

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DE LA STÉAROYL-COENZYME A DÉSATURASE-1
DANS LA MIGRATION DES CELLULES
DE CANCER DU SEIN MÉTASTATIQUE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARINE LINGRAND

JUIN 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué à la réussite de mon projet de maîtrise. Premièrement, je suis extrêmement reconnaissante envers la Dre Catherine Mounier, ma directrice de recherche, pour ses précieux conseils ainsi que pour son soutien. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir proposé ce sujet passionnant pendant ces deux belles années. Catherine est pour nous comme une maman, non pas une mère biologique mais une plutôt une « mère de biologie » ...! Je remercie également le Dr Éric Rassart, mon co-directeur de maîtrise pour son expertise infinie dans le domaine de la biologie moléculaire. Je tiens à remercier particulièrement le Dr Karl-Frédéric Bergeron qui m'a encadrée durant ces deux années de recherche. Merci de m'avoir aidée à mener à bien ce projet et de m'avoir transmis toutes ces connaissances en termes de techniques de laboratoire et d'analyse de résultats. De plus, je remercie Denis Flipo pour son temps lors de ma formation à la microscopie confocale. Par ailleurs, ces remerciements ne rimeraient à rien si je ne mentionnais pas la « gang Mounier » dont les membres sont devenus de vrais amis : Frédéric Desmarais, Gaëtan Ravaut, Sabri Rial et Alexandre Légiot et, avec qui le labeur rime toujours avec bonne humeur. Merci pour leur aide dans ce projet et surtout pour leur soutien dans les bons moments et les moins bons! Je remercie aussi toutes les sympathiques personnes travaillant au pavillon des Sciences Biologiques (professeurs, techniciens, étudiants) ainsi que les stagiaires qui nous ont accompagnés pendant la durée de cette maîtrise. Finalement, je tiens à remercier mes proches, les derniers mais pas les moindres, et tout particulièrement mes parents qui me permettent de poursuivre mes rêves même à des milliers de kilomètres. Et finalement, mon compagnon, Florent Laval, qui sait exactement ce que c'est que de sacrifier des soirées et des fins de semaine au laboratoire par passion.

DÉDICACE

À mes proches, ainsi qu'à toutes les personnes
Qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail,
Ma reconnaissance la plus profonde
Pour votre soutien et vos encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
DÉDICACE	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xvi
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xviii
RÉSUMÉ	xx
ABSTRACT.....	xxii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I CADRE THÉORIQUE DU SUJET.....	5
1.1.Le cancer.....	5
1.1.1. Généralités sur le cancer métastatique	5
1.1.2. De la tumeur aux métastases : la transition épithélio-mésenchymateuse et la formation de métastases	6

1.2.Le cancer du sein	9
1.2.1. Statistiques liées cancer du sein.....	9
1.2.2. Le sein : morphologie et développement	10
1.2.3. Les différents stades de cancer du sein	12
1.2.4. Les différents sous-types de cancers du sein	14
1.2.5. Le cancer du sein triple négatif.....	16
1.3.Rôle de la migration, de l'invasion et de l'adhésion dans le processus de métastase..	16
1.3.1. La migration cellulaire	16
1.3.1.1. La migration cellulaire collective	17
1.3.1.2. La migration individuelle.....	18
1.3.2. L'invasion cellulaire	20
1.3.3. L'adhésion cellulaire.....	20
1.3.4. La directionnalité associée à la migration.....	22
1.4.Métabolisme énergétique et cancer du sein	24
1.4.1. Effet Warburg et glycolyse	25
1.4.2. Le métabolisme de la glutamine ou glutaminolyse.....	26
1.4.3. Lipogenèse et métabolisme des acides gras.....	27
1.4.4. Les stéaroyl-coA désaturases	29
1.4.4.1. Définitions	29
1.4.4.2. SCD1 et son implication dans la progression du cancer du sein	30
1.5.Signalisation moléculaire médiée par les lipides cellulaires ou bioactifs.....	31
1.5.1. Activation des récepteurs couplés à une protéine G par les acides gras.....	31
1.5.2. Les phospholipases	33
1.5.2.1. La phospholipase C γ	35
1.5.2.2. La phospholipase D2	36

1.5.3.	La voie de signalisation mTOR	37
1.5.4.	La voie Wnt / β -caténine.....	39
CHAPITRE II HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS		41
2.1.	Hypothèses.....	41
2.2.	Objectifs.....	43
CHAPITRE III.....		45
3.1.	Abstract.....	46
3.2.	Introduction.....	47
3.3.	Material and Methods	49
3.4.	Results.....	53
3.5.	Discussion	57
3.6.	Figures	62
3.7.	Supplementary Figures	71
CHAPITRE IV MÉTHODOLOGIE DES RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES		73
4.1.	Culture cellulaire et traitements.....	73
4.2.	Étude du potentiel migratoire par recouvrement de la plaie (scratch test)	74
4.3.	Extraction protéique, dosage et immunobuvardage.....	75
4.4.	Étude de la morphologie par immunofluorescence.....	76
4.5.	Analyses statistiques	77
CHAPITRE V FIGURES SUPPLÉMENTAIRES		79

CHAPITRE VI RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	83
CHAPITRE VII DISCUSSION.....	87
CONCLUSION.....	101
RÉFÉRENCES	103

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Processus de formation de la métastase.....	8
Figure 1.2 La transition épithélio-mésenchymateuse.....	9
Figure 1.3 Morphologie du sein adulte et du sein au cours de l'allaitement	11
Figure 1.4 Régulation des propriétés de contractilité et de l'adhésion à la membrane par les récepteurs à l'EGF.....	22
Figure 1.5 Schématisation de la directionnalité	24
Figure 1.6 Différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et l'effet Warburg.....	26
Figure 1.7 Mécanismes de reprogrammation métabolique simplifiés dans les cellules cancéreuses de sein	29
Figure 1.8 Substrats et produits de SCD1	30
Figure 1.9 Site de clivage des différentes classes de phospholipases	34
Figure 1.10 Les complexes mTORC1 et mTORC2 et leurs rôles dans la signalisation des cellules cancéreuses	39

Figure 1.11 Représentation schématique de la voie Wnt canonique	40
Figure 3.1. SCD1 expression is associated with morbid outcomes in metastatic breast cancer patients.	62
Figure 3.2. Oleic acid stimulates scratch wound closure in several breast cancer cell lines.	63
Figure 3.3. Oleic acid increases MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell migration speed and directionality.	64
Figure 3.5. Oleic acid promotes MDA-MB-231 wound recovery via PLD and mTOR activities.	66
Figure 3.6. MDA-MB-231 cell migration depends on the activity of SCD1 and PLD enzymes.	68
Figure 3.7. Concomitant inhibition of SCD1 and PLD activity decreases MDA-MB-231 cell proliferation and impedes cell viability.	69
Figure 3.8. Hypothetical model of SCD1 and PLD2 activity in triple-negative breast cancer cell migration.	70
Supplementary Figure 3.1. <i>PLD1</i> gene expression is not significantly associated to metastatic breast cancer patient outcomes.	71
Supplementary Figure 3.2. SCD1 protein expression is similar in the three breast cancer cell lines tested.	72

Figure supplémentaire 5.1. La modulation de l'activité de SCD1 régule son expression dans les lignées cellulaires de cancer du sein	79
Figure Supplémentaire 5.2. L'activité de PLD2 joue un rôle sur la régulation de la phosphorylation de la protéine FAK.....	80
Figure Supplémentaire 5.3. L'acide oléique augmente la migration des MDA-MB-231 en régulant les voies PLC et PI3K	81
Figure 7.1. Modèle et simplifié de l'activité de SCD1 et de PLD2 dans la régulation de la migration des cellules de cancer du sein triple négatif.....	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Définition du grade et des stades des cancers du sein.....	13
Tableau 1.2 Classification moléculaire des sous-types de cancer du sein	15

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

Acronymes francophones

ACACA	Acétyl-coA carboxylase
AO	Acide oléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BC	Breast Cancer
DAG	Diacyl glycérol
E-cadhérine	Protéine cadhérine de type épithélial
MDA-MB-231	Lignée cellulaire MDA-MB-231-luc-D3H2LN
MEC	Matrice extra-cellulaire
N-cadhérine	Protéine cadhérine de type neural
OMS	Organisation mondiale de la santé
p70S6K	Kinase ribosomique p70
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PR	Récepteur de la progestérone
ER	Récepteur de l'œstrogène
SCD1	Stéaroyl-coenzyme désaturase-1
SCD5	Stéaroyl-coenzyme désaturase-5
Ser	Sérine
siRNA	petit ARN interférent
siSCD1	siRNA contre SCD1
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
PIP2	Phosphatidyl inositol-4,5-bi-phosphate
PIP3	Phosphatidyl inositol-3,4,5-tri-phosphate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
TEM	transition épithélio-mésenchymateuse
Thr	Thréonine

Acronymes anglophones

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein
AMP	Adenosine Mono-Phosphate
AMPK	AMP activated protein kinase
ANOVA	ANalysis Of VAriance
BRCA	Breast Cancer Gene
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole
DMSO	DiMethylSulfOxyde
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
ECL	Enhanced chemiluminescence
eiF4E	Eukaryotic translation initiation Factor 4 ^E
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAS	Fatty Acid Synthase
FBS	Fetal Bovine Serum
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HRP	Horseradish peroxidase
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1	mTOR Complex 1
mTORC2	mTOR Complex 2
MTT	3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2, diphenyl Tetrazolium bromide
MUFA	Mono-Unsaturated Fatty Acids
OA	Oleic Acid
p70S6K	Kinase ribosomique p70
PA	Phosphatidic Acid
POA	PalmitOleic Acid
PLD	Phospholipase D
SEM	Standard Error of the Mean
SREBP-1	Sterol Regulatory Element Binding Protein-1
TNBC	Triple Negative Breast Cancer

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Unités de longueur

m	Mètre
μm	Micromètre
nm	Nanomètre

Unités de masse

g	Gramme
mg	Milligramme
ng	Nanogramme
kDa	KiloDalton

Unités de volume

l	Litre
ml	Millilitre
μl	Microlitre

Concentrations

mM	Millimolaire
μM	Micromolaire
nM	Nanomolaire

Mesures relatives aux acides nucléiques

pdb	Paire de base
kb	Kilobase

Symboles mathématiques

%	Pourcentage
---	-------------

RÉSUMÉ

Le cancer du sein (CS) est le cancer le plus commun chez la femme. Grâce au dépistage précoce ainsi qu'aux traitements modernes, de nombreuses patientes peuvent désormais guérir de cette pathologie. Néanmoins, dans les cas de cancers du sein métastatiques, les traitements sont moins efficaces. Actuellement, les recherches sont dirigées vers les possibilités de nouveaux traitements contre les métastases. Parmi les cibles possibles, les voies métaboliques lipidiques ont attiré l'attention de la communauté scientifique, puisque les tumeurs puisent principalement leur énergie des lipides synthétisés *de novo*. Par ailleurs, des niveaux d'expression élevés de stéaroyl-coenzyme A désaturase-1 (*SCD1*) ont été rapportés dans les cancers du sein. *SCD1* est une enzyme catalysant la formation d'acides gras mono-insaturés à partir d'acides gras saturés. *SCD1* produit l'acide oléique (AO) à partir de l'acide stéarique. Il a été précédemment suggéré que l'AO stimule la migration des cellules de (CS) triple négatif. De plus, l'AO active la phospholipase D2 (*PLD2*), enzyme qui produit les acides phosphatidiques à partir des phospholipides. Ces derniers activent le complexe mTOR, régulant la prolifération et la migration cellulaire. Cette étude visait à mieux caractériser le lien entre *SCD1*, l'AO et les voies de signalisation impliquées dans la progression du CS triple négatif métastatique. La lignée MDA-MB-231 a été étudiée comme modèle cellulaire de CS triple négatif et comparée aux lignées MCF-7 et T47D (CS non triple négatif). L'invasion, la migration et la prolifération cellulaires ont été étudiées en modulant l'activité de *SCD1* à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, ou par traitement à l'AO afin de mimer la suractivité de *SCD1*. Nos résultats démontrent que l'AO augmente la migration des cellules MDA-MB-231 en activant la *PLD2* et la phospholipase $C\gamma$. Dans l'étude présentée ici, inhiber *SCD1* impacte la migration, l'invasion, la prolifération et la morphologie des cellules de CS triple négatif alors que son produit, l'AO a l'effet inverse. Finalement, *SCD1* joue un rôle prépondérant dans la progression du CS triple négatif notamment via la voie de signalisation *PLD2/PI3K/mTORC1*.

