that extinction of Scd1 expression and Scd activity led to activation of ER stress (28). Thus, we hypothesized that the lost of MUFA synthesis through Scd inhibition by t10,c12 CLA treatment acted as a possible inducer of ER stress and cell death. We studied the expression of characteristic ER stress markers among the arms of UPR. Under ER stress, this pathway is activated by the release of GRP78 protein from the UPR transducers anchored in the ER membrane. Concomitantly, transcription of GRP78 gene is enhanced. We demonstrated here that addition of t10,c12

CLA at 25 and 50 μ M for 72 hours in SW480 and HCT116 cell lines increased GRP78 mRNA content compared to vehicle and c9,t11 CLA (Fig. 3A). Nevertheless, GRP78 protein expression did not significantly change in these conditions in SW480 and HCT116 cell lines (Fig. 3B), although these cancer cells were sensitive to thapsigargin (ER stress inducer) for GRP78 protein up-regulation showing that machinery for GRP78 protein regulation was efficient (data not shown). We also showed that treatment of t10,c12 CLA led to the activation of the IRE1 α arm of UPR. Indeed, this treatment triggered processing of Xbp1 mRNA evidenced by hybrid (h-Xbp1) and non conventional spliced Xbp1 (s-Xbp1) transcripts in both cell lines (Fig. 3C). Furthermore, we found that ER stress markers (s-Xbp1 and GRP78 mRNA) were more induced at the concentration of 25 μ M than 50 μ M that could be associated to the fact t10,c12 CLA-mediated apoptosis raised at the concentration of 25 μ M (Fig. 1C and 1D).

Prevention of eIF2 α phosphorylation increases t10,c12 CLA-mediated cell death.

Activation of PERK, another ER stress transducer, could be indirectly evaluated by phosphorylation of its substrate eIF2 α which in turn inhibits the general protein synthesis. As expected, t10,c12 CLA addition triggered phosphorylation of eIF2 α in SW480 cells in a dose-dependent manner at 72 hours (Fig. 4A). The phosphorylation of eIF2 α was also observed in HCT116 cells treated by t10,c12 CLA for 72 hours (Fig. 4B). As we were interested in testing the eIF2 α involvement in t10,c12 CLA-induced cell death, we established SW480 cells stably expressing wild-type (WT) and S51A-eIF2 α . Transfected cells were treated with vehicle, c9,t11 or t10,c12 CLA for 72 hours and total cell death was determined by PI staining. We observed that expression of the different constructs in vehicle- and c9,t11 CLA-treated cells did not affect cell viability. In contrast, we found that S51A-eIF2 α overexpression enhanced t10,c12 CLA-induced cell death whereas WT-eIF2 α overexpression decreased t10,c12 CLA-induced cell death (Fig. 4C). The analysis of apoptosis by PARP cleavage level showed that t10,c12 CLA treatment induced a more pronounced expression of c-PARP in SW480 cells expressing S51A-eIF2 α protein than

expressing the phosphorylable WT- eIF2 α protein (Fig. 4D). These data would suggest that eIF2 α phosphorylation presented a pro-survival activity in cells treated by t10,c12 CLA.

Ablation of GADD153/CHOP expression prevents t10,c12 CLA-induced cell death.

In condition of severe ER stress, apoptotic program is activated and is dependent of CHOP expression, a pro-apoptotic factor. SW480 and HCT116 cancer cells increased CHOP protein expression when they were treated with t10,c12 CLA (25 and 50 μ M) (Fig. 5A). The up-regulation of CHOP expression could be the signal of apoptosis induced by t10,c12 CLA treatment. Thus, we evaluated the role of CHOP in t10,c12 CLA-mediated cell death. SW480 cells treated by control siRNA (scr) or CHOP siRNA were exposed to c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 μ M for 72 hours. We analysed the effect of CHOP depletion on total cell death by PI staining analysis. We first found that extinction of CHOP expression by siRNA did not alter cell viability for vehicle- or c9,t11 CLA-treated cells (Fig. 5B). In contrast, inhibition of CHOP induction by t10,c12 CLA treatment protected against activation of total cell death (Fig. 5B). We showed by PARP cleavage analysis that CHOP depletion in t10,c12 CLA-treated SW480 cells reduced induction of apoptosis (Fig. 5C). Here, we evidenced that CHOP participated to the activation of apoptosis by t10,c12 CLA treatment.

OA alleviates t10,c12 CLA-induced GADD153/CHOP expression and apoptosis.

Abolition of de novo oleic acid synthesis by t10,c12 CLA treatment was shown in SW480 cells and associated with activation of ER stress and CHOP expression. Thus, we carried out to study the effect of a supplementation with 100 μ M oleic acid (OA) on cell death and CHOP expression in t10,c12 CLA-treated cells. We showed that t10,c12 CLA treatment for 72 hours reached a maximum of apoptosis at 25 μ M whereas 50 μ M of c9,t11 CLA modestly induced cell death without apoptotic features (Fig. 1C and 1D). We first ensure that addition of 100 μ M OA on cancer cells for 72 hours did not affect cell proliferation (data not shown). At this concentration, OA counteracted cell death induced either by t10,c12 CLA (25 and 50 μ M) or by c9,t11

CLA (50 μ M) (Fig. 6A). We also evidenced that OA prevented induction of PARP cleavage, hallmark of apoptosis, in SW480 cells treated by t10,c12 CLA (Fig. 6B). Furthermore, we sought for modifications of CHOP mRNA expression triggered by OA treatment that could account for prevention of apoptosis. We found that OA treatment prevented CHOP mRNA induction by t10,c12 CLA in SW480 cells (Fig. 6D). Altogether these results showed that oleic acid exerted cytoprotective effects against CHOP-mediated apoptosis induced by t10,c12 CLA.

DISCUSSION

Define the molecular mechanisms of how dietary c9,t11 and t10,c12 CLA exerted anti-cancer effects might be of great interest in the development of new anti-colorectal cancer therapies. Thus, in this purpose we treated SW480 and HCT116 colon cancer cells with either c9,t11 or t10,c12 CLA for 72 hours and analysed their effects on Scd activity and ER stress-induced apoptosis.

We clearly demonstrated that t10,c12 CLA but not c9,t11 CLA had the ability to activate ER stress highlighted by increase of eIF2 α phosphorylation and CHOP expression. Furthermore, we showed that t10,c12 CLA-mediated apoptosis involved eIF2 α and CHOP in colon cancer cells. We also evidenced that OA supplementation could alleviate CHOP induction and apoptosis by probably counteracting the abrogation of stearyl-CoA desaturase activity under the control of t10,c12 CLA. Conjugated linoleic acids are positional and geometric conjugated dienoic isomers of linoleic acid that have different ability to regulate Scd activity depending on cell type. In breast cancer cells, both c9,t11 and t10,c12 CLA modulate Scd activity without affecting Scd1 mRNA or protein level whereas only t10,c12 CLA represses Scd activity in intact hepatoma cells (22,35-37). Here, we showed in SW480 colon cancer cells that c9,t11 and t10,c12 CLA differently regulated Scd activity (Fig. 2). Although c9,t11 and t10,c12 CLA did not change drastically Scd1 protein expression in those cells, we observed a severe abolition of Scd activity with 25 μ M of t10,c12 CLA whereas even at 50 μ M of c9,t11 CLA, more than 20% of Scd activity remained in treated cells. It is now well established that Scd1

expression or activity level is inversely correlated with ER stress induction. Indeed, palmitic acid-induced ER stress was prevented in Scd1-overexpressed cells and was exacerbated in Scd1-depleted cells (27). Moreover, docosahexaenoic acid, a polyunsaturated fatty acid known as inhibitor of Scd1 expression, also induced ER stress in colon cancer cells (38). Recently, it has been demonstrated that Scd1 depletion was sufficient to activate UPR pathway and to lead to ER stress (27,28). We have postulated that repression of Scd1 activity and inhibition of de novo oleic acid synthesis by t10,c12 CLA was sufficient to trigger ER stress and CHOP-dependent apoptosis (Fig. 5). In this context, we evidenced that supplementation with oleic acid counteracted t10,c12 CLA effects on CHOP expression and induction of apoptosis (Fig. 6). It is interesting to note that several reports indicated that MUFA alleviated the cytotoxic effect of t10,c12 CLA on rat hepatoma cells through p38 MAPK (39,40). Moreover, transcription of CHOP gene is activated by p38 MAPK signalling pathway suggesting that modulation of CHOP expression in SW480 cells treated with t10,c12 CLA might occur through this signalling pathway (41,42). We highlighted that t10,c12 CLA-mediated apoptosis was correlated with CHOP induction since we observed a decrease of apoptosis in CHOP-depleted SW480 cells comforting previous data linking CHOP and t10,c12 CLA-induced apoptosis (43).

Moreover, our results reinforced the hypothesis that c9,t11 CLA, despite a modest increase of total cell death at 50 μ M, did not trigger apoptosis in colon cancer cells (Fig. 1C and D), which might be correlated with the absence of CHOP expression and ER stress induction.

Although several hallmarks of ER stress (CHOP, sXbp1, p-eIF2 α) were induced by t10,c12 CLA treatment in SW480 and HCT116 cells, we did not observe any evident modification of GRP78 protein level (Fig. 3B). This result is in agreement with the fact that p53-mutant TM4t mouse mammary tumor cells treated with t10,c12 CLA did not induce GRP78 protein expression and triggered a non canonical ER stress (43). GRP78 is a

chaperone protein whose role is to repress activation of ER stress transducers PERK and IRE1. In absence of GRP78 induction, kinase activity of PERK might be enhanced and its target eIF2 α phosphorylated (29,44). However, PERK is one of four identified eIF2 α kinases activated by different stressful conditions. Therefore, phosphorylation of eIF2 α is a convergence point for different stress pathways and this post-translational modification may play either pro-death or pro-survival role depending on the kinase involved in the eIF2 α phosphorylation (45,46). In this study, we showed that ectopic expression of a non phosphorylable eIF2 α (DN-eIF2 α) construct increased t10,c12 CLA-mediated cell death compared to overexpression of a phosphorylable eIF2 α (WT-eIF2 α construct suggesting a protective role of phospho-eIF2 α (Fig. 4C). The cytoprotective down-stream pathways activated by phosphorylation of eIF2 α involved phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathways (47,48). These data are inconsistent with the effects of a treatment with t10,c12 CLA in HT29 colon cancer cells. Indeed, t10,c12 CLA downregulates PI3K activity and does not modify NF- κ B activation in acute conditions (24 hours) (49,50). In this context, further investigations are needed to determine the cytoprotective pathways linked to phosphorylation of eIF2 α induced by t10,c12 CLA treatment.

In this work, we demonstrated that t10,c12 CLA was a more potent pro-apoptotic fatty acid than c9,t11 CLA for colon cancer cells. Furthermore, we evidenced that apoptosis induced by t10,c12 CLA was dependent of eIF2 α and CHOP proteins. Moreover, we showed that t10,c12 CLA abolished Scd activity and consequently de novo MUFA synthesis in colorectal cancer cells, which could initiate the activation of ER stress observed in cells treated with t10,c12 CLA. Altogether, these results suggest that dietary intervention with t10,c12 CLA could be a potential adjunctive agent in the treatment of colon cancer.

REFERENCES

1. Belury, M.A. (2002) *Annu Rev Nutr.* **22**, 505-31
2. Larsson, S.C., Bergkvist, L. and Wolk, A. (2005) *Am J Clin Nutr.* **82**, 894-900
3. Ha, Y.L., Storkson, J. and Pariza, M.W. (1990) *Cancer Res.* **50**, 1097-101
4. Hubbard, N.E., Lim, D. and Erickson, K.L. (2003) *Cancer Lett.* **190**, 13-9
5. Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A. and Pariza, M.W. (1991) *Cancer Res.* **51**, 6118-24
6. Kuniyasu, H., Yoshida, K., Sasaki, T., Sasahira, T., Fujii, K. and Ohmori, H. (2006) *Int J Cancer.* **118**, 571-6
7. Shiraishi, R., Iwakiri, R., Fujise, T., Kuroki, T., Kakimoto, T., Takashima, T., Sakata, Y., Tsunada, S., Nakashima, Y., Yanagita, T. and Fujimoto, K. (2010) *J Gastroenterol.* **45**, 625-35
8. Yasui, Y., Suzuki, R., Kohno, H., Miyamoto, S., Beppu, F., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Tanaka, T. (2007) *Nutr Cancer.* **59**, 82-91
9. Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C. and Chevalier, S. (2010) *Prog Lipid Res.* **49**, 76-86
10. Cho, E., Spiegelman, D., Hunter, D.J., Chen, W.Y., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. and Willett, W.C. (2003) *J Natl Cancer Inst.* **95**, 1079-85
11. Majumder, B., Wahle, K.W., Moir, S., Schofield, A., Choe, S.N., Farquharson, A., Grant, I. and Heys, S.D. (2002) *FASEB J.* **16**, 1447-9
12. Masso-Welch, P.A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M.M., Shoemaker, S., Ramirez, R.A. and Ip, M.M. (2002) *Cancer Res.* **62**, 4383-9
13. Palombo, J.D., Ganguly, A., Bistran, B.R. and Menard, M.P. (2002) *Cancer Lett.* **177**, 163-72
14. Park, H.S., Ryu, J.H., Ha, Y.L. and Park, J.H. (2001) *Br J Nutr.* **86**, 549-55.
15. Kelley, N.S., Hubbard, N.E. and Erickson, K.L. (2007) *J Nutr.* **137**, 2599-607
16. Cho, H.J., Kim, W.K., Jung, J.I., Kim, E.J., Lim, S.S., Kwon, D.Y. and Park, J.H. (2005) *World J Gastroenterol.* **11**, 5142-50
17. Lee, S.H., Yamaguchi, K., Kim, J.S., Eling, T.E., Safe, S., Park, Y. and Baek, S.J. (2006) *Carcinogenesis.* **27**, 972-81
18. Miller, A., Stanton, C. and Devery, R. (2002) *Anticancer Res.* **22**, 3879-87
19. Cho, H.J., Kwon, G.T. and Park, J.H. (2009) *J Med Food.* **12**, 952-8
20. Ou, L., Ip, C., Lisafeld, B. and Ip, M.M. (2007) *Biochem Biophys Res Commun.* **356**, 1044-9
21. Lee, K.N., Pariza, M.W. and Ntambi, J.M. (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* **248**, 817-21
22. Park, Y., Storkson, J.M., Ntambi, J.M., Cook, M.E., Sih, C.J. and Pariza, M.W. (2000) *Biochim Biophys Acta.* **1486**, 285-92
23. Kharroubi, I., Ladriere, L., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Cnop, M. and Eizirik, D.L. (2004) *Endocrinology.* **145**, 5087-96
24. Peter, A., Weigert, C., Staiger, H., Machicao, F., Schick, F., Machann, J., Stefan, N., Thamer, C., Haring, H.U. and Schleicher, E. (2009) *Diabetes.* **58**, 1757-65
25. Pfaffenbach, K.T., Gentile, C.L., Nivala, A.M., Wang, D., Wei, Y. and Pagliassotti, M.J. (2010) *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **298**, E1027-35
26. Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F. and Pagliassotti, M.J. (2006) *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **291**, E275-81
27. Ariyama, H., Kono, N., Matsuda, S., Inoue, T. and Arai, H. (2010) *J Biol Chem.* **285**, 22027-35
28. Minville-Walz, M., Pierre, A.S., Pichon, L., Bellenger, S., Fevre, C., Bellenger, J., Tessier, C., Narce, M. and Rialland, M. (2010) *PLoS One.* **5**, e14363
29. Ron, D. and Walter, P. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 519-29
30. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A. (2006) *EMBO Rep.* **7**, 880-5
31. Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. and Kaufman, R.J. (2002) *Genes Dev.* **16**, 452-66
32. Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M. and Mori, K. (2002) *Biochem J.* **366**, 585-94
33. Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. and Strasser, A. (2007) *Cell.* **129**, 1337-49
34. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L. and Ron, D. (1998) *Genes Dev.* **12**, 982-95

35. Bretillon, L., Chardigny, J.M., Gregoire, S., Berdeaux, O. and Sebedio, J.L. (1999) *Lipids*. **34**, 965-9
36. Choi, Y., Park, Y., Pariza, M.W. and Ntambi, J.M. (2001) *Biochem Biophys Res Commun*. **284**, 689-93
37. Choi, Y., Park, Y., Storkson, J.M., Pariza, M.W. and Ntambi, J.M. (2002) *Biochem Biophys Res Commun*. **294**, 785-90
38. Jakobsen, C.H., Storvold, G.L., Bremseth, H., Follestad, T., Sand, K., Mack, M., Olsen, K.S., Lundemo, A.G., Iversen, J.G., Krokan, H.E. and Schonberg, S.A. (2008) *J Lipid Res*. **49**, 2089-100
39. Yamasaki, M., Chujo, H., Nou, S., Tachibana, H. and Yamada, K. (2003) *Cancer Lett*. **196**, 187-96
40. Yamasaki, M., Tachibana, H., Yamada, A., Ochi, Y., Madhyastha, H., Nishiyama, K. and Yamada, K. (2008) *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. **44**, 290-4
41. Rolli-Derkinderen, M. and Gaestel, M. (2000) *Biol Chem*. **381**, 193-8
42. Sunnerhagen, P. (2007) *Mol Genet Genomics*. **277**, 341-55
43. Ou, L., Wu, Y., Ip, C., Meng, X., Hsu, Y.C. and Ip, M.M. (2008) *J Lipid Res*. **49**, 985-94
44. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. (2000) *Nat Cell Biol*. **2**, 326-32
45. Muaddi, H., Majumder, M., Peidis, P., Papadakis, A.I., Holcik, M., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Hatzoglou, M. and Koromilas, A.E. (2010) *Mol Biol Cell*. **21**, 3220-31
46. Wek, R.C., Jiang, H.Y. and Anthony, T.G. (2006) *Biochem Soc Trans*. **34**, 7-11
47. Deng, J., Lu, P.D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Sonenberg, N., Harding, H.P. and Ron, D. (2004) *Mol Cell Biol*. **24**, 10161-8
48. Kazemi, S., Mounir, Z., Baltzis, D., Raven, J.F., Wang, S., Krishnamoorthy, J.L., Pluquet, O., Pelletier, J. and Koromilas, A.E. (2007) *Mol Biol Cell*. **18**, 3635-44
49. Kim, E.J., Kang, I.J., Cho, H.J., Kim, W.K., Ha, Y.L. and Park, J.H. (2003) *J Nutr*. **133**, 2675-81
50. Shah, S.A., Mahmud, N., Mftah, M., Roche, H.M. and Kelleher, D. (2006) *Eur J Cancer Prev*. **15**, 125-33

Footnotes

We are grateful to Dr. C. Reilly for providing eIF2 α constructs. We also thank A. Hammann and A. Sequeira-Legrand for flow cytometry experiments. This work was supported by grants from INSERM, Région Bourgogne and the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière. The authors confirm that they are no conflicts of interest.

Figure 1

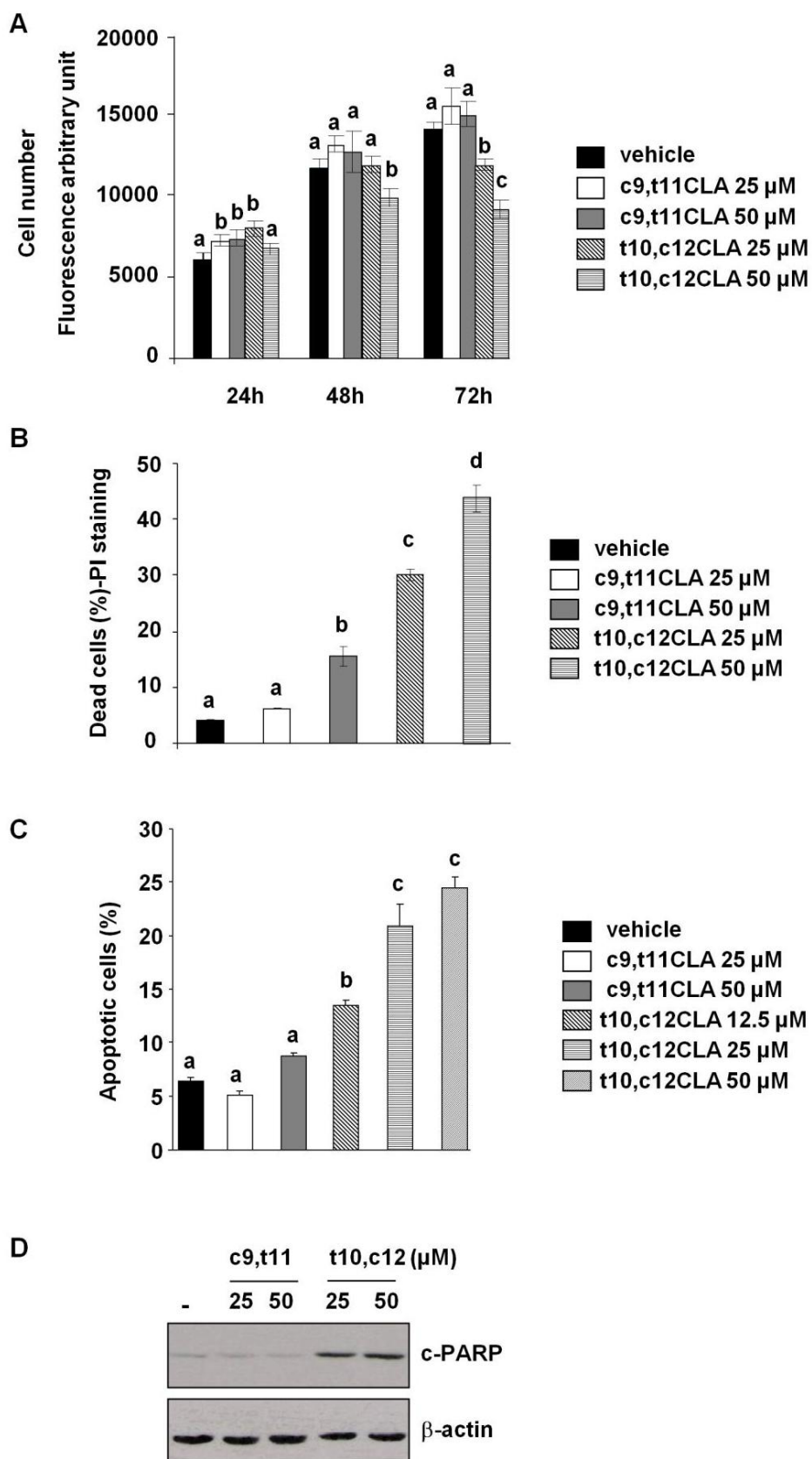
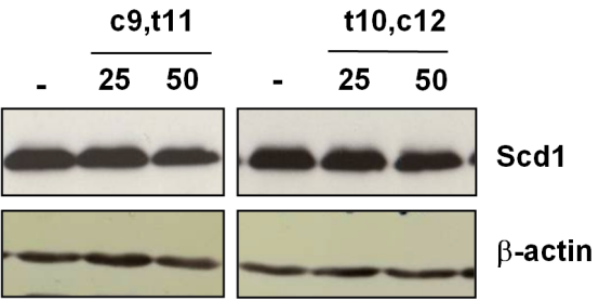


Figure 2

A



B

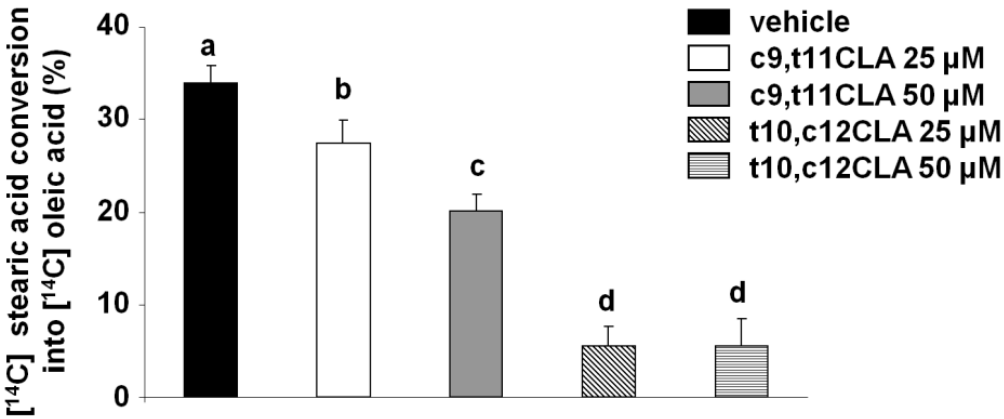
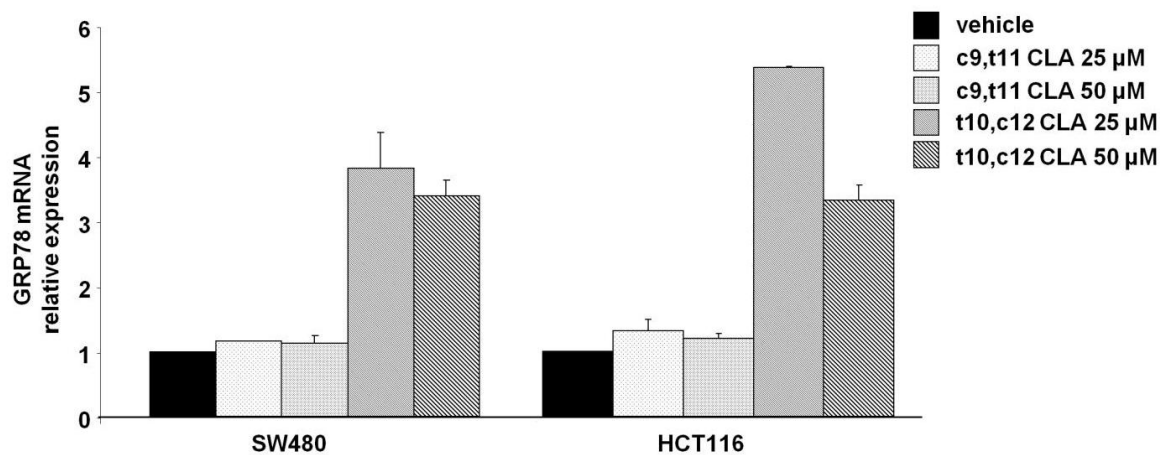
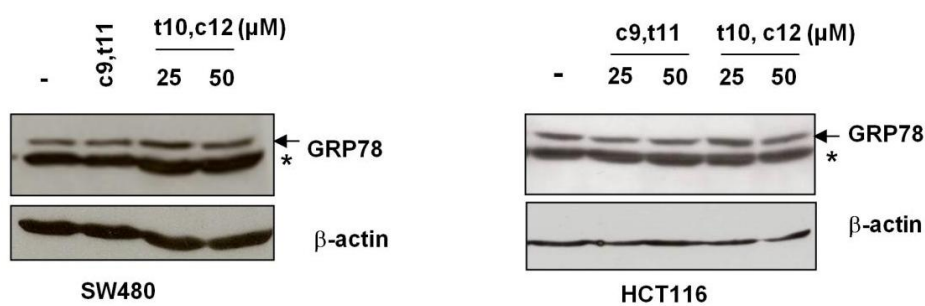