Mots clés :

Stéaroyl-Coenzyme A Désaturase-1 (*SCD1*), mTOR, p70S6K, Phospholipase D2 (*PLD2*), Cancer du sein triple négatif

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women. Thanks to early detection and modern treatments, many patients can recover from this pathology. Nevertheless, in metastatic cases, treatments are less effective and metastases decrease the survival average by more than ten years. Nowadays, researches are directed towards new targets for therapies against metastases. Among the conceivable targets, lipid metabolic pathways have drawn the attention of the scientific community. Indeed, tumors draw their energy in part from *de novo* synthesized lipids; that is why the study of lipogenesis represents a promising approach towards treatments. In addition, high levels of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase-1 (*SCD1*) expression have been reported BC. *SCD1* catalyses the formation of mono-unsaturated fatty acids from saturated fatty acids. *SCD1* synthesises oleic acid (OA) from stearic acid. Furthermore, OA has been shown to stimulate the migration of metastatic triple negative breast cancer (TNBC) cells. In addition, it also activates phospholipase D2 (PLD2), an enzyme that synthesizes phosphatidic acids from membrane phospholipids. Phosphatidic acids activate mTOR complexes, which regulates proliferation as well as cell migration. This study aimed to better characterize the link between *SCD1*, OA and the signaling pathways involved in the progression of metastatic TNBC. MDA-MB-231 line has been studied as a triple negative breast cancer cell model and compared to the MCF-7 and T47D (breast cancer cell lines that are not triple). Cell invasion, migration and proliferation were studied by modulating *SCD1* activity using pharmacological inhibitors, or by OA treatment to mimic *SCD1* overactivity. Our results demonstrate that OA increases cell migration of MDA-MB-231 cells by activating phospholipase pathways: PLD2 and PLC γ . Finally, inhibiting *SCD1* impacts the migration, invasion, proliferation and morphology of triple negative breast cancer cells, MDA-MB-231 whereas *SCD1* over-activity mimiced by OA treatment yields the opposite results. In this study here, *SCD1* plays a major role in the progression of metastatic TNBC, particularly via the PLD2/PI3K/mTORC1 signaling pathway.

Keywords :

Stearoyl Coenzyme A Desaturase-1 (*SCD1*), mTOR, p70S6K, Phospholipase D2 (PLD2), Triple Negative Breast Cancer

INTRODUCTION

Le cancer est une pathologie complexe entraînant une prolifération cellulaire dérégulée et accrue qui engendre la formation de tumeurs. Il existe différents sous-types de cancers et cette hétérogénéité rend très complexe le dépistage, ainsi que le développement de traitements. Dans la plupart des cancers du sein, un diagnostic précoce et diverses thérapies permettent d'augmenter la survie des patients et peut même conduire à la rémission du cancer ([Steeg et Theodorescu, 2008](#); [Weigelt et al., 2005](#)). Néanmoins, il existe un sous-type de cancer très agressif et invasif les traitements sont moins efficaces et les tumeurs plus difficiles à cibler. Ce sous-type est un cancer du sein est appelé « triple négatif » à cause de l'absence de récepteurs à l'œstrogène (ER) et à la progestérone (PR) ainsi qu'un défaut de surexpression du récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER2) au niveau des cellules tumorales. La survie des patientes atteintes de cancer du sein triple négatif est la plus courte de tous les sous-types de cancers du sein ([Hudis et Gianni, 2011](#)). Les cancers du sein triple négatifs sont souvent diagnostiqués à un stade avancé lorsque des métastases sont déjà développées. La formation des métastases est un processus complexe menant à la dissémination des cellules cancéreuses à partir de la tumeur primaire. Le processus métastatique implique (i.) la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), (ii.) l'intravasation et (iii.) l'extravasation, la migration et la prolifération cellulaires (Chapitre I, 2.1.2) ([Gunasinghe et al., 2012](#); [Saunus et al., 2017](#)). L'association de l'expression *SCDI* avec le développement de cancers a essentiellement été étudiée dans le contexte du développement de la tumeur primaire

de plusieurs types de cancers, tels que les cancers de la prostate, du rein, du foie, des poumons et du sein (Falvella et al., 2002; Huang, G. M. et al., 2015; Huang, J. et al., 2016; Igal, 2011; Mason et al., 2012; Qiang et al., 2015). La protéine SCD1 est une enzyme qui catalyse la formation d'une double liaison en position $\Delta 9$ des acides gras saturés pour donner des acides gras mono-insaturés. SCD1 va principalement former l'acide oléique et l'acide palmitoléique à partir de l'acide stéarique et de l'acide palmitique, respectivement (Castro et al., 2011; Ntambi et Miyazaki, 2004). Dans plusieurs études, un haut niveau de lipides mono-insaturés circulants et dans les tissus a été corrélée avec un risque plus élevé de cancer (Igal, 2010; Sotgia et al., 2013). En effet, les changements dans les niveaux d'acides gras saturés et mono-insaturés peuvent modifier un large éventail de mécanismes cellulaires impliqués dans la carcinogenèse tels que la synthèse des phospholipides membranaires, le métabolisme énergétique et la signalisation liée à l'inflammation (Silva Figueiredo et al., 2017). En outre, notre équipe a précédemment démontré que SCD1 joue un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Mauvoisin et al., 2013), suggérant un rôle possible de SCD1 dans le processus métastatique des cellules cancéreuses. Il a également été montré que l'acide oléique, l'un des produits principaux de SCD1, favorise la migration des cellules MDA-MB-231, lignée cellulaire dérivée du cancer du sein triple négatif (Navarro-Tito et al., 2010), et induit leur prolifération en activant le récepteur 40 couplé aux protéines G (Hardy et al., 2000; Soto-Guzman et al., 2008). De plus, Kim *et al.* ont rapporté une activation sélective de la phospholipase 2 (PLD2) par l'acide oléique, justifiant l'étude de SCD1 et PLD2 afin de vérifier la possibilité d'une implication commune dans la migration associée au processus métastatique du cancer du sein (Arous et al., 2011; Boarder, 1994; Kim et al., 1999; Sumida et al., 1993). L'action de PLD2 est d'hydrolyser les phospholipides. PLD2 libère de l'acide phosphatidique qui fait partie d'une famille de lipides signalétiques labiles affectant une grande variété de mécanismes cellulaires associés au cancer, y compris la survie et la prolifération cellulaires (Peng et Frohman, 2012). La surproduction d'acide

phosphatidique est associée à une augmentation de la croissance tumorale et à la migration des cellules cancéreuses humaines métastatiques ([Sliva et al., 2000](#)). De plus, dans les cellules MDA-MB-231, l'acide phosphatidique est capable de stimuler la motilité cellulaire d'une manière dépendante de la PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K) ([Paplomata et O'Regan, 2014](#)). Les effets de PLD2 (via l'acide phosphatidique) sur la migration cellulaire et sur la progression du cancer du sein semblent provenir de l'activation de la voie de signalisation de mTOR (cible de la rapamycine chez les mammifères) via la phosphorylation de son effecteur p70S6K. Associés aux modifications des propriétés migratoires des cellules, un changement dans la morphologie et la directionnalité des cellules a également été observé lorsqu'activité de SCD1 est modulée ([Navarro-Tito et al., 2008](#); [Navarro-Tito et al., 2010](#); [Ntambi, 1999](#)). Finalement, dans les cellules cancéreuses, une activité importante de SCD1, associée à une augmentation du ratio en acides gras mono-insaturés versus en acides gras saturés, diminue la survie des patientes ([Holder et al., 2013](#)). La présente étude, vise à étudier les effets de la modulation de l'activité de SCD1 dans l'initiation des métastases du cancer du sein ainsi que de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués.

CHAPITRE I

CADRE THÉORIQUE DU SUJET

1.1. Le cancer

1.1.1. Généralités sur le cancer métastatique

Le terme « cancer », signifiant crabe en latin, a été suggéré la première fois durant l'antiquité par Hippocrate pour définir la maladie du même nom. Le cancer est une pathologie complexe définie par une prolifération cellulaire anormale et accrue, entraînant la formation de tumeurs. Toutes les tumeurs ne sont pas forcément cancéreuses : elles peuvent être bénignes ou malignes. La tumeur bénigne menace localement le tissu de l'organe atteint ainsi que sa fonction. La tumeur maligne est cancéreuse, elle s'installe dans le tissu et peut atteindre les systèmes sanguin et lymphatique. Les cancers sont causés par plusieurs facteurs : des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques. Parmi les facteurs environnementaux, le Centre International de la Recherche sur le Cancer, qui est une agence de l'OMS spécialisée sur le cancer, définit cent vingt agents cancérigènes depuis janvier 2018. Parmi cette liste, se déclinent certains virus, les rayons ultra-violets, la pollution ou certains produits chimiques. Ces différents agents engendrent la formation de cancers après exposition aiguë ou chronique (Organisation mondiale de la santé, 2015). D'un

point de vue génétique, les cancers sont transmis à la génération suivante par une mutation génétique héréditaire (Ellis, 2010).

De nombreux mécanismes moléculaires régissent la carcinogenèse qui est définie comme la différenciation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse (Mego et al., 2010). Ces mécanismes moléculaires seront abordés tout au long de cette étude.

1.1.2. De la tumeur aux métastases : la transition épithélio-mésenchymateuse et la formation de métastases

La métastase est l'évènement le plus invasif chez les patients atteints de cancer. La cascade métastatique est composée d'évènements successifs permettant à la cellule tumorale d'acquérir ses activités métastatiques (Patanaphan et al., 1988) (Fig. 1.1). La cascade métastatique (ou dissémination) est réalisée par les voies lymphatique, ganglionnaire, hématogène ou canalaire. Le processus métastatique regroupe trois phénomènes essentiels : l'intravasation, l'extravasation et la colonisation (Nguyen et al., 2009) (Fig. 1.2). Lors de l'intravasation, les cellules cancéreuses originaires de la tumeur primaire se détachent et arrivent dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques afin de coloniser d'autres foyers distants de la tumeur primaire. Premièrement, l'étape d'intravasation est facilitée par la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui est nécessaire pour l'invasion de la tumeur et les métastases (Tsuji et al., 2009). La TEM est un des processus majeurs associés aux changements d'interactions cellule-matrice. En effet, la perte de capacité d'interaction des cellules entre-elles permet aux cellules tumorales malignes de se dissocier de la masse tumorale primaire et les changements dans l'interaction cellules-matrice extracellulaire permettent aux cellules d'envahir le stroma environnant. La TEM caractérise la dédifférenciation des cellules de type épithéliales en cellules de type mésenchymales. Plus particulièrement, les cellules épithéliales perdent leur polarité afin d'obtenir les caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Les cellules épithéliales interagissent entre elles grâce aux jonctions serrées, aux jonctions adhérentes et aux desmosomes, ce qui est permis par

la E-cadhérine. Les cellules mésenchymateuses, quant à elles, se fixent à la matrice extracellulaire sans toutefois être liées entre elles en exprimant la N-cadhérine (**Fig. 1.2**) (Lamouille et al., 2014). Dans la circulation sanguine, les cellules tumorales interagissent avec les cellules endothéliales et des macrophages (collectivement appelés microenvironnement tumoral de métastases), permettant la sécrétion de substances chimiques spécifiques afin de dégrader la membrane basale et la matrice extracellulaire (Karagiannis et al., 2017). La dégradation de la matrice est également permise par la présence de métalloprotéinases matricielles (MMP) stimulées par des facteurs de croissance (comme TGF- β). La dégradation de la matrice extracellulaire favorise la pénétration des cellules tumorales dans l'endothélium. Les vaisseaux sanguins irrigant la tumeur fournissent une voie permettant aux cellules « détachées » d'entrer dans les systèmes circulatoires et d'envahir les sites plus éloignés (**Fig. 1.1**). À l'approche des capillaires sanguins vascularisant un organe, les cellules provenant de la tumeur primaire s'accumulent pour atteindre celui-ci et le traverser, mais peuvent être trop volumineuses pour y pénétrer. Les cellules cancéreuses continuent de proliférer alors jusqu'à la rupture du capillaire, ce qui les fait sortir de la circulation sanguine et pénétrer dans le nouveau tissu : c'est le processus d'extravasation (**Fig. 1.1**). De plus, une adaptation au nouveau tissu envahi est nécessaire. En effet, cet environnement est différent de celui de la tumeur primaire. Le processus de transition d'une cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse étant un phénomène réversible, les cellules mésenchymateuses se dédifférencient, à ce stade, en cellules épithéliales pour coloniser le nouveau site. Ce processus s'appelle la transition mésenchymeuse-épithéliale (Lamouille et al., 2014). Après ce stade, les cellules épithéliales interagissent de nouveau entre elles grâce aux marqueurs comme la E-cadhérine. La nouvelle tumeur, alors formée, est appelée tumeur secondaire ou métastase. Cette tumeur secondaire est composée des cellules similaires à celles de la tumeur originelle ou primaire (Demicheli et al., 1997). En revanche, en fonction du type de cancer, et donc de la localisation de la tumeur primaire, les métastases se développent dans des

tissus ou organes différents. Dans un contexte de cancer du sein, ce sont les os, les poumons et le cerveau qui sont les sites métastatiques les plus courants. En effet, l'établissement de la tumeur secondaire, nécessite des exigences particulières : au niveau des os, la survie des cellules cancéreuses secondaires va être favorisée par des facteurs d'activation des ostéoclastes ; au niveau des capillaires pulmonaires, l'extravasation va être permise par des chimiokines et des cytokines favorisant l'adaptation au microenvironnement pulmonaire et au niveau du cerveau, les cellules tumorales traversent la barrière hémato-encéphalique en interagissant avec les cellules endothéliales (Demicheli et al., 1997; Gupta et Massague, 2006; Valastyan et Weinberg, 2011).