Figure 3

A



B



C

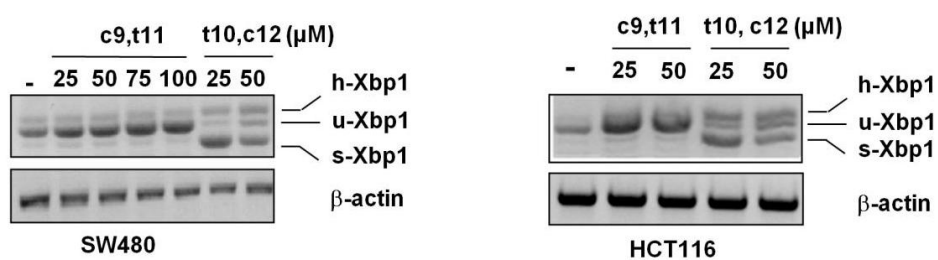


Figure 4

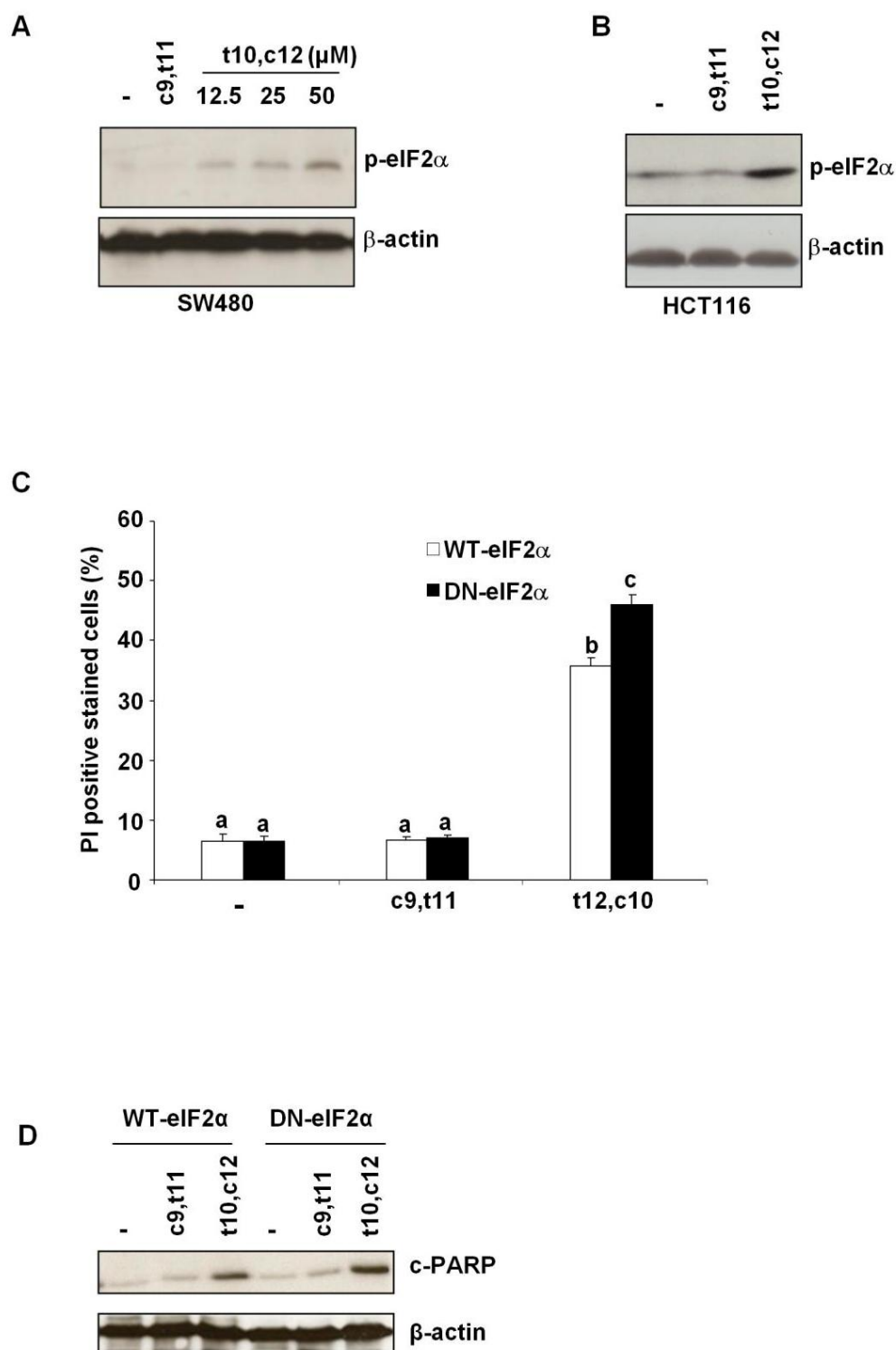


Figure 5

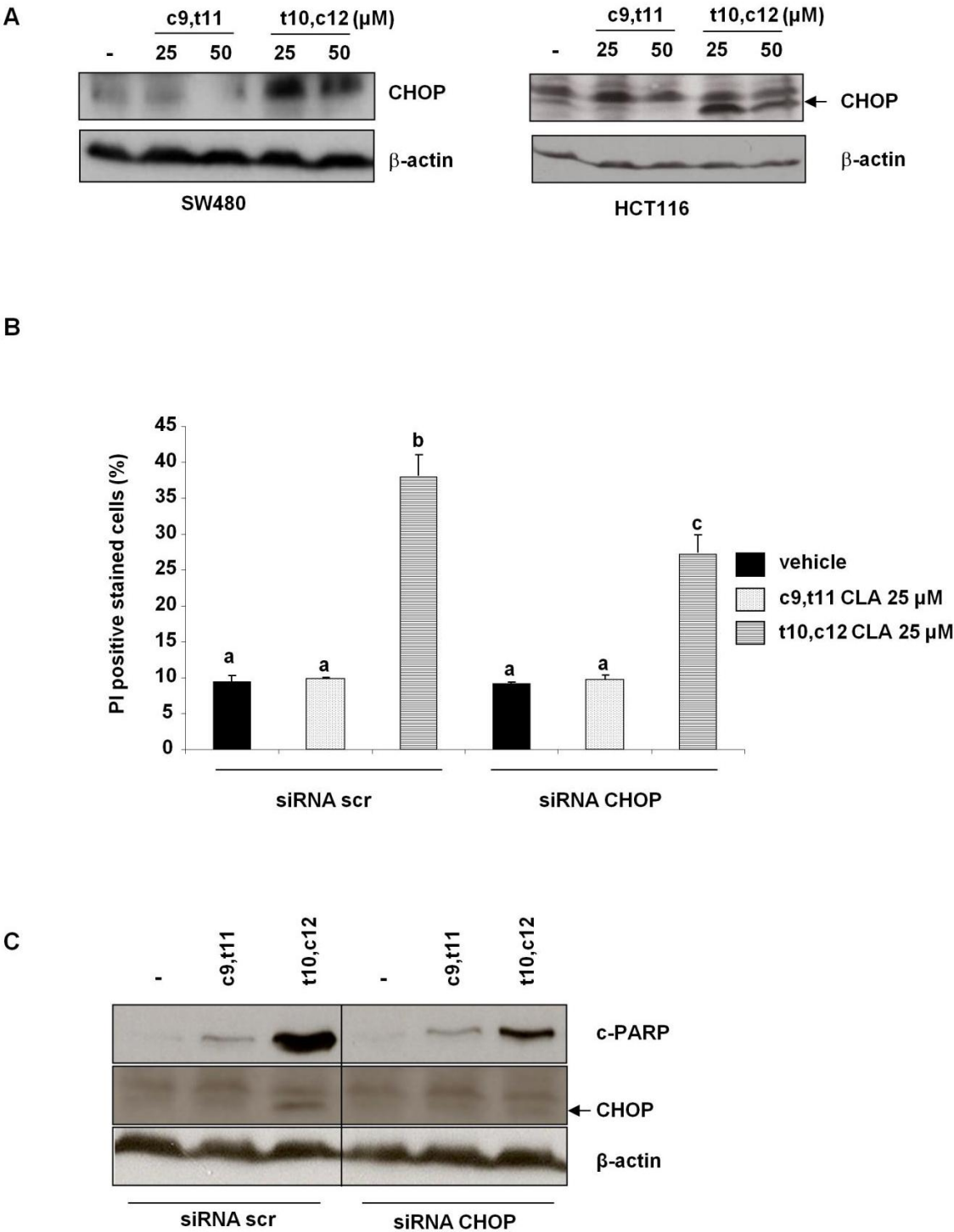


Figure 6

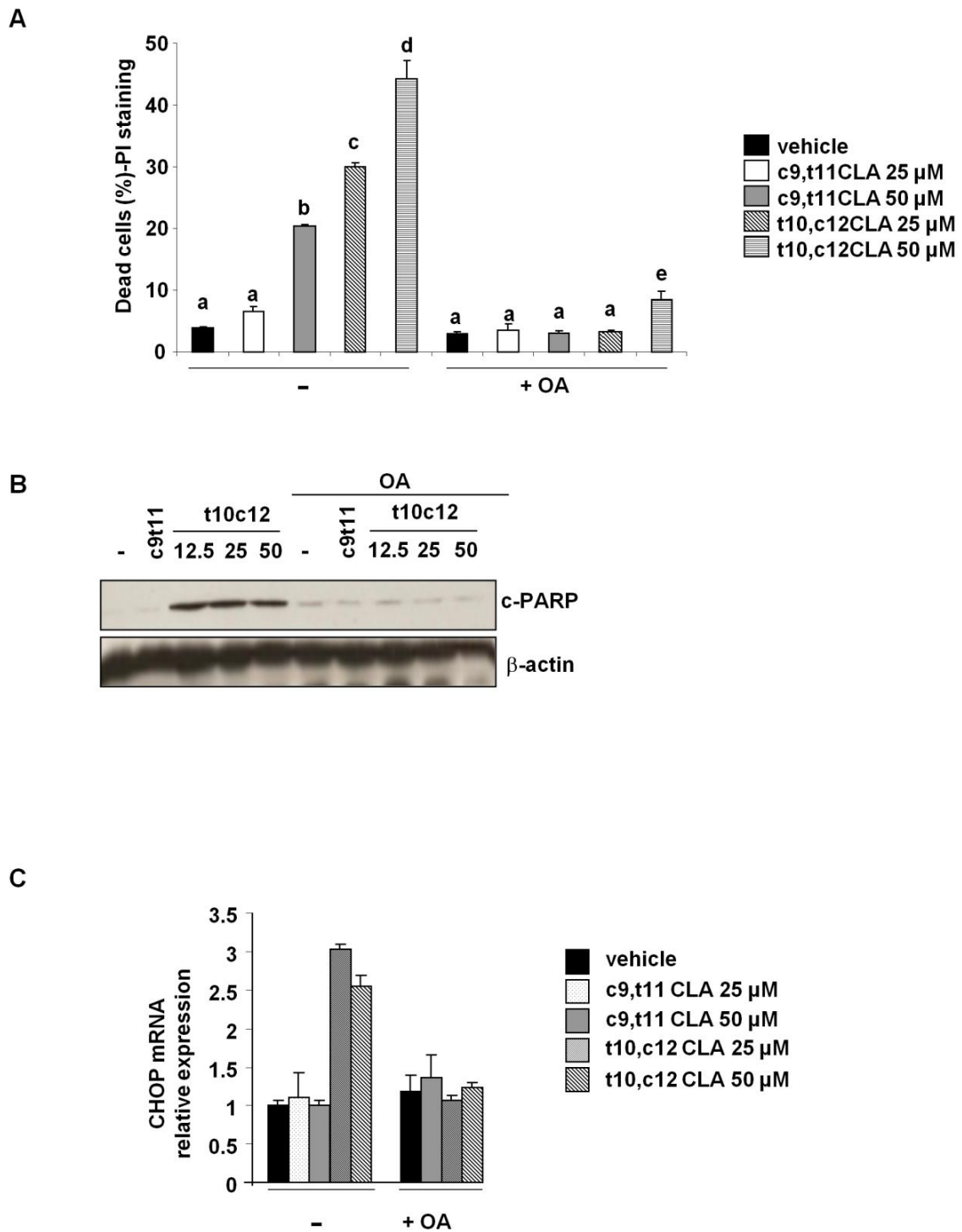


FIGURE LEGEND

Fig. 1. Apoptosis is induced by t10,c12 CLA. SW480 cells were treated with vehicle, c9,t11 CLA and t10,c12 CLA at indicated concentrations. (A) Proliferation status was determined by CyQuant® proliferation assay. Each value was the mean of relative fluorescence unit $\pm$ SEM of triplicate and representative of three independent experiments. Bars assigned a different superscript letter of vehicle (control) were statistically different ($p < 0.05$) by OneWay Anova followed by Dunnet test. (B) Cell death was measured 72 hours after treatment with propidium iodide (PI) staining and flow cytometry. Each value was the mean of three independent experiments $\pm$ SEM. (C) Apoptosis was evaluated 72 hours after treatment by Hoeschst staining. Nuclei were counted using phase contrast microscope and results were expressed as % of positive apoptotic nuclei / total nuclei ratio. Each value was the mean of two independent experiments $\pm$ SEM. (D) Protein whole-cell lysates were prepared 72 hours after treatment and PARP cleavage (c-PARP) was determined by Western blot using a rabbit polyclonal anti-cleaved PARP. β -actin was used to normalize loading. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$).

Fig. 2. Exposure to t10,c12 CLA represses de novo MUFA production. (A) Protein whole-cell lysates were prepared 72 hours after treatment with vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 and 50 μ M. Scd1 protein expression was analysed by Western-Blot. (B) SW480 cells treated 72 hours as in (A) were incubated for further 6 hours with [14C] stearic acid and total lipid extraction was performed. Scd activity was evaluated by RP-HPLC as the rate of [14C] stearic acid conversion into [14C] oleic acid by SW480 cells. Scd activity was expressed as the % ratio of [14C] oleic acid on [14C] oleic and stearic acids. Values represented the mean $\pm$ SEM from two independent experiments. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$).

Fig. 3. ER stress pathway is activated by t10,c12 CLA. Cancer cells were treated 72 hours with vehicle (-), c9,t11 CLA and t10,c12 CLA at 25 and 50 μ M. (A) GRP78 mRNA expression in SW480 and HCT116 cells was analysed by quantitative RT-PCR. GRP78 mRNA expression was normalized to β -actin expression. Values represented GRP78 mRNA expression in CLA treated-cells relative to GRP78 expression in vehicle-treated cancer cells and were the mean of two independent experiments performed in triplicate $\pm$ SEM. (B) Protein whole-cell lysates were prepared from SW480 and HCT116 cells treated for 72 hours with vehicle (-), c9,t11 CLA (50 μ M) and t10,c12 CLA (25 and 50 μ M). Analysis of GRP78 protein expression was performed by Western-Blotting. *, non specific. β -actin was used to normalize loading. (C) SW480 and HCT116 were treated at indicated concentrations with c9,t11 and t10,c12 CLA for 72 hours. Xbp1 mRNA processing was analysed by semi-quantitative RT-PCR. The detected Xbp1 mRNA species were spliced- (s-Xbp1), unspliced- (u-Xbp1) and hybrid-Xbp1 (h-Xbp1) mRNA.

Fig. 4. Phosphorylation status of eIF2 α regulates t10,c12 CLA-mediated cell death. (A) SW480 cells were collected 72 hours after treatment by vehicle (-), c9,t11 (50 μ M) and t10,c12 CLA at indicated concentrations for phospho-eIF2 α protein expression analysis. β -actin was used to normalize loading. (B) HCT116 cells were collected 72 hours after treatment by vehicle (-), c9,t11 (12.5 μ M) and t10,c12 CLA (12.5 μ M) for phospho-eIF2 α protein expression analysis. (C) SW480 cells stably transfected with WT-eIF2 α or DN-eIF2 α pcDNA3.1 expression vector were treated for 72 hours with vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 μ M. Total cell death was measured with propidium iodide (PI) staining by flow cytometry. Each value was the mean of three independent experiments performed in triplicate $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (D) SW480 cells stably transfected with WT-eIF2 α or DN-eIF2 α pcDNA3.1 expression vector were treated for 72

hours with vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 μ M. Protein whole-cell lysates were prepared for cleaved PARP analysis by Western-Blot.

Fig. 5. Ablation of GADD153/CHOP expression prevents t10,c12 CLA-induced cell death. (A) SW480 and HCT116 cells were collected 72 h after treatment by vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 and 50 μ M for CHOP protein expression analysis by Western-Blotting analyses with a monoclonal anti-CHOP antibody. (B) SW480 cells were transfected with siRNA against unrelated human mRNA (scr) and CHOP (siRNA CHOP). Next day, SW480 cells were exposed to vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at 25 μ M for 72 hours. Death status was measured by flow cytometry by propidium iodide (PI) staining. Values represented PI positive CLA-treated SW480 cells relative to PI positive vehicle-treated SW480 cells. Each value was the mean of two independent experiments performed in triplicate $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$). (C) SW480 cells were transfected and treated as in (B). Protein whole-cell lysates were prepared and PARP cleavage and CHOP expression was analysed by Western-Blot.

Fig. 6. OA alleviates t10,c12 CLA-induced GADD153/CHOP expression and cell death. SW480 cells were treated for 72 hours with vehicle (-), c9,t11 and t10,c12 CLA at indicated concentrations with or without oleic acid (OA) at 100 μ M. (A) Death status was measured by flow cytometry by propidium iodide (PI) staining. Each value is the mean of two independent experiments $\pm$ SEM. (B) Protein whole-cell lysates were prepared 72 hours after treatments and PARP cleavage expression was analysed by Western-Blot with specific anti-cleaved PARP. (C) SW480 cells were collected for analysis of CHOP mRNA expression by RT-qPCR. CHOP mRNA expression was normalized to β -actin expression. Values represented CHOP mRNA expression in CLA treated-cells relative to CHOP expression in vehicle-treated SW480 cells and were representative of two different experiments performed in triplicate $\pm$ SEM. Bars assigned different superscript letters were statistically different ($p < 0.05$).

Conclusion:

Dans cette première partie du travail, nous avons évalué les effets d'une extinction de SCD1 -enzyme limitante de la voie de biosynthèse des AGMI- sur les capacités de prolifération et sur la survie de cellules cancéreuses.

Nos résultats montrent que l'abolition de la voie de synthèse des AGMI induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses. En effet, nous mettons en évidence la forme clivée de PARP et une induction de l'activité caspase 3 dans les cellules cancéreuses déplétées en SCD1.

Cette mort semble spécifique des cellules cancéreuses puisque l'extinction de SCD1 altère seulement la viabilité des cellules cancéreuses et non celle des cellules normales. Ainsi, nous pouvons supposer que les cellules non cancéreuses ne nécessiteraient pas d'apport élevé et rapide en AGMI - comme les cellules cancéreuses-, et ne seraient donc pas affectées par l'abolition de la voie de synthèse des AGMI. Les cellules normales proliférant moins vite, la synthèse de nouvelles membranes pourrait se faire préférentiellement par le captage d'AG exogènes.

Ainsi, une thérapie anticancéreuse ciblée sur l'inhibition de la voie de biosynthèse des acides gras monoinsaturés pourrait induire des effets uniquement sur les cellules cancéreuses et non sur les cellules normales –limitant ainsi les effets secondaires.

L'abolition de la voie de synthèse des AGMI par l'extinction de SCD conduit à la mort des cellules cancéreuses. Il a par ailleurs été rapporté qu'une altération du métabolisme lipidique pouvait induire du stress du réticulum endoplasmique, une nouvelle voie de mort par apoptose. Au cours de nos recherches, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à cette voie de mort cellulaire.

Nos résultats montrent que l'abolition de la voie de synthèse des AGMI induit bien certains marqueurs de la voie UPR activée au cours du stress du RE. En effet, nous avons mis en évidence l'activation des voies PERK et IRE1 en montrant respectivement la phosphorylation d'eIF2 α et l'épissage du facteur de transcription XBP1. Cependant l'activation de la voie IRE1 α est moins prononcée dans les cellules U2OS que dans les cellules SW480. La délétion de SCD1 dans les cellules cancéreuses conduit à un stress du RE particulier, puisque nous n'observons pas d'augmentation de l'expression de la protéine chaperonne GRP78. Certains travaux en relation avec le métabolisme lipidique, confirment l'absence de régulation de GRP78 au cours d'un stress du RE.

Au cours de cette étude, nous montrons également que la déplétion de SCD1 dans les cellules cancéreuses U2OS, SW480 et HCT116 active l'expression du facteur de transcription CHOP et nous montrons pour la première fois que la déplétion de l'expression de SCD1 induit une mort cellulaire dépendante de CHOP.

Cependant, cette inhibition de l'expression de CHOP ne restaure pas complètement la viabilité cellulaire induite par une déplétion de SCD1. Ce résultat suggère que d'autres voies de régulation sont probablement impliquées dans l'induction de la mort cellulaire par la déplétion de SCD1.

L'ajout d'oléate –principal produit de SCD- ne prévient pas la mort des cellules cancéreuses U2OS, lorsque la voie endogène de production des AGMI est supprimée par les siRNA SCD. Cependant, lors de l'inhibition de cette voie par le t10c12CLA, l'ajout d'oléate pallie la mort des cellules cancéreuses SW480. Cette protection de l'oléate peut passer par l'augmentation de la production de TG qui vont pouvoir incorporer les AGS en excès, protégeant ainsi les cellules de leurs effets cytotoxiques.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que l'extinction de SCD1 induit la voie de stress du RE et la mort par apoptose des cellules cancéreuses via une activation de CHOP. Une modulation de la voie de synthèse des AGMI apparaît comme une cible prometteuse dans la thérapie des cancers coliques et d'ostéosarcomes.

Ces travaux prometteurs nécessiterait cependant d'être approfondie. En effet, nous pourrions rechercher l'implication de la voie intrinsèque de l'apoptose et déterminer les caspases impliquées dans cette mort des cellules cancéreuses observée lors d'une abolition de la voie de biosynthèse des AGMI.

D'autre part, des altérations de la voie de synthèse des AGMI induisent une modification structurale de la membrane plasmique. Certains agents chimiothérapeutiques ne franchissent pas la membrane plasmique induisant des résistances. Ainsi, nous pouvons supposer qu'une inhibition de l'expression de SCD1 modulerait la composition en AG des phospholipides membranaires et induirait une meilleure sensibilisation aux agents chimio-thérapeutiques -tels que TRAIL- dans les cellules cancéreuses devenues insensibles aux traitements thérapeutiques.

Enfin, l'étude de l'implication de SCD1 dans la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses apparaît intéressante. D'une part, nous pourrions rechercher les régulations cellulaires aboutissant à l'augmentation de l'expression de SCD1 au cours du développement tumoraux et d'autre part, nous pourrions surexprimer SCD1 dans des cellules normales et rechercher des marqueurs de transformations cancéreuses.

L'abolition de la voie de biosynthèse des AGMI dans les cellules cancéreuses est une cible thérapeutique prometteuse même si de nombreuses études complémentaires seront nécessaires avant d'envisager des essais cliniques.

Chapitre 2 : Métabolisme des acides gras monoinsaturés et athérosclérose

Introduction :

I. Généralités :

L'athérosclérose a été décrite pour la première fois par le médecin allemand Krell en 1740 : il observe des concrétions calciques au niveau de la paroi artérielle et les nomme "plaques osseuses". Ce n'est qu'en 1904, que le terme athérosclérose apparaît avec le médecin Marchand. Ce terme vient du grecque *athere* signifiant bouilli et *skleros* qui veut dire dur.

Différentes théories se sont succédées pour expliquer l'athérosclérose. En 1852, Karl Von Rokitansky propose la théorie de l'incrustation : la plaque résulterait de dépôts de produits sanguins tels que la fibrine. En 1860, Rudolf Virchow énonce la théorie inflammatoire après une observation microscopique d'une intima modifiée. En 1908, Ignatowski élabore la théorie de l'imbibition en mettant en parallèle la consommation de produits carnés et le développement des plaques d'athérome.

Ce n'est qu'en 1954, que l'OMS définit cette pathologie comme *"une association variable du remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang, et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modification de la média"*.

L'athérosclérose est le principal facteur responsable d'affections aiguës que sont :

- Les infarctus du myocarde dus à l'installation de la pathologie dans les artères coronaires.
- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) dus à la formation de plaques d'athérome dans les artères encéphaliques.
- Les ischémies aiguës des membres inférieurs.

En 2004, les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux sont les deux premières causes de mortalité dans le monde avec respectivement plus de 7 et 5 millions de décès. Ils représentent à eux-seuls plus de 20% des décès (Tableau 4).

Tableau 4: Principales causes de mortalités dans le monde en 2004

Causes	Cause des décès	Nombre de décès dans le monde en 2004 (x10 ³)	% de mortalité
1	Infarctus du myocarde	7198	12.2
2	Accident vasculaire cérébral	5712	9.7
3	Infection de voies respiratoires inférieures	4177	7.1
4	Obstruction chroniques pulmonaires	3025	5.1
5	Diarrhées	2163	3.7
6	VIH/SIDA	2040	3.5
7	Tuberculose	1464	2.5
8	Cancers trachées/bronches/poumons	1323	2.3
9	Accidents de la route	1275	2.2
10	Prématurés et faible poids à la naissance	1179	2

Lorsqu'elle n'est pas fatale, l'athérosclérose est également responsable de nombreuses séquelles fonctionnelles sévères, notamment des paralysies et des insuffisances cardiaques.

Il existe de grandes disparités quant à la prévalence de cette pathologie dans le monde et même au sein d'un pays. L'étude Monica (monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases) a d'ailleurs mis en évidence que la mortalité due à l'athérosclérose était moindre dans le sud de la France par rapport au nord [236]. Ce phénomène a été baptisé "French paradox" [237].

De nombreuses études attribuent cette disparité à l'alimentation étant donné que les principaux autres facteurs de risques sont similaires d'une région à l'autre. Cette alimentation est de type Méditerranéen (riche en fruits, légumes, et huile d'olive –riche en acide oléique) associé à une consommation modérée en vin (riche en polyphénol aux propriétés anti-oxydantes).

A. Facteurs de risques :

1. Généralités :

De nombreux facteurs de risque de l'athérogenèse sont connus. Des études épidémiologiques ont mis en évidence un certain nombre d'entre eux. Cependant, tous les facteurs de risque de cette pathologie complexe qui met en jeu de nombreux mécanismes ne sont pas encore connus. En effet, la liste des facteurs impliqués dans le développement de cette pathologie est en constante évolution, en relation avec notre alimentation et notre environnement.

Les facteurs de risque majeurs, même isolés et plus encore quand ils sont associés, participent au développement de maladies vasculaires. En règle générale, un facteur de risque majeur double la probabilité de maladies vasculaires, deux facteurs la quadruplent et trois la multiplient par neuf.

L'un des facteurs importants est le sexe puisque l'athérosclérose touche quatre hommes pour trois femmes. De plus, cette pathologie est présente dès 40 ans chez l'homme alors que chez la femme, elle ne produit des complications qu'en moyenne à partir de 65 ans. L'hypertension, le diabète, la sédentarité, le tabagisme, le stress, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycémie, la dyslipidémie, l'obésité sont autant de facteurs de risque [238-240].

2. Les acides gras trans : un facteur de risque ?

Depuis quelques années, un nouveau facteur de risque de l'athérosclérose est envisagé. Certaines études épidémiologiques mettent en corrélation la consommation de l'AGT ELA et le risque de MCV. L'équipe de Watts a en effet, montré une relation entre la progression de MCV mesurée par angiographie et la consommation d'acide élaïdique [241]. Plus récemment, une étude a montré qu'au niveau de plaque d'athérome humaine, un fort taux d'ELA était incorporé. Cet AG est également retrouvé en forte teneur dans le tissu adipeux des patients – reflet d'une alimentation riche en AGT ELA [242].

Par ailleurs, des études portant sur le TVA ne montrent pas d'effet délétère de la consommation de cet AG. Des études épidémiologiques suggèrent même un effet bénéfique de la consommation -ou d'un taux plasmatique élevé - de TVA lors de maladies coronariennes [243].

Une étude contradictoire, effectuée chez le Hamster, met en évidence une augmentation du taux plasmatique de cholestérol contenu dans les LDL /HDL lors d'un régime riche en TVA tandis que ELA n'induirait aucune modification de ce paramètre lipidique [244].

L'état actuel des connaissances, ne permet donc pas de statuer précisément sur le rôle du TVA dans le développement de la pathologie athéromateuse.

Ainsi, il est de l'intérêt des industries laitières de soutenir des études comparatives des effets du TVA -d'origine naturelle- et présent dans les produits laitiers et l'ELA -d'origine industrielle- et suspecté comme pro-athérogène sur le risque de MCV afin de distinguer les effets de ces deux molécules.

C'est pourquoi, il est intéressant de comparer du TVA et d'ELA ainsi que celui de leur homologue de configuration *cis* l'acide oléique sur les cellules musculaires lisses vasculaires impliquées dans l'athérogenèse.

B. Athérogenèse :

1. Structure de la paroi artérielle vasculaire saine :

Les parois artérielles possèdent un plan d'organisation assez similaire quelle que soit leur localisation. Elles sont constituées de trois tuniques : l'intima au contact du flux sanguin, la média-tunique intermédiaire- et l'adventice, tunique la plus externe (*Figure 29*) [245].

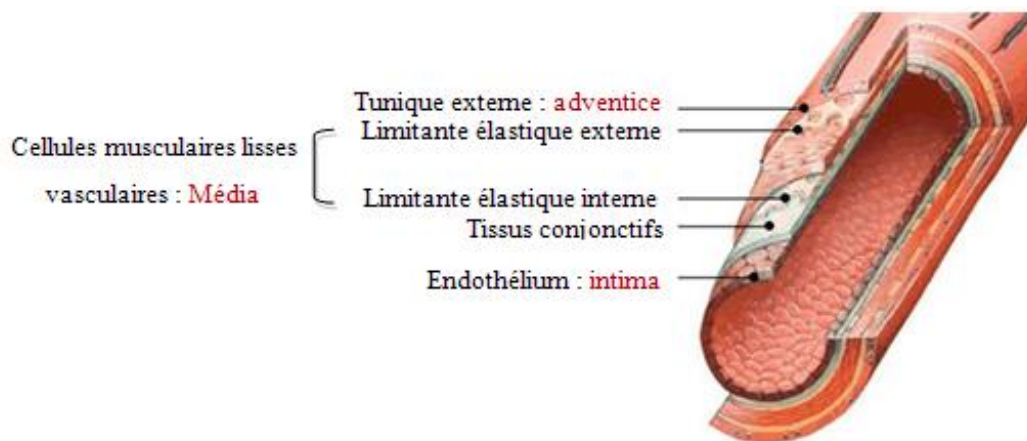


Figure 29: Plan d'organisation de la paroi artérielle

L'intima est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle est directement en contact avec le flux sanguin [246].

Cette tunique est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales formant une protection étanche, de tissu conjonctif fibro-élastique et des fibres élastiques constituant la limitante élastique interne. Tissu conjonctif et fibres élastiques sont absentes des vaisseaux de plus petit calibre comme les artérioles. Une couche de tissu conjonctif sépare les cellules endothéliales de la média [245].

La tunique intermédiaire est appelée média. Elle est plus épaisse et le constituant principal de l'artère. Elle est essentiellement composée de cellules musculaires lisses (CML) vasculaires, empilées en couches concentriques, ce qui délimite des unités lamellaires. Selon le calibre de l'artère, le nombre d'unités lamellaires varie : plus l'artère est grosse plus le nombre d'unités est important. Chaque unité lamellaire est entourée de matrice extracellulaire qui est un ensemble de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de polysaccharides. Une lame d'élastine sépare la média de l'adventice : elle est nommée limitante élastique externe. Celle-ci n'est présente que dans les artères de plus gros diamètre.

L'adventice est la tunique la plus externe. Elle est constituée de tissu conjonctif -riche en collagène, fibres élastiques, fibroblastes et adipocytes-, d'une enveloppe assurant l'ancrage des artères aux structures avoisinantes et d'un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés rejoignant les fibres musculaires lisses de la média. Elle est également irriguée par des *vasa vasorum* qui possèdent un rôle nourricier pour l'adventice et la média.

2. Anatomopathologie de la plaque d'athérosclérose :

L'athérogenèse est un phénomène évolutif et lent. Les événements qui se succèdent au cours de cette pathologie peuvent débuter dès le stade fœtal au niveau de l'intima [247]. En 1994, Stary propose une classification du développement de la plaque d'athérosclérose qu'il divise en huit stades distincts (*Figure 30*) [248, 249].

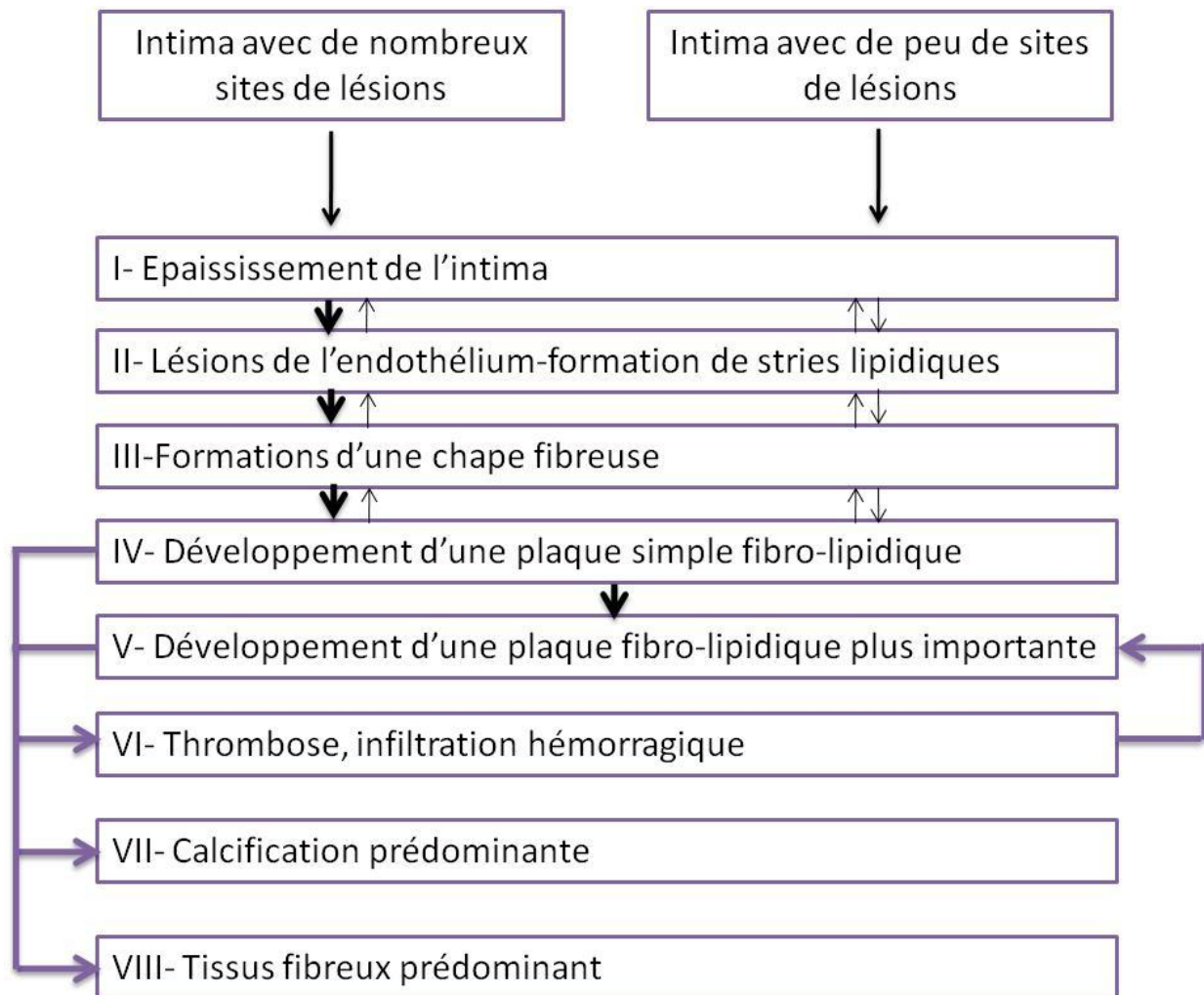


Figure 30: Genèse de la plaque – Classification de Stary 1994

La première étape de la genèse de la plaque d'athérosclérose consiste en un épaissement fibromusculaire de l'intima. Celle-ci se charge alors de cellules spumeuses (stade I). Les macrophages s'infiltrent au niveau sous-endothélial. Une partie de ces macrophages vont accumuler des lipides pour former des cellules spumeuses [245].

Dans un même temps, les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) vont débiter leur prolifération. Tous ces événements qui interviennent au niveau sous endothélial (sans obstruction de la lumière vasculaire), ne débouchent pas systématiquement sur la pathologie athérosclérose.

Ce sont les facteurs de risque présents au niveau du flux sanguin qui vont léser l'endothélium et permettre des dépôts lipidiques formant des stries (stade II). Avec l'âge, la capacité de régénération de l'endothélium s'amenuise et la probabilité de formation de plaques est plus importante. Les stries lipidiques sont essentiellement constituées de cellules spumeuses (macrophages et CML) et diminuent légèrement le diamètre de la lumière artérielle. Ce stade (II) réversible peut être présent dès l'enfance. Chez le jeune adulte cet épaississement devient un pré-athérome (stade III), évoluant en chape fibreuse (*Figure 31*)[246].

Il s'ensuit la formation d'une plaque simple fibro-lipidique (stades IV et V). Les premiers stades de formation de la plaque d'athérome sont asymptomatiques. La plaque simple, non compliquée, est un épaississement artériel blanc ou jaunâtre de taille variable compris entre 3 et 15 mm recouvert d'une couche d'endothélium saine. Sur les stries lipidiques, une chape fibreuse se forme (scléreuse). Le tissu fibreux- constitué de collagène, d'élastine, de mucopolysaccharides, de fibrine et de CML - sépare le centre athéromateux de la média. La formation de ce tissu est exclusivement assurée par les CML. Suite à la dégénérescence des CML spumeuses, les lipides vont s'accumuler au niveau de la plaque d'athérome. Ceux-ci sont constitués à 50% d'esters de cholestérol, à 25% de cholestérol et à 25% de phospholipides. Toutes ces modifications conduisent à l'amincissement de la média et à l'augmentation de l'irrigation due à l'angiogenèse des *vaso vasorum*.

A partir de ce stade, les conséquences de l'évolution de la pathologie sont beaucoup plus graves. Des accidents de rupture avec thrombose et infiltrations hémorragiques peuvent survenir (plaque compliquée stade VI). La plaque évolue dans le sens longitudinal et circonférentiel de l'artère. L'épaississement est lié à la plaque elle-même ou des phénomènes survenant à sa surface : ulcération, hémorragie, thrombose ou calcification (stade VII et VIII).

Il s'ensuit des complications graves : cardiopathies ischémiques (athérome des artères coronaires), accidents vasculaires cérébraux (athérome des artères cérébrales), artérites (artères des membres inférieurs).

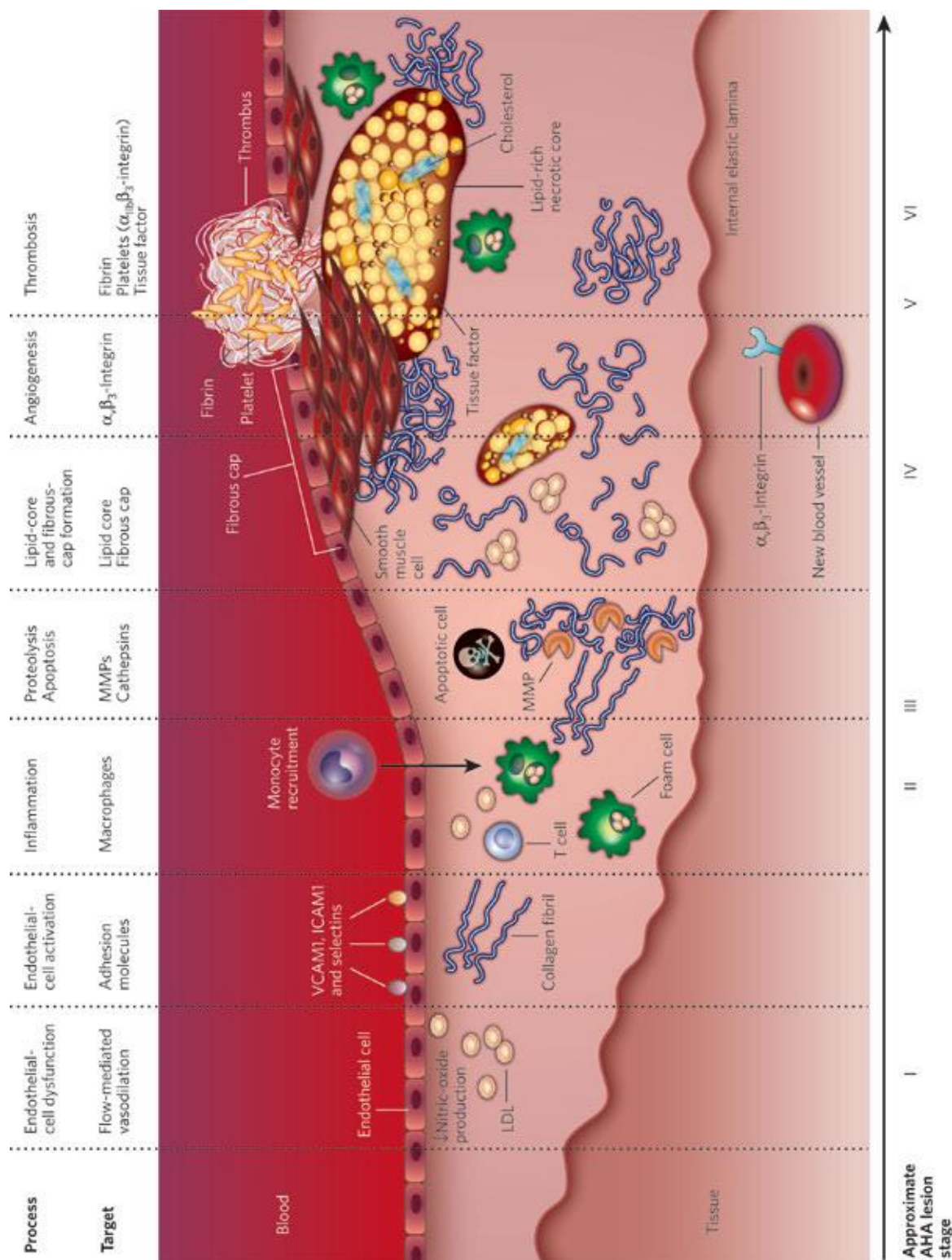


Figure 31: Progression d'une lésion d'athérosclérose [246]

Développement à partir d'un vaisseau sain (à gauche) à un vaisseau avec une plaque d'athérome superposée à une thrombose (à droite). Les cibles moléculaires possibles à chaque stade sont également listées. AHA, American Heart Association; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; LDL, low-density lipoprotein; MMP, matrix metalloproteinase; VCAM1, vascular cell-adhesion molecule 1.

Pour résumer, les facteurs de risque présents au niveau du flux sanguin activent les cellules endothéliales et les monocytes qui quittent alors le système sanguin par diapédèse pour entrer dans l'intima. Les macrophages et les CML deviennent spumeux. Les CML migrent de la média jusqu'à l'intima et prolifèrent. Celles-ci secrètent alors du collagène, des fibres élastiques et des protéoglycanes. Le tissu conjonctif, les lipides, les CML et les cellules spumeuses s'accumulent formant la plaque d'athérome obstruant progressivement le flux artériel. A un stade plus évolué de la pathologie, les cellules présentes au niveau de la plaque vont entrer en apoptose - voie de mort cellulaire programmée - et conduire au détachement de la plaque.

Les différentes étapes décrites ci-dessus n'apparaissent pas toujours dans cet ordre. Plusieurs phénomènes peuvent être concomitants ou dans un ordre inversé.

II. Rôle des CML dans l'athérosclérose :

Les CML jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. En effet, au cours de la pathologie, elles perdent leur phénotype contractile non prolifératif pour acquérir un phénotype migratoire, synthétique prolifératif, spumeux et plus tardivement apoptotique [245].

Au niveau d'un vaisseau sain, les CML différenciées présentent des caractéristiques phénotypiques leur conférant une activité contractile et se maintiennent dans un état différencié non prolifératif. Au cours de l'athérogenèse, les modifications micro-environnementales induisent à proximité de ces cellules un apport de facteurs inflammatoires et mitogéniques modifiant ce phénotype différencié [245].

L'induction de la prolifération des CML implique plusieurs facteurs de croissance, parmi lesquels le PDGF-BB, IGF-1, bFGF, EGF, l'angiotensine II, l'acide oléique ou encore les LDL modifiées dont les LDLoxydées (LDL-ox) [245, 250].

Par exemple, selon la concentration et le degré d'oxydation, les LDL-ox stimulent la prolifération ou l'apoptose des CML [251-254]. Les LDL-ox stimulent la prolifération des CML via un mécanisme oxydatif qui cause la libération de FGF-2, de l'angiotensine II et stimule l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K [255-258].

L'acide oléique, induit la prolifération et la migration des CML via l'induction de la protéine kinase C (PKC), les espèces réactives à l'oxygène (ROS) et la voie de signalisation ERK [259-264].

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'un taux élevé de LDL – transport lipidique du foie aux organes périphériques- et qu'un taux réduit d'HDL – responsable du transport inverse du cholestérol des organes cibles vers le foie où il sera dégradé- sont des facteurs de risque de l'athérosclérose [265]. Les HDL sont riches en apoprotéine ApoD. Une étude a montré que l'ApoD des HDL pouvait inhiber la prolifération des CML médié par PDGF-BB via une inhibition de la voie ERK [266]. Les HDL aurait donc un effet anti-athéromateux aux niveaux des CML via l'ApoD.

L'adiponectine – une adipocytokine synthétisée dans le tissu adipeux et impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique- inhibe également la migration des CML via une inhibition de la voie ERK indépendamment de la voie PI3K [267].

Au cours de l'athérosclérose, les besoins en lipides des CML sont accrus, d'une part à cause de leurs entrées en prolifération et d'autre part via l'acquisition de leurs phénotypes spumeux. Ces besoins conduisent à une modification du métabolisme lipidique qui peut s'expliquer en partie par une augmentation du captage lipides exogènes via les lipoprotéines [268-270].

Cependant, au niveau de la plaque d'athérome, les CML –contrairement aux macrophages- n'expriment pas un fort taux de récepteurs scavenger des LDL oxydées. Les CML sont donc résistantes à l'accumulation lipidique lorsqu'elles sont exposées à des LDL normales et oxydées *in vitro* [271-275]. L'absence de récepteur scavenger sur les CML suggère qu'un autre procédé d'accumulation lipidique interviendrait. *In vitro*, les CML sont capables de capter des agrégats de LDL et de VLDL par les récepteurs de LDL et VLDL ainsi que les AG non estérifiés du sérum [276-279].

Un mécanisme alternatif au captage exogène des lipides serait la synthèse *de novo* lipidique. Les CML seraient ainsi capables de produire *de novo* lipidiques au cours de l'athérosclérose, conduisant au phénotype spumeux. Afin d'étayer cette théorie, des CML ont été mise à incuber avec de l'acétate radiomarqué –précurseur de la voie de biosynthèse des AG radiomarqués. Les résultats montrent une incorporation de l'acétate radiomarqué dans les PL, les TG et les CE [280, 281] –le type de lipides produit dépendant du phénotype de CML et des effets des oxysterols [282, 283]. Les PL, TG et CE

ainsi synthétisés sont riches en acide oléique [191, 284]. La synthèse excessive *de novo* lipidique conduit à une accumulation lipidique et à la formation de cellules spumeuses. De part ce fait, l'acquisition du phénotype spumeux des CML est probablement due à un captage des lipoprotéines et une accumulation lipidique *de novo*. Ainsi, l'activation des CML au cours de l'athérogenèse met en évidence une altération du métabolisme lipidique avec notamment une augmentation de la synthèse *de novo* d'AG dont l'acide oléique produit par l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase [285].

Publication:

Régulation de la stéaroyl-CoA désaturase par les acides gras *cis* et *trans* en C18:1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires :

Comme nous l'avons vu précédemment, l'athérosclérose est l'aboutissement de nombreuses altérations métaboliques et cellulaires, qui touchent notamment les CML dans lesquelles il a été observé des altérations du métabolisme lipidique et en particulier des altérations de la teneur en AGMI.

Diverses études épidémiologiques ont mis en relation la consommation d'acide élaïdique de configuration *trans* - d'origine industrielle - et le risque athérogène. Par ailleurs, concernant l'acide *trans* vaccénique, l'isomère naturel de l'ELA, les études épidémiologiques ne démontrent aucun effet délétère.

L'objectif de cette étude est d'évaluer et comparer l'impact des AG en C18:1 de configurations *cis* et *trans* sur le devenir des CML, en lien avec leurs caractéristiques développées au cours de l'athérosclérose : la prolifération, la mort cellulaire et la spumosité.

Ainsi, nous avons donc cherché à déterminer si les acides oléique, *trans* vaccénique et élaïdique induisaient de la prolifération, et de la mort cellulaire.

Il a été montré qu'au cours de l'athérosclérose, les CML deviennent spumeuses du fait de l'augmentation du captage en AG et du fait d'une augmentation des enzymes de la lipogenèse. Nous nous sommes donc orientés vers l'étude de l'impact des AG en C18:1 de configuration *cis* et *trans* sur le métabolisme lipidique dans les CML et plus particulièrement des modifications de la composition en AG des lipides totaux et des enzymes de la lipogenèse. Nous avons plus particulièrement centré notre étude sur la régulation de SCD par ces différents AG.

Article 3:

Article prochainement soumis dans atherosclerosis

Title

Stearoyl-CoA desaturase regulation by C18:1 fatty acids in human aortic smooth muscle cells.

Authors and Affiliations

Mélaine Minville¹, Joseph Gresti¹, Laurent Pichon¹, Sandrine Bellenger¹, Jérôme Bellenger¹, Michel Narce¹ and Mickaël Rialland^{1#}.

1 Université de Bourgogne, Centre de Recherche INSERM « Lipides, Nutrition, Cancer » UMR866, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

corresponding author: mickael.rialland@u-bourgogne.fr

Abstract

Accumulation of lipids in vascular smooth muscle cells (VSMC) is a feature of atherosclerosis and increase of lipogenesis is observed. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) is a lipogenic enzyme that catalyzes the production of monounsaturated fatty acids (e.g. oleic acid) and its expression is associated with atherosclerosis development. We were interested in analysing regulation of SCD activity and SCD1 expression in human aortic smooth muscle cells (HASMC) exposed to monounsaturated C18:1 fatty acid isomers. HASMC in control condition presented a 50% desaturation rate of stearic acid into cis-9 oleic acid. Treatment of HASMC with oleic acid for 48h drastically decreased delta-9 desaturation rate while trans-11 vaccenic acid slightly decreased delta-9 desaturation rate compared with control treatment. By contrast, desaturation rate reached 80% in trans-9 elaidic acid-treated HASMC. We showed that regulation of desaturation activity was correlated with SCD1 expression and that monounsaturated fatty acids controlled SCD1 expression at transcriptional level.

Keywords

Stearoyl-CoA desaturase, trans fatty acids, vascular smooth muscle cells

Introduction:

Stearoyl-CoA desaturase (SCD) is an endoplasmic reticulum (ER) resident protein and a key enzyme of mono-unsaturated fatty acid (MUFA) biosynthesis. This enzyme requires the presence of NADH-reductase, cytochrome b5 and oxygen to catalyze the introduction of a cis double bond at delta 9 position of palmitoyl- or stearoyl-CoA to form palmitoleyl- or oleyl-CoA, respectively [1].

Different SCD isoforms are described according to the species. Four SCD isoforms were found in mouse (SCD1-4) and two isoforms in rat (SCD1-2) [2]. So far, two isoforms of SCD (SCD1 and SCD5) are identified in human which differ in tissue distribution. Indeed, human SCD1 is almost ubiquitously expressed with highest expression in liver and adipose tissue while SCD5 is mainly found in brain and pancreas [3,4].

SCD1 expression and activity are regulated by hormonal and nutrients stimuli. Thus, a polyunsaturated fatty acids (PUFA) enriched-diet represses SCD1 expression in mice liver whereas saturated fatty acids (SFA) enriched-diet increases SCD1 liver expression [5,6]. The stimulation of SCD1 expression by saturated fatty acids-diet appears to be mainly regulated at transcriptional level by activation of PGC-1 β and sterol responsive element binding protein (SREBP) pathway [7]. However, the modulation of SCD1 expression could also take place at post transcriptional level. Sessler et al. described in mouse adipocytes that PUFA reduce SCD1 mRNA stability repressing its activity about 60% [8]. Moreover, regulation of SCD1 mRNA expression by fatty acid (FA) depends on the cell type. For instance, palmitic acid increases SCD1 mRNA in human vascular smooth muscle cells (VSMC) and HepG2 without affecting SCD1 mRNA in human endothelial cells [9].

Regulation of SCD1 also appears at post-translational level. Thus, a fat-restricted regimen induces a more than 50-fold increase of SCD1 protein expression that decreases with refeeding to undetectable levels due to a rapid degradation of SCD1 protein [10]. SCD1 is a naturally short-lived protein and is degraded in a proteasome-dependent and -independent manner [11,12,13]. The SCD1 degradation by the proteasome-independent pathway involves an ER plasminogen-like protease (PLG) [14]. However, Kato et al. described that SCD1 degradation could be reduced by proteasome inhibitors and that polyubiquitylated SCD1 accumulated in the ER [13]. They suggested the involvement of ERAD (ER-associated degradation) system to control the SCD1

degradation as SCD1 interacted with AAA-ATPase p97, which is essential for proteasome-dependent ERAD.

Regulation of SCD1 expression and activity is of great interest since this enzyme is associated with the development of various diseases including atherosclerosis [15]. According to the mice model used, SCD1 inhibition had either pro- or anti-atherogenic effect. Indeed, SCD1 abolition in LDLr^{-/-} and LDLr^{-/-} Apob100/100 mice induced an increase of atherosclerotic lesions whereas in mice fed a high cholesterol diet subjected to chronic intermittent hypoxia presented a reduction of these lesions [16,17,18]. Addition of oleic acid (OA), a product of SCD activity, to the atherogenic diet did not prevent atherogenesis in SCD1 ^{+/+} and SCD1 ^{-/-} LDLr ^{-/-} mice [16]. By contrast another C18:1 fatty acid (trans-11 vaccenic acid, TVA) has anti-atherogenic effect in LDLr^{-/-} mice [19]. VSMC in arterial wall play a crucial role in the pathogenesis of atherosclerosis [20]. Thus, in addition to abnormal migration and proliferation to intima, VSMC accumulate lipids and participate to the development of atheroma plaque. Accumulation of lipids in VSMC is associated to a change in lipid metabolism and an increase of SCD1 expression [21].

In this report, we were interested in comparing the effects of C18:1 fatty acid isomers on SCD1 regulation in human aortic smooth muscle cell (HASMC). We showed that OA, and TVA in a more modest manner, repressed SCD1 activity and expression while trans elaidic acid (trans-9, C18:1, ELA) increased SCD1 activity in HASMC. We demonstrated that SCD1 regulation by C18:1 FA involved transcriptional level. Moreover, we found that HASMC has the capability to produce cis-9, trans-11, 18:2 from TVA probably through SCD1 activity.

Material and methods

Material

Human aortic smooth muscle cells (HASMC) were obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). DMEM without phenol red, delipidated foetal bovine serum, penicillin, streptomycin and L-glutamine were purchased from Dutscher (France) were from Dutscher (France) and medium 231 supplemented with smooth muscle growth supplement (SMGS) from Invitrogen. Anti-SCD1 was purchased from Santa-Cruz biotechnologies, anti-HA and anti- β -actin from Sigma. Oleic, stearic, *trans* vaccenic and *trans* elaidic acids were obtained from Sigma and [14 C] stearic acid from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). CyQuant® NF cell proliferation assay was obtained from Invitrogen.

Cell culture

HASMC were maintained in medium 231 supplemented with SMGS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), and L glutamine (2 mM). For experiments, cells were maintained 24h in DMEM without phenol red supplemented with 1% of delipidated FBS, 0,5% of bovine serum albumin (BSA) fatty acid free (Sigma), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), and L glutamine (2 mM). Subsequently, medium was supplemented for 48h with stearic, oleic, *trans*-vaccenic or elaidic acids bound to BSA (ratio 4:1) at a final concentration of 100 μ M.

Cell proliferation

Cell proliferation analysis was carried out using CyQuant® NF cell proliferation assay (Invitrogen). Adherent cells were washed and frozen at -80°C . Cells were thawed and treated with CyQuant GR dye, which binds stoichiometrically to nucleic acids and, thus, measures cell number. Fluorescence quantification was measured using a microtiter plate fluorimeter (VICTOR3V™, PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA) with excitation at 485 nm and detection at 535 nm.

Determination of desaturation rate

Conversion of [^{14}C] stearic acid into [^{14}C] oleic acid was used to measure SCD activity after 48h in presence of fatty acid. Cells were incubated with 3 μM (0,25 μCi /dish of [^{14}C] stearic acid) for 6 h at 37°C in 5 % CO_2 incubator. Cells were collected and total lipids were extracted according to Bligh and Dyer method. Lipids were saponified and esterified. Radiolabelled fatty acid methyl esters were separated by RP-HPLC and detected on line by a radioisotope detector (Packard Flow Scintillation Analyser, PerkinElmer Life Sciences Inc., Wellesley, MA) as already described by Merlin et al [22]. The [^{14}C] oleic acid / ([^{14}C] oleic and stearic acids) ratio was determined as desaturation rate by SCD activity.

Western Blotting

Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in ice-cold Ripa buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma) for 15 min on ice. We cleared protein lysate by centrifugation at 10 000g for 10 min at 4°C. Thirty micrograms of total proteins were loaded for SDS-PAGE electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane. Immunoblotting was performed with antibodies raised against anti SCD1 (1/500), against HA (1/500) and anti- β -actin (1/4000). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used at 1/10 000.

For SCD1 protein half-life study, HASMC were co-incubated with 100 μM fatty acid and 50 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide (Sigma) for indicated time. SCD1 protein expression was analyzed by Western-blotting and quantified using NIH ImageJ Software analysis (NIH). The levels of SCD1 were normalized against the corresponding actin level.

RNA purification and RT-PCR

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

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

SCD1: sense 5'-TTC AGA AAC ACA TGC TGA TCC TCA TAA TTC CC-3' and antisense 5'-ATT AAG CAC CAC AGC ATA TCG CAA GAA AGT CTG-3' ; SCD5: sense 5'-GTG GGA TGG CTG TTC CAA-3' and antisense 5'-GGC AAC CAA GCC GAT GAT 3' and β -actin: sense 5'-CTG GTG CCT GGG GCG-3' antisense 5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA-3'. The relative

amount of target genes was determined using $\Delta\Delta Ct$ method. The normalized delta cycle threshold (ΔCt) was calculated by subtracting the gene cycle threshold value from the β -actin cycle threshold value ($\Delta Ct = Ct_{\beta\text{-actin}} - Ct_{\text{gene}}$). Comparative gene expression between two independent samples, or $\Delta\Delta Ct$, was obtained by subtracting the control delta cycle threshold from the sample delta cycle threshold ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$). Fold change expression was defined with $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

SCD1 promoter activity assay

HASMC were transiently co-transfected with -500 bp human SCD1 promoter-PGL3 (generous gift from J. Ntambi) and β -galactosidase expression vector for normalization using Amaxa® human AoSMC Nucleofector® (Lonza) according to the manufacturer recommendations. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with fatty acids as described above. Cells were collected and lysed with. SCD1 promoter activity was defined as the ratio of luciferase and β -galactosidase activity

Lipid extraction and analysis

Cells were treated as previously described for 48h at 100 μ M of fatty acid. Cells were collected and lipid extraction was performed by Folch method [23]. Saponification and methylation were performed by Slover et Lanza method [24]. Methyl esters were solubilised in hexane and analysed by gas chromatography (GC)(Perkin Elmer). The GC was performed by on column injection of VARIAN VF23ms column (0.25mm inner diameter, x30m) using hydrogen gas and a FID detector.

Statistical analysis

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

Results:

C18:1 fatty acid isomers modulate C18:0 desaturation rate in HASMC.

For experiments, we maintained human aortic smooth muscle cells (HASMC) in quiescent state in serum-free medium for 24h before fatty acid treatment. Quiescent cells were then incubated for indicated time with 100 μ M oleic acid (OA), trans vaccenic acid (TVA) or trans elaidic acid (ELA) bound to BSA or BSA alone (0.5%) as control to evaluate the regulation of SCD1 by C18:1 fatty acid isomers. We first showed that treatment with the different FA did not modify cell growth of HASMC (Fig. 1A).

We also analysed total lipid composition in HASMC incubated for 48h with C18:1 FA isomers. We observed that exogenous C18:1 FA accumulated in HASMC in similar levels and reduced the endogenous FA contents compared to BSA treatment (Table 1). However, we found that TVA treatment induced the production of c9,t11-18:2 probably through desaturation of exogenous TVA by SCD activity.

In order to measure C18:1-treated HASMC ability to desaturate FA, we incubated HASMC with 100 μ M of C18:1 fatty acid (OA, TVA or ELA) for 48 h and analysed exogenous [14 C] stearic acid conversion into [14 C] oleic acid. HASMC in control condition presented a basal desaturation rate of approximately 50 % (Fig. 1B). TVA and OA decreased the C18:0 desaturation capability of HASMC. However, TVA treatment modestly down-regulated the desaturation rate whereas OA treatment drastically reduced it to less than 10 %. By contrast, ELA increased the C18:0 desaturation rate up to 80 % (Fig. 1B).

C18:1 fatty acid isomers differently regulate SCD1 protein expression in HASMC.