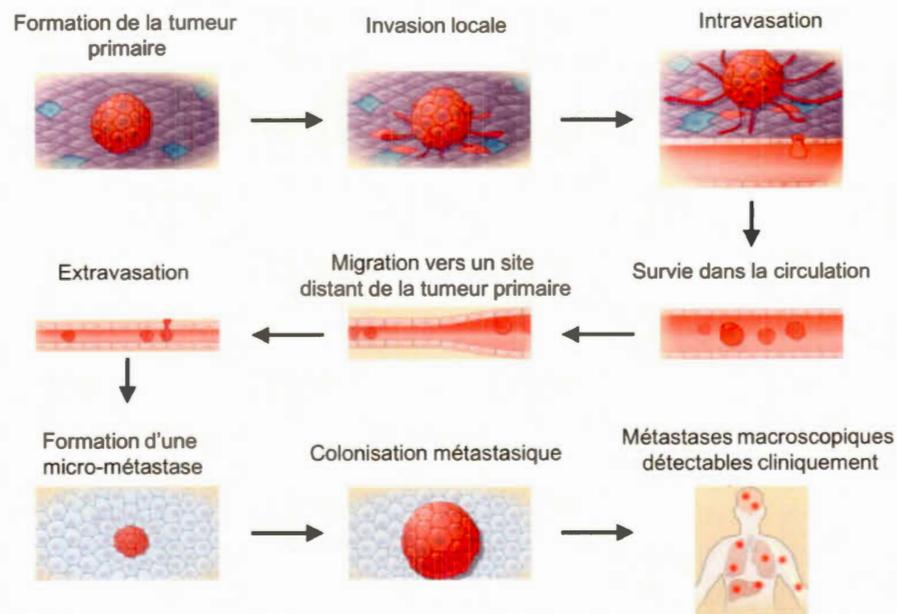


Figure 1.1 Processus de formation de la métastase

Les métastases se forment à partir de la tumeur primaire en suivant plusieurs étapes : l'invasion, l'intravasation, l'extravasation et finalement la colonisation de la métastase dans le nouveau site. Adaptée de Valastyan et Weinberg, 2011.

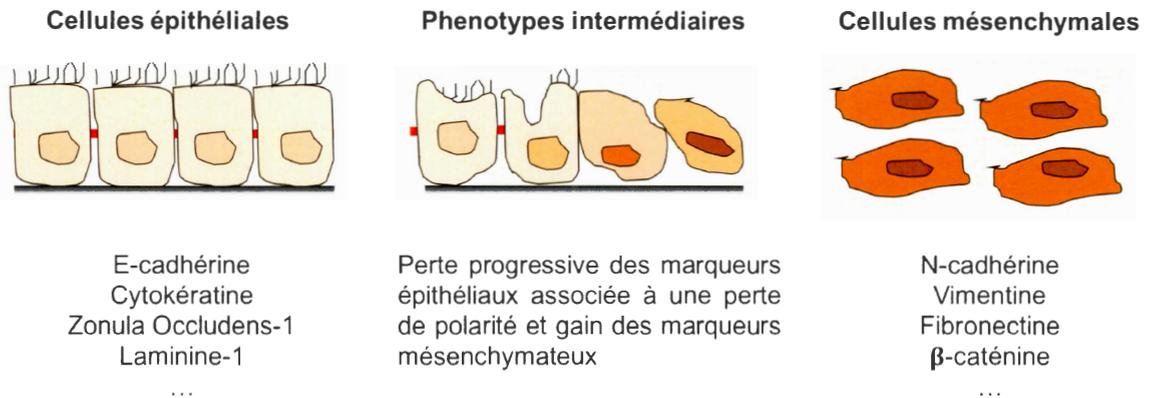


Figure 1.2 La transition épithélio-mésenchymateuse

Pendant la transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules épithéliales perdent leur polarité et se dédifférencient en cellules mésenchymateuses. Cette perte de polarité est causée par la perte progressive des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératine, etc.) en faveur des marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine, etc.). Adaptée et traduite de Kalluri et Weinberg, 2009.

1.2. Le cancer du sein

1.2.1. Statistiques liées cancer du sein

Le cancer du sein est la forme de cancer la plus fréquente chez la femme. En effet, une femme sur huit est atteinte du cancer du sein et une femme sur trente en meurt tous les ans au Canada (Canadian Cancer Society's Advisory Committee, 2016). Cinq à dix pour cent des cancers du sein sont dus à des mutations génétiques au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2* qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs contrôlant la division cellulaire. Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* peuvent survenir dans le gène au complet, c'est-à-dire qu'il n'existe pas de position particulière pour la mutation, ni de mutation fortement récurrente. Or, les mutations génétiques sont héréditaires et il existe une forte possibilité qu'elles se transmettent de génération en génération. C'est pourquoi il est important d'effectuer un dépistage génétique si des cas de cancers

familiaux sont connus (Organisation mondiale de la santé, 2015). De nos jours, principalement en Europe de l'Ouest et dans les pays nord-américains, les mutations sur ces gènes sont utilisées comme biomarqueurs dans le cadre du dépistage génétique précoce. D'autres moyens de dépistage sont envisageables, comme la mammographie ou encore la biopsie.

1.2.2. Le sein : morphologie et développement

La poitrine comprend trois structures principales : la peau, le tissu sous-cutané et le tissu mammaire composé d'épithélium et de stroma (correspond au volume mammaire chez la femme qui n'est pas en période d'allaitement) (**Fig. 1.3**). Les composants épithéliaux relient les lobules au mamelon. Les lobules deviennent les glandes structurales et lactogènes en période d'allaitement après l'accouchement. Enfin, le stroma est à la fois composé de tissu adipeux et de tissu conjonctif fibreux (Labhsetwar, 1970; Lunaas, 1962; Savchenko, 1961). Au cours de sa vie, la glande mammaire subit des changements continuels de taille, de forme et de fonction. Ces changements se produisent en majorité pendant la puberté, lorsque l'épithélium canalaire envahit le coussinet gras environnant pour former un arbre mammaire organisé (Besins, 1982; Chumachenko et Anokhina, 1977). Tout au long de son existence (développement, grossesse, lactation, involution), l'épithélium traverse plusieurs cycles de prolifération et de mort cellulaire causés essentiellement par des changements hormonaux (Lanigan et al., 2007). La progestérone est impliquée dans les dernières étapes de la formation du sein après la croissance du système canalaire. Elle agit avec les autres hormones pour développer les lobules et les alvéoles du sein et adapte les alvéoles aux propriétés de sécrétion. De plus, dans le processus de lactation, deux hormones jouent un rôle crucial : la prolactine et l'ocytocine, hormones qui sont libérées par l'hypophyse. La prolactine stimule la production de lait à partir du tissu mammaire, tandis que l'ocytocine facilite la contraction des muscles lisses des glandes mammaires, qui aident à expulser le lait. Ces deux hormones sont produites

en réponse à la stimulation du mamelon. En revanche, tout au long du développement du sein, une autre hormone engendre une grande partie des changements au niveau de la glande mammaire en augmentant la prolifération cellulaire : c'est l'œstrogène (Lunaas, 1962). Par ailleurs, il a été démontré qu'une exposition prolongée aux œstrogènes est corrélée au développement de certains cancers comme les cancers du sein (McNamara et al., 2017). Cependant cette hormone n'est pas impliquée de la même manière dans tous les cancers du sein. En effet, dans le cancer du sein triple négatif, les cellules cancéreuses n'expriment pas les récepteurs d'œstrogène α mais continuent d'exprimer en partie les récepteurs d'œstrogène β (ER β). Pour ces patientes en particulier, la croissance du cancer n'est pas soutenue par les œstrogènes et qu'elles ne répondent pas à tous les traitements tels que les hormonothérapies (McNamara et al., 2017). Cependant, de récents résultats indiquent que les récepteurs ER β pourraient être considérés comme une cible potentielle de traitement (Austin et al., 2018).

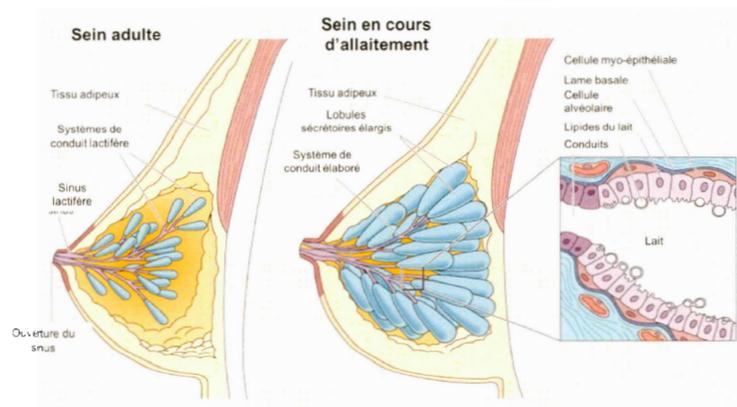


Figure 1.3 Morphologie du sein adulte et du sein au cours de l'allaitement

Tout au long de sa vie, la glande mammaire subit des modifications au niveau de la morphologie de son sein. En effet, le sein adulte diffère du sein en cours d'allaitement. Le sein inactif est principalement constitué de tissu adipeux. Pendant le développement du sein, le système canalaire se développe et se ramifie; la quantité de tissu conjonctif et de cellules de soutien augmente et la graisse est déposée dans le sein. Cependant, le sein en lactation a une plus grande proportion de tissu glandulaire. Pendant la grossesse, les seins grossissent; le pigment du mamelon s'assombrit; la peau devient plus fine et les veines du sein deviennent plus saillantes. Traduite et adaptée de Gartner et Hiatt, 2006.

1.2.3. Les différents stades de cancer du sein

Les cancers du sein sont définis par différents stades numérotés de 0 à IV. Ces stades dépendent de la classification TNM : *Tumor* (tumeur), *Nodes* (ganglions) and *Metastasis* (métastases) (**Tableau 1.1**) (Prvulovic et al., 2010). Les différents stades sont :

- le stade 0 qui est un stade «pré-cancereux», le cancer est non-invasif (TisN0M0);
- le stade I : cancer invasif à l'intérieur du sein avec une tumeur plus petite que 2 cm (T1N0M0);
- le stade II : cancer qui atteint les ganglions (1 à 3 ganglions atteints), les tumeurs mesurent 2 à 5 cm (T0N1M0, T1N1M0, T2N0M0, T2N1M0, T3N0M0);
- le stade III : cancer plus avancé, les tumeurs ont atteint plus de 4 ganglions avec une tumeur mesurant plus de 5 cm (T0N2M0, T1N2M0, T1N2M0, T3N1M0, T3N2M0, T4N0M0, T4N1M0, T4N2M0, Tous T N3M0);
- le stade IV : cancer métastatique (Tous T Tous N M1).

Tableau 1.1 Définition du grade et des stades des cancers du sein

Les cancers sont définis par différents stades numérotés de 0 à IV. Ces stades sont définis à l'aide de la classification TNM : Tumor (tumeur), Nodes (ganglions) and Metastasis (métastases). Traduit et adapté de Singletary et al., 2002; Valastyan et Weinberg, 2011.

Tailles de la tumeur	Ganglions atteints	Métastases
T0 Pas de tumeur primaire ou tumeur primitive non palpable Tis Carcinome <i>in situ</i> , tumeur présente seulement dans les conduits ou les lobules (bénin)	N0 Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints	M0 Pas de métastase
T1 0-2 cm	N1 Cellules cancéreuses dans 1 à 3 ganglions axillaires (ganglions de l'aisselle)	M1 Tumeurs secondaires dans d'autres organes
T2 2-5 cm	N1mi Tumeur ganglionnaire supérieure à 2 mm (micrométastase)	
T3 Supérieure à 5 cm	N2 Cellules cancéreuses dans 4 à 9 ganglions axillaires	
T4 Tumeurs de toutes les tailles avec des extensions à la poitrine, à la peau ou une ulcération	N3 Cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques infra/supra claviculaires ou dans plus de 10 ganglions axillaires	

1.2.4. Les différents sous-types de cancers du sein

Selon les cellules qui sont atteintes, les cancers sont classés en plusieurs types : les sarcomes sont des cancers qui se forment dans les tissus conjonctifs (muscles, os). Les carcinomes sont des cancers qui se forment à partir de cellules épithéliales (peau, muqueuses). Or, la grande majorité des cancers du sein sont des adénocarcinomes qui sont des tumeurs malignes qui se développent au détriment de l'épithélium glandulaire. Les cancers du sein peuvent être classés d'un point de vue histologique ou moléculaire. Premièrement, selon la classification histologique, les adénocarcinomes peuvent être *in situ* ou infiltrants. Les adénocarcinomes *in situ* sont des cellules tumorales qui se développent dans les canaux galactophores ou dans les lobules, ce sont les plus courants (Eroles et al., 2012). Dans les cas de carcinomes infiltrants, les cellules cancéreuses traversent la membrane basale des canaux ou des lobules et envahissent le sein ou d'autres tissus par la formation de métastases.