SCD1 catalyses the production of FA with unsaturation in delta 9 position such as OA from stearic acid (SA). Thus, we were interested in analysing SCD1 expression in HASMC treated by cis and trans C18:1 FA isomers. We found that SCD1 protein content is decreased by OA in a dose-dependent manner whereas SA increased SCD1 protein content compared to the control cells (Fig. 2A). Moreover we observed that HASMC in presence of ELA for 48 h presented an increase of SCD1 protein amount and a slight decrease in presence of TVA compared to control HASMC (Fig. 2B).

We were then interested in the possible regulation of SCD1 protein turn-over in HASMC treated by C18:1 fatty acids. In agreement with a previous report, we showed that inhibition of proteasome machinery by MG132 treatment for 24h led to SCD1 protein

accumulation in HASMC suggesting a possible post-translational regulation by fatty acid (Fig. 2C). We first analysed ectopic SCD1-HA expression in HASMC incubated with 100 μ M of OA for 48h. In this condition, SCD1 content was independent of transcriptional regulation since SCD1-HA transcription is under the control of CMV promoter. We observed that SCD1-HA expression level remained unchanged in OA condition while endogenous SCD1 level was decreased by OA treatment demonstrating that SCD1 degradation machinery was functional (Fig. 2D). In order to comfort the hypothesis that OA treatment did not change the turn-over of SCD1 protein, we treated cells with 50 μ g/ml of cycloheximide to block translation and harvested HASMC at various times for analysis of SCD1 protein expression. We confirmed that SCD1 protein half-life was approximately 3h30 but we did not observe any significant differences in half-life of SCD1 protein in HASMC treated by OA compared to BSA control cells (Fig. 2E and 2F). Altogether these data suggested a regulation of SCD1 content at mRNA level.

C18:1 fatty acid isomers regulate SCD1 at transcriptional level in HASMC.

In human, SCD activity can be supported by two isoforms (SCD1 and SCD5) which differ by their tissue distribution. We evaluated SCD1 and SCD5 mRNA expression in HASMC and found that SCD5 mRNA was barely expressed compared to SCD1 mRNA (Fig. 3A and 3B). This data suggests that SCD activity was essentially due to SCD1 in HASMC. We then analysed SCD1 mRNA expression by qPCR in HASMC treated for 48 h with 100 μ M of C18:1 FA id isomers. We found that OA treatment drastically reduced SCD1 mRNA expression compared to control and trans C18:1 FA treatments. TVA also decreased SCD1 mRNA expression compared to the control whereas ELA treatment increased SCD1 expression (Fig. 3C). To determine whether the regulation of SCD1 mRNA content was at transcriptional level, we analysed the activity of human SCD1 promoter-luciferase vector transfected in HASMC which were treated with C18:1 FA. We demonstrated that of OA repressed SCD1 promoter activity about approximately 40 % and TVA 20 % (Fig. 3D). We also showed that ELA treatment led to increase of SCD1 promoter activity compared to control HASMC

These observations showed that regulation of SCD1 mRNA content by C18:1 FA was at least through a transcriptional control.

Figure 1

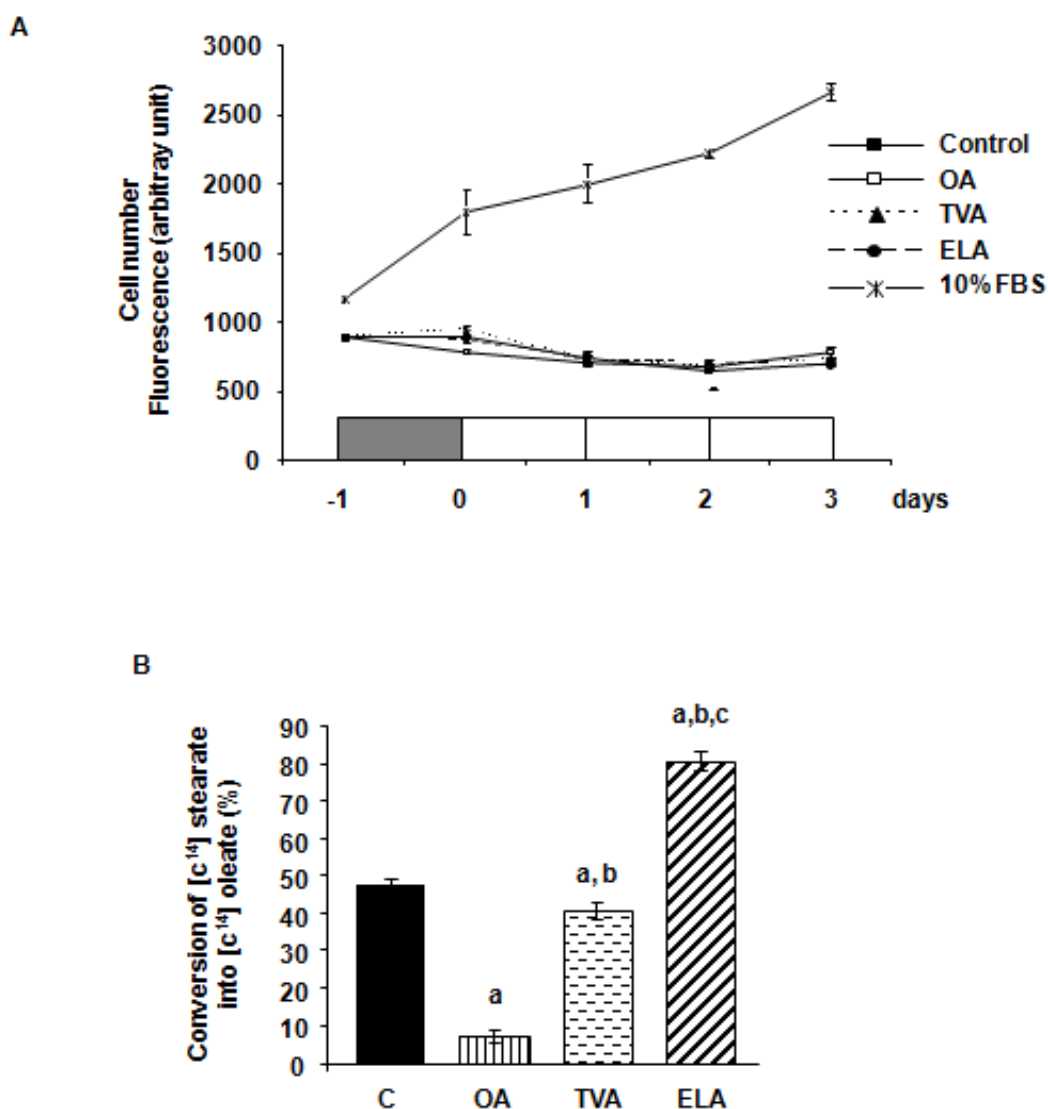


Figure 1 : C18:1 fatty acid isomers modulate C18:0 desaturation rate in HASMC. (A) HASMC were pre-treated 24h in DMEM with 0,5% BSA. At day 0, cells were treated with oleic acid (OA), trans vaccenic acid (TVA) and elaidic acid (ELA) at 100 μ M. Proliferation control cells were maintained in DMEM with 10%FBS. Cell number was determined by Cyquant $\text{\textcircled{R}}$ kit. Values represent the mean $\pm$ SEM (n=3). (B) Determination of desaturation activity in HASMC exposed to 100 μ M of fatty acid compared to control HASMC. FA-treated cells were then incubated with [14 C] stearic acid for 6h and total lipid extraction was performed for radiolabelled fatty acid separation by RP-HPLC. Values represent the mean $\pm$ SEM (n=3). The graph is representative of three independent experiments. a, significantly different from control treatment ($p < 0.05$); b, significantly different from OA treatment ($p < 0.05$); c, significantly different from TVA treatment ($p < 0.05$).

Table 1

FA ($\mu\text{g/g protein}$)	control	OA	TVA	ELA
14:0	2,12 $\pm$ 0,26	0,46 $\pm$ 0,46 ^a	0,92 $\pm$ 0,02 ^a	0,61 $\pm$ 0,03 ^a
16:0	8,95 $\pm$ 1,02	4,80 $\pm$ 1,19 ^a	3,67 $\pm$ 0,25 ^a	2,58 $\pm$ 0,33 ^a
c9-16:1	3,69 $\pm$ 0,35	1,12 $\pm$ 0,41 ^{a,b}	3,51 $\pm$ 0,36	1,23 $\pm$ 0,07 ^{a,b}
18:0	3,66 $\pm$ 0,78	2,47 $\pm$ 0,19	1,86 $\pm$ 0,08 ^a	1,28 $\pm$ 0,13 ^a
t9-18:1 (ELA)	ND	ND	ND	19,22 $\pm$ 1,58
t11-18:1 (TVA)	ND	ND	16,17 $\pm$ 0,97	ND
c9-18:1 (OA)	10,03 $\pm$ 1,25 ^c	39,20 $\pm$ 2,49	4,71 $\pm$ 0,45 ^c	5,60 $\pm$ 0,71 ^c
c11-18:1	4,00 $\pm$ 0,70	2,34 $\pm$ 0,26	1,21 $\pm$ 0,13	1,29 $\pm$ 0,08
c9,t11-18:2	ND	ND	5,06 $\pm$ 0,44	ND
ratio 16:0/c9-16:1	2,42 $\pm$ 0,05	4,47 $\pm$ 0,55	1,08 $\pm$ 0,17	2,08 $\pm$ 0,17
ratio 18:0/c9-18:1	0.36 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,17

Table 1: Total fatty acid composition. HASMC were treated with 100 μM fatty acid for 48h and total fatty acid composition was analysed by gas chromatography. Values are the mean $\pm$ SEM (n=3). a, significantly different from control treatment ($p < 0.05$); b, significantly different from TVA treatment ($p < 0.05$); c, significantly different from OA treatment ($p < 0.05$).

Figure 2

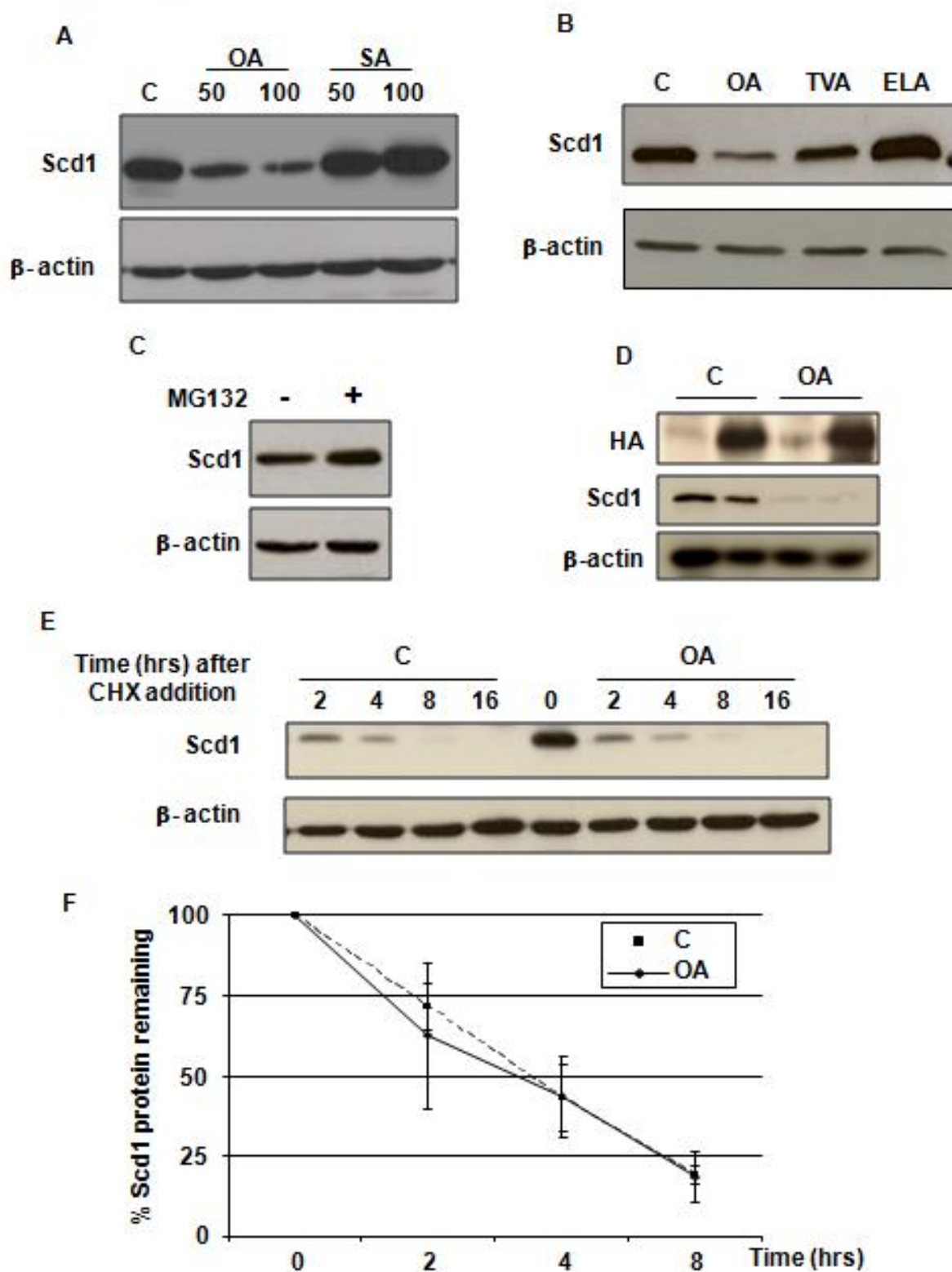


Figure 2 : C18:1 fatty acid isomers differently regulate SCD1 protein expression in HASMC. SCD1 protein expression was analysed by western-blot. (A) HASMC were treated for 48h at 50 μ M or 100 μ M with oleic acid (OA) or stearic acid (SA). (B) HASMC were treated for 48h with 0.5% BSA (C), 100 μ M oleic acid (OA), trans vaccenic acid (TVA) and trans elaidic acid (ELA). (C) HASMC were exposed for 24h to 5 μ M MG132, a proteasome inhibitor, or vehicle. (D) HASMC were transfected with SCD1-HA expression vector or empty vector and treated for 48h with 100 μ M OA or 0.5% BSA (C). Ectopic expression of SCD1-HA was evaluated by immuno-blotting with anti-HA and endogenous SCD1 by anti-SCD1. (E) HASMC were co-treated with 100 μ M OA or control BSA (C) and cycloheximide (CHX) at 50 μ g/ml. Cells were collected 0,2, 4, 8 and 16 hours after treatment. (F) Scatter plot from normalized densitometry values from SCD1 and β -actin immunoblots from CHX-treated HASMC. Values represent the mean $\pm$ SEM (n=4).

Figure 3

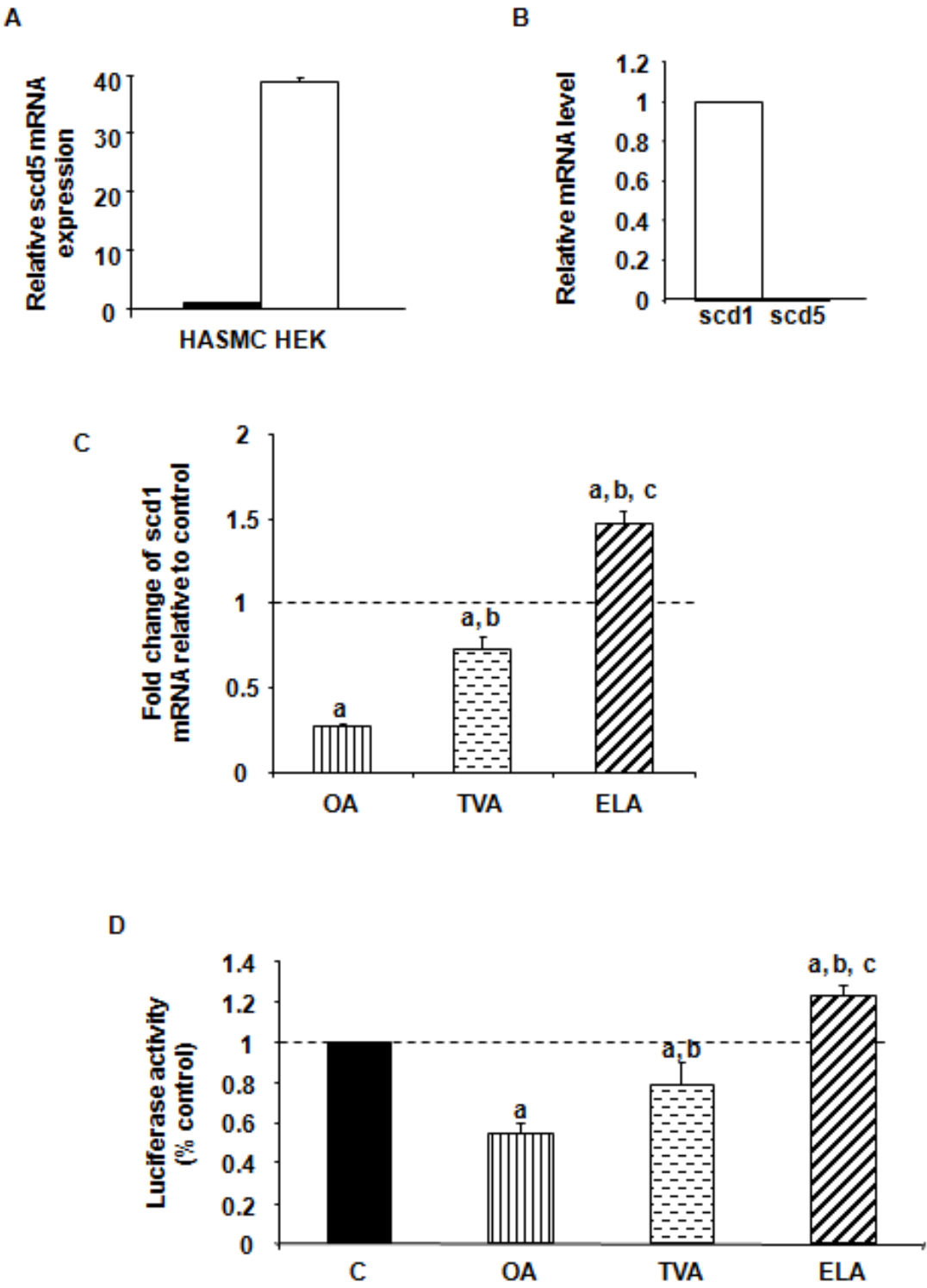


Figure 3 : SCD1 regulation at transcriptional level by C18:1 in HASMC. (A) Validation of SCD5 qRT-PCR primers. Comparative SCD5 mRNA expression in HASMC and human embryonic kidney cells (HEK) used as positive control. (B) Comparative SCD5 and SCD1 mRNA expression in HASMC by qRT-PCR. (C) SCD1 mRNA expression in HASMC treated for 48h at 100 μ M oleic acid (OA), trans vaccenic acid (TVA) and trans elaidic acid (ELA) compared to 0.5% BSA (C). (D) Quantification of human SCD1 promoter luciferase activity normalized with β -galactosidase expression vector activity in HASMC treated with OA, TVA and ELA at 100 μ M for 48h. Values represents the mean $\pm$ SEM (n=3). a, significantly different from control (C) treatment ($p<0.05$); b, significantly different from OA treatment ($p<0.05$); c, significantly different from TVA treatment ($p<0.05$).

Discussion:

In this report, we showed that C18:1 FA isomers differently regulated SCD1 expression in HASMC. Thus, OA repressed SCD activity and SCD1 mRNA expression whereas trans ELA increased SCD activity correlated with SCD1 expression level. The SCD1 regulation was not related to the isomer configuration because trans vaccenic acid (TVA) did not present the same regulation as ELA. A common observation in this study was the decrease of endogenous FA content. Indeed, excepted the increase of the C18:1 content due to its exogenous addition, endogenous FA amount was reduced by FA treatment probably under activation of β -oxidation. It was already reported that addition of OA, TVA or ELA for 3 days in the β -cell line INS-1 induced increase of fatty acid oxidation associated with up-regulation of carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) mRNA [25,26]. We also found production of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (c9, t11 CLA) in cells exposed to TVA. TVA-enriched diet and TVA-treated cells lead to cellular accumulation of c9, t11 CLA. Increase content of c9, t11 CLA from TVA exposure was due to the delta-9 desaturase activity since sterculic acid treatment (a SCD inhibitor) reduced TVA transformation in c9, t11 CLA whereas SCD1 overexpression increased c9, t11 CLA production [27,28].

SCD1 expression may be regulated at different cellular levels from transcriptional to post-translational level. SCD1 protein is a short-lived protein under the control of dependend- and independent-proteasomal degradation [13,29]. Here we showed accumulation of endogenous SCD1 protein in HASMC in presence of the proteasomal

inhibitor MG132 but OA addition did not modify the turn-over of SCD1 protein confirming previous observations obtained for rat and mouse SCD1 protein [13].

In our model, SCD1 activity and protein content was associated with SCD1 gene transcription regulation by C18:1 FA isomers. Indeed, we showed that human SCD1 promoter activity was modulated by FA treatment and correlated with SCD1 mRNA expression indicating that SCD1 mRNA content in HASMC was primarily regulated at transcriptional level by C18:1 FA. The down-regulation of SCD1 mRNA content by OA was also described for rat hepatocytes [30]. However, this end-product regulation of SCD1 was not observed in mouse adipocytes (3T3-L1) and human hepatocarcinoma cells (HepG2) highlighting a SCD1 regulation way by OA that is dependent of the cell type [8,31]. Moreover, SCD1 mRNA expression decreased with increase of FA unsaturation in rat hepatocytes [30]. They showed that linolenic acid (18:3) is a more potent suppressor of SCD1 mRNA expression than linoleic (18:2) and oleic (18:1) acids, and that FA with identical unsaturation number had similar repression of SCD1 mRNA expression. In our study, OA and trans FA are C18:1 FA but differently modulate SCD1 mRNA expression that did not confirm relationship between unsaturation degree and SCD1 expression down-regulation. We demonstrated that human SCD1 promoter activity was repressed by OA and more modestly by TVA while ELA up-regulated its activity. The SCD1 promoter construct used for this study contains regulatory elements for transcription factors such as the sterol regulatory element binding protein (SREBP), CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP) and nuclear factor-1 (NF-1) [31]. We did not observe any modifications of SREBP-1 maturation in HASMC (data not shown) excluding implication of this pathway in SCD1 transcription regulation by C18:1 FA in these cells. Activation of LXR pathway induces accumulation of OA-enriched triacylglycerol in VSMC that is a feature of atherosclerotic lesion and that is correlated with increase of SCD1 mRNA expression [21]. Thus, induction of SCD1 mRNA expression under ELA treatment could be supported by LXR pathway. Recently, down-regulation of SCD1 transcription by leptin was associated with Erk1/2 activation in HepG2 [32]. It was reported that OA could also activate Erk1/2 pathway but in VSMC [33]. This observation could account for SCD1 transcription repression by OA.

In summary, we have demonstrated that C18:1 FA according to their geometric configuration differently regulated SCD1 expression at transcriptional level.

Acknowledgements

We are grateful to James Ntambi for providing human SCD1 promoter construct. This work was supported by grants from INSERM, Région Bourgogne and the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière.

References :

1. Shimakata T, Mihara K, Sato R (1972) Reconstitution of hepatic microsomal stearyl-coenzyme A desaturase system from solubilized components. *J Biochem* 72: 1163-1174.
2. Miyazaki M, Ntambi JM (2003) Role of stearyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68: 113-121.
3. Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM (1999) Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J* 340 (Pt 1): 255-264.
4. Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, et al. (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 735-742.
5. Bellenger J, Bellenger S, Clement L, Mandard S, Diot C, et al. (2004) A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J* 18: 773-775.
6. Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM (2007) Stearyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem* 282: 2483-2493.
7. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, et al. (2005) Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell* 120: 261-273.
8. Sessler AM, Kaur N, Palta JP, Ntambi JM (1996) Regulation of stearyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 271: 29854-29858.
9. Peter A, Weigert C, Staiger H, Rittig K, Cegan A, et al. (2008) Induction of stearyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E339-349.

10. Oshino N (1972) The dynamic behavior during dietary induction of the terminal enzyme (cyanide-sensitive factor) of the stearyl CoA desaturation system of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 149: 378-387.
11. Ozols J (1997) Degradation of hepatic stearyl CoA delta 9-desaturase. *Mol Biol Cell* 8: 2281-2290.
12. Heinemann FS, Ozols J (1998) Degradation of stearyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol Biol Cell* 9: 3445-3453.
13. Kato H, Sakaki K, Mihara K (2006) Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearyl-CoA desaturase. *J Cell Sci* 119: 2342-2353.
14. Heinemann FS, Korza G, Ozols J (2003) A plasminogen-like protein selectively degrades stearyl-CoA desaturase in liver microsomes. *J Biol Chem* 278: 42966-42975.
15. Ntambi JM, Miyazaki M (2004) Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 43: 91-104.
16. Brown JM, Chung S, Sawyer JK, Degirolamo C, Alger HM, et al. (2008) Inhibition of stearyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation* 118: 1467-1475.
17. MacDonald ML, van Eck M, Hildebrand RB, Wong BW, Bissada N, et al. (2009) Despite antiatherogenic metabolic characteristics, SCD1-deficient mice have increased inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 341-347.
18. Savransky V, Jun J, Li J, Nanayakkara A, Fonti S, et al. (2008) Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearyl coenzyme A desaturase. *Circ Res* 103: 1173-1180.
19. Bassett CM, Edel AL, Patenaude AF, McCullough RS, Blackwood DP, et al. Dietary vaccenic acid has antiatherogenic effects in LDLr^{-/-} mice. *J Nutr* 140: 18-24.
20. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG (2002) Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 8: 1249-1256.
21. Davies JD, Carpenter KL, Challis IR, Figg NL, McNair R, et al. (2005) Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280: 3911-3919.
22. Merlin J-F, Gresti J, Bellenger S, Narce M (2006) Fast high performance liquid chromatography analysis in lipidomics : Separation of radiolabelled fatty acids and phosphatidylcholine molecular species using on monolithic C18 silica column. *Analytica Chimica Acta* 565: 163-167.

23. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
24. Slover HT, Lanza EJ (1979) Quantitative analysis of food fatty acids by capillarity gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 56: 933-943.
25. Alstrup KK, Brock B, Hermansen K (2004) Long-Term exposure of INS-1 cells to cis and trans fatty acids influences insulin release and fatty acid oxidation differentially. *Metabolism* 53: 1158-1165.
26. Brun T, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Prentki M (1997) Long-chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes* 46: 393-400.
27. Lock AL, Corl BA, Barbano DM, Bauman DE, Ip C (2004) The anticarcinogenic effect of trans-11 18:1 is dependent on its conversion to cis-9, trans-11 CLA by delta9-desaturase in rats. *J Nutr* 134: 2698-2704.
28. Wu Z, Li D, Gou K (2010) Overexpression of stearoyl-CoA desaturase-1 results in an increase of conjugated linoleic acid (CLA) and n-7 fatty acids in 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 473-476.
29. Mziaut H, Korza G, Ozols J (2000) The N terminus of microsomal delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8883-8888.
30. Landschulz KT, Jump DB, MacDougald OA, Lane MD (1994) Transcriptional control of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 763-768.
31. Bene H, Lasky D, Ntambi JM (2001) Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 1194-1198.
32. Mauvoisin D, Prevost M, Ducheix S, Arnaud MP, Mounier C (2010) Key role of the ERK1/2 MAPK pathway in the transcriptional regulation of the Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) gene expression in response to leptin. *Mol Cell Endocrinol* 319: 116-128.
33. Gouni-Berthold I, Berthold HK, Seul C, Ko Y, Vetter H, et al. (2001) Effects of authentic and VLDL hydrolysis-derived fatty acids on vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol* 132: 1725-1734.

Résultats annexes :

Incorporation des AG dans les HASMC :

Les cellules HASMC sont prétraitées en milieu DMEM sans rouge de phenol, 1% sérum délipidé, 0,5% BSA, 2mM L-glutamine, 1% antibiotique puis traitées à 100µM d'AG pendant 48h.

Dans les cellules traitées par les différents AG, nous retrouvons une incorporation très similaire des différents AG (Tableau 5), nous permettant une comparaison entre les différents traitements par les AG.

Dans les cellules témoins, nous ne retrouvons ni de TVA ni d'ELA. La teneur en OL est de 26,4%±1%. Afin d'obtenir le taux d'incorporation dans les cellules traitées par l'OL, nous avons soustrait le pourcentage molaire d'OL des cellules témoin à celui des cellules traitées par l'OL.

Concernant les cellules traitées par le TVA, le pourcentage d'incorporation prend en compte le TVA et le CLA1, le produit de la conversion du TVA par la SCD. Les cellules témoins ne contiennent pas de CLA1.

Tableau 5 : Pourcentage d'incorporation en AG dans les HASMC traitées 48h à 100µM d'AG

AG	% d'incorporation
OL	47,7±3,89
TVA+CLA1	49,41±3,32
ELA	54,27±2,23

Etude des effets cytotoxiques des AGT dans les HASMC :

Afin de déterminer l'impact des AGT sur l'induction de la mort des CML, les cellules sont prétraitées pendant 24h en milieu 10% sérum délipidé, 2mM L-glutamine, 1% pénicilline/streptomycine, puis traitées par les différents AG à 100µM.

Les cellules sont également traitées par l'acide docohexaénoïque (DHA), capable d'induire la mort des cellules musculaires lisses vasculaires – validant nos conditions de culture (contrôle positif de mortalité) (*Figure 32*) [286].

L'OL, le TVA et l'ELA n'induisent pas de mort cellulaire des HASMC. Cependant, l'OL qui ne possède pas d'effet prolifératif seul, a des effets synergiques avec les facteurs de croissance du sérum puisque les cellules prolifèrent plus que le témoin. Ces résultats

sont également en accord avec l'équipe de Renard [287] qui montre des effets synergiques entre l'OL et le facteur de croissance PDGF-BB dans des CML humaines.