Étant donné que le cancer du sein est une maladie très hétérogène au niveau moléculaire et que le pronostic vital de cette pathologie dépend de l'expression de différents gènes, un classement moléculaire des sous-types de cancers du sein a été mis en place depuis les années 2000 (Eliyatkina et al., 2015). Dans ce classement on retrouve le cancer luminal, le cancer HER2+, le cancer « basal-like » et le « normal-like ». Le cancer luminal est divisé en deux groupes : le luminal A (ER+/PR+) et le luminal B (ER+/PR+, ER+/HER2+ ou ER+/PR-) (Tableau 1.2). Le cancer luminal se développe au niveau des cellules épithéliales lobulaires ou canalaire. Ensuite, le sous-type HER2+ désigne les cancers du sein dont le récepteur HER2 est surexprimé à la surface des cellules cancéreuses. Enfin, les derniers sous-types, appelés « basal-like » et le « normal-like », sont des cancers du sein triple négatif. Le sous-type « normal-like » est aussi négatif pour les marqueurs CDK5 et Ki-67 (Karakas, 2011; Yersal et Barutca, 2014). Les cancers du sein « luminal A » et « luminal B », qui sont positifs

pour les récepteurs oestrogène et progestérone, sont moins invasifs et moins mortels que les cancers du sein triple négatifs (Dai, X. et al., 2015).

Tableau 1.2 Classification moléculaire des sous-types de cancer du sein

Les cancers du sein sont classés au niveau moléculaire en 5 sous-types : les cancers du sein luminal A et luminal B, le cancer HER2+ et les cancers du sein triple négatifs. (basal-like et normal-like). Adapté de Yersal et Barutca, 2014.

Sous-types	Définitions
Luminal A (ER+; PR+)	<ul style="list-style-type: none"> • « Luminal A-like » : positif aux récepteurs ER et PR et négatif aux récepteurs HER2. Le marqueur métastatique et marqueur de prolifération Ki-67 est faible
Luminal B (ER+)	<ul style="list-style-type: none"> • « Luminal B-like » : positif aux récepteurs ER, négatif aux récepteurs HER2 et <ul style="list-style-type: none"> - Le marqueur Ki-67 est élevé - Les récepteurs PR peuvent être faiblement ou fortement exprimés • « Luminal B » : Positif aux récepteurs ER et <ul style="list-style-type: none"> - Les récepteurs HER2 sont surexprimés <i>Ou</i> <ul style="list-style-type: none"> - Le marqueur Ki-67 est amplifié <i>Ou</i> <ul style="list-style-type: none"> - Les récepteurs PR sont exprimés
Sur-expression de Erb-B2 (HER 2+)	<ul style="list-style-type: none"> • <u>HER 2 positif</u> : (non luminal) Les récepteurs HER2 sont surexprimés, les récepteurs ER et PR sont absents
Cancers du sein triple négatif (ER-; PR-; HER 2-)	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de ER et PR du récepteur HER2 • « Basal-like » : Le marqueur Ki-67 est amplifié • « Normal-like » : Le marqueur Ki-67 est faiblement exprimé

1.2.5. Le cancer du sein triple négatif

Le cancer du sein triple négatif est un sous-type de cancer du sein hautement invasif et agressif. Il présente un risque plus élevé et un diagnostic moins favorable que les

autres sous-types de cancer du sein. Il est dit « triple négatif » car les récepteurs à l'œstrogène α et à la progestérone ne sont pas présents. De plus le récepteur HER2 n'est pas surexprimé dans la tumeur cancéreuse. Les cellules tumorales n'ayant pas les récepteurs nécessaires, des traitements communs comme la thérapie hormonale et les médicaments ciblant HER2 sont inefficaces. L'utilisation de la chimiothérapie pour traiter le cancer du sein triple négatif est l'une des seules options de traitement, option qui n'est que partiellement efficace (McNamara et al., 2017).

1.3. Rôle de la migration, de l'invasion et de l'adhésion dans le processus de métastase

1.3.1. La migration cellulaire

Comme précédemment évoqué, le cancer métastatique consiste en la dissémination des cellules tumorales à partir de la tumeur primaire vers un ou plusieurs organe(s) distant(s). La dissémination (ou cascade métastatique) est un phénomène de motilité cellulaire complexe impliquant la coordination moléculaire des activités de protrusion, de chimiotaxie, d'invasion et de contractilité des cellules tumorales (Gadea et al., 2008; Yoshida et Soldati, 2006). Lorsque les cellules migrent, elles optent pour une morphologie allongée qui est dépendante de la régulation du cytosquelette d'actine et d'interactions entre la matrice extracellulaire et la surface des cellules. Le changement de la forme du corps cellulaire lié à une modification du cytosquelette d'actine est commun à tous les modes de migration (Keren et al., 2008). En effet, plusieurs modes de migration sont utilisés par les cellules pour migrer en fonction du type cellulaire et de leur fonction. Ces modes de migration ont été classés selon la morphologie des cellules en migration et l'organisation du cytosquelette d'actine. Les deux types principaux sont (i.) la migration collective et (ii.) la migration individuelle (Friedl et

Wolf, 2010). La migration individuelle est elle-même divisée en deux sous-types : la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse (Kramer et al., 2013).

1.3.1.1. La migration cellulaire collective

La migration cellulaire collective est un processus récurrent des organismes multicellulaires (développement embryonnaire, cicatrisation des plaies), mais aussi dans la propagation du cancer (métastases)(Kramer et al., 2013). La migration cellulaire collective correspond à la migration de plusieurs cellules qui interagissent les unes avec les autres à l'aide de jonctions cellules-cellules et par interactions avec leur environnement. Elle a lieu lorsque les cellules n'ont pas la possibilité de migrer seules. Les cellules s'organisent alors en couches pour acquérir une polarité baso-latérale collective (Kramer et al., 2013). L'interaction des cellules entre elles est permise par les protéines des jonctions adhérentes comme les cadhérines. De plus, le mouvement coordonné des groupes de cellules dépend des signaux de l'environnement tumoral. En effet, l'environnement des cellules en migration peut affecter la vitesse, la persistance et le sens de migration par des mécanismes de stimulation ou d'inhibition régis par plusieurs types de molécules comme des chimiokines, des facteurs de croissances, ou des protéines constituant la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire fournit non seulement le support structurel et biochimique, mais joue également un rôle majeur dans la régulation du comportement cellulaire. Différentes protéines de la matrice extracellulaire (le collagène, l'élastine, la fibronectine, la laminine) permettent aux cellules d'adhérer et de migrer tout en formant des adhérences focales. En utilisant ces sites d'adhésion, les cellules détectent également les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire (Friedl et Gilmour, 2009). En revanche, toutes les cellules du groupe n'ont pas le même comportement et l'ensemble des cellules forme une polarité au sein même du groupe. Une partie des cellules a des propriétés d'adhésion à la matrice extracellulaire et une activité intrusive plus élevée pour attirer les autres cellules n'ayant pas les propriétés requises afin de migrer efficacement. Dans certains

cas, des cellules quittent le groupe pour se différencier en cellules mésenchymateuses individuelles (Kramer et al., 2013).

1.3.1.2. La migration individuelle

1.3.1.2.1. La migration individuelle des cellules amiboïdes

Ce qui caractérise les cellules qui migrent de façon amiboïde, ce sont les modifications rapides de leur morphologie. Les cellules amiboïdes ont une morphologie très arrondie due à une contractilité cellulaire accrue. La matrice est très peu dégradée dans ce mode de migration. En effet, il y a très peu d'interaction entre la cellule et la matrice en raison de la morphologie arrondie de cette dernière (Friedl et Wolf, 2003). Un environnement donné favorisera un mécanisme de migration amiboïde, si la cellule adhère ou non avec son environnement. En effet, la migration des cellules amiboïdes dépend essentiellement des mécanismes d'action de l'actine et la myosine du cytosquelette. Si la cellule adhère à la matrice ou interagit avec une autre cellule, la cellule est tirée via les déplacements du cytoplasme. Si la cellule adhère peu avec son environnement, elle n'a pas la capacité de migrer. Une fois que la cellule est dans un environnement restreint en termes d'espace, elle exerce une pression intracellulaire à l'aide de son cytosquelette et forme des protrusions avec sa membrane plasmique appelées « *blebs* ». (Kramer et al., 2013). La contractilité des *blebs* dépend de l'activation de la voie de signalisation des GTPases Rho qui régulent par la suite le réarrangement du cytosquelette d'actine (Kramer et al., 2013). De plus, les *blebs* diffèrent des autres protrusions cellulaires, telles que les lamellipodes ou les filopodes, car les *blebs* sont associés aux mécanismes de l'apoptose. Lors de l'apoptose, il crée une vésicule qui se détache de la cellule pour former un corps apoptotique (Charras et Paluch, 2008). En formant des protrusions avec la membrane plasmique et donc des *blebs*, les cellules tumorales peuvent alors se faufiler à travers la matrice. Cette plasticité dans les modes de migration représente un mécanisme d'échappement putatif des cellules après le traitement par inhibiteur de protéase et donc peut causer la dissémination du cancer.

Les inhibiteurs de protéase, qui empêchent la motilité mésenchymateuse, peuvent induire le passage du mésenchymateux à la motilité via les *blebs* (Charras et Paluch, 2008).

1.3.1.2.2. La migration individuelle des cellules mésenchymateuses

La migration individuelle des cellules mésenchymateuses est un mécanisme très utilisé dans le processus de la propagation des métastases. Les cellules tumorales différenciées en cellules mésenchymateuses (via la TEM) acquièrent un phénotype invasif et migrent individuellement (Kramer et al., 2013). En effet, ce phénotype spécifique de la cellule mésenchymateuse lui donne sa capacité de migrer. La migration des cellules mésenchymateuses dépend des morphologies des cellules qui sont régulées par la croissance des lamellipodes (larges filaments d'actine) et des filopodes (fins filaments d'actine). Les lamellipodes et les filopodes sont des extensions de la membrane plasmique de la cellule (Lamouille et al., 2014). Ces extensions cellulaires sont formées grâce à la polymérisation d'actine du cytosquelette. La croissance des extensions cellulaires est associée à divers signaux, y compris ceux de messagers externes, de la conformation de la matrice extracellulaire, de la machinerie de polarité intracellulaire et des récepteurs d'adhésions. Les récepteurs d'adhésion peuvent converger au niveau des protéines de la familles des Rho-GTPases pour moduler l'adhérence et le remodelage du cytosquelette nécessaires à la formation des lamellipodes. En plus de ces extensions, les cellules mésenchymateuses acquièrent des invadopodes (plus invasifs que les lamellipodes mais leur mécanisme est encore peu connu) qui permettent aux cellules d'avoir la capacité de dégrader la matrice extracellulaire grâce à des métallo protéinases matricielles (MMP) et de pénétrer ainsi dans les tissus (Kramer et al., 2013; Ridley, 2011).

1.3.2. L'invasion cellulaire

En termes de pathologie, l'invasion par les adénocarcinomes est définie comme la pénétration des barrières tissulaires, telle que le passage de la membrane basale et l'infiltration dans les tissus interstitiels sous-jacents par des cellules tumorales malignes. L'invasion nécessite l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire à travers la protéolyse des composants de la matrice extracellulaire (Friedl et Wolf, 2010). Afin de traverser la matrice, une cellule doit modifier sa morphologie et interagir avec la matrice extracellulaire, qui, d'une part, fournit le substrat de fixation cellulaire, et d'autre part, représente une barrière par rapport au corps cellulaire en mouvement. L'invasion par la cellule mésenchymateuse implique une forte contractilité du cytosquelette, des corps cellulaires fusiformes allongés, une forte adhésion cellulaire et finalement une intrusion à travers la matrice extracellulaire, (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008).

1.3.3. L'adhésion cellulaire

Dans certaines pathologies comme les cancers, l'adhésion cellulaire est dérégulée. Cette situation cause un désordre tissulaire, une migration cellulaire aberrante et des changements au niveau des voies de signalisation associées. L'adhésion cellulaire est contrôlée, en partie, par une famille majeure de récepteurs de surface cellulaire pour la matrice extracellulaire, appelés les intégrines (Zhao et Guan, 2009). Les intégrines activent la protéine FAK qui est une tyrosine kinase cytoplasmique localisée au niveau des points d'adhérences focaux. Les points d'adhérence focaux servent de contact entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. (Schlaepfer et al., 1999). La protéine FAK joue un rôle important dans la propagation cellulaire, la différenciation, la migration et la mort cellulaire. Elle a une activité élevée dans le contexte du cancer du sein, ce qui est associé à une migration et à une prolifération accrue des cellules cancéreuses (Zhao et Guan, 2009). Lorsque la protéine FAK est activée par les

migration et la mort cellulaire. Elle a une activité élevée dans le contexte du cancer du sein, ce qui est associé à une migration et à une prolifération accrue des cellules cancéreuses (Zhao et Guan, 2009). Lorsque la protéine FAK est activée par les intégrines, elle forme un complexe avec des kinases de la famille Src et des protéines de la matrice extracellulaire (Burridge et al., 1992; Schaller et Parsons, 1994). Les protéines de la matrice extracellulaire peuvent alors interagir avec d'autres intégrines et récepteurs de surface comme le récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR (*epidermal growth factor receptor*) pour phosphoryler différents substrats et déclencher une multitude de voies de signalisation intracellulaires impliquant Src, PLC, la Phosphatidyl Inositol 3-Kinase (PI3K), afin de réguler diverses fonctions cellulaires (adhésion, migration et transition épithélio-mésenchymateuse). La liaison de l'EGF à l'EGFR entraîne l'activation directe de Src, qui pourrait être renforcée en présence de complexes intégrine-FAK-Src. L'activation de Src mène ensuite à une cascade signalétique activant les Rho-GTPase (Huveneers et Danen, 2009). De plus, la phosphorylation de FAK au niveau du résidu tyrosine-397 est associée à une augmentation de la migration. Ce résidu est connu pour servir de site de liaison à la fois pour Src et pour PI3K, ce qui implique qu'ils sont nécessaires pour que FAK active la migration cellulaire (Huveneers et Danen, 2009; Reiske et al., 1999) (**Fig. 1.4**). Des études antérieures ont montré que l'association induite par l'adhésion de la paxilline avec la protéine FAK conduisait à la phosphorylation des résidus Tyr 31 et Tyr 118 de la paxilline (Bellis et al., 1995; Petit et al., 2000). La paxilline est une protéine d'échafaudage et adaptatrice qui fait partie des complexes d'adhésion focale facilitant l'assemblage des complexes protéiques pour réguler l'adhésion focale et la motilité. La phosphorylation des résidus Tyr de la paxilline provoque des changements dans les adhérences focales qui sont associées à une motilité importante des cellules MDA-MB-231 (Pribic et Brazill, 2012).

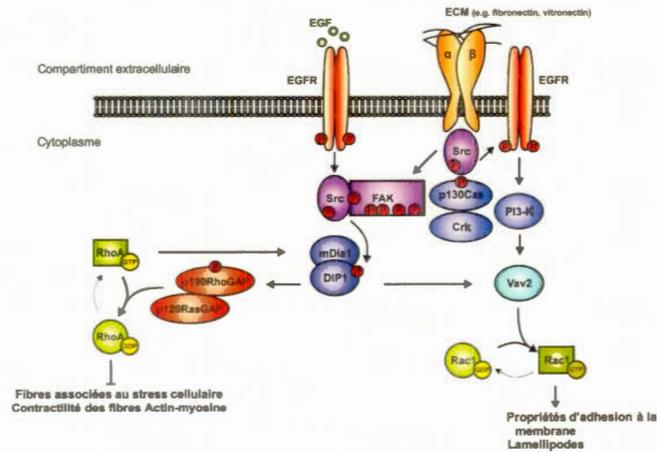


Figure 1.4 Régulation des propriétés de contractilité et de l'adhésion à la membrane par les récepteurs à l'EGF.

Les protéines de la matrice extracellulaire peuvent interagir avec d'autres intégrines pour favoriser la phosphorylation de l'EGFR médiée par Src en l'absence de facteurs de croissance, ce qui se produit par l'intermédiaire d'un complexe de signalisation impliquant Src. Les signaux EGFR non engagés mais activés via PI3K pour promouvoir le chargement de Rho GTPase (Rac1). La liaison de l'EGF à l'EGFR entraîne l'activation directe de Src, qui pourrait être renforcée en présence de complexes intégrine-FAK-Src. L'activation de Src mène ensuite à l'activation de DIP1, qui à son tour interagit avec p19RhoGAP (conduisant à l'inactivation de RhoA) et à Vav2 (entraînant l'activation de Rac1). Traduit de Huveneers et Dannen, 2009.

1.3.4. La directionnalité associée à la migration

Conceptuellement, la directionnalité de la migration est définie comme le déplacement (d) divisé par la longueur totale du trajet (D) de la cellule (**Fig. 1.5 A-C**) (Gorelik et Gautreau, 2014). D'autres paramètres peuvent entrer en jeu comme l'angle de rotation (θ) et le déplacement net (**Fig. 1.5 B, C**) (Ryan J. Petrie, 2009; Weiger et al., 2013). Or, la migration cellulaire directionnelle ne dépend pas que de ces paramètres physiques, mais aussi, de la polarité de la cellule et la capacité régulatrice de son environnement (Ryan J. Petrie, 2009). Certaines cellules adoptent une morphologie très polarisée en étendant de longues digitations envahissant le tissu (Ridley et al., 2003; Santner et al., 2001). Cette morphologie polarisée est permise par l'organisation

de l'actine F qui est régulée par un recrutement de molécules à des régions particulières au niveau de la membrane cellulaire interne. Dans ces systèmes, les cellules individuelles tendent à s'aligner progressivement avec le mouvement général du tissu (Stephens et al., 2012). La migration est déclenchée par une augmentation de la motilité des cellules situées à proximité de l'espace à combler. À l'apparition d'une blessure, les cellules « réagissent » rapidement et s'auto-organisent sur la base des contraintes mécaniques pour contrer le système chaotique imposé par la blessure. Si un stimulus est présenté sous la forme d'un gradient de concentration externe ou un autre mécanisme de signal environnemental comme la chimiotaxie, la cellule subit une migration qui sera « dirigée ». La nature du signal asymétrique de la cellule (polarité) ainsi que sa morphologie définit la direction qu'elle prend (Ryan J. Petrie, 2009). Ainsi, la direction de la migration résulte de la formation et de la régulation des lamellipodes (Ryan J. Petrie, 2009). Un grand nombre de lamellipodes latéraux (répartis autour de la cellule) peut entraîner une migration aléatoire et une capacité réduite à répondre aux signaux externes. Au contraire, s'il y a peu de lamellipodes latéraux, reflétant une morphologie asymétrique avec des bords avant et arrière bien définis, la migration est persistante et dominante du côté du « bord d'attaque » (**Fig. 1.5 B, C**) (Ryan J. Petrie, 2009). Le « bord d'attaque » est le côté du lamellipode qui permet de déclencher et d'orienter la migration. (Weiger et al., 2013). Ainsi, au niveau du « bord d'attaque », à l'avant de la cellule, on retrouve les phospho-inositol-3-phosphate (PIP3) et les protéines GTPases Rac et CDC42. Les autres Rho GTPases et PTEN (phosphatase de PIP3) se trouvent vers l'arrière, au côté opposé du bord d'attaque (Ridley et al., 2003).

Afin de mesurer l'impact des facteurs biochimiques et biomécaniques affectant la migration cellulaire, la vitesse de migration et la direction associée peuvent être étudiées via la réalisation de tests de migration cellulaire, comme les « scratch test » réalisés dans cette étude.

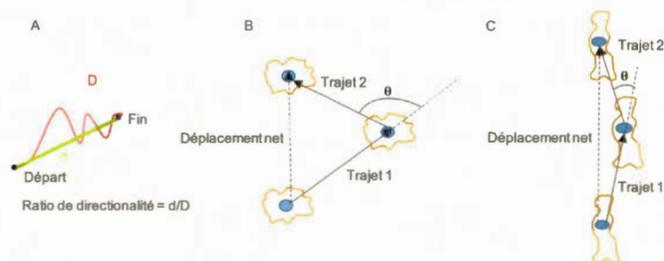


Figure 1.5 Schématisation de la directionnalité

(A) La directionnalité correspond au ratio de la distance nette parcourue sur le trajet total de la cellule. Le comportement d'une cellule peut être ainsi quantifié plus précisément. (B) (C) La figure décrit une cellule à trois moments différents au cours de sa migration. La migration peut être définie par la distance parcourue entre les positions (longueur du trajet), l'angle de direction (θ) et le déplacement net. Ces informations peuvent être utilisées pour décrire le taux et la directionnalité de la migration. La directionnalité est définie comme le déplacement divisé par la longueur totale du chemin de la cellule. Si une cellule migre de manière plus aléatoire, la directionnalité diminue et inversement. (A) Adaptée de Gorelik et Gautreau, 2014 et (B, C) inspirée de Ryan J. Petrie, 2009.

1.4. Métabolisme énergétique et cancer du sein

La communauté scientifique s'intéresse de plus en plus au ciblage des enzymes métaboliques dans le développement de traitements contre le cancer (Long et al., 2016). L'altération du métabolisme énergétique ainsi que sa reprogrammation font partie des facteurs principaux associés à cette pathologie (Hensley et al., 2013; Zhou, M. et al., 2010). Le stress cellulaire associé au développement du cancer force les cellules tumorales à s'adapter selon la reprogrammation métabolique causée par des mutations génétiques. Or, les changements métaboliques peuvent être causés à la fois par des mutations génétiques et épigénétiques mais aussi par le microenvironnement de la tumeur (Vander Heiden et al., 2009). Afin de répondre aux besoins abondants d'énergie et de molécules nécessaires à la prolifération cellulaire, les cellules cancéreuses augmentent leur consommation d'énergie via des mécanismes spécifiques

comme la glycolyse (Warburg), la glutaminolyse et la synthèse d'acides gras (Vander Heiden et al., 2009).

1.4.1. Effet Warburg et glycolyse

L'effet Warburg, découvert par Otto Warburg, est la consommation excessive de glucose par les cellules cancéreuses (Warburg, 1956; Warburg et al., 1927). Cette consommation excessive est liée au processus de fermentation lactique. La fermentation est caractérisée par un rendement faible en énergie, et c'est pourquoi les cellules cancéreuses compensent ce faible rendement par un taux élevé de glycolyse (Warburg et al., 1927). Les cellules non cancéreuses, quant à elles, ont un taux de glycolyse relativement faible suivi d'une oxydation de pyruvate dans les mitochondries. En présence d'oxygène, les tissus différenciés métabolisent d'abord le glucose en le transformant en pyruvate via la glycolyse et oxydent complètement la majorité du pyruvate dans les mitochondries en dioxyde de carbone (**Fig. 1.6**). Dans un contexte de cancer, la tumeur est en condition d'hypoxie, c'est-à-dire que la cellule est privée d'oxygène. En l'absence d'oxygène, les cellules transforment le pyruvate en générant du lactate. Cette génération de lactate entraîne une production d'ATP minimale par rapport à la phosphorylation oxydative (**Fig. 1.6**). L'effet Warburg consiste en une conversion de glucose en lactate par les cellules cancéreuses (**Fig. 1.6**). Par ailleurs, les mitochondries restent fonctionnelles et elles continuent leurs processus de phosphorylation oxydative (Vander Heiden et al., 2009).

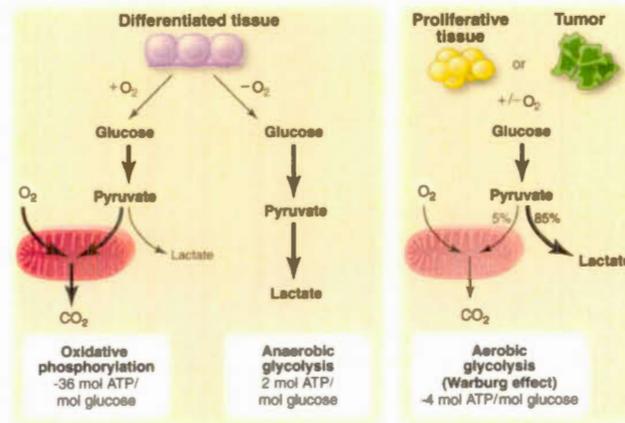


Figure 1.6 Différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et l'effet Warburg

Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (effet Warburg). En présence d'oxygène, les tissus qui ne prolifèrent plus (différenciés) métabolisent d'abord le glucose en pyruvate via la glycolyse, puis oxydent complètement la plus grande partie de ce pyruvate dans les mitochondries en CO₂ au cours du processus d'oxydation. Puisque l'oxygène agit en tant qu'accepteur d'électrons final pour oxyder complètement le glucose, l'oxygène est essentiel dans ce processus. Lorsque l'oxygène est limitant, les cellules peuvent détourner le pyruvate généré par la glycolyse de la phosphorylation oxydative mitochondriale en formant du lactate (glycolyse anaérobie). Cette génération de lactate au cours de la glycolyse anaérobie permet la poursuite de la glycolyse, et entraîne une production minimale d'ATP par rapport à la phosphorylation oxydative. Warburg a observé que les cellules cancéreuses convertissent la plupart du glucose en lactate, en présence ou non d'oxygène (glycolyse aérobie). Cette propriété est partagée par les tissus prolifératifs normaux. Néanmoins, la glycolyse aérobie est moins efficace que la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP. Tirée de Vander Heiden et al., 2009.

1.4.2. Le métabolisme de la glutamine ou glutaminolyse

Dans de nombreuses cellules cancéreuses, la glutamine est utilisée pour approvisionner le cycle de l'acide tricarboxylique et la phosphorylation oxydative au lieu de l'utilisation du glucose afin de produire suffisamment d'ATP pour soutenir la

prolifération cellulaire (Fan et al., 2013) (**Fig 1.6**). La dépendance à la glutamine est une stratégie courante pour certaines cellules cancéreuses (comme les cellules cancéreuses du sein) afin d'échapper aux traitements médicamenteux anti-cancéreux employés contre les autres cibles métaboliques comme ceux ciblant la glycolyse ou la voie mTOR. Les transporteurs de la glutamine sont des cibles pharmacologiques potentielles pour traiter les cellules cancéreuses résistantes à la thérapie initiale. Finalement, la glutaminase, qui est l'enzyme qui catalyse la réaction de transformation de la glutamine en glutamate, a récemment suscité beaucoup d'intérêt pour la thérapie ciblée contre le cancer (Long et al., 2016).