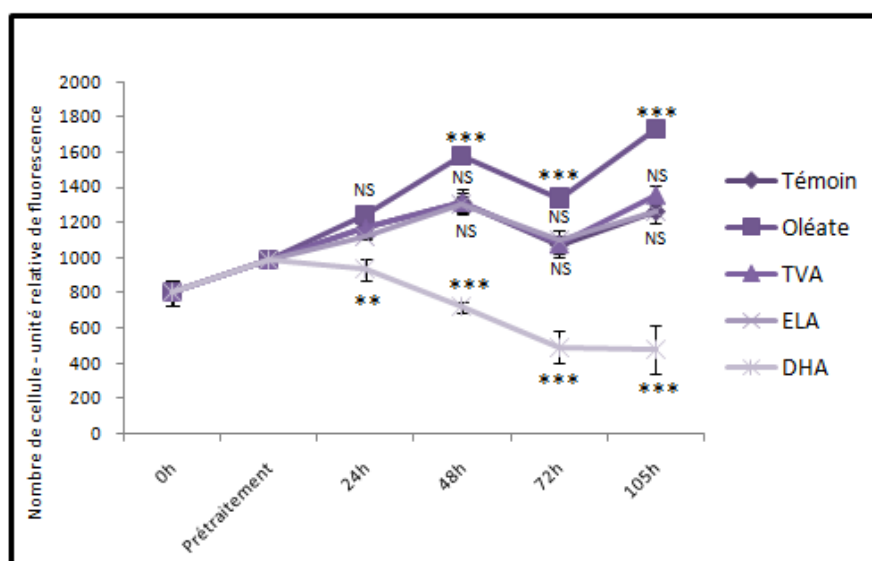


Figure 32 : Effets des AG sur la mort des HASMC prétraitées 24h en milieu 10% SD, puis traitées par les différents AG à 100µM, 24h, 48h, 72h et 105h

Ces résultats démontrent que les AGT n'induisent pas d'effets prolifératifs ou cytotoxiques. Cependant, il est à noter que l'OL en présence de sérum favorise la prolifération des CML humaines.

Conclusion :

Cette étude avait pour but de comparer entre eux les effets des AGMI en C18:1 de configuration *trans* d'origine naturelle (TVA) et industrielle (*ELA*) d'une part et *cis* (OL) d'autre part, sur les CML, en particulier leur impact sur la prolifération, la mort cellulaire et le métabolisme lipidique.

Nos résultats ont montré une bonne incorporation des acide oléique, *trans* vaccénique et élaïdique dans les CML et ce de façon similaire, permettant ainsi de comparer leurs effets. Nos travaux ne mettent pas en évidence d'effet des acide oléique, *trans* vaccénique et élaïdique sur la prolifération et la mort cellulaire. Cependant, bien que présentant pas d'effet prolifératif à lui seul, l'acide oléique induit une prolifération en synergie avec des facteurs mitogéniques. Ainsi, au début de la pathologie athéromateuse, où les facteurs inflammatoires et mitogéniques circulants sont très exprimés, l'acide oléique favoriserait la progression de la plaque, tandis que les AGT seraient sans effet sur la progression de la plaque d'athérôme au niveau de la viabilité des CML.

La composition en AG des lipides totaux des CML traitées avec les différents AG ne montre pas de modification après 48h de traitement, hormis pour les CML traitées avec le TVA, où la présence de c9t11CLA est détectée. Ce dernier est très probablement issu de la conversion du TVA par SCD. L'isomère c9t11CLA possède des propriétés intéressantes puisqu'il a été démontré comme un facteur diminuant les paramètres sanguins du risque de MCV chez l'homme et le hamster, participant ainsi à la réduction du risque de MCV [288, 289]. Le TVA pourrait ainsi physiologiquement diminuer le risque d'athérosclérose via sa conversion en c9t11CLA.

Les AG en C18:1 de configuration *cis* et *trans* régulent l'activité de SCD en modulant notamment son activité transcriptionnelle. En conséquence, dans les CML traitées par l'acide oléique, l'activité SCD est fortement réprimée suggérant que ce dernier, par une repression de la synthèse des AGMI pouvant prévenir le développement du phénotype spumeux des CML.

Les résultats obtenus lors des traitements des CML avec les acides *trans* vaccénique et élaïdique sont différents : en effet, si l'acide *trans* vaccénique réprime plus faiblement l'activité SCD en comparaison à l'acide oléique, tandis que l'acide élaïdique induit une augmentation de l'activité SCD et une surexpression de son expression protéique.

Le caractère pro-athéromateux attribué à l'acide élaïdique pourrait donc être la conséquence de cette modulation du métabolisme lipidique intervenant dans le phénotype spumeux des CML, plutôt que d'une modulation des phénotypes prolifératif ou de mort cellulaire. Le TVA, quand à lui, présenterait une propriété anti-athéromateux, en s'opposant à l'acquisition du phénotype spumeux.

Afin d'évaluer plus globalement l'impact des AGT, sur la pathologie athéromateuse, il serait intéressant de poursuivre ces expérimentation sur les deux autres types cellulaires impliqués dans le développement de la pathologie : les cellules endothéliales et les monocytes.

Au vue de nos résultats, le rôle de SCD1 apparaît important dans les changements phénotypiques des CML observés au cours du développement de l'athérosclérose. Nous pourrions donc rechercher plus précisément les régulations et le rôle de SCD1 au cours de cette pathologie.

Ainsi, nous pourrions rechercher les acteurs de la régulation de SCD par l'acide oléique et élaïdique, en nous intéressant plus particulièrement aux facteurs de transcription (SREBP, PPAR et LXR) et à la stabilité de l'ARNm de SCD.

De plus, nous pourrions réaliser des marquages par immunohistochimie de SCD1 au niveau de la plaque d'athérome à différents stades de son évolution. Ainsi, nous pourrions établir si SCD intervient de façon précoce dans le développement de la pathologie.

Pour une étude plus approfondie de l'effet de l'acide élaïdique sur le risque d'athérosclérose, nous pourrions rechercher si l'acide élaïdique induit une augmentation de SCD dans d'autres types cellulaires. Nous pourrions également utiliser le modèle de souris KO SCD1 -/- sous régime riche en TVA ou ELA afin d'évaluer leurs relations avec SCD dans le développement de l'athérosclérose.

Par ailleurs, l'utilisation du lapin comme modèle *in vivo*, plus sensible que la souris à l'induction de l'athérosclérose par un régime alimentaire, pourrait aider à définir les effets supposés pro-athérogénique d'ELA et anti-athérogénique du TVA.

Nous pourrions ainsi soumettre ces lapins à un régime standard enrichi en TVA, ELA ou OL afin d'évaluer l'effet athérogénique de ces AG ; par ailleurs un régime athérogène

enrichie à 5% d'huile d'arachide et 0,5% de cholestérol, additionné de TVA ou ELA permettrait de mesurer l'effet de ces AGT sur l'installation de la plaque d'athérôme.

Il serait également intéressant d'évaluer l'impact de ces différents AG en relation avec la progression de la pathologie athéromateuse (formation de la plaque, plaque, plaque instable). Nous pourrions ainsi mettre en relation la teneur et la composition en AG du tissu adipeux et des lipoprotéines circulantes avec le développement de la plaque, sa morphologie (épaisseur, structure,...), les différents marqueurs inflammatoires et apoptotiques, ainsi que les différentes voies de signalisations induites.

Ces compléments expérimentaux permettraient d'avoir une vue d'ensemble de l'effet des AG de configuration cis et trans sur l'installation de la plaque, sa stabilité ou sa résorption, et de discriminer les effets des différents AG en C18 de configuration *trans* d'origine naturelle et industrielle.

Conclusion générale :

Altérations métaboliques cellulaires : la voie de biosynthèse des AGMI comme cible thérapeutique, dans le traitement du cancer et de l'athérosclérose ?

La voie de biosynthèse des AGMI apparaît altérée dans de nombreuses pathologies. En effet, comme nous l'avons décrit, l'expression de SCD –enzyme limitante de la biosynthèse des AGMI- est fortement induite dans divers types de cancers. De plus, au niveau de cellules musculaires lisses vasculaires issues d'une plaque d'athérome, une forte teneur en acide oléique –principal produit de l'expression de SCD est décelée. Ces observations sont autant d'indices qui tendent à démontrer l'importance de la voie de biosynthèse des AGMI dans le développement de ces deux pathologies.

L'augmentation de l'expression de SCD conférerait aux cellules cancéreuses et aux CML, un avantage prolifératif – un phénotype fortement impliqué dans le développement de ces deux pathologies. En effet, l'augmentation de l'expression de SCD permet d'une part de fournir les substrats nécessaires à la synthèse de nouvelles membranes pour la division cellulaire et d'autre part, de diminuer la teneur intracellulaire en AGS, connus comme étant lipotoxiques et induisant de la mort cellulaire. Ainsi, au cours de l'athérosclérose, l'acquisition du phénotype spumeux des CML est corrélée à l'augmentation de l'expression de SCD et à la teneur en acide oléique.

L'altération de la voie de biosynthèse des AGMI apparaît comme une caractéristique propre à la pathologie, pouvant en faire une cible thérapeutique envisageable. Il reste cependant à déterminer si l'expression de SCD1 peut-être modulée, et si le cas échéant, elle est capable de faire régresser ou encore prévenir des pathologies cancéreuses et athérosclérotiques.

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que l'abolition de la voie de biosynthèse des AGMI par différentes approches – utilisation d'inhibiteur naturel t10c12 CLA et d'ARN interférant- induisait une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses, via une mort par apoptose induite par la voie du stress du réticulum endoplasmique. Nous

avons démontré l'importance du facteur de transcription CHOP dans l'induction de cette mort cellulaire. De plus, le traitement par l'isomère naturel c9t11 CLA ne conduit pas à une diminution drastique de la viabilité des cellules cancéreuses et module plus modestement l'activité SCD comparé à l'isomère t10c12 CLA.

Par ailleurs, l'ajout exogène d'acide oléique, ne semble pas restaurer la viabilité des cellules cancéreuses délétées en SCD1 par la technique de SiRNA dirigé contre Scd1, tandis que la viabilité des cellules cancéreuses conjointement traitées avec le t10c12CLA et l'oléate n'est pas affectée.

L'altération de la voie de biosynthèse des AGMI semble donc être une cible thérapeutique de choix d'autant que nos travaux ont montré une altération de la viabilité spécifique aux cellules cancéreuses.

Ces travaux ont également mis en évidence une modulation de l'expression de SCD1 par des AG en C18 :1 dans les CML. En effet, nous avons établi que l'acide oléique diminuait drastiquement l'activité de SCD1, tandis que l'acide *trans* vaccénique, d'origine naturelle ne diminuait que très légèrement celle-ci. En revanche, l'AGT d'origine industrielle, l'acide élaïdique, induit une forte augmentation de l'activité SCD1. Ces résultats mettent en évidence que les AG alimentaires sont capables d'induire des modifications de l'expression de SCD et participeraient à la protection ou au développement de la pathologie. Ainsi, nous pouvons supposer que l'acide oléique, très présent dans le régime méditerranéen, protège de l'athérosclérose en diminuant l'activité de SCD, ce qui aurait pour conséquence une diminution des substrats nécessaires au renouvellement des membranes cellulaires et donc à la prolifération mais également en augmentant le taux d'AGS qui induirait alors de la lipotoxicité et donc la mort des cellules. De plus, une diminution de l'activité SCD s'opposerait également au développement du phénotype spumeux.

L'acide *trans* vaccénique, d'origine naturelle et présent dans les produits laitiers, diminue très légèrement l'activité SCD et ne serait pas un facteur aggravant du développement de l'athérosclérose au niveau des CML, -ce qui est en accord avec les données épidémiologiques.

A contrario, l'acide élaïdique, d'origine industrielle et présent dans les produits manufacturés, induit une forte induction de l'activité SCD. Cet AG étant très présents au niveau de la plaque de l'athérome, nous pouvons supposer qu'il pourrait ainsi participer au développement de l'acquisition des phénotypes spumeux au niveau des CML.

Nous avons ainsi mis en évidence des effets distincts entre les AGT en C18:1 d'origine naturelle (TVA) et d'origine industrielle (ELA) mais également avec l'AG de configuration *cis*, l'acide oléique.

En résumé, les acides gras trans d'origine naturelle, le TVA et son métabolite le c9t11 CLA n'apparaissent pas comme des acteurs favorisant le développement athéromateux ou tumoral. En effet, contrairement à son homologue d'origine industrielle l'acide élaïdique, le TVA d'origine naturelle modulerait à la baisse l'activité SCD1 (enzyme lipogénique), et certaines cytokines pro-inflammatoires. Quant à l'isomère c9t11 CLA, même si son effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses coliques reste modeste comparé à l'isomère t10c12 CLA, il ne favorise pas la prolifération cellulaire mais pourrait potentialiser l'effet d'autres agents anticancéreux.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que la voie de biosynthèse des AGMI pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer et de l'athérosclérose.

Références bibliographiques :

1. Chilliard, Y., and Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod Nutr Dev* 44, 467-492.
2. Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., and Lamberet, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J Dairy Sci* 86, 1751-1770.
3. Griinari J.M., B.D.E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. *Advances in conjugated linoleic acid research Vol. 1.*, Pages 180-200.
4. Ledoux M., L.L., Sauvant D. (2000). Les isomères *trans* des acides gras : origine et présence dans l'alimentation. *Sci. Alim* 20, 393-411.
5. Ledoux M., L.L., Wolff R.L. (2000). Analytical methods for determination of *trans*-C18 fatty acid isomers in milk fat. *Analisis* 28, 402-412.
6. Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V., and Bauman, D.E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J Nutr* 130, 2285-2291.
7. Precht, D., and Molkentin, J. (2000). Recent trends in the fatty acid composition of German sunflower margarines, shortenings and cooking fats with emphasis on individual C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 and C20:1 *trans* isomers. *Nahrung* 44, 222-228.
8. Wolff R.L, P.D., Molkentin J. (1998). Occurrence and distribution profiles of *trans*-18:1 acids in edible fats of natural origin, in *Trans fatty acids in human nutrition*. Sébédio JL *Chapter 1*, 1-33.
9. Yurawecz, M.P., Roach, J.A., Sehat, N., Mossoba, M.M., Kramer, J.K., Fritsche, J., Steinhart, H., and Ku, Y. (1998). A new conjugated linoleic acid isomer, 7 *trans*, 9 *cis*-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 33, 803-809.
10. Pariza, M.W., Park, Y., and Cook, M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40, 283-298.
11. Aro, A., and Salminen, I. (1998). Difference between animal and vegetable *trans* fatty acids. *Am J Clin Nutr* 68, 918-919.
12. Guzman, M., Klein, W., Gomez del Pulgar, T., and Geelen, M.J. (1999). Metabolism of *trans* fatty acids by hepatocytes. *Lipids* 34, 381-386.
13. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P.G., and Jacobsson, A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 49, 186-199.
14. Schmitz, G., and Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47, 147-155.
15. Sprecher, H. (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486, 219-231.
16. Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89, 1025-1078.
17. Abu-Elheiga, L., Jayakumar, A., Baldini, A., Chirala, S.S., and Wakil, S.J. (1995). Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4011-4015.
18. Iverson, A.J., Bianchi, A., Nordlund, A.C., and Witters, L.A. (1990). Immunological analysis of acetyl-CoA carboxylase mass, tissue distribution and subunit composition. *Biochem J* 269, 365-371.

19. Maier, T., Jenni, S., and Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* 311, 1258-1262.
20. Bloomfield, D.K., and Bloch, K. (1960). The formation of delta 9-unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 235, 337-345.
21. Jeffcoat, R., Brawn, P.R., Safford, R., and James, A.T. (1977). Properties of rat liver microsomal stearyl-coenzyme A desaturase. *Biochem J* 161, 431-437.
22. McKeon, T.A., and Stumpf, P.K. (1982). Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *J Biol Chem* 257, 12141-12147.
23. Ntambi, J.M. (1999). Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40, 1549-1558.
24. Broadwater, W.T., Hoehn, R.C., and King, P.H. (1973). Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl Microbiol* 26, 391-393.
25. Shanklin, J., Whittle, E., and Fox, B.G. (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33, 12787-12794.
26. Ntambi, J.M., and Miyazaki, M. (2004). Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 43, 91-104.
27. Stukey, J.E., McDonough, V.M., and Martin, C.E. (1990). The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* 265, 20144-20149.
28. Watts, J.L., and Browse, J. (2000). A palmitoyl-CoA-specific delta9 fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 263-269.
29. Ward, R.J., Travers, M.T., Vernon, R.G., Salter, A.M., Buttery, P.J., and Barber, M.C. (1997). The ovine stearyl-CoA desaturase gene: cloning and determination of gene number within the ovine genome. *Biochem Soc Trans* 25, S673.
30. Ideta, R., Seki, T., Adachi, K., and Nakayama, Y. (1998). The isolation and characterization of androgen-dependent genes in the flank organs of golden Syrian hamsters. *Dermatology* 196, 47-50.
31. Mihara, K. (1990). Structure and regulation of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase gene. *J Biochem* 108, 1022-1029.
32. Zheng, Y., Prouty, S.M., Harmon, A., Sundberg, J.P., Stenn, K.S., and Parimoo, S. (2001). Scd3--a novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics* 71, 182-191.
33. Kaestner, K.H., Ntambi, J.M., Kelly, T.J., Jr., and Lane, M.D. (1989). Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 264, 14755-14761.
34. Ntambi, J.M., Buhrow, S.A., Kaestner, K.H., Christy, R.J., Sibley, E., Kelly, T.J., Jr., and Lane, M.D. (1988). Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 263, 17291-17300.
35. Zhang, L., Ge, L., Parimoo, S., Stenn, K., and Prouty, S.M. (1999). Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J* 340 (Pt 1), 255-264.

36. Zhang, L., Ge, L., Tran, T., Stenn, K., and Prouty, S.M. (2001). Isolation and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element. *Biochem J* 357, 183-193.
37. Wang, J., Yu, L., Schmidt, R.E., Su, C., Huang, X., Gould, K., and Cao, G. (2005). Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 735-742.
38. Miyazaki, M., Bruggink, S.M., and Ntambi, J.M. (2006). Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Delta9-desaturase. *J Lipid Res* 47, 700-704.
39. Miyazaki, M., Jacobson, M.J., Man, W.C., Cohen, P., Asilmaz, E., Friedman, J.M., and Ntambi, J.M. (2003). Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem* 278, 33904-33911.
40. Thiede, M.A., Ozols, J., and Strittmatter, P. (1986). Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J Biol Chem* 261, 13230-13235.
41. Man, W.C., Miyazaki, M., Chu, K., and Ntambi, J.M. (2006). Membrane topology of mouse stearyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 281, 1251-1260.
42. Tabor, D.E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., and Edwards, P.A. (1999). Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem* 274, 20603-20610.
43. Bene, H., Lasky, D., and Ntambi, J.M. (2001). Cloning and characterization of the human stearyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 1194-1198.
44. Briggs, M.R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 268, 14490-14496.
45. Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99, 838-845.
46. Horton, J.D. (2002). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* 30, 1091-1095.
47. Demoulin, J.B., Ericsson, J., Kallin, A., Rorsman, C., Ronnstrand, L., and Heldin, C.H. (2004). Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 279, 35392-35402.
48. Chang, Y., Wang, J., Lu, X., Thewke, D.P., and Mason, R.J. (2005). KGF induces lipogenic genes through a PI3K and JNK/SREBP-1 pathway in H292 cells. *J Lipid Res* 46, 2624-2635.
49. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C., and Ntambi, J.M. (2006). Stearyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol* 26, 6786-6798.
50. Jamroz-Wisniewska, A., Wojcicka, G., Horoszewicz, K., and Beltowski, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61, 760-785.

51. Wojcicka, G., Jamroz-Wisniewska, A., Horoszewicz, K., and Beltowski, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61, 736-759.
52. Peter, A., Weigert, C., Staiger, H., Rittig, K., Cegan, A., Lutz, P., Machicao, F., Haring, H.U., and Schleicher, E. (2008). Induction of stearoyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E339-349.
53. Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831-2838.
54. Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W., and Gonzalez, F.J. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598-5604.
55. Hebbachi, A.M., Knight, B.L., Wiggins, D., Patel, D.D., and Gibbons, G.F. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency abolishes the response of lipogenic gene expression to re-feeding: restoration of the normal response by activation of liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 283, 4866-4876.
56. Qin, X., Xie, X., Fan, Y., Tian, J., Guan, Y., Wang, X., Zhu, Y., and Wang, N. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 48, 432-441.
57. Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., et al. (1999). PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4, 597-609.
58. Miles, P.D., Barak, Y., He, W., Evans, R.M., and Olefsky, J.M. (2000). Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* 105, 287-292.
59. Kawashima, Y., Nakagawa, S., Tachibana, Y., and Kozuka, H. (1983). Effects of peroxisome proliferators on fatty acid-binding protein in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 754, 21-27.
60. Miller, C.W., and Ntambi, J.M. (1996). Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9443-9448.
61. Toyama, T., Kudo, N., Hibino, Y., Mitsumoto, A., Nishikawa, M., and Kawashima, Y. (2007). Effects of pioglitazone on stearoyl-CoA desaturase in obese Zucker fa/fa rats. *J Pharmacol Sci* 104, 137-145.
62. Riserus, U., Tan, G.D., Fielding, B.A., Neville, M.J., Currie, J., Savage, D.B., Chatterjee, V.K., Frayn, K.N., O'Rahilly, S., and Karpe, F. (2005). Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 54, 1379-1384.
63. Kim, Y.C., Gomez, F.E., Fox, B.G., and Ntambi, J.M. (2000). Differential regulation of the stearoyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes. *J Lipid Res* 41, 1310-1316.
64. Bryzgalova, G., Lundholm, L., Portwood, N., Gustafsson, J.A., Khan, A., Efendic, S., and Dahlman-Wright, K. (2008). Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E904-912.

65. Paquette, A., Wang, D., Jankowski, M., Gutkowska, J., and Lavoie, J.M. (2008). Effects of ovariectomy on PPAR alpha, SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause* 15, 1169-1175.
66. Sessler, A.M., Kaur, N., Palta, J.P., and Ntambi, J.M. (1996). Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 271, 29854-29858.
67. Gonzalez, C.I., and Martin, C.E. (1996). Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces* OLE1 transcript. *J Biol Chem* 271, 25801-25809.
68. Xu, Z.X., and Rooney, S.A. (1997). Glucocorticoids increase fatty-acid synthase mRNA stability in fetal rat lung. *Am J Physiol* 272, L860-864.
69. Oshino, N., and Sato, R. (1972). The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 149, 369-377.
70. Ozols, J. (1997). Degradation of hepatic stearyl CoA delta 9-desaturase. *Mol Biol Cell* 8, 2281-2290.
71. Heinemann, F.S., and Ozols, J. (1998). Degradation of stearoyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol Biol Cell* 9, 3445-3453.
72. Kato, H., Sakaki, K., and Mihara, K. (2006). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. *J Cell Sci* 119, 2342-2353.
73. Heinemann, F.S., Korza, G., and Ozols, J. (2003). A plasminogen-like protein selectively degrades stearoyl-CoA desaturase in liver microsomes. *J Biol Chem* 278, 42966-42975.
74. Heinemann, F.S., Mziaut, H., Korza, G., and Ozols, J. (2003). A microsomal endopeptidase from liver that preferentially degrades stearoyl-CoA desaturase. *Biochemistry* 42, 6929-6937.
75. Mziaut, H., Korza, G., Benraiss, A., and Ozols, J. (2002). Selective mutagenesis of lysyl residues leads to a stable and active form of delta 9 stearoyl-CoA desaturase. *Biochim Biophys Acta* 1583, 45-52.
76. Rogers, S.W., and Rechsteiner, M.C. (1986). Microinjection studies on selective protein degradation: relationships between stability, structure, and location. *Biomed Biochim Acta* 45, 1611-1618.
77. Liu, G. (2009). Stearoyl-CoA desaturase inhibitors: update on patented compounds. *Expert Opin Ther Pat* 19, 1169-1191.
78. Liu, G., Lynch, J.K., Freeman, J., Liu, B., Xin, Z., Zhao, H., Serby, M.D., Kym, P.R., Suhar, T.S., Smith, H.T., et al. (2007). Discovery of potent, selective, orally bioavailable stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors. *J Med Chem* 50, 3086-3100.
79. Koltun, D.O., Parkhill, E.Q., Vasilevich, N.I., Glushkov, A.I., Zilbershtein, T.M., Ivanov, A.V., Cole, A.G., Henderson, I., Zautke, N.A., Brunn, S.A., et al. (2009). Novel, potent, selective, and metabolically stable stearoyl-CoA desaturase (SCD) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 2048-2052.
80. Koltun, D.O., Vasilevich, N.I., Parkhill, E.Q., Glushkov, A.I., Zilbershtein, T.M., Mayboroda, E.I., Boze, M.A., Cole, A.G., Henderson, I., Zautke, N.A., et al. (2009). Orally bioavailable, liver-selective stearoyl-CoA desaturase (SCD) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 3050-3053.
81. Koltun, D.O., Zilbershtein, T.M., Migulin, V.A., Vasilevich, N.I., Parkhill, E.Q., Glushkov, A.I., McGregor, M.J., Brunn, S.A., Chu, N., Hao, J., et al. (2009). Potent, orally bioavailable, liver-selective stearoyl-CoA desaturase (SCD) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19, 4070-4074.

82. Scaglia, N., Chisholm, J.W., and Igal, R.A. (2009). Inhibition of stearylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One* 4, e6812.
83. Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., and Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18, 581-592.
84. Khan, N., Adhami, V.M., and Mukhtar, H. (2008). Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol* 76, 1333-1339.
85. Khan, N., Afaq, F., and Mukhtar, H. (2008). Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid Redox Signal* 10, 475-510.
86. Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3, 768-780.
87. Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., and Los, M. (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 10, 13-29.
88. Rashidian, J., Iyirhiaro, G.O., and Park, D.S. (2007). Cell cycle machinery and stroke. *Biochim Biophys Acta* 1772, 484-493.
89. Weinstein, I.B. (2000). Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 21, 857-864.
90. Davis, C.D., and Milner, J.A. (2007). Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1262-1273.
91. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
92. Davis, C.D., Emenaker, N.J., and Milner, J.A. Cellular proliferation, apoptosis and angiogenesis: molecular targets for nutritional preemption of cancer. *Semin Oncol* 37, 243-257.
93. Maiuri, F., Del Basso De Caro, M., Siciliano, A., Peca, C., Vergara, P., Mariniello, G., and Pettinato, G. Expression of growth factors in brain tumors: correlation with tumor grade, recurrence and survival. *Clin Neuropathol* 29, 109-114.
94. Sinkovics, J.G. (1991). Kaposi's sarcoma: its 'oncogenes' and growth factors. *Crit Rev Oncol Hematol* 11, 87-107.
95. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
96. Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57, 443-478.
97. Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., and Aaronson, S.A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237, 178-182.
98. Kliem, A., Tetens, F., Niemann, H., and Fischer, B. (1998). Only a truncated epidermal growth factor receptor protein is present in porcine endometrium. *Biol Reprod* 58, 1367-1371.
99. Lukashev, M.E., and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 8, 437-441.
100. Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.
101. Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., and Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins,

- immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50, 197-263.
102. Medema, R.H., and Bos, J.L. (1993). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 4, 615-661.
 103. Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333-346.
 104. Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
 105. Rommel, C., and Hafen, E. (1998). Ras--a versatile cellular switch. *Curr Opin Genet Dev* 8, 412-418.
 106. Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
 107. Moses, H.L., Yang, E.Y., and Pietenpol, J.A. (1990). TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 63, 245-247.
 108. Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
 109. Datto, M.B., Hu, P.P., Kowalik, T.F., Yingling, J., and Wang, X.F. (1997). The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 17, 2030-2037.
 110. Fynan, T.M., and Reiss, M. (1993). Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 4, 493-540.
 111. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
 112. Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., and Van Dyke, T. (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78, 703-711.
 113. Christofori, G., Naik, P., and Hanahan, D. (1994). A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis. *Nature* 369, 414-418.
 114. Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
 115. Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317-1322.
 116. Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-267.
 117. Cantley, L.C., and Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245.
 118. Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., et al. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.
 119. Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62, 1180-1190.
 120. Wright, W.E., Pereira-Smith, O.M., and Shay, J.W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9, 3088-3092.

121. Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11, 1921-1929.
122. Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.
123. Bryan, T.M., and Cech, T.R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11, 318-324.
124. Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14, 4240-4248.
125. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
126. Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8, 279-282.
127. Counter, C.M., Hahn, W.C., Wei, W., Caddle, S.D., Beijersbergen, R.L., Lansdorp, P.M., Sedivy, J.M., and Weinberg, R.A. (1998). Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14723-14728.
128. Halvorsen, T.L., Leibowitz, G., and Levine, F. (1999). Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol Cell Biol* 19, 1864-1870.
129. Zhu, J., Wang, H., Bishop, J.M., and Blackburn, E.H. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3723-3728.
130. Greenberg, R.A., Chin, L., Femino, A., Lee, K.H., Gottlieb, G.J., Singer, R.H., Greider, C.W., and DePinho, R.A. (1999). Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(Δ 2/3) cancer-prone mouse. *Cell* 97, 515-525.
131. Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S.C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69, 135-174.
132. Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
133. Folkman, J. (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 79, 1-8.
134. Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9, 211-220.
135. Bull, H.A., Brickell, P.M., and Dowd, P.M. (1994). Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett* 351, 41-44.
136. Varner, J.A., and Cheresch, D.A. (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8, 724-730.
137. Stetler-Stevenson, W.G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103, 1237-1241.
138. Folkman, J. (1974). Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 19, 331-358.
139. Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844.

140. Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.
141. Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
142. Johnson, J.P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 10, 11-22.
143. Kaiser, U., Auerbach, B., and Oldenburg, M. (1996). The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 20, 389-395.
144. Fogar, P., Basso, D., Pasquali, C., De Paoli, M., Sperti, C., Roveroni, G., Pedrazzoli, S., and Plebani, M. (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* 17, 1227-1230.
145. Belury, M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 22, 505-531.
146. Larsson, S.C., Bergkvist, L., and Wolk, A. (2005). High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am J Clin Nutr* 82, 894-900.
147. Ha, Y.L., Storkson, J., and Pariza, M.W. (1990). Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50, 1097-1101.
148. Hubbard, N.E., Lim, D., and Erickson, K.L. (2003). Effect of separate conjugated linoleic acid isomers on murine mammary tumorigenesis. *Cancer Lett* 190, 13-19.
149. Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A., and Pariza, M.W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51, 6118-6124.
150. Kuniyasu, H., Yoshida, K., Sasaki, T., Sasahira, T., Fujii, K., and Ohmori, H. (2006). Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. *Int J Cancer* 118, 571-576.
151. Shiraishi, R., Iwakiri, R., Fujise, T., Kuroki, T., Kakimoto, T., Takashima, T., Sakata, Y., Tsunada, S., Nakashima, Y., Yanagita, T., et al. Conjugated linoleic acid suppresses colon carcinogenesis in azoxymethane-pretreated rats with long-term feeding of diet containing beef tallow. *J Gastroenterol* 45, 625-635.
152. Yasui, Y., Suzuki, R., Kohno, H., Miyamoto, S., Beppu, F., Hosokawa, M., Miyashita, K., and Tanaka, T. (2007). 9trans,11trans conjugated linoleic acid inhibits the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Nutr Cancer* 59, 82-91.
153. Majumder, B., Wahle, K.W., Moir, S., Schofield, A., Choe, S.N., Farquharson, A., Grant, I., and Heys, S.D. (2002). Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *FASEB J* 16, 1447-1449.
154. Masso-Welch, P.A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M.M., Shoemaker, S., Ramirez, R.A., and Ip, M.M. (2002). Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. *Cancer Res* 62, 4383-4389.
155. Palombo, J.D., Ganguly, A., Bistrian, B.R., and Menard, M.P. (2002). The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett* 177, 163-172.
156. Park, H.S., Ryu, J.H., Ha, Y.L., and Park, J.H. (2001). Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86, 549-555.

157. Kelley, N.S., Hubbard, N.E., and Erickson, K.L. (2007). Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J Nutr* 137, 2599-2607.
158. Cho, H.J., Kim, W.K., Jung, J.I., Kim, E.J., Lim, S.S., Kwon, D.Y., and Park, J.H. (2005). Trans-10,cis-12, not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid decreases ErbB3 expression in HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 11, 5142-5150.
159. Cho, H.J., Kwon, G.T., and Park, J.H. (2009). trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid induces depolarization of mitochondrial membranes in HT-29 human colon cancer cells: a possible mechanism for induction of apoptosis. *J Med Food* 12, 952-958.
160. Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C., and Chevalier, S. Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* 49, 76-86.
161. Cho, E., Spiegelman, D., Hunter, D.J., Chen, W.Y., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., and Willett, W.C. (2003). Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 1079-1085.
162. Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., and Thompson, C.B. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 18, 54-61.
163. Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
164. DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11-20.
165. Young, C.D., and Anderson, S.M. (2008). Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res* 10, 202.
166. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
167. Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol Aspects Med* 31, 60-74.
168. Warburg, O. (1926). *Über den Stoffwechsel der Tumore*. Springer, Berlin. Translated: *The Metabolism of Tumors*, 1930.
169. Swinnen, J.V., Van Veldhoven, P.P., Timmermans, L., De Schrijver, E., Brusselmans, K., Vanderhoydonc, F., Van de Sande, T., Heemers, H., Heyns, W., and Verhoeven, G. (2003). Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 898-903.
170. Chajes, V., Lanson, M., Fetissof, F., Lhuillery, C., and Bougnoux, P. (1995). Membrane fatty acids of breast carcinoma: contribution of host fatty acids and tumor properties. *Int J Cancer* 63, 169-175.
171. Yam, D., Ben-Hur, H., Dgani, R., Fink, A., Shani, A., and Berry, E.M. (1997). Subcutaneous, omentum and tumor fatty acid composition, and serum insulin status in patients with benign or cancerous ovarian or endometrial tumors. Do tumors preferentially utilize polyunsaturated fatty acids? *Cancer Lett* 111, 179-185.
172. Szachowicz-Petelska, B., Sulkowski, S., and Figaszewski, Z.A. (2007). Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue. *Mol Cell Biochem* 294, 237-242.

173. Bartsch, H., Nair, J., and Owen, R.W. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20, 2209-2218.
174. Riboni, L., Ghidoni, R., Sonnino, S., Omodeo-Sale, F., Gaini, S.M., and Berra, B. (1984). Phospholipid content and composition of human meningiomas. *Neurochem Pathol* 2, 171-188.
175. Robert, J., Montaudon, D., and Hugues, P. (1983). Incorporation and metabolism of exogenous fatty acids by cultured normal and tumoral glial cells. *Biochim Biophys Acta* 752, 383-395.
176. Sakai, K., Okuyama, H., Yura, J., Takeyama, H., Shinagawa, N., Tsuruga, N., Kato, K., Miura, K., Kawase, K., Tsujimura, T., et al. (1992). Composition and turnover of phospholipids and neutral lipids in human breast cancer and reference tissues. *Carcinogenesis* 13, 579-584.
177. Sabine, J., Abraham, S., and Chaikoff, I. (1967). Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res* 27, 793-799.
178. Kannan, R., Lyon, I., and Baker, N. (1980). Dietary control of lipogenesis in vivo in host tissues and tumors of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res* 40, 4606-4611.
179. Milgram, L.Z., Witters, L.A., Pasternack, G.R., and Kuhajda, F.P. (1997). Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 3, 2115-2120.
180. Swinnen, J.V., Vanderhoydonc, F., Elgamal, A.A., Eelen, M., Vercaeren, I., Joniau, S., Van Poppel, H., Baert, L., Goossens, K., Heyns, W., et al. (2000). Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer* 88, 176-179.
181. Kuhajda, F.P., Jenner, K., Wood, F.D., Hennigar, R.A., Jacobs, L.B., Dick, J.D., and Pasternack, G.R. (1994). Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6379-6383.
182. Swinnen, J.V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., and Verhoeven, G. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 98, 19-22.
183. Piyathilake, C.J., Frost, A.R., Manne, U., Bell, W.C., Weiss, H., Heimbürger, D.C., and Grizzle, W.E. (2000). The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 31, 1068-1073.
184. Rashid, A., Pizer, E.S., Moga, M., Milgram, L.Z., Zahurak, M., Pasternack, G.R., Kuhajda, F.P., and Hamilton, S.R. (1997). Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 150, 201-208.
185. Swinnen, J.V., Brusselmans, K., and Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9, 358-365.
186. Kridel, S.J., Lowther, W.T., and Pemble, C.W.t. (2007). Fatty acid synthase inhibitors: new directions for oncology. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 1817-1829.
187. Kuhajda, F.P. (2006). Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 66, 5977-5980.

188. Kuhajda, F.P. (2000). Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 16, 202-208.
189. Wang, Y.Y., Kuhajda, F.P., Li, J., Finch, T.T., Cheng, P., Koh, C., Li, T., Sokoll, L.J., and Chan, D.W. (2004). Fatty acid synthase as a tumor marker: its extracellular expression in human breast cancer. *J Exp Ther Oncol* 4, 101-110.
190. Wang, Y., Kuhajda, F.P., Li, J.N., Pizer, E.S., Han, W.F., Sokoll, L.J., and Chan, D.W. (2001). Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett* 167, 99-104.
191. Scaglia, N., Caviglia, J.M., and Igal, R.A. (2005). High stearyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1687, 141-151.
192. Ruggieri, S., Roblin, R., and Black, P.H. (1979). Lipids of whole cells and plasma membrane fractions from Balb/c3T3, SV3T3, and concanavalin A-selected revertant cells. *J Lipid Res* 20, 760-771.
193. Bougnoux, P., Chajes, V., Lanson, M., Hacene, K., Body, G., Couet, C., and Le Floch, O. (1992). Prognostic significance of tumor phosphatidylcholine stearic acid level in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 20, 185-194.
194. Lu, Y. (1997). [Relation between accumulation of multiple gene variation and cancer onset and development]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 77, 877-880.
195. Li, J., Ding, S.F., Habib, N.A., Fermor, B.F., Wood, C.B., and Gilmour, R.S. (1994). Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 57, 348-352.
196. Thai, S.F., Allen, J.W., DeAngelo, A.B., George, M.H., and Fuscoe, J.C. (2001). Detection of early gene expression changes by differential display in the livers of mice exposed to dichloroacetic acid. *Carcinogenesis* 22, 1317-1322.
197. Moore, S., Knudsen, B., True, L.D., Hawley, S., Etzioni, R., Wade, C., Gifford, D., Coleman, I., and Nelson, P.S. (2005). Loss of stearyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 114, 563-571.
198. Fritz, V., Benfodda, Z., Rodier, G., Henriquet, C., Iborra, F., Avances, C., Allory, Y., de la Taille, A., Culine, S., Blancou, H., et al. Abrogation of de novo lipogenesis by stearyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol Cancer Ther* 9, 1740-1754.
199. Jin, Z., and El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4, 139-163.
200. Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
201. Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
202. Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288.
203. Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tambllyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., et al. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-895.
204. Brenner, D., and Mak, T.W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21, 871-877.

205. Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem* 104, 1124-1149.
206. Lemasters, J.J. (2005). Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 129, 351-360.
207. Wallach, D., Kang, T.B., and Kovalenko, A. (2008). The extrinsic cell death pathway and the elan mortel. *Cell Death Differ* 15, 1533-1541.
208. Khosravi-Far, R., and Esposti, M.D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* 3, 1051-1057.
209. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.
210. Ola, M.S., Nawaz, M., and Ahsan, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*.
211. Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64, 7183-7190.
212. Zhang, X., Jin, T.G., Yang, H., DeWolf, W.C., Khosravi-Far, R., and Olumi, A.F. (2004). Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res* 64, 7086-7091.
213. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
214. Soussi, T., Dehouche, K., and Beroud, C. (2000). p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 15, 105-113.
215. Kapoor, A., and Sanyal, A.J. (2009). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin Liver Dis* 13, 581-590.
216. Rasheva, V.I., and Domingos, P.M. (2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14, 996-1007.
217. Szegezdi, E., Macdonald, D.C., Ni Chonghaile, T., Gupta, S., and Samali, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C941-953.
218. Lai, E., Teodoro, T., and Volchuk, A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22, 193-201.
219. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880-885.
220. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Murakami, S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 11, 5-13.
221. Groenendyk, J., and Michalak, M. (2005). Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 52, 381-395.
222. Szegezdi, E., Fitzgerald, U., and Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 186-194.
223. Brusselmans, K., De Schrijver, E., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2005). RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 65, 6719-6725.
224. Chajes, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G.M., and Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res* 66, 5287-5294.

225. Funabashi, H., Kawaguchi, A., Tomoda, H., Omura, S., Okuda, S., and Iwasaki, S. (1989). Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase. *J Biochem* 105, 751-755.
226. McFadden, J.M., Medghalchi, S.M., Thupari, J.N., Pinn, M.L., Vadlamudi, A., Miller, K.I., Kuhajda, F.P., and Townsend, C.A. (2005). Application of a flexible synthesis of (5R)-thiolactomycin to develop new inhibitors of type I fatty acid synthase. *J Med Chem* 48, 946-961.
227. Alli, P.M., Pinn, M.L., Jaffee, E.M., McFadden, J.M., and Kuhajda, F.P. (2005). Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* 24, 39-46.
228. Murata, S., Yanagisawa, K., Fukunaga, K., Oda, T., Kobayashi, A., Sasaki, R., and Ohkohchi, N. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci* 101, 1861-1865.
229. Bandyopadhyay, S., Pai, S.K., Watabe, M., Gross, S.C., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Saito, K., Markwell, S.J., et al. (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, 5389-5395.
230. Little, J.L., Wheeler, F.B., Fels, D.R., Koumenis, C., and Kridel, S.J. (2007). Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res* 67, 1262-1269.
231. Morgan-Lappe, S.E., Tucker, L.A., Huang, X., Zhang, Q., Sarthy, A.V., Zakula, D., Vernetti, L., Schurdak, M., Wang, J., and Fesik, S.W. (2007). Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res* 67, 4390-4398.
232. Scaglia, N., and Igal, R.A. (2008). Inhibition of Stearyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol* 33, 839-850.
233. Igal, R.A. Stearyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* 31, 1509-1515.
234. Hess, D., Chisholm, J.W., and Igal, R.A. Inhibition of stearylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLoS One* 5, e11394.
235. Ho, T.S., Ho, Y.P., Wong, W.Y., Chi-Ming Chiu, L., Wong, Y.S., and Eng-Choon Ooi, V. (2007). Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother* 61, 578-587.
236. Cambou, J.P., Arveiler, D., Amouyel, P., Ruidavets, J.B., Haas, B., Montaye, M., Bingham, A., and Richard, J.L. (1996). [Coronary disease in France: data from the MONICA registers (1985-1991)]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 44 Suppl 1, S46-52.
237. Chassignole, J. (1999). En finir avec l'infarctus. Paris : Ed.Stock.
238. Goldschmidt-Clermont, P.J., Creager, M.A., Losordo, D.W., Lam, G.K., Wassef, M., and Dzau, V.J. (2005). Atherosclerosis 2005: recent discoveries and novel hypotheses. *Circulation* 112, 3348-3353.
239. Stehbens, W.E. (1990). The epidemiological relationship of hypercholesterolemia, hypertension, diabetes mellitus and obesity to coronary heart disease and atherogenesis. *J Clin Epidemiol* 43, 733-741.

240. Sowers, J.R. (1992). Insulin resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension, and accelerated atherosclerosis. *J Clin Pharmacol* 32, 529-535.
241. Watts, G.F., Jackson, P., Burke, V., and Lewis, B. (1996). Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. *Am J Clin Nutr* 64, 202-209.
242. Stachowska, E., Dolegowska, B., Chlubek, D., Wesolowska, T., Ciechanowski, K., Gutowski, P., Szumilowicz, H., and Turowski, R. (2004). Dietary trans fatty acids and composition of human atheromatous plaques. *Eur J Nutr* 43, 313-318.
243. Field, C.J., Blewett, H.H., Proctor, S., and Vine, D. (2009). Human health benefits of vaccenic acid. *Appl Physiol Nutr Metab* 34, 979-991.
244. Meijer, G.W., van Tol, A., van Berkel, T.J., and Weststrate, J.A. (2001). Effect of dietary elaidic versus vaccenic acid on blood and liver lipids in the hamster. *Atherosclerosis* 157, 31-40.
245. Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C., and Sedding, D.G. (2002). Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 8, 1249-1256.
246. Sanz, J., and Fayad, Z.A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451, 953-957.
247. Capron, L. (1996). [Atherosclerosis and cardio-vascular complications of diabetes]. *Ann Endocrinol (Paris)* 57, 161-165.
248. Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14, 840-856.
249. Stary, H.C. (1994). Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol* 89 Suppl 1, 17-32.
250. Greene, E.L., Lu, G., Zhang, D., and Egan, B.M. (2001). Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration. *Hypertension* 37, 308-312.
251. Han, C.Y., and Pak, Y.K. (1999). Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med* 31, 165-173.
252. Bjorkerud, B., and Bjorkerud, S. (1996). Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 416-424.
253. Auge, N., Pieraggi, M.T., Thiers, J.C., Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (1995). Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 309 (Pt 3), 1015-1020.
254. Chatterjee, S. (1992). Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 111, 143-147.
255. Chisolm, G.M., 3rd, and Chai, Y. (2000). Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic Biol Med* 28, 1697-1707.
256. Yang, C.M., Chien, C.S., Hsiao, L.D., Pan, S.L., Wang, C.C., Chiu, C.T., and Lin, C.C. (2001). Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol* 132, 1531-1541.

257. Chai, Y.C., Howe, P.H., DiCorleto, P.E., and Chisolm, G.M. (1996). Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 271, 17791-17797.
258. Watanabe, T., Pakala, R., Katagiri, T., and Benedict, C.R. (2001). Mildly oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with angiotensin II in inducing vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens* 19, 1065-1073.
259. Lu, G., Morinelli, T.A., Meier, K.E., Rosenzweig, S.A., and Egan, B.M. (1996). Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. *Circ Res* 79, 611-618.
260. Lu, G., Meier, K.E., Jaffa, A.A., Rosenzweig, S.A., and Egan, B.M. (1998). Oleic acid and angiotensin II induce a synergistic mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 31, 978-985.
261. Dzau, V.J., and Gibbons, G.H. (1991). Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension. *Hypertension* 18, III115-121.
262. Hoshina, S., Ueffing, M., and Weinstein, I.B. (1990). Growth factor-induced DNA synthesis in cells that overproduce protein kinase C. *J Cell Physiol* 145, 262-267.
263. Cobb, M.H., Boulton, T.G., and Robbins, D.J. (1991). Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* 2, 965-978.
264. Davis, R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268, 14553-14556.
265. Shah, P.K., Kaul, S., Nilsson, J., and Cercek, B. (2001). Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation* 104, 2376-2383.
266. Sarjeant, J.M., Lawrie, A., Kinnear, C., Yablonsky, S., Leung, W., Massaeli, H., Prichett, W., Veinot, J.P., Rassart, E., and Rabinovitch, M. (2003). Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2172-2177.
267. Motobayashi, Y., Izawa-Ishizawa, Y., Ishizawa, K., Orino, S., Yamaguchi, K., Kawazoe, K., Hamano, S., Tsuchiya, K., Tomita, S., and Tamaki, T. (2009). Adiponectin inhibits insulin-like growth factor-1-induced cell migration by the suppression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, but not Akt in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 32, 188-193.
268. Mietus-Snyder, M., Frieria, A., Glass, C.K., and Pitas, R.E. (1997). Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 969-978.
269. Proudfoot, D., Davies, J.D., Skepper, J.N., Weissberg, P.L., and Shanahan, C.M. (2002). Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation* 106, 3044-3050.
270. Arghmann, C.A., Sawyez, C.G., Li, S., Nong, Z., Hegele, R.A., Pickering, J.G., and Huff, M.W. (2004). Human smooth muscle cell subpopulations differentially accumulate cholesteryl ester when exposed to native and oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1290-1296.
271. Stein, O., Vanderhoek, J., and Stein, Y. (1977). Cholesterol ester accumulation in cultured aortic smooth muscle cells. Induction of cholesterol ester retention by

- chloroquine and low density lipoprotein and its reversion by mixtures of high density apolipoprotein and sphingomyelin. *Atherosclerosis* 26, 465-482.
272. Stein, O., and Stein, Y. (1977). The lipoproteins and arterial smooth muscle cells: uptake of VLDL, LDL, HDL. *Adv Exp Med Biol* 82, 903-909.
 273. Hoff, H.F., Pepin, J.M., and Morton, R.E. (1991). Modified low density lipoprotein isolated from atherosclerotic lesions does not cause lipid accumulation in aortic smooth muscle cells. *J Lipid Res* 32, 115-124.
 274. Naito, M., Suzuki, H., Mori, T., Matsumoto, A., Kodama, T., and Takahashi, K. (1992). Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 141, 591-599.
 275. Gough, P.J., Greaves, D.R., Suzuki, H., Hakkinen, T., Hiltunen, M.O., Turunen, M., Herttuala, S.Y., Kodama, T., and Gordon, S. (1999). Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 461-471.
 276. Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. (2000). LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1572-1579.
 277. Ishii, I., Satoh, H., Kawachi, H., Jingami, H., Matsuoka, N., Ohmori, S., Bujo, H., Yamamoto, T., Saito, Y., and Kitada, M. (2002). Intimal smooth muscle cells up-regulate beta-very low density lipoprotein-mediated cholesterol accumulation by enhancing beta-very low density lipoprotein uptake and decreasing cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1585, 30-38.
 278. Laughton, C.W., Ruddle, D.L., Bedord, C.J., and Alderman, E.L. (1988). Sera containing elevated nonesterified fatty acids from patients with angiographically documented coronary atherosclerosis cause marked lipid accumulation in cultured human arterial smooth muscle-derived cells. *Atherosclerosis* 70, 233-246.
 279. Stein, O., Shiloni, E., and Stein, Y. (1991). Effect of TNF on triacylglycerol in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1082, 33-36.
 280. Chernick, S., Srere, P.A., and Chaikoff, I.L. (1949). The metabolism of arterial tissue; lipide syntheses; the formation in vitro of fatty acids and phospholipides by rat artery with C14 and P32 as indicators. *J Biol Chem* 179, 113-118.
 281. Portman, O.W. (1970). Arterial composition and metabolism: esterified fatty acids and cholesterol. *Adv Lipid Res* 8, 41-114.
 282. Seillan, C. (1990). Oxysterol mediated changes in fatty acid distribution and lipid synthesis in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Lipids* 25, 172-176.
 283. Dusserre, E., Bourdillon, M.C., Ciavatti, M., Covacho, C., and Renaud, S. (1993). Lipid biosynthesis in cultured arterial smooth muscle cells is related to their phenotype. *Lipids* 28, 589-592.
 284. Batetta, B., Mulas, M.F., Sanna, F., Putzolu, M., Bonatesta, R.R., Gasperi-Campani, A., Roncuzzi, L., Baiocchi, D., and Dessi, S. (2003). Role of cholesterol ester pathway in the control of cell cycle in human aortic smooth muscle cells. *FASEB J* 17, 746-748.
 285. Davies, J.D., Carpenter, K.L., Challis, I.R., Figg, N.L., McNair, R., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., and Shanahan, C.M. (2005). Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280, 3911-3919.

286. Diep, Q.N., Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. (2000). Docosaheaxaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 36, 851-855.
287. Renard, C.B., Askari, B., Suzuki, L.A., Kramer, F., and Bornfeldt, K.E. (2003). Oleate, not ligands of the receptor for advanced glycation end-products, promotes proliferation of human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia* 46, 1676-1687.
288. Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J.J., Jones, E.L., Grimble, R.F., Williams, C.M., Yaqoob, P., and Calder, P.C. (2004). Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 80, 614-620.
289. Valeille, K., Gripois, D., Blouquit, M.F., Souidi, M., Riottot, M., Bouthegourd, J.C., Serougne, C., and Martin, J.C. (2004). Lipid atherogenic risk markers can be more favourably influenced by the cis-9,trans-11-octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *Br J Nutr* 91, 191-199.
290. Bassett, C.M., McCullough, R.S., Edel, A.L., Maddaford, T.G., Dibrov, E., Blackwood, D.P., Austria, J.A., and Pierce, G.N. (2009). Trans-fatty acids in the diet stimulate atherosclerosis. *Metabolism* 58, 1802-1808.
291. Bassett, C.M., Edel, A.L., Patenaude, A.F., McCullough, R.S., Blackwood, D.P., Chouinard, P.Y., Paquin, P., Lamarche, B., and Pierce, G.N. (2010). Dietary vaccenic acid has antiatherogenic effects in LDLr^{-/-} mice. *J Nutr* 140, 18-24.
292. Bounoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C., and Chevalier, S. (2010). Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* 49, 76-86.
293. Ou, L., Ip, C., Lisafeld, B., and Ip, M.M. (2007). Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 1044-1049.
294. Beppu, F., Hosokawa, M., Tanaka, L., Kohno, H., Tanaka, T., and Miyashita, K. (2006). Potent inhibitory effect of trans9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 17, 830-836.
295. Lee, S.H., Yamaguchi, K., Kim, J.S., Eling, T.E., Safe, S., Park, Y., and Baek, S.J. (2006). Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. *Carcinogenesis* 27, 972-981.
296. Miller, A., Stanton, C., and Devery, R. (2002). Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res* 22, 3879-3887.

Publications et communications scientifiques :

Publications:

1. Minville-Walz M, Pierre AS, Pichon L, et al. Inhibition of stearyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells. PLoS One; 5: e14363.
2. Fevre C, Bellenger S, Pierre AS, et al. The metabolic cascade leading to eicosanoid precursors--desaturases, elongases, and phospholipases A2--is altered in Zucker fatty rats. Biochim Biophys Acta; 1811: 409-17.
3. Narce M, Rialland M, Minville-Walz M, Bellenger S, Bellenger J. Les acides gras trans : des acides gras bien singuliers. Médecine des Maladies Métaboliques 2011.

Publications en cours:

4. Minville-Walz, M., Pierre, A.S., Pichon, L., Bellenger, S., Fevre, C., Bellenger, J., Tessier, C., Narce, M., and Rialland, M. t10c12CLA induces cell death by involving ER stress pathway in cancer cells.
5. Minville-Walz, M., Pichon, L., Bellenger, S., Bellenger, J., Narce, M., and Rialland, M. Stearyl-CoA desaturase regulation by cis and trans C18:1 fatty acids in human aortic smooth muscle cells.

Congrès:

2011: Vitagora à Dijon - Deuxième prix poster: "Dietary polyunsaturated fatty acids and colon cancer cell death: role of endoplasmic reticulum stress"- AS Pierre, M Minville-Walz, A Varin, J Gresti, S Bellenger, J Bellenger, M Narce and M Rialland.

2010: European association of cancer research à Oslo- Norvège – Poster: "Inhibition of Stearyl-CoA Desaturase induces cell death and activation of AMPK pathway in cancer cells"- M Minville, AS Pierre, J Gresti, C Fèvre, J Bellenger, S Bellenger, L Pichon, M Narce and M Rialland.

Cancéropole à Dijon – Poster: "Conjugated linoleic acids induce cell death of colon tumor cells: possible Stearyl CoA Desaturase and ER Stress implication"- M Minville, AS Pierre, J Gresti, S Bellenger, J Bellenger, L Pichon, M Rialland, M Narce.

Vitagora à Dijon - Deuxième prix poster: "Impacts des acides gras trans sur la lipogenèse et la prolifération des cellules musculaires lisses humaines"- M Minville, J Gresti, S Bellenger, M Rialland et M Narce.

2009: Présentation orale au siège sociale du CNIEL “Interaction de l’acide vaccénique avec la biosynthèse des acides gras monoinsaturés et répercussions sur les acteurs cellulaires de l’athérosclérose” - *M Minville, J Gresti, S Bellenger, M Rialland et M Narce.*

Forum des Jeunes Chercheurs à Dijon (présentation orale).

Vitagora à Dijon – poster : “Impact des acides gras trans sur le métabolisme lipidique et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires humaines” - *M Minville, J Gresti, S Bellenger, M Rialland et M Narce.*

2008: Forum des Jeunes Chercheurs à Besançon - Deuxième prix poster : “Impact des acides gras trans sur le métabolisme lipidique et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires de rat” - *M Minville, A Varin, S Bellenger, M Rialland et M Narce.*

Annexes :

Les acides gras trans : des acides gras bien singuliers

Trans fatty acids : very peculiar fatty acids

Michel Narce^{1,2}, Mickael Rialland¹, Méline Minville-Walz¹, Sandrine Bellenger¹,

Jérôme Bellenger¹

¹ INSERM UMR866, UFR Sciences de la Vie de la Terre et de l'Environnement, Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel 21000 Dijon.

Résumé : Cette revue résume des données expérimentales ou cliniques récentes sur les acides gras trans, qui permettent de considérer certains d'entre eux comme des molécules bioactives d'intérêt -en particulier dans le domaine cardiovasculaire et en cancérologie-, susceptibles d'apporter une impulsion nouvelle aux applications industrielles relatives à leurs effets favorables sur la santé. Dans cette revue, nous soulignons l'émergence de divers aspects bénéfiques des acides gras trans naturels, qui ont des propriétés distinctes et parfois même opposées à celles des acides gras trans retrouvés dans les huiles partiellement hydrogénées. Ainsi, après avoir été mis en avant pour leurs effets délétères sur la santé, les acides gras trans –ou plutôt certains d'entre eux- sont considérés sous un éclairage nouveau pour leurs effets bénéfiques. Décidément, les acides gras trans sont des acides gras bien singuliers...

Abstract : This review focus on recent experimental and clinical data related to trans fatty acids, leading to consider some of them as interesting bioactive molecules particularly regarding cardiovascular diseases and cancerogenesis. These data provide a new momentum for industrial applications related to their positive effects on health. In this review, we will focus on several emerging beneficial aspects of natural trans fatty acids that have distinct and sometimes opposite properties compared to trans found in partially hydrogenated oils. So, after being advanced for their deleterious effects on health, trans fatty acids –or more exactly some of them- are now enlightened for their beneficial effects. Obviously, trans fatty acids are very peculiar fatty acids...

Mots-clés : acide trans-vaccénique ; CLA ; risque cardiovasculaire; athérosclérose ; cancer

Key-words : trans-vaccenic acid ; CLA ; cardiovascular risk; atherosclerosis ; cancer

² Correspondance :

Pr Michel Narce

INSERM UMR866,

UFR Sciences de la Vie de la Terre et de l'Environnement,

Université de Bourgogne,

6 Bd Gabriel 21000 Dijon.

michel.narce@u-bourgogne.fr

tél : 0380396317

fax : 0380396330

Introduction

Les différents isomères trans de l'acide oléique (9t 18 : 1 ou 11t 18 : 1) et de l'acide linoléique (principalement les c9,t11 18 : 2 n-6 et t10,c12 18 : 2 n-6) (figure 1) peuvent exercer des effets biologiques très différents. D'abord considérés pour certains d'entre eux comme des molécules à effets bénéfiques vis-à-vis de l'obésité, les acides gras trans (AGT) sont reconnus depuis les années 1990 pour poser de nombreux problèmes de santé publique. Ainsi, une consommation d'AGT d'origine industrielle supérieure au seuil de 2% de l'apport énergétique total entraîne une augmentation significative du risque cardio-vasculaire, plus encore que l'excès de graisses saturées. Différents auteurs ont associé positivement, sur le plan épidémiologique, des apports élevés en AGT totaux avec le risque coronarien ou de mortalité cardiovasculaire [1-5]. Cependant, on s'attache maintenant à discriminer les effets santé des AGT selon leur origine alimentaire. Les acides gras trans d'origine naturelle sont contenus dans les produits laitiers (lait, fromage, beurre...) et les viandes de ruminants ; en d'autres termes, il s'agit des AGT issus de la biohydrogénation ruminale (figure 2) dont les principaux représentants sont l'acide 11-trans vaccénique (TVA) et le c9,t11-ruménique (CLA1). Les AGT d'origine technologique, dont les principaux représentants sont les acides 9-trans élaïdique (ELA) et t10,c12-CLA (CLA2), sont ceux contenus dans les aliments intégrant des matières grasses végétales hydrogénées (margarines, gâteaux, pâtisseries, viennoiseries, plats cuisinés...) ; ils incluent également les matières grasses distribuées en alimentation animale et retrouvés dans des produits animaux (charcuteries, volailles, poissons d'élevage...). Les AGT peuvent également être présents dans notre alimentation sous forme de compléments alimentaires, qui sont le plus souvent des mélanges d'AGT.