1.4.3. Lipogenèse et métabolisme des acides gras

Les acides gras constituent, pour les cellules cancéreuses, une autre source d'énergie utilisable. Dans les cellules non cancéreuses, un équilibre est constamment maintenu entre la lipogenèse et la dégradation des lipides assuré par la lipolyse et la β -oxydation. Les cellules non cancéreuses sont approvisionnées en acides gras à partir des lipides circulants, alors que les cellules tumorales sont approvisionnées en lipides via la synthèse de lipides *de novo* (Medes et al., 1953). Dans un contexte non cancéreux, la voie de la lipogenèse *de novo* est régulée par des facteurs modulateurs de la transcription, des hormones et des nutriments, et est activée suite à la consommation de glucides et d'acides gras saturés (Kersten, 2001). Dans un contexte de cancer, l'expression et l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse et la transformation lipidiques sont augmentées de façon constitutive en comparaison à des cellules non cancéreuses (Swinnen et al., 2006). Les cellules cancéreuses qui prolifèrent abondamment nécessitent un apport élevé en acides gras dans le but de synthétiser les membranes plasmiques des nouvelles cellules et de subvenir à leurs besoins énergétiques. Elles puisent une part importante de leur énergie de la lipogenèse *de novo*. Il est donc possible de baser les recherches de traitements sur ce métabolisme alternatif pour fournir de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer (Sotgia

et al., 2013; Vander Heiden et al., 2009). De nombreuses études démontrent qu'une augmentation de l'activité de l'acétyl-coA carboxylase (ACC ou ACACA), enzyme impliquée dans la lipogenèse *de novo*, est positivement corrélée à la prolifération des cellules de cancer du sein (Long et al., 2016). L'ACACA transforme l'acétyl-coA en malonyl-coA. Le malonyl-coA est ensuite converti en acide palmitique par la *fatty acid synthase* (FAS), une des enzymes majeures dans la voie de synthèse des acides gras (Long et al., 2016) (**Fig. 1.7**). Le produit de l'activité de FAS étant un acide gras saturé, le palmitate, La cellule, par la suite, convertit ses acides gras saturés en acides gras mono-insaturés par l'intermédiaire de la Stéaroyl-coA désaturase-1 (SCD1) (Monaco, 2017). Il a précédemment été démontré qu'une diminution du ratio des acides gras saturés par rapport aux acides gras mono-insaturés dans la tumeur primaire est associée à un risque élevé de développer un cancer du sein (Chajes et al., 2008). Ainsi, la proportion d'acides gras mono-insaturés incorporés à la membrane (messagers intracellulaires) pourrait être utilisée comme biomarqueur dans le dépistage du cancer du sein (Shannon et al., 2007).

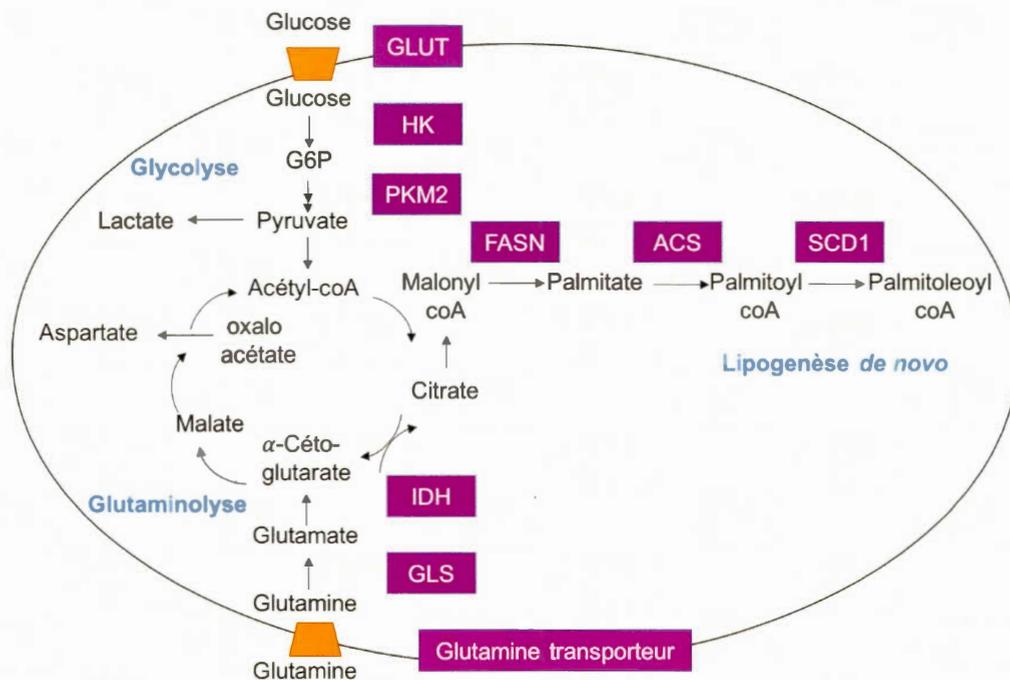


Figure 1.7 Mécanismes de reprogrammation métabolique simplifiés dans les cellules cancéreuses de sein

Les cellules cancéreuses présentent une augmentation de la glycolyse aérobie, de la synthèse des acides gras et de la glutaminolyse. Les rectangles violets représentent les enzymes métaboliques. GLUT: protéines transporteurs de glucose; HK: Hexokinase; PKM: pyruvate kinase M; LDH: Lactate déshydrogénase; FASN: Acides Gras Synthase; ACS: acétyl-CoA synthase; SCD1: Stéaroyl-coA désaturase-1 IDH: Isocitrate déshydrogénase; GLS: Glutaminase. Adaptée de Long et al., 2016.

1.4.4. Les stéaroyl-coA désaturases

1.4.4.1. Définitions

La famille des stéaroyl-CoA désaturases permet de catalyser la synthèse *de novo* des acides gras mono-insaturés (Castro et al., 2011; Ntambi et Miyazaki, 2004). Ce sont des enzymes essentielles à la survie de différents organismes, des bactéries aux mammifères (Alloatti et al., 2011; Horikawa et al., 2008; Igal, 2011; Ntambi, 1999). Il existe cinq isoformes dans la famille SCD chez la plupart des vertébrés (Castro et al.,

2011). Les désaturases se retrouvent toutes enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Deux isoformes sont retrouvés chez l'humain, *SCD1* et *SCD5* (Ntambi et Miyazaki, 2004). La protéine SCD1 est présente dans les cellules de la plupart des tissus (Castro et al., 2011), alors que SCD5 est exprimée essentiellement dans les tissus embryonnaires, ainsi que dans le cerveau et le pancréas chez l'adulte (Wang et al., 2005). La protéine SCD1 est une enzyme qui catalyse la formation d'une double liaison en position $\Delta 9$ des acides gras saturés pour donner des acides gras mono-insaturés. SCD1 forme principalement former l'acide oléique et l'acide palmitoléique à partir de l'acide stéarique et de l'acide palmitique, respectivement (Fig. 1.8).

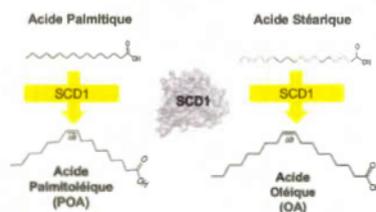


Figure 1.8 Substrats et produits de SCD1

SCD1 catalyse la formation d'une double liaison en position $\Delta 9$ des acides gras saturés pour donner des acides gras mono-insaturés. Les deux produits de SCD1 sont l'acide oléique et l'acide palmitoléique formés à partir de l'acide stéarique et de l'acide palmitique,

1.4.4.2. SCD1 et son implication dans la progression du cancer du sein

De nombreuses recherches cliniques et épidémiologiques indiquent la présence de niveaux élevés d'acides gras saturés et d'acides gras mono-insaturés dans les tissus et dans le sang des patients atteints de cancer (Brown et Rudel, 2010; Flowers et Ntambi, 2009; Ntambi et al., 2004; Popeijus et al., 2008; Wang et al., 2005). Une diminution du ratio acide stéarique/acide oléique liée à une activité élevée de SCD1 a été rapportée chez des patientes atteintes du cancer du sein (Pala et al., 2001). Jusqu'à présent, l'association de SCD1 avec le cancer du sein a principalement été étudiée dans le

contexte du développement de la tumeur primaire. Cependant, son rôle dans le processus métastatique a été faiblement exploré (Holder et al., 2013). Notre laboratoire a précédemment montré que diminuer l'activité de *SCD1* inhibe la voie de signalisation Wnt/ β -Caténine, processus crucial dans la transition épithélio-mésenchymateuse conduisant à la métastase (Mauvoisin et al., 2013). En effet, cette étude a démontré que réduire l'expression de *SCD1* dans les cellules cancéreuses du sein diminue les niveaux de prolifération cellulaire, l'expression des protéines modulant le cycle cellulaire et la phosphorylation de ERK1/2 MAPK (Thr202/Tyr204). La diminution de l'expression de *SCD1* réduit également le niveau de phosphorylation de GSK3 α/β (Ser21/9), indiquant une activité plus élevée de la kinase. Ainsi, la réduction de l'expression de *SCD1* entraîne une diminution des quantités de β -caténine dans le noyau, une inhibition de sa capacité de trans-activation et une diminution de l'expression de ses gènes cibles. De plus, les cellules MDA-MB-231 transfectées avec un ARN interférant contre *SCD1* présentent un potentiel invasif inférieur à celui des cellules contrôles. Finalement, l'extinction du gène *SCD1* diminue la capacité des cellules à réaliser la TEM. *SCD1* jouerait ainsi un rôle important dans l'activation de la TEM des cellules de cancer du sein menant au développement des métastases (Mauvoisin et al., 2013). De plus, l'expression élevée de *SCD1* est corrélée à l'augmentation de la prolifération des cellules de deux lignées cellulaires issues d'adénocarcinomes mammaires : les MCF-7 et les MDA-MB-231 (Mauvoisin et al., 2013). Dans l'ensemble, cette étude suggère fortement un rôle de *SCD1* dans la progression du cancer du sein métastatique.

1.5. Signalisation moléculaire médiée par les lipides cellulaires ou bioactifs

1.5.1. Activation des récepteurs couplés à une protéine G par les acides gras

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques sains et pathologiques c'est pourquoi ils sont très

fréquemment utilisés comme une cible thérapeutique notamment dans le cadre de nombreuses pathologies comme le cancer du sein (Wojciech et al., 2018). Les récepteurs couplés à une protéine G (RCPG) sont une famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires. Ce sont des protéines qui permettent la transmission de signaux provenant du milieu extracellulaire aux différents effecteurs intracellulaires (Weis et Kobilka, 2018). Lorsque ces récepteurs sont activés ils ont la capacité de se coupler à une molécule de GTP. Il existe plusieurs types de protéines G qui sont divisés en trois grandes familles: les protéines Gs, Gi et Gq. La protéine Gs (s pour stimulante) active la production d'AMPc, la Gi (i=inhibition) a un effet antagoniste à celui de la Gs : en effet elle inhibe l'adénylate cyclase. Enfin la protéine Gq, agit sur la stimulation d'une autre enzyme : la phospholipase C (PLC) qui intervient dans le métabolisme des lipidique (Weis et Kobilka, 2018). Les protéines Gs, Gi et Gq sont composées toutes les trois de trois sous unités : α , β et γ . Cependant, ce qui diffère entre ces trois protéines G, c'est la sous unité α , car les sous unités β et γ ne varient pas. Lorsque la sous unité α de la protéine Gs, est activée, elle active l'adénylate cyclase impliquée dans les voies de signalisation de l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de la protéine kinase A (PKA) (Weis et Kobilka, 2018). L'ensemble des RCPG permettent d'activer une multitude de cascades signalétiques comme par exemple activer d'autres récepteurs : le récepteur à l'EGF (EGFR). Ce mécanisme de transactivation par le récepteur à l'EGF implique également l'activation de PLC, la signalisation du calcium intracellulaire et SRC qui par la suite activent des métallo-protéinases transmembranaires jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire (Gschwind et al., 2001).

Les RCPG ont plusieurs ligands et il existe 2 récepteurs particuliers qui sont connus pour répondre aux acides gras à chaîne moyenne et à chaîne longue. Il s'agit des récepteurs GPR40 et GPR120. GPR40, également appelé FFAR1 pour *free fatty acid receptor 1* (récepteurs aux acides gras libre 1), est exprimé dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein, il a précédemment été montré que l'acide oléique

spécifiquement active GPR40 et active la prolifération dans les cellules de cancer du sein (Hardy et al., 2000).

1.5.2. Les phospholipases

Les phospholipases ont été associées de nombreuses fois au développement du cancer ainsi qu'à la formation des métastases. Plus particulièrement, la production d'acides phosphatidiques a été associée à différents mécanismes signalétiques, impliquant la progression des cellules cancéreuses (Fang et al., 2001; Foster, 2009; Gomez-Cambronero, 2014b; Peng et Frohman, 2012). Les phospholipases interagissent avec la membrane cellulaire et hydrolysent les phospholipides qui composent cette dernière. L'hydrolyse des phospholipides permet la libération de nombreux médiateurs lipidiques, comme des composés lipidiques bioactifs tels que le diacylglycérol, l'acide phosphatidique, l'acide lysophosphatidique et l'acide arachidonique. Leurs fonctions vont au-delà de leur rôle dans l'homéostasie membranaire. En effet, les médiateurs lipidiques bioactifs générés par les phospholipases régulent de multiples processus cellulaires pouvant favoriser la tumorigenèse, la prolifération, la migration et l'invasion (Park et al., 2012).

Il existe quatre types de phospholipases dont la classification dépend du site d'action enzymatique : ces classes sont désignées par les lettres A, B, C et D (**Fig. 1.9**) (Aloulou et al., 2018).

- les phospholipases A sont divisées en 2 sous types : la phospholipase A1 (PLA1) hydrolyse les esters carboxyliques via le mécanisme de substitution nucléophile 1 (sn-1) alors que : la phospholipase A2 (PLA2) hydrolyse les squelettes de glycérol via le mécanisme de substitution nucléophile 2 (sn-2)
- les phospholipases B hydrolysent les esters carboxyliques en position sn-1 et sn-2, c'est-à-dire que ces enzymes cumulent les rôles des phospholipases A1 et A2

- les phospholipases C sont des phosphodiesterases responsables de l'hydrolyse des liaisons phosphodiester (liaisons riches en énergie reliant un groupement phosphate et deux molécules via deux liaisons ester). Son substrat est le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) qui est hydrolysé pour former le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP3)
- les phospholipases D sont également des phosphodiesterases qui catalysent l'hydrolyse des phospholipides en libérant des acides phosphatidiques. Elles sont principalement localisées au niveau des radeaux lipidiques composant la membrane plasmique.

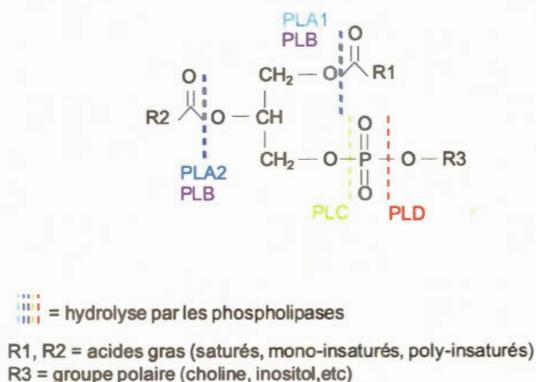


Figure 1.9 Site de clivage des différentes classes de phospholipases

Les phospholipases sont classées en 4 types et cette classification dépend du site de clivage enzymatique : ces classes sont désignées par les lettres A, B, C et D. Adaptée de Aloulou et al., 2018; Zhou, H. et Huang, 2011.

La diversité des fonctions des phospholipases suggère que ces dernières sont essentielles à la vie étant donné que le remodelage continu des membranes cellulaires nécessite l'action d'une ou de plusieurs phospholipases. Chaque phospholipase est impliquée dans des voies de signalisation spécifiques, mais des molécules de signalisation présentent en aval sont communes à plusieurs phospholipases (Park et

al., 2012). Les phospholipases coordonnent la signalisation intercellulaire et intracellulaire. Elles intègrent et amplifient les signaux extracellulaires en activant différentes voies de signalisation et les kinases Janus (JAK), MAPK et mTOR. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire impliqué dans l'angiogenèse (VEGF) et les chimiokines activent également la signalisation intracellulaire des cellules endothéliales par la régulation de la PLC γ et de la PLD, activant la migration et la prolifération des cellules endothéliales pour l'angiogenèse (Park et al., 2012).

1.5.2.1. La phospholipase C γ

Les phospholipases C (PLC) régulent un certain nombre de comportements cellulaires, notamment la motilité cellulaire, la transformation cellulaire, la différenciation et la croissance cellulaire (Cai et al., 2017). Les PLC jouent un rôle de régulation chez les cellules cancéreuses étant activées par des cytokines telles que l'EGF et les interleukines (Cai et al., 2017). Les phospholipases C sont activées par des récepteurs à activité tyrosine kinase ainsi que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), activant la protéine Galpha-q. Il existe plusieurs isoenzymes de phospholipases C : β , γ , δ , ϵ . Toutes les isoenzymes n'ont pas la même implication dans le développement et la progression du cancer. Plusieurs études ont impliqué la PLC γ en tant que régulateur de l'invasion des cellules cancéreuses et des métastases via de multiples mécanismes (Navarro-Tito et al., 2010). L'activation de la PLC γ en réponse aux facteurs de croissance est nécessaire à la motilité cellulaire via l'hydrolyse de Phosphoinositolphosphate (4,5) P2 (PIP2) pour polymériser localement l'actine (Mouneimne et al., 2004), ce qui conduit par la suite à l'activation des familles Rho GTPases CDC42 et Rac1, pour induire la propagation cellulaire et la motilité (Park et al., 2012). La régulation négative de l'expression de la PLC γ entrave gravement l'activation des Rac ainsi que la capacité invasive des lignées cellulaires du cancer du sein. Cependant, la PLC γ peut également être recrutée, ainsi que la sous unité p85 de la PI3K, lorsque le récepteur à l'EGF est activé. Les acides gras insaturés,

contrairement aux acides gras saturés, peuvent induire la phosphorylation des résidus tyrosines sur le récepteur à l'EGF (Vacaresse et al., 1999). Le récepteur à l'EGF peut également être activé via l'activation d'un autre type de récepteur, soit le RCPG dans plusieurs types cellulaires avec différents ligands (Daub et al., 1997; Vacaresse et al., 1999). De plus, dans des modèles de cancer du sein métastatique utilisant la méthode de xénotransgreffe humaine chez la souris, la suppression de la PLC γ inhibe le développement initial de métastases pulmonaires dérivées de cellules de cancer du sein humaines MDA-MB-231 et réduit la taille des métastases formées (Sala et al., 2008). Une autre équipe a démontré que la PLC γ régule la migration cellulaire de cette lignée cellulaire (Navarro-Tito et al., 2010).

1.5.2.2. La phospholipase D2

Chez les mammifères, les phospholipases sont ubiquitaires et sont exprimées principalement sous deux isoformes : *PLD1* et *PLD2*. Le rôle de la biosynthèse d'acide phosphatidique par la PLD2 a été extrêmement documenté dans les processus de carcinogénèse incluant la formation de métastases (Fang et al., 2001; Foster, 2009; Gomez-Cambronero, 2014b; Peng et Frohman, 2012). Une activité élevée de phospholipases D (isoformes PLD1 et 2) est observée dans pratiquement tous les types de cancers où elle a été examinée (Foster, 2009). De plus, une surexpression des PLD a été associée à une augmentation de la tumorigénèse (Gomez-Cambronero, 2014a). Les PLD génèrent de l'acide phosphatidique qui possède plusieurs activités biologiques comme la régulation de nombreuses voies de signalisations telles celles impliquant PI3K et mTOR (Boarder, 1994; Bruntz et al., 2014; Exton, 1997; Frohman et Morris, 1996). Une étude a précédemment montré que la PLD2 est impliquée dans les mécanismes d'invasion cellulaire, de croissance tumorale et de formation de métastases dans un modèle de xénotransgreffe murin issue d'une tumeur d'une patiente atteinte du cancer du sein (Henkels et al., 2013).

1.5.3. La voie de signalisation mTOR

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase qui est composée de deux complexes : les complexes mTORC1 et mTORC2 (Zhou, H. et Huang, 2011) (**Fig. 1.10**). mTOR est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires (Laplanche et Sabatini, 2012). En effet, cette protéine est impliquée dans plusieurs voies de signalisations régulant la migration, la prolifération, la survie et la mobilité cellulaires, raisons pour lesquelles elle est directement liée au cancer ainsi qu'au processus métastatique (Foster, 2009; Hsieh et al., 2012; Laplanche et Sabatini, 2012; Zhou, H. et Huang, 2011). Depuis une décennie, mTOR est utilisée comme cible thérapeutique dans le cadre du traitement de plusieurs cancers (Oudard et al., 2009; Rivera et al., 2011). Les inhibiteurs de mTOR, tels que la rapamycine et ses dérivés, présentent des effets bénéfiques sur les modèles de lignées cellulaires cancéreuses *in vitro* et les modèles de xénogreffe chez la souris, ainsi qu'au niveau des cancers de la tête, du cou et du sein (Paplomata et O'Regan, 2014). En tant qu'agent thérapeutique, la rapamycine exerce un effet anti-prolifératif en combinaison avec des agents de radiothérapie, des agents chimio-thérapeutiques ou d'autres agents thérapeutiques ciblés dans le cadre de différents cancers (Gao et al., 2012; Zhou, H. et Huang, 2011). Théoriquement, la rapamycine n'inhibe que le complexe mTORC1 mais il a été démontré qu'un traitement prolongé à la rapamycine inhibe mTORC2 de la même manière (Zhou, H. et Huang, 2011). Les deux mTORC1 et mTORC2 interagissent directement avec DEPTOR qui est un régulateur négatif. (Zhou, H. et Huang, 2011). La surexpression de DEPTOR régule à la baisse l'activité de mTORC1 et de mTORC2 *in vitro*. mTORC1 et mTORC2 peuvent tous deux inhiber DEPTOR par phosphorylation (Zhou, H. et Huang, 2011).

Ces deux complexes fonctionnent différemment avec des mécanismes d'activation distincts, des cibles divergentes régulant différents systèmes et fonctions cellulaires. Plus précisément, mTORC1 régule spécifiquement la synthèse protéique, le

métabolisme énergétique, l'autophagie, la motilité et l'invasion. mTORC1 est régulée par des facteurs de croissance, par des acides aminés, et la signalisation Wnt et celle impliquant la voie PI3K/Akt (Laplane et Sabatini, 2009);(Zhou, H. et Huang, 2011). Les niveaux de phosphorylation de mTORC1 et des cibles en aval eIF4E, 4EBP1, S6K1 et S6 sont des biomarqueurs diagnostiques et thérapeutiques pour différents types de cancers (Liao et al., 2012; Zhou, H. et Huang, 2011). De plus, l'activation de mTORC1 par phosphorylation active directement ou indirectement son effecteur p70S6K au niveau du résidu thréonine 389 (Hannan et al., 2003).(Arous et al., 2011; Lehman et al., 2007).

Par ailleurs, mTORC2 régule la motilité cellulaire en réorganisant le cytosquelette d'actine (actine-F) via des mécanismes impliquant les Rho GTPases, ainsi que la PKC α (Liu et al., 2008; Zhou, H. et Huang, 2011). Dans une précédente étude, il a été démontré que la rapamycine inhibe la réorganisation de l'actine-F et la phosphorylation des protéines FAK (Liu et al., 2008). Actuellement, les voies signalétiques menant à la régulation de la phosphorylation des protéines d'adhésion focale par le biais de mTORC2 ne sont pas encore bien identifiées.

Finalement, de plus en plus d'études suggèrent que les voies PI3K, mTORC1-mTORC2 et p70S6K, jouent un rôle essentiel dans la régulation de la motilité des cellules tumorales et de l'invasion des métastases (Chen, J. S. et al., 2009; Gulhati et al., 2011; Liu et al., 2006).

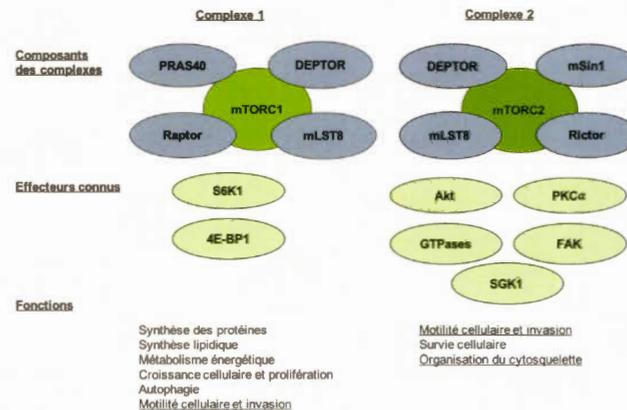


Figure 1.10 Les complexes mTORC1 et mTORC2 et leurs rôles dans la signalisation des cellules cancéreuses

mTOR fonctionne sous la forme de deux complexes de signalisation distincts, mTORC1 et mTORC2. mTORC1 est composé de mTOR, raptor, PRAS40 et mLST8; mTORC2 est composé de mTOR, rictor, mSin1 et mLST8. Les deux mTORC1 et mTORC2 interagissent avec DEPTOR qui est un régulateur négatif. Adaptée de Zhou, H. et Huang, 2011

1.5.4. La voie Wnt / β -caténine

Les protéines Wnt (dérivé de Wg et Int pour Wingless et site d'INTEgration) sont des glycoprotéines qui régulent l'organogenèse, la prolifération et la polarité cellulaires (Clevers, 2006; Hirabayashi et al., 2004). Lorsque les protéines Wnt se lient à leurs récepteurs, plusieurs voies différentes peuvent être activées. Premièrement, Wnt active la voie canonique qui est dépendante de la β -caténine. Ensuite, la protéine Wnt active aussi les voies non canoniques, qui sont indépendantes de la β -caténine et active en aval les protéines Jun N-terminal Kinase (JNK), Rho et Rac (Seidensticker et Behrens, 2000). En l'absence de ligand Wnt, la β -caténine est phosphorylée par CK1 et GSK3- β et dégradée par le protéasome. Avec la stimulation de Wnt, la signalisation par le récepteur transmembranaire Frizzled (Fz) induit la double phosphorylation de LRP6 par CK1 et GSK3- β , ce qui permet la dislocation et la translocation de la β -caténine dans le noyau où elle se

complexifie avec les membres de la famille Lef/Tcf pour induire la transcription des gènes cibles (**Fig. 1.11**) (Komiya et Habas, 2008). L'activation des composantes en aval de cette voie de signalisation, comme la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3) et la β -caténine nucléaire, est positivement corrélée à un mauvais diagnostic chez les patients atteints de cancer du sein (Logullo et al., 2010; Mauvoisin et al., 2013; Mauvoisin et Mounier, 2011). De plus, GSK3 est hyper-phosphorylée et donc activée lorsque l'activité de SCD1 est inhibée dans les cellules de cancer du sein (Mauvoisin et al., 2013).