Outre leurs effets cardio-vasculaires, les acides gras trans d'origine industrielle ont été également associés à différents types de cancer. Cependant, ce lien est encore insuffisamment

élucidé et demeure controversé. Au travers d'études sur différents modèles expérimentaux et chez l'homme, il reste difficile d'évaluer si l'association entre certains isomères d'AGT et certains polymorphismes génétiques peut augmenter le risque de cancer de la prostate, du colon ou du sein [6]. Divers biais expérimentaux peuvent en effet expliquer les incohérences observées dans la littérature. Des études déjà assez anciennes, rapportent par ailleurs des corrélations entre les taux d'AGT circulants et risque de cancer du sein [7].

Par conséquent, les professionnels du secteur agroalimentaire français ont considérablement réduit ces dernières années la teneur en acides gras trans de leurs produits, ce qui fait dire à certains que les acides gras trans ne sont plus un problème de santé publique. En effet, l'analyse de la teneur en AGT de nombreux produits industriels a montré que celle-ci était dans la très grande majorité négligeable, et inférieure aux recommandations. Cependant, tous les produits alimentaires n'ont pas été analysés et il demeure une grande hétérogénéité en ce qui concerne leur teneur en AGT. Selon les données de l'ANSES, les apports en AGT sont plus élevés en moyenne chez les adultes (2,3 g/j) que chez les enfants (1,9 g/j). Toutefois, les apports moyens rapportés à l'apport énergétique total sont similaires chez les adultes et chez les enfants, autour de 1 %. Chez les adultes, les groupes d'aliments vecteurs d'AGT naturels (viandes et produits laitiers) contribuent majoritairement à l'apport total en AGT et couvrent une part plus importante que les AGT d'origine technologique. Chez les enfants, on observe une répartition équivalente entre les AGT des deux origines, naturelle et technologique. Cependant, on estime que les apports en AGT apparaissent encore beaucoup trop importants, et les recommandations sont toujours à la baisse.

Des isomères fonctionnellement très différents: exemple du risque cardiovasculaire

Compte-tenu de l'évolution des données, il apparaît aujourd'hui que l'origine des AGT doive être prise en compte sur le plan de la santé publique, ceux-ci ne constituant pas un groupe homogène de molécules. Dans des études où la distinction entre les AGT d'origine naturelle et technologique a pu être établie, il est montré que l'augmentation du risque cardiovasculaire est liée à des apports élevés en AGT d'origine technologique, lorsqu'ils représentent plus de 1,5 % de l'apport énergétique total [1,2]. Pour ce qui concerne les AG trans naturels, aucune association avec le risque coronarien n'a pu être observée [8]. Récemment, une étude prospective a montré que l'apport en AGT d'origine naturelle n'était pas associé au risque coronarien [9], alors qu'une consommation d'AGT d'origine technologique à un niveau d'apport supérieur à 2 % de l'AET accroît le risque cardiovasculaire *via* une augmentation du cholestérol LDL et une diminution du cholestérol HDL [10].

Par ailleurs, diverses études expérimentales ou épidémiologiques mettent en relation la consommation d'acide élaïdique avec le risque cardiovasculaires [241]. Il a notamment été montré chez des patients obèses consommant de fortes quantités d'acide élaïdique, qu'un taux élevé de cet acide gras pouvait être incorporé au niveau des plaques d'athérome et dans le tissu adipeux [242]. Une étude récente a également mis en évidence que des AGT provenant d'huiles végétales hydrogénées – principalement l'acide élaïdique- induisaient le développement de lésions athéromateuses chez des souris transgéniques LDLr^{-/-} [290], alors qu'un beurre riche en TVA - en présence ou en absence de cholestérol alimentaire- avait un effet protecteur, en diminuant les teneurs en cholestérol et en triglycérides circulants. Au contraire donc de l'acide élaïdique qui induit la formation de la plaque athéromateuse, le TVA la réduit [291].

Au cours de l'athérogenèse, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) accumulent des gouttelettes lipidiques et sont capables de capter des agrégats de LDL et de VLDL via leurs récepteurs respectifs, ainsi que des AG non estérifiés du sérum [276-279], ce qui conduit à l'acquisition du phénotype spumeux. L'implication de l'enzyme stéaroyl-CoA désaturase est soupçonnée dans ce processus. Cette enzyme joue un rôle majeur dans la bioconversion des acides gras trans d'origine naturelle et peut donc être fortement régulée par ces derniers. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au laboratoire à l'implication des AGT dans la régulation de la prolifération, la mort cellulaire et la spumosité des CMLV. Nous avons pu mettre en évidence que, en fonction de la conformation et de la position de la double liaison, les monoènes pouvaient réguler différemment la stéaroyl-CoA désaturase des cellules musculaires lisses, l'acide oléique étant un plus puissant répresseur de l'enzyme que l'acide vaccénique, alors que l'acide élaïdique stimule son activité (résultats non publiés). Ces régulations de la stéaroyl-CoA désaturase par ces monoènes peuvent avoir des impacts intéressants sur les transformations des CMLV au cours de l'athérogenèse, et ouvrent des perspectives intéressantes pour les AGT en tant que molécules bioactives.

Effets sur les paramètres sanguins

Les données ci-dessus ont bien-sûr conduit à s'intéresser aux effets des AGT sur les paramètres circulants dans des conditions normales. Les résultats indiquent que chez des sujets sains, les AGT issus de ruminants ingérés à dose modérée n'altèrent pas -contrairement aux produits de l'hydrogénation catalytique- les biomarqueurs sanguins du risque cardiovasculaire [18]. Cependant, les concentrations en LDL-cholestérol plasmatique sont significativement plus élevées après ingestion d'un régime à teneur élevée en TVA, comparativement à un régime témoin ou à un régime à teneur modérée en cet acide gras. En revanche, ces concentrations sont encore beaucoup plus élevées avec un régime contenant

des AGT d'origine industrielle. Par ailleurs, les concentrations en HDL-cholestérol plasmatique sont significativement plus faibles avec un régime riche en TVA qu'avec un régime modéré en TVA. Finalement, tous les facteurs de risque sont comparables entre un régime témoin et un régime à teneur modérée en AGT d'origine naturelle. Alors qu'une forte ingestion d'AGT peut affecter de manière adverse l'homéostasie du cholestérol chez des individus sains, des ingestions modérées d'AGT d'origine naturelle -aux niveaux où ils peuvent être consommés dans l'alimentation (au maximum 1,5 % de l'AET)- ont des effets neutres sur les lipides plasmatiques et ne sont pas associés à une augmentation du risque cardiovasculaire [19-21]. Les propriétés hypolipémiantes du TVA rapportées dans certaines études sont liées en particulier à une diminution de production de chylomicrons et à l'amélioration de la lipémie post-prandiale [22]. Il a notamment été montré que des hamsters nourris avec des beurres enrichis en un mélange TVA/acide ruménique, présentaient une diminution de leur rapport $[VLDL + (IDL) + LDL] / HDL$ comparé à des animaux nourris avec un régime témoin. Ainsi dans ce cas, l'enrichissement du régime alimentaire en TVA pourrait diminuer le risque athérogène et coronarien. [243].

Effets des AGT naturels en relation avec le syndrome métabolique et l'obésité

Alors que le CLA2 a été montré comme capable de mobiliser de façon drastique la masse grasse –mais au prix de perturbations métaboliques conséquentes-, les AGT d'origine naturelle peuvent avoir des effets bénéfiques vis-à-vis du syndrome métabolique, mais ceux-ci sont bien moins décrits et apparaissent être isomère-spécifiques. Ainsi, l'acide ruménique, structuré sous forme de triacylglycérol peut présenter - ainsi que peut-être son précurseur le TVA- des propriétés bénéfiques vis-à-vis de la régulation du métabolisme lipidique et de l'insulino-résistance [20,24]. Des études conduites au laboratoire sur la souris ob/ob vont dans le même sens. Ces effets régulateurs peuvent être intimement liés à la forme sous laquelle les

AGT sont ingérés, et les études comparant les effets des AGT en fonction de leur mode d'absorption (acides gras libres, esters éthyliques, TAG ou PL) sont encore très limitées, la forme libre semblant beaucoup moins bien absorbée que la forme TAG [25]. Dans un modèle murin de syndrome métabolique et d'obésité, le TVA peut modifier favorablement le profil pro-inflammatoire des lymphocytes mésentériques, et exercer un effet hypolipémiant chez ces animaux [26,27]. Son effet serait donc différent de celui de l'acide élaïdique, comme en témoigne la mesure des biomarqueurs plasmatiques et hépatiques [28]. Ces résultats suggèrent que le TVA pourrait réguler négativement la synthèse hépatique d'acides gras et influencer directement la lipogenèse intestinale. Cependant, dans une étude conduite chez le porc, le TVA et le c9,t11-CLA provenant de beurres enrichis ne modifient pas significativement le profil lipoprotéique plasmatique [29], mais augmentent les concentrations sériques en acide alpha-linolénique et diminuent les teneurs en acides myristique et palmitique, laissant supposer un effet bénéfique de ces AGT sur la composition sérique en acides gras.

Effets des AGT naturels en relation avec l'immunité

En ce qui concerne les marqueurs de l'inflammation, les effets des AGT peuvent être très spécifiques : ainsi, le c9,t11-trans CLA atténue les marqueurs de l'inflammation (TNF α , IL-12, IL-6) dans des cellules Caco-2, mais pas son précurseur, le TVA[30]. Cependant, un traitement par le c9,t11-trans CLA ou par le TVA diminue l'index de delta-9 désaturation et induit des modifications de la composition en acides gras dans ce modèle d'épithélium intestinal humain. Concernant les propriétés immunitaires, il a été montré qu'un lait de vache enrichi en c9,t11-CLA et en TVA diminuait les allergies respiratoires chez la souris [31], et que le TVA et le c9,t11-CLA modifiaient favorablement les fonctions immunitaires chez des

rats obèses JCR : LA-cp. En effet, les splénocytes de rat nourris au TVA produisent 16-23% fois moins d'IL2, d'IL-10 et de TNF α que les animaux témoins [26].

Effets des AGT naturels en relation avec la cancérogenèse

Bien que les AGT d'origine industrielle aient été considérés comme pouvant augmenter le risque de cancer [6,7], certains d'entre eux semblent néanmoins présenter un intérêt dans le domaine de la cancérologie [161, 292] depuis qu'il a été montré qu'une consommation à long terme de CLA était inversement corrélée avec l'incidence du cancer colorectal [146]. Par ailleurs, il a été montré sur des modèles murins de tumeurs induites ou greffées que les c9,t11 ou t10,c12 CLA alimentaires pouvaient exercer des effets anti-cancérigènes notables [147-152]. Cette suppression du développement tumoral sous l'effet d'un traitement par les CLA peut-être attribuée ou bien à une induction d'apoptose ou à une inhibition de la prolifération cellulaire ou de l'angiogenèse. Comme précédemment, ces effets sont fortement dépendants du type d'isomère et du type de cancer. Ainsi, dans des lignées de cancer colique, le t10,c12 CLA induit une cytotoxicité plus prononcée que le c9,t11 CLA [158, 293-296]. Nous avons très récemment mis en évidence au laboratoire que le t10,c12 CLA induisait une apoptose -dépendante d'un stress du réticulum- plus prononcée que le c9,t11 CLA- sur des cellules de cancer colique, ainsi qu'une inhibition de l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase (résultats non publiés).

Conclusion

Après avoir été considérés pour leurs effets bénéfiques sur la composition corporelle – diminution de la masse grasse/augmentation de la masse maigre-, les acides gras trans dans leur globalité et plus particulièrement ceux d'origine industrielle ou de synthèse ont été associés à une augmentation du risque cardiovasculaire et de l'incidence de différents cancers. L'ensemble des informations récentes développées ci-dessus confirme la singularité

des acides gras trans, dans la mesure où leurs effets peuvent être bénéfiques ou délétères selon leur configuration géométrique, la position et le nombre d'insaturations. En tout état de cause, les acides gras issus de la biohydrogénation ruminale ou leurs dérivés présentent des effets métaboliques qui permettent de considérer au moins certains d'entre eux comme des molécules bioactives d'intérêt en particulier dans le domaine cardiovasculaire et en cancérologie. Ces données récentes apportent une impulsion nouvelle aux applications industrielles relatives à l'effet bénéfique de ces acides gras sur la santé.

Références

- [1] Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Rosner BA, Sampson LA, Hennekens CH. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet* 1993; 341:581-585.
- [2] Ascherio A, Hennekens CH, Buring JE, Master C, Stampfer MJ, Willett WC. Trans-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89:94-101.
- [3] Ascherio A, Katan MB, Zock PL, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:1994-1998.
- [4] Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1997 ; 337:1491-1499.
- [5] Oomen CM, Ocké MC, Feskens EJ, van Erp-Baart MA, Kok FJ, Kromhout D. Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. *Lancet* 2001;357:746-751.
- [6] Smith BK, Robinson LE, Nam R, Ma DW. Trans-fatty acids and cancer: a mini-review. *Br J Nutr.* 2009;102:1254-1266.
- [7] Chajès V, Thiébaud AC, Rotival M, Gauthier E, Maillard V, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir GM, Clavel-Chapelon F. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol.* 2008;167:1312-1320.
- [8] Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1601-1613.
- [9] Bendsen NT, Christensen R, Bartels EM, Astrup A. Consumption of industrial and ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Clin Nutr.* 2011 [Epub ahead of print]

- [10] Lock AL, Horne CA, Bauman DE, Salter AM. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *J Nutr.* 2005;135:1934-1939.
- [11] Watts, G.F., Jackson, P., Burke, V., and Lewis, B. Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 202-209.
- [12] Stachowska, E., Dolegowska, B., Chlubek, D., Wesolowska, T., Ciechanowski, K., Gutowski, P., Szumilowicz, H., and Turowski, R. Dietary trans fatty acids and composition of human atheromatous plaques. *Eur J Nutr* 2004; 43: 313-318.
- [13] J.W. Bortolotto, C. Reis, A. Ferreira, S. Costa, C.C. Mottin, A.A. Souto, R.M. Guaragna, Higher content of trans fatty acids in abdominal visceral fat of morbidly obese individuals undergoing bariatric surgery compared to non-obese subjects. *Obes Surg* 2005; 15: 1265-1270.
- [14] C.M. Bassett, R.S. McCullough, A.L. Edel, T.G. Maddaford, E. Dibrov, D.P. Blackwood, J.A. Austria, G.N. Pierce, Trans-fatty acids in the diet stimulate atherosclerosis. *Metabolism* 2009; 58: 1802-1808.
- [15] C.M. Bassett, A.L. Edel, A.F. Patenaude, R.S. McCullough, D.P. Blackwood, P.Y. Chouinard, P. Paquin, B. Lamarche, G.N. Pierce, Dietary vaccenic acid has antiatherogenic effects in LDLr^{-/-} mice. *J Nutr.* 2010; 140: 18-24.
- [16] Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. LDL receptor related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1572-1579.
- [17] Ishii, I., Satoh, H., Kawachi, H., Jingami, H., Matsuoka, N., Ohmori, S., Bujo, H., Yamamoto, T., Saito, Y., and Kitada, M. Intimal smooth muscle cells up-regulate beta-very low density lipoprotein-mediated cholesterol accumulation by enhancing beta-very low

density lipoprotein uptake and decreasing cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 30-38.

[18] Motard-Bélanger A, Charest A, Grenier G, Paquin P, Chouinard Y, Lemieux S, Couture P, Lamarche B. Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:593-599.

[19] Chardigny JM, Destailats F, Malpuech-Brugère C, Moulin J, Bauman DE, Lock AL, Barbano DM, Mensink RP, Bezelgues JB, Chaumont P, Combe N, Cristiani I, Joffre F, German JB, Dionisi F, Boirie Y, Sébédio JL. Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:558-566.

[20] Tardy AL, Morio B, Chardigny JM, Malpuech-Brugère C. Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. *Nutr Res Rev*. 2011;15:1-7.

[21] Malpuech-Brugère C, Mourirot J, Boue-Vaysse C, Combe N, Peyraud JL, LeRuyet P, Chesneau G, Morio B, Chardigny JM. Differential impact of milk fatty acid profiles on cardiovascular risk biomarkers in healthy men and women. *Eur J Clin Nutr*. 2010 ;64:752-9.

[22] Wang Y, Jacome-Sosa MM, Ruth MR, Goruk SD, Reaney MJ, Glimm DR, Wright DC, Vine DF, Field CJ, Proctor SD. Trans-11 vaccenic acid reduces hepatic lipogenesis and chylomicron secretion in JCR:LA-cp rats. *J Nutr*. 2009; 139:2049-2054.

[23] Field, C.J., Blewett, H.H., Proctor, S., and Vine, D. Human health benefits of vaccenic acid. *Appl Physiol Nutr Metab* 2001; 34: 979-991.

[24] Tardy AL, Giraudet C, Rousset P, Rigaudière JP, Laillet B, Chalancon S, Salles J, Loreau O Chardigny JM, Morio B. Effects of trans MUFA from dairy and industrial sources on muscle mitochondrial function and insulin sensitivity. *J Lipid Res*. 2008;4:1445-455.

- [25] Tsuzuki T, Ikeda I. Slow absorption of conjugated linoleic acid in rat intestines, and similar absorption rates of 9c,11t-conjugated linoleic acid and 10t,12c-conjugated linoleic acid. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71: 2034-2040.
- [26] Blewett HJ, Gerdung CA, Ruth MR, Proctor SD, Field CJ. Vaccenic acid favourably alters immune function in obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr.* 2009;102:526-536.
- [27] Wang Y, Lu J, Ruth MR, Goruk SD, Reaney MJ, Glimm DR, Vine DF, Field CJ, Proctor SD. Trans-11 vaccenic acid dietary supplementation induces hypolipidemic effects in JCR:LA-cp rats. *J Nutr.* 2008;138:2117-22.
- [28] Tyburczy C, Major C, Lock AL, Destailats F, Lawrence P, Brenna JT, Salter AM, Bauman DE. Individual trans octadecenoic acids and partially hydrogenated vegetable oil differentially affect hepatic lipid and lipoprotein metabolism in golden Syrian hamsters. *J Nutr.* 2009;139:257-263.
- [29] Haug A, Sjøgren P, Hølland N, Müller H, Kjos NP, Taugbøl O, Fjerdingsby N, Biong AS, Selmer-Olsen E, Harstad OM. Effects of butter naturally enriched with conjugated linoleic acid and vaccenic acid on blood lipids and LDL particle size in growing pigs. *Lipids Health Dis.* 2008;7:31.
- [30] Reynolds CM, Loscher CE, Moloney AP, Roche HM. Cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid but not its precursor trans-vaccenic acid attenuate inflammatory markers in the human colonic epithelial cell line Caco-2. *Br J Nutr.* 2008;100:13-7.
- [31] Kanwar RK, Macgibbon AK, Black PN, Kanwar JR, Rowan A, Vale M, Krissansen GW. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice. *Clin Exp Allergy.* 2008;38:208-218.
- [32] Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C., Chevalier, S., Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* 2010; 49: 76-86.

- [33] Cho, E., Spiegelman, D., Hunter, D. J., Chen, W. Y., et al., Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1079-1085.
- [34] Larsson, S. C., Bergkvist, L., Wolk, A., High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am J Clin Nutr* 2005; 8: 894-900.
- [35] Shiraishi, R., Iwakiri, R., Fujise, T., Kuroki, T., et al., Conjugated linoleic acid suppresses colon carcinogenesis in azoxymethane-pretreated rats with long-term feeding of diet containing beef tallow. *J Gastroenterol*. 2010; 45: 625-635.
- [36] Hubbard, N. E., Lim, D., Erickson, K. L., Effect of separate conjugated linoleic acid isomers on murine mammary tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2003; 190: 13-19.
- [37] Kuniyasu, H., Yoshida, K., Sasaki, T., Sasahira, T., et al., Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. *Int J Cancer* 2006; 118: 571-576.
- [38] Beppu, F., Hosokawa, M., Tanaka, L., Kohno, H., et al., Potent inhibitory effect of trans9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2006; 17: 830-836.
- [39] Lee, S. H., Yamaguchi, K., Kim, J. S., Eling, T. E., et al., Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. *Carcinogenesis* 2006; 27: 972-981.
- [40] Cho, H. J., Kwon, G. T., Park, J. H., trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid induces depolarization of mitochondrial membranes in HT-29 human colon cancer cells: a possible mechanism for induction of apoptosis. *J Med Food* 2009; 12: 952-958.

Figure 1 :

(a) Structure des acides élaïdique (trans-9 18 : 1) et trans vaccénique (trans-11 18 : 1, TVA)

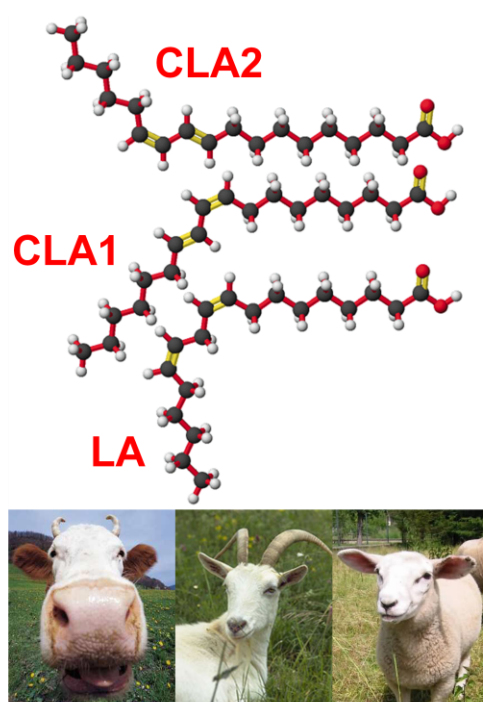
(b) Les isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) : Structures des acides *trans*-10, *cis*-12 CLA (CLA2), *cis*-9, *trans*-11 CLA (CLA1) et de l'acide linoéique (LA). D'après Pariza, M. W., Park, Y. and Cook, M. E. (2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Prog Lipid Res 40, 283-298

Figure 2 : Biohydrogénation ruminale et distribution des AGT dans les glandes mammaires

Figure 1 (a)



Figure 1 (b)



CLA = conjugated linoleic acid
ensemble des isomères conjugués géométriques et positionnels de l'acide linoléique

✓ **LA** = acide *cis-9 cis-11* linoléique

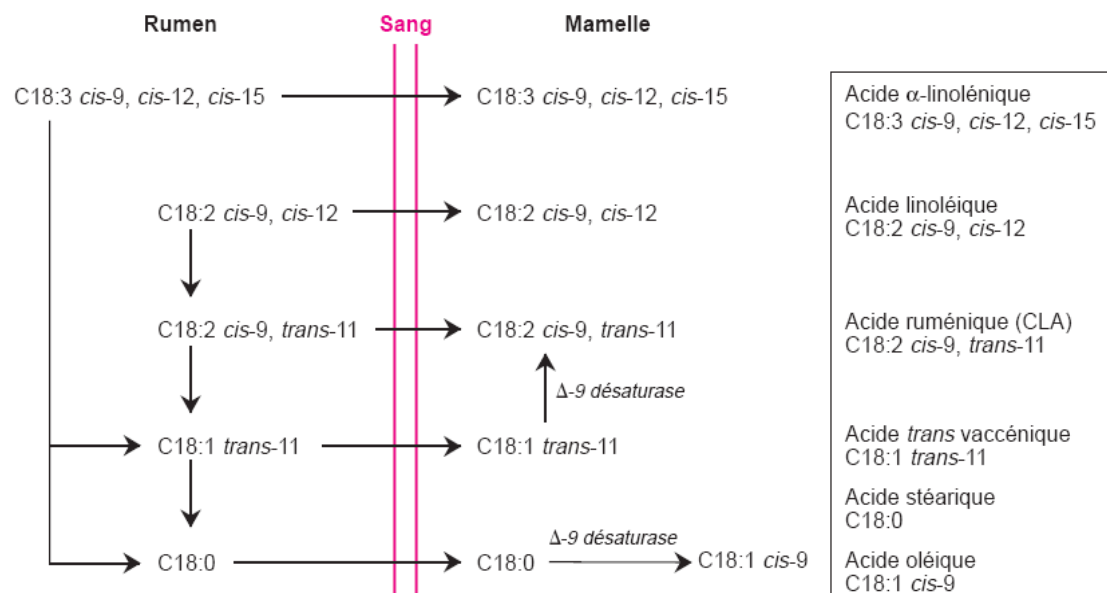
✓ **CLA1** = acide *cis-9 trans-11* linoléique
= acide ruménique

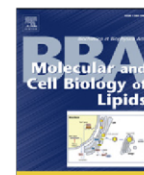
- ✓ synthétisé dans le rumen par biohydrogénation microbologique de LA et ALA
- ✓ CLA d'origine naturelle
- ✓ présent dans le lait et la viande (jusqu'à 5%)

✓ **CLA2** = acide *trans-10 cis-12* linoléique

- ✓ Détecté en très faible quantité dans les tissus des ruminants
- ✓ Dans le rumen, le mécanisme de synthèse analogue à CLA1 est impossible
- ✓ produit durant le raffinage et l'hydrogénation partielle d'huiles végétales alimentaires
- ✓ CLA d'origine synthétique

Figure 2





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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2010

Received in revised form 18 November 2010

Accepted 10 December 2010

Available online 21 December 2010

Keywords:

Metabolic syndrome

Desaturase

Elongase

Phospholipase A₂

ABSTRACT

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

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Materials and methods

2.1. Animals, organs, and blood parameters measurements

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

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

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

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

2.2. Secreted PLA₂ activity

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

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

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

2.3. Pancreas immunofluorescence

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

2.4. Liver microsomes preparation

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

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

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

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

2.6. Fatty acid of total lipids composition

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

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

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

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

Table 1
Primers sequences used for RT-PCR.

Gene	Primer sequences	Expected size (pb)	Number of cycles
β-Actin	S: 5' ATGATATCGCCGCTCGTCGTC 3' AS: 5' AGGTCCCGCCAGCAGGTCCAG 3'	547	23
L19	S: 5' CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG 3' AS: 5' GGACAGAGTCTTGATGATCTC 3'	195	23
FAS	S: 5' CTCACCCAGGGGTAGAGATAAGTA 3' AS: 5' AGACTCCAACGAGCTAGAGACATT 3'	440	25
SCD-1	S: 5' TGGGAAGTGAAGCGAGCAACCG 3' AS: 5' AGAGGGGACCTCTTCTATCTTCTC 3'	149	22
D6D	S: 5' ATGGGGAAGGAGGTAAAC 3' AS: 5' GAAATCCAGGTCCAGGTG 3'	243	24
D5D	S: 5' CAACCATCTCTTCTTCC 3' AS: 5' AGGTGATTCATGTTGAGGTG 3'	204	24
Elovl-1	S: 5' CCCTACCTTTGGTGAAGAA 3' AS: 5' TCCAGATGAGGTGGATGATG 3'	136	30
Elovl-2	S: 5' TTGGCTGTCTCATCTTCCA 3' AS: 5' GGGAACCATTTCTCACTTC 3'	134	30
Elovl-5	S: 5' TCAACAGCTTCATCCACGTC 3' AS: 5' AGAGGCCCTTCTTGTGTG 3'	266	21
Elovl-6	S: 5' GCCATGTTTCATCAGTTGTC 3' AS: 5' CCGATGTAGGCTCAAGAA 3'	191	27
SREBP-1c	S: 5' GCACAGCAACCAAGAACTCA 3' AS: 5' CCAGGTCTTTCAGTGATTGC 3'	177	25
sPLA ₂ IIA	S: 5' CTGGAGTTTGGGCAATGAT 3' AS: 5' ACGTTTCTCCAGACGGTTGT 3'	165	27
sPLA ₂ VII	S: 5' TTCCAAGGCTCTCAGTGCAA 3' AS: 5' ATCAAGGCAATCCACATC 3'	202	30
cPLA ₂ IVA	S: 5' CCACCCTGATTTTCCAGAGA 3' AS: 5' GGCAACATCAGCTCTGACA 3'	316	27
cPLA ₂ VIA	S: 5' GCCAACAGCACAGAGAATGA 3' AS: 5' CTGTAGCACTGGGGATTGT 3'	180	27
Insulin	S: 5' CACCTTTGTGGTCTCACT 3' AS: 5' GACGGGACTTGGGTGTAG 3'	82	18
Glucagon	S: 5' AACACATTGCCAACGTCA 3' AS: 5' CAGCTATGCCGACTTCTCC 3'	125	23

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

2.8. Western blotting

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

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

2.9. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Zucker rats carbohydrate and lipid status

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

Table 2
Antibodies used for Western blotting.

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

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

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

3.2. Unsaturated fatty acid metabolism

3.2.1. Biosynthesis

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

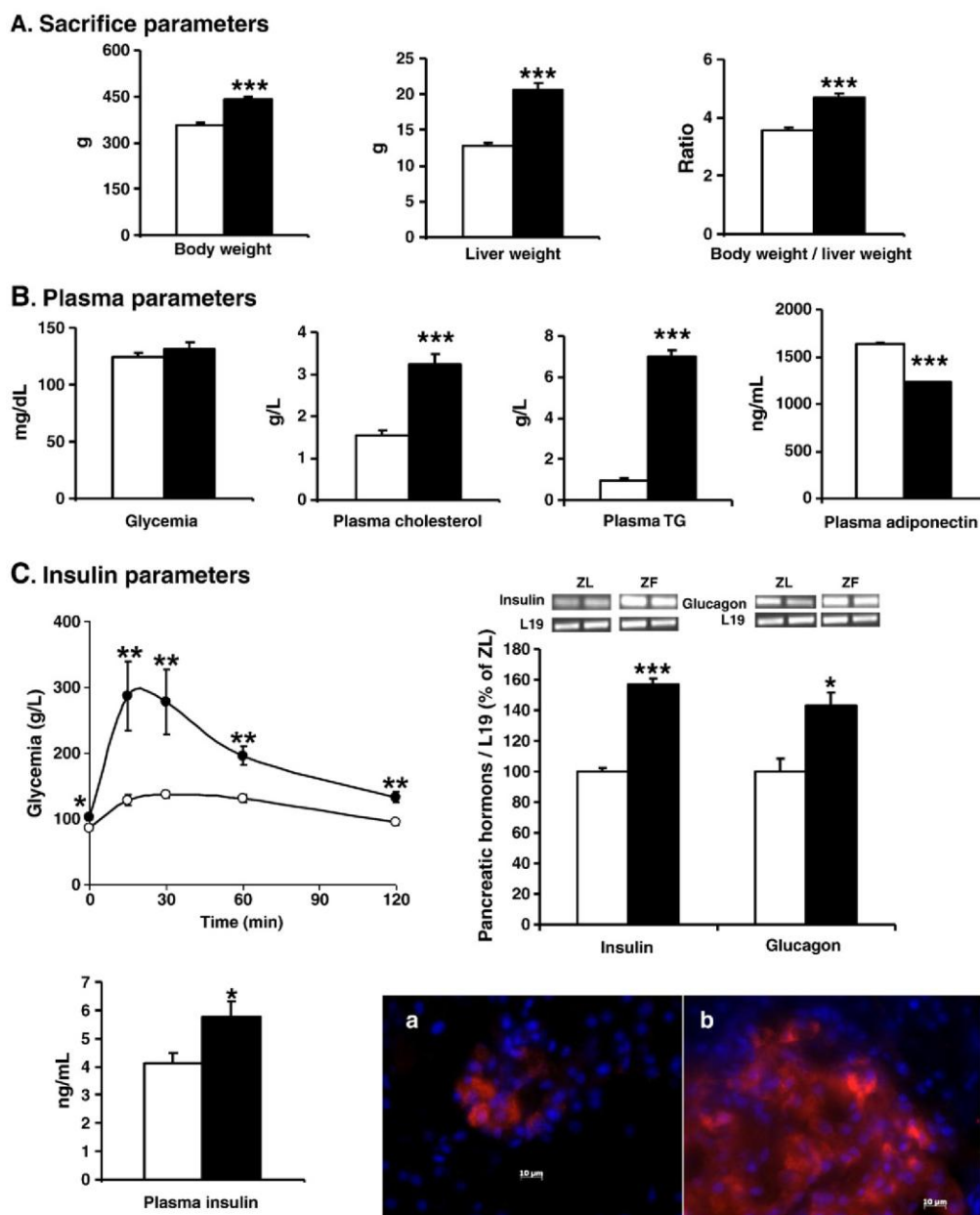


Fig. 1. Characterization of ZL (□) and ZF (■) rats. A: Sacrifice parameters at 14 weeks of age. Body weight, liver weight, and ratio of body weight/liver weight. B: Plasma parameters. Glycemia during feeding. Plasma cholesterol and triglycerides (TG) after a 12-h fasting. Plasma adiponectin levels in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

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

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

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

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

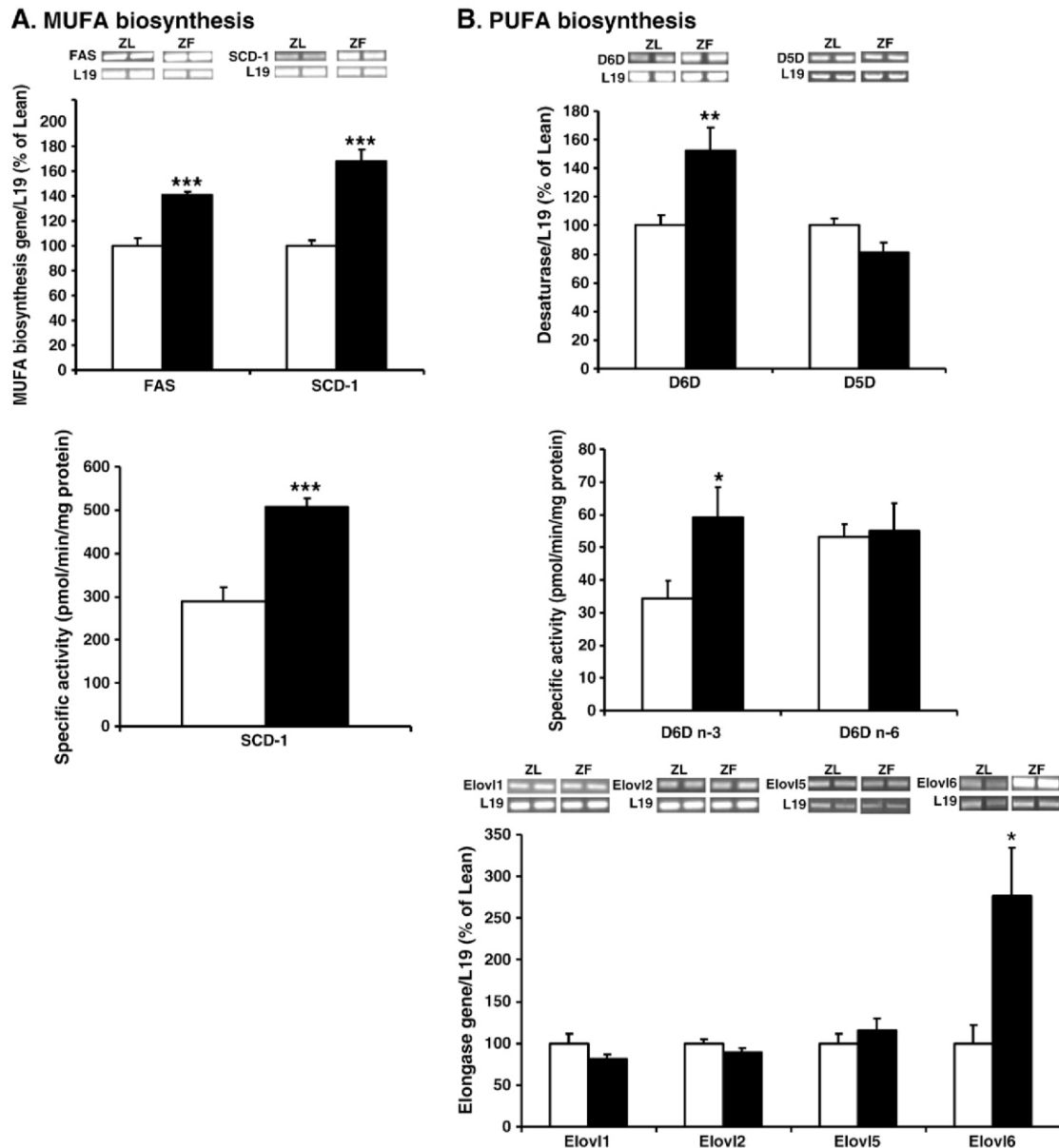


Fig. 2. Fatty acid biosynthesis enzymes expression and activity in the liver of ZL (□) and ZF (■) rats. A: FAS and SCD-1 hepatic gene expression, and SCD-1-specific activity. B: Desaturases and elongases hepatic mRNA expression, and D6D *n*-3 and *n*-6 specific activities. C: Hepatic SREBP-1c gene and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

C. SREBP-1c expression

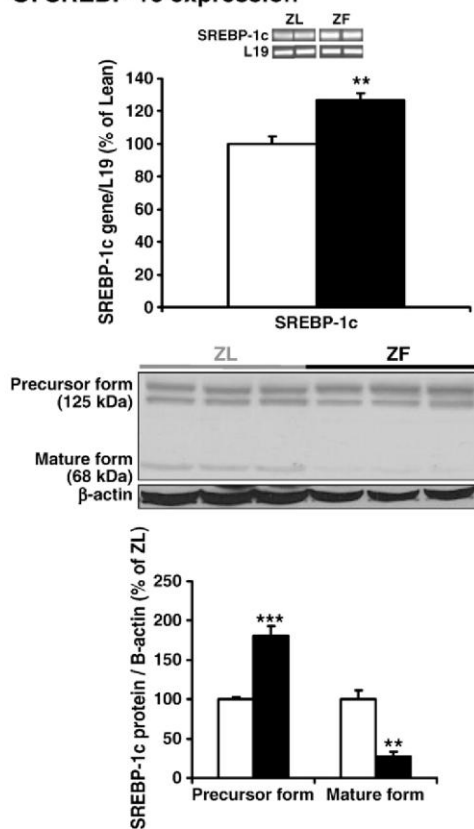


Fig. 2 (continued).

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

Table 3

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

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

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

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

3.2.2. Signalling

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

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

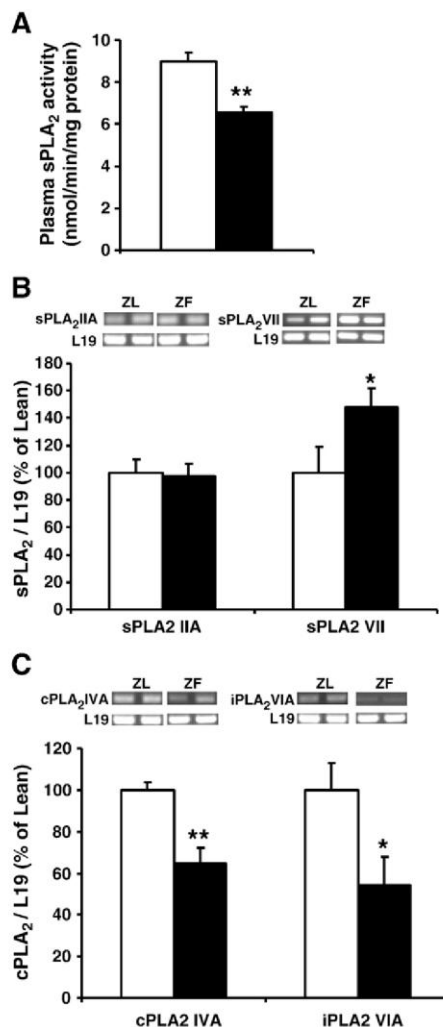


Fig. 3. Phospholipase A₂ regulation in ZL (□) and ZF (■) rats. A: Plasma sPLA₂ activity. B: Hepatic secreted (sPLA₂ IIA and sPLA₂ VII) mRNA expression. C: Hepatic cytosolic PLA₂ (cPLA₂ IVA and cPLA₂ VIA) gene expression. Values are expressed as means $\pm$ SEM of eight rats per lot. *Shows significant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

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

4. Discussion

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

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

Besides, our results also showed specific disturbances in liver PUFA biosynthesis enzymes, since both D6D and Elovl-6 were increased in ZF animals, whereas no change was observed for D5D, Elovl-1, -2, and -5. Moreover, liver fatty acid of total lipids analysis revealed a decline in ZF hepatic PUFA content (i.e., 20:4 n-6 and 22:6 n-3). This decrease has also been observed in ob/ob mice [18] and might appear inconsistent with the increase in D6D activity and expression. However, similarly to ob/ob mice, Zucker rats are hyperphagic and their ingestion of excessive calories increased insulin pancreatic and plasmatic content, leading to enhance *de novo* lipogenesis and MUFA synthesis.

D6D, which catalyzes the first desaturation reaction, is one of the rate-limiting step of PUFA biosynthesis pathway. This enzyme is known to be highly regulated by several physio-pathological conditions such as diabetes [18,30] and obesity [18]. The observed increase of both liver D6D expression (+50%) and activity (+73% D6D n-3) in ZF developing MS agree with the changes in hepatic D6D activity and expression in 6-week-old ob/ob mice [18,31]. However, previous studies conducted in our laboratory suggested no difference between ZF and ZL rats on the delta-6 desaturation rate [32]. This discrepancy may be related with the glucose status of the animals: in the present case, studies were carried out on young adults rats (3 months) with glucose intolerance, whereas the previous works were realized on 6-month animals, with installed type 2 diabetes. Indeed, a previous

report has evidenced in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rat, that desaturases were not modified [33]. Additionally, no change in delta-5 and delta-6 desaturation has been observed in mice rendered type 2 diabetics by a high-fat diet [18]. In contrast to desaturases, elongases have been only recently recognized as important contributors for the regulation of hepatic lipid composition [18]. These enzymes have been shown to be highly regulated in metabolic diseases [34], but physiological control of fatty acid elongation remains poorly defined. In rat, Elovl-1 and -6 elongate SFA and MUFA, Elovl-2 is responsible for C20-22 elongation [35] and Elovl-5 uses a broad substrate array, C16-22 [18]. Our results evidenced for the first time that Elovl-6 mRNA expression was strongly increased during MS establishment, whereas Elovl-1, -2, and -5 were not. Both Elovl-5 and -6 are also upregulated in ob/ob mice [18], and Elovl-5 has recently been shown to regulate hepatic lipid and carbohydrate composition [36]. The present work showed that Elovl-6 may also contribute specifically to the fatty liver phenotype since this enzyme is induced along with *de novo* lipogenesis and SCD-1 activity.

Elongase and desaturase gene expressions are known to be regulated by certain transcription factors, notably SREBP-1c [17,37,38]. In this study, the precursor form of SREBP-1c was enhanced in ZF rats, but the mature form was decreased, indicating that SREBP-1c was inactivated. Whereas several studies have shown the implication of SREBP-1c in regulating SCD-1, delta-6, and -5 desaturases as well as elongases [17,37,38], this work indicated that this transcription factor may not be implicated in the development of fatty liver during the establishment of MS. Such liver SREBP-independent desaturase regulation has been yet observed in SHR fed a PUFA diet [25]. SREBP-1c was also shown to be inactive in stimulating SCD-1 transcription in Chinese Hamster Ovary cells [39]. Moreover, in rat hepatocyte primary cell culture, SREBP-1c was not sufficient to induce lipogenic enzymes in response to insulin treatment [40]. The mechanisms of liver genes regulation by SREBP-1c are complex and may involve other transcription factors.

Once PUFA, and more specifically AA, are biosynthesized into membrane phospholipids, they can be released by the action of PLA₂ enzymes and then transformed into downstream signalling molecules such as eicosanoids, cyclooxygenase, and lipoxygenase metabolites of AA. There is general agreement that the PLA₂-mediated hydrolysis of phospholipids is the major pathway controlling AA mobilization in cells [41]. As desaturases and elongases, the physiological involvement of this superfamily of enzymes, during establishment of MS, is not yet elucidated. However, PLA₂ might be attractive targets for drugs to control type 2 diabetes, fatty liver disease, and other manifestations of the MS.

MS being characterized by a chronic inflammation, sPLA₂ – in particular sPLA₂ IIA and Lp-PLA₂ – being described as novel plasma increased markers of inflammation [42,43], we measured total plasma sPLA₂ activity. Our results showed an unexpected decrease of sPLA₂ activity in ZF rat plasma, compared to diverse inflammatory conditions [5]. Moreover, 3-month-old ZF animals showed all the feature of MS: obesity, glucose intolerance corroborated by hyperinsulinemia, and fatty liver lipid dysregulation. Furthermore, the enzymatic assay kit used in this study allows the detection of secreted PLA₂, except Lp-PLA₂. This enzyme has been recently described as a novel risk factor for cardiovascular disease [42,44]. Our results showed a significant increase of hepatic mRNA expression of Lp-PLA₂, which may indicate a novel role for this enzyme in the establishment of MS.

Several studies have shown the implication of different isoforms of PLA₂ in the development of metabolic diseases. Thus, sPLA₂-IB-null mice have been found to be resistant to high-fat-diet-induced obesity and insulin resistance and to exhibit reduced postprandial hyperglycemia, superior glucose tolerance, and increased insulin sensitivity compared with wild-type littermates [45]. Using type IVA PLA₂-deficient mice, it was found that this isoform was involved in the storage of lipids in the liver under normal and high-fat diet [46,47].

More recently, it has been shown that male iPLA₂ type VIA-null mice exhibited impaired glucose tolerance, but transgenic null mice that overexpress this isoform in insulin-secreting b-cells of pancreatic islets exhibited improved glucose tolerance [48]. In contrast, mice-deficient group VIB PLA₂ exhibited relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet [49]. Here, we showed for the first time a specific decrease of liver gene expression type IVA and VIA PLA₂ during installation of MS, which evidenced that these PLA₂ isoforms may play an important and previously unrecognized role in liver homeostasis. The exact role and the mechanism of regulation of these PLA₂ isoforms remained to be elucidated.

Altogether, our data show that the development of MS is accompanied with a strong upregulation of both liver fatty acid elongases (and more specifically Elovl-6) and desaturase (SCD-1 and delta-6) expressions. We evidenced here for the first time that specific PLA₂ isoforms (type IVA and VIA) are differently regulated in the fatty liver of obese animals and are important contributors to liver lipid homeostasis, suggesting that these enzymes can be potential targets to ameliorate liver lipid dysregulation during the establishment of MS.

Acknowledgments

This work was supported by founding from INSERM and the Regional Council of Burgundy. Cécile Fèvre was supported by INSERM/Regional Council of Burgundy. The authors highly acknowledge Dr. André Bouchot for technical assistance for the immunofluorescence study. The authors wish also to thank Jean-Pierre Gay for proofreading the manuscript.

References

- [1] G. Perez-Chacon, A.M. Astudillo, D. Balgoma, M.A. Balboa, J. Balsinde, Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 1103–1113.
- [2] J.E. Burke, E.A. Dennis, Phospholipase A2 biochemistry, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (2009) 49–59.
- [3] J.E. Burke, E.A. Dennis, Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling, *J. Lipid Res.* 50 (Suppl) (2009) S237–S242.
- [4] E.A. Capper, L.A. Marshall, Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis, *Prog. Lipid Res.* 40 (2001) 167–197.
- [5] B.B. Boyanovsky, N.R. Webb, Biology of secretory phospholipase A2, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23 (2009) 61–72.
- [6] Y. Kita, T. Ohto, N. Uozumi, T. Shimizu, Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1317–1322.
- [7] V. Magriotti, G. Kokotos, Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases, *Expert Opin. Ther. Pat.* 20 (2010) 1–18.
- [8] J.J. Seilhamer, W. Pruzanski, P. Vadas, S. Plant, J.A. Miller, J. Kloss, L.K. Johnson, Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5335–5338.
- [9] S. Masuda, M. Murakami, K. Komiyama, M. Ishihara, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, Various secretory phospholipase A2 enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells, *FEBS J.* 272 (2005) 655–672.
- [10] S.M. Boekholdt, T.T. Keller, N.J. Wareham, R. Luben, S.A. Bingham, N.E. Day, M.S. Sandhu, J.W. Jukema, J.J. Kastelein, C.E. Hack, K.T. Khaw, Serum levels of type II secretory phospholipase A2 and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 839–846.
- [11] J.D. Clark, L.L. Lin, R.W. Kriz, C.S. Ramesha, L.A. Sultzman, A.Y. Lin, N. Milona, J.L. Knopf, A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP, *Cell* 65 (1991) 1043–1051.
- [12] J. Balsinde, I.D. Bianco, E.J. Ackermann, K. Condeelis, E.A. Dennis, Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8527–8531.
- [13] S. Tabuchi, N. Uozumi, S. Ishii, Y. Shimizu, T. Watanabe, T. Shimizu, Mice deficient in cytosolic phospholipase A2 are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury, *Acta Neurochir. Suppl.* 86 (2003) 169–172.
- [14] T. Nagase, N. Uozumi, S. Ishii, K. Kume, T. Izumi, Y. Ouchi, T. Shimizu, Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2, *Nat. Immunol.* 1 (2000) 42–46.
- [15] N. Uozumi, K. Kume, T. Nagase, N. Nakatani, S. Ishii, F. Tashiro, Y. Komagata, K. Maki, K. Ikuta, Y. Ouchi, J. Miyazaki, T. Shimizu, Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition, *Nature* 390 (1997) 618–622.
- [16] D.W. Gilroy, J. Newson, P. Sawmynaden, D.A. Willoughby, J.D. Croxtall, A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation, *FASEB J.* 18 (2004) 489–498.
- [17] R. Meshkani, K. Adeli, Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease, *Clin. Biochem.* 42 (2009) 1331–1346.
- [18] Y. Wang, D. Botolin, J. Xu, B. Christian, E. Mitchell, B. Jayaprakasam, M.G. Nair, J.M. Peters, J.V. Busik, L.K. Olson, D.B. Jump, Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 2028–2041.
- [19] D. Hall, C. Poussin, V.R. Velagapudi, C. Empsen, M. Joffraud, J.S. Beckmann, A.E. Geerts, Y. Ravussin, M. Ibberson, M. Oresic, B. Thorens, Peroxisomal and microsomal lipid pathways associated with resistance to hepatic steatosis and reduced pro-inflammatory state, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 31011–31023.
- [20] J.P. Poisson, Y.S. Huang, D.E. Mills, R.J. de Antueno, P.R. Redden, X. Lin, M. Narce, D. F. Horrobin, Effect of salt-loading and spontaneous hypertension on in vitro metabolism of [1-14C]linoleic and [2-14C]dihomo-gamma-linolenic acids, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 49 (1993) 57–66.
- [21] E. Layne, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, *Meth. Enzymol.* 3 (1957) 447–455.
- [22] S. Bellenger-Germain, J.P. Poisson, M. Narce, Antihypertensive effects of a dietary unsaturated FA mixture in spontaneously hypertensive rats, *Lipids* 37 (2002) 561–567.
- [23] M. Narce, P. Asdrubal, M.C. Delachambre, J. Gresti, J.P. Poisson, Influence of spontaneous hypertension on n-3 delta-6-desaturase activity and fatty acid composition of rat hepatocytes, *Mol. Cell. Biochem.* 152 (1995) 7–12.
- [24] H.T. Slover, E.J. Lanza, Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56 (1979) 933–943.
- [25] J. Bellenger, S. Bellenger, L. Clement, S. Mandard, C. Diot, J.P. Poisson, M. Narce, A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension, *FASEB J.* 18 (2004) 773–775.
- [26] J.-F. Merlin, J. Gresti, S. Bellenger, M. Narce, Fast high performance liquid chromatography analysis in lipidomics: separation of radiolabelled fatty acids and phosphatidylcholine molecular species using on monolithic C18 silica column, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 163–167.
- [27] K.D. Bruce, C.D. Byrne, The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder, *Postgrad. Med. J.* 85 (2009) 614–621.
- [28] M.T. Flowers, J.M. Ntambi, Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 85–91.
- [29] J.M. Ntambi, M. Miyazaki, J.P. Stoeck, H. Lan, C.M. Kendziora, B.S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J.M. Friedman, A.D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11482–11486.
- [30] C. Comte, S. Bellenger, J. Bellenger, C. Tessier, J.P. Poisson, M. Narce, Effects of streptozotocin and dietary fructose on delta-6 desaturation in spontaneously hypertensive rat liver, *Biochimie* 86 (2004) 799–806.
- [31] S. Hughes, D.A. York, Hepatic delta 6-desaturase activity in lean and genetically obese ob/ob mice, *Biochem. J.* 225 (1985) 307–313.
- [32] J.P. Blond, C. Henchiri, J. Bezard, Delta 6 and delta 5 desaturase activities in liver from obese Zucker rats at different ages, *Lipids* 24 (1989) 389–395.
- [33] M.A. Montanaro, O.J. Rimoldi, R.A. Igal, S. Montenegro, M.C. Tarres, S.M. Martinez, R.R. Brenner, Hepatic delta9, delta6, and delta5 desaturations in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rats, *Lipids* 38 (2003) 827–832.
- [34] Y. Wang, D. Botolin, B. Christian, J. Busik, J. Xu, D.B. Jump, Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 706–715.
- [35] A.E. Leonard, S.L. Pereira, H. Sprecher, Y.S. Huang, Elongation of long-chain fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 36–54.
- [36] Y. Wang, M. Torres-Gonzalez, S. Tripathy, D. Botolin, B. Christian, D.B. Jump, Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1538–1552.
- [37] T. Matsuzaka, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Yoshikawa, A.H. Hasty, Y. Tamura, J. Osuga, H. Okazaki, Y. Iizuka, A. Takahashi, H. Sone, T. Gotoda, S. Ishibashi, N. Yamada, Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 107–114.
- [38] J.D. Horton, N.A. Shah, J.A. Warrington, N.N. Anderson, S.W. Park, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 12027–12032.
- [39] J.T. Pai, O. Guryev, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26138–26148.
- [40] A.K. Stoeckman, H.C. Towle, The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27029–27035.
- [41] J. Balsinde, M.V. Winstead, E.A. Dennis, Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Lett.* 531 (2002) 2–6.
- [42] M.A. Corson, P.H. Jones, M.H. Davidson, Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker, *Am. J. Cardiol.* 101 (2008) 41F–50F.
- [43] D. Divchev, B. Schieffer, The secretory phospholipase A2 group IIA: a missing link between inflammation, activated renin-angiotensin system, and atherogenesis? *Vasc. Health Risk Manage.* 4 (2008) 597–604.
- [44] M. Madjid, M. Ali, J.T. Willerson, Lipoprotein-associated phospholipase A2 as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature, *Tex. Heart Inst. J.* 37 (2010) 25–39.

- [45] K.W. Huggins, A.C. Boileau, D.Y. Hui, Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in Group 1B PLA2-deficient mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (2002) E994–E1001.
- [46] H. li, N. Yokoyama, S. Yoshida, K. Tsutsumi, S. Hatakeyama, T. Sato, K. Ishihara, S. Akiba, Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A2-knockout mice, *PLoS ONE* 4 (2009) e8089.
- [47] H. li, S. Hatakeyama, K. Tsutsumi, T. Sato, S. Akiba, Group IVA phospholipase A2 is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 86 (2008) 12–17.
- [48] S. Bao, H. Song, M. Wohltmann, S. Ramanadham, W. Jin, A. Bohrer, J. Turk, Insulin secretory responses and phospholipid composition of pancreatic islets from mice that do not express Group VIA phospholipase A2 and effects of metabolic stress on glucose homeostasis, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20958–20973.
- [49] H. Song, M. Wohltmann, S. Bao, J.H. Ladenson, C.F. Semenkovich, J. Turk, Mice deficient in group VIB phospholipase A2 (iPLA2gamma) exhibit relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2010) E1097–E1114.

Summary:

Stearoyl Co-A desaturase (SCD) is the key enzyme of the metabolism of mono-unsaturated fatty acids (MUFA). Its activity Δ 9 desaturase introduces a double bond cis in position 9 of saturated fatty acids (SFA), induced formation of MUFA. Impaired biosynthesis of MUFA is involved in many diseases such as cancer and cardiovascular disease.

Cancer cells have a de novo synthesis of fatty acids increased with an accumulation MUFA. This change in the metabolism of fatty acids is associated with overexpression SCD1 which catalyzes the conversion of saturated fatty acids, monounsaturated fat. Several reports have shown that inhibition of SCD1 leads to blockage of proliferation and induction of apoptosis in cancer cells. However, the mechanism of cell death activation remains to be understood. In this study, we demonstrated that the extinction of SCD1 by siRNA, synthetic or natural inhibitor induces the abolition of de novo MUFA synthesis in cancer cells or not. SCD1 inhibition activates cell death by apoptosis only in cancer cells. In addition, depletion of SCD1 induced endoplasmic reticulum stress, these features being XBP1 mRNA splicing, phosphorylation of eIF2 α and increased expression of CHOP. However, activation of ER stress in the abolition of SCD1 is special because we do not show changes in expression of the chaperone protein GRP78, another characteristic of ER stress. Finally, we showed that induction of CHOP is involved in activation of cell death during shutdown of SCD1. Indeed, overexpression of dominant negative constructs and anti-CHOP partially restores the viability of cancer cells depleted of SCD1. In conclusion, these results suggest that inhibition of de novo synthesis of MUFA through the extinction of SCD1 could be a promising therapeutic target against cancer by inducing cell death through the activation of the stress and endoplasmic reticulum transcription factor CHOP.

We are also interested in the regulation of SCD by different MUFA in a cellular model linked with atherosclerotic disease. Many risk factors contribute to the development of this disease, including trans fatty acid (TFA). Indeed, epidemiological studies have correlated the consumption of TFA from industrial sources and the risk of cardiovascular disease. TFA could play their atherogenic effects by altering the lipid metabolism of vascular cells. The accumulation of lipids in vascular smooth muscle cells (SMC) is a feature of atherosclerosis and a consequence of increased lipogenesis. The expression of SCD is associated with the induction of lipogenesis and development of atherosclerosis. We are interested in the regulation of SCD1 activity in SMCs exposed to isomers of MUFA C18 [cis-9 oleic (OL), trans-11 vaccenic acid (TVA) and acid trans -9 elaidic (ELA)].

We showed that SCD which is present in SMC was regulated differently depending on the isomer C18: 1. Indeed, we observed an increase in the expression and activity of SCD1 as a result of treatment with ELA and a significant decrease for treatment with OL. The effect of the TVA on the expression and activity in SMCs remains modest decrease is nevertheless found.

We correlated the activity of SCD with its level of protein expression. Indeed, it is increased by the ELA and decreased by OL. This regulation is posttranslational and expression of SCD1 during treatment with the OL and the ELA is modulated at the transcriptional level.

To conclude, we demonstrated a modulation of SCD activity by MUFA (C18: 1) cis and trans-mediated regulation of SCD1 gene transcription.