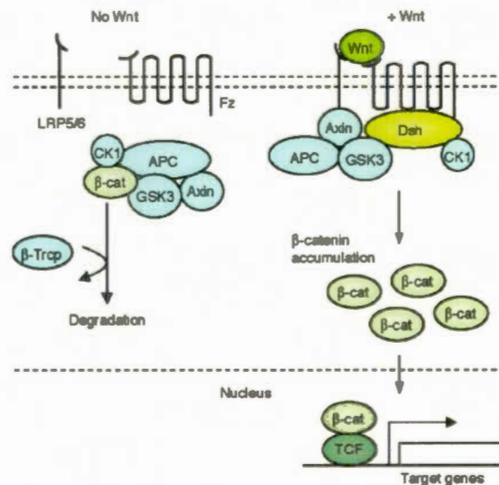


Figure 1.11 Représentation schématique de la voie Wnt canonique

A gauche, en l'absence de ligand Wnt, un complexe d'Axin, APC, GSK3- β , CK1 et β -caténine est formé dans le cytosol. La β -caténine est alors phosphorylée par CK1 et GSK3- β , dégradée par la machinerie protéosomale induite par β -TrCP. À droite, suite à une stimulation Wnt, la signalisation via le récepteur Fz et le co-récepteur LRP5/6 induit la double phosphorylation de LRP6 par CK1 et GSK3- β , ce qui permet la translocation d'un complexe protéique contenant l'Axine du cytosol à la membrane plasmique. Dsh est également recruté sur la membrane et se lie à Fz et l'Axine se lie à LRP5/6 phosphorylé. Ce complexe formé au niveau de la membrane induit la stabilisation de la β -caténine via la séquestration et / ou la dégradation de l'Axine. La β -caténine effectue alors une translocation dans le noyau où elle se complexifie avec les membres de la famille Lef/Tcf pour induire la transcription des gènes cibles. Tirée de Komiya et Habas, 2008

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

2.1. Hypothèses

SCD1 est une enzyme impliquée dans la lipogenèse *de novo* et est responsable de la formation d'acides gras mono-insaturés. Lorsque plusieurs acides gras sont disponibles (saturés, mono-insaturés, polyinsaturés), les acides gras mono-insaturés sont préférentiellement incorporés dans les triglycérides qui sont une réserve d'énergie fondamentale. De plus, les acides gras mono-insaturés ont une importance majeure dans la régulation de la fluidité membranaire par les phospholipides. (Man et al., 2006). Les phospholipides sont les composants majeurs des membranes plasmiques et la composition en acides gras influence la fluidité de la membrane. En effet, si les membranes comportent davantage d'acides gras insaturés, elles se fluidifient grâce aux doubles liaisons qui empêchent les chaînes aliphatiques de s'organiser parallèlement entre elles (Los et Murata, 2004). Plusieurs équipes de recherche ont déjà montré l'existence d'un lien entre le métabolisme des lipides et le cancer (Sounni et al., 2014). De plus, le métabolisme lipidique est considéré comme l'un des apports énergétiques les plus importants dans les cancers du sein, en plus de l'effet Warburg et du métabolisme de la glutamine. Il a également été suggéré que le métabolisme lipidique a une implication dans la formation de métastases dans les cancers du sein (Sounni et

al., 2014). En effet, l'augmentation de l'expression et de l'activité de SCD1 est corrélée avec une diminution de la survie chez plusieurs types de cellules cancéreuses comme celles du foie, du poumon, du sein et de la prostate (Fritz et al., 2010; Huang, G. M. et al., 2015; Huang, J. et al., 2016; Ide et al., 2013; Mason et al., 2012; Scaglia et al., 2009; von Roemeling et al., 2013). L'implication de SCD1 dans le processus de la formation des métastases a été étudiée précédemment par notre équipe dans deux lignées de cancer du sein (MDA-MB-231 et MCF-7). Ces résultats indiquent que SCD1 joue un rôle dans la TEM via la voie Wnt/ β -caténine (Mauvoisin et al., 2013). Or, la TEM, différenciant les cellules épithéliales en cellules mésenchymateuse, est associée à une haute agressivité des tumeurs (Nieva et al., 2012). De plus, l'agressivité de la tumeur a été corrélée à la présence d'acides gras mono-insaturés liées à une forte activité désaturase chez les patientes atteintes du cancer du sein (Zhu et al., 1995). Par ailleurs, l'acide oléique, l'un des produits principaux de SCD1, activerait spécifiquement la PLD2 pour former de l'acide phosphatidique lui-même associé à une haute agressivité des cellules de cancer du sein. L'acide oléique sous la forme d'un acide gras libre est capable d'entrer dans les cellules et une partie de ses effets pourrait être attribuée à sa métabolisation (Kim et al., 1999; Scott et al., 2009).

À la lumière de ces connaissances, notre hypothèse générale est que SCD1 jouerait un rôle clé dans la progression métastatique des cellules de cancer du sein. D'une part, les activités de SCD1 et PLD2 pourraient influencer leur potentiel migratoire. D'autre part, ces changements de comportements migratoires pourraient être accompagnés par des modifications au niveau de la morphologie des cellules de cancer du sein. Par ailleurs, l'acide phosphatidique produit par la PLD2 pourrait être aussi capable d'activer la voie de signalisation mTOR. Notre étude vise ainsi à mieux comprendre l'implication de SCD1 dans la migration cellulaire à travers l'activation de la voie de signalisation PLD2/mTOR pour déterminer si cette désaturase pourrait être la cible d'un traitement contre les métastases du cancer du sein. Globalement, le but est de

mieux caractériser le lien entre SCD1, l'acide oléique et leurs rôles dans les différentes voies de signalisation impliquées dans la progression du cancer du sein métastatique.

Dans la présente étude, les hypothèses sont que :

- (1) SCD1, de par son expression et son activité, joue un rôle dans la migration des cellules des cancers du sein métastatique;
- (2) l'acide oléique, produit principal de SCD1, active la voie de signalisation dépendante de PLD2 et favorise la migration des cellules de cancer du sein métastatique;
- (3) l'activation de la voie mTOR via PLD2 conduit à la migration et la prolifération des cellules du cancer du sein métastatique.

2.2. Objectifs

Pour cela, dans cette étude les objectifs sont :

- Étudier, dans un contexte *in vitro*, les processus de progression métastatiques comme la migration, l'invasion et la prolifération cellulaires en utilisant la lignée de cellules MDA-MB-231, cellules issues d'un cancer du sein triple négatif hautement métastatique,
- Moduler l'activité de SCD1 en traitant les cellules avec un inhibiteur dirigé contre SCD1 et avec des acides gras : les acides palmitoléique et oléique, produits de SCD1 afin de mimer la suractivation de cette dernière dans les cellules MDA-MB-231 ;
- Caractériser les mécanismes moléculaires impliquant les enzymes SCD1, PLD2 dans le processus de migration des cellules de cancer du sein métastatique afin :
 - o D'évaluer l'activation de la voie mTOR par l'acide oléique en modulant l'activité de PLD2 ;

- De caractériser une voie de signalisation impliquant SCD1 qui régule la migration cellulaire dans la lignée cellulaire MDA-MB-231

CHAPITRE III

ARTICLE SOUMIS AU JOURNAL BREAST CANCER (JUN 2019)

SCD1 activity promotes triple-negative breast cancer cell migration via a PLD-mTOR pathway

Marine Lingrand, Simon Lalonde, Karl-F. Bergeron, Eric Rassart and Catherine Mounier*

Molecular Metabolism of Lipids Laboratory, Biological Sciences Department, University of Quebec in Montreal (UQAM)

* **To whom correspondence should be addressed:** Catherine Mounier, Biological Sciences Department, UQAM, 141 President-Kennedy Avenue, Montreal (Quebec), Canada H2X 1Y4, 1-514-897-3000 extension 8912, mounier.catherine@uqam.ca

Author contributions: ML and SL performed experiments. ML and KFB wrote the manuscript. ER and CM edited the manuscript.

3.1. Abstract

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women. Despite high survival rates in Western countries, treatments are less effective in metastatic cases. High expression levels of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) have been reported in BC. Our Kaplan-Meier survival analyses suggest that SCD1 expression in the primary tumor is associated to metastasis-related morbid outcomes in BC patients. SCD1 is an enzyme that catalyzes the formation of oleic acid (OA), a lipid stimulating the migration of metastatic BC cells. Using the TNBC-derived MDA-MB-231 cell line, we show that modulation of SCD1 activity by a pharmaceutical inhibitor or by OA treatment (to mimic SCD1 over-activity) is associated with the modification of TNBC cell migration properties, including changes in speed, direction and cell morphology. These effects are not observed in non-TNBC cell lines such as MCF-7 and T47D. Cell migration properties in the MDA-MB-231 cell line are modulated by SCD1 activity through a phospholipase D-mTOR/p70S6K signaling pathway. Taken together, our results establish a key role for the lipid desaturase SCD1 in the migration properties of TNBC cells.

Abbreviations:

mTOR: mammalian target of rapamycin; SCD1: stearoyl-coenzyme A desaturase-1; OA: oleic acid; POA: palmitoleic acid; PLD: phospholipase D; p70S6K: p70S6 kinase; TNBC: triple-negative breast cancer; BSA: bovine serum albumin; DMSO: dimethyl sulfoxide

Keywords: stearoyl-coenzyme A desaturase-1; oleic acid; phospholipase D; mammalian target of rapamycin; triple-negative breast cancer

3.2. Introduction

Breast cancers are classified in different subtypes according to the presence or absence of key molecular markers. Triple-negative breast cancer (TNBC) is a subtype characterized by the lack of estrogen and progesterone receptor as well as human epidermal growth factor receptor-2 amplification ([Hudis et Gianni, 2011](#)). TNBC patient survival is the shortest across breast cancer subtypes ([Kwan et al., 2009](#)). TNBC is aggressive, invasive and highly metastatic, rendering it particularly difficult to treat. Metastasis, a multistep process leading to cancer dissemination from the primary tumor, involves several complex cell behaviors including: epithelial-mesenchymal transition, intra/extravasation, migration and proliferation ([Gunasinghe et al., 2012](#); [Saunus et al., 2017](#)).

Stearoyl-coenzyme A desaturase-1 (SCD1) catalyzes the Δ^9 -desaturation of saturated fatty acids to produce mono-unsaturated fatty acids: oleic acid (OA) and palmitoleic acid (POA). Changes in saturated and mono-unsaturated fatty acid levels can alter a wide range of cellular mechanisms involved in carcinogenesis, such as membrane phospholipid synthesis, energy metabolism, and inflammation signaling ([Igal, 2010, 2011](#)). Interestingly, lipid desaturation has also been correlated with higher breast cancer risk ([Chajes et al., 1999](#); [Guo et al., 2014](#)). Previous studies have established a key role for SCD1 in several types of human cancers such as prostate, colon, kidney, liver, lung and even breast cancer ([Fritz et al., 2010](#); [Huang, G. M. et al., 2015](#); [Huang, J. et al., 2016](#); [Ide et al., 2013](#); [Mason et al., 2012](#); [von Roemeling et al., 2013](#)). SCD1 is thought to be an important factor in cell proliferation by regulating anti-apoptosis signals, which would promote cell growth and survival ([Mason et al., 2012](#); [Scaglia et al., 2009](#)). Moreover, SCD1 has been associated to a metabolism state favoring tumor growth ([Igal, 2010](#); [Mason et al., 2012](#); [Nashed et al., 2012](#)). High levels of *SCD1* expression have previously been associated with breast cancer ([Holder et al., 2013](#); [Ide](#)

et al., 2013). However, these studies have mainly focused on the development of the primary breast tumor. A possible role for SCD1 in the metastatic process has only begun to be explored. Elevated *SCD1* expression has interestingly been reported in breast tumors with increased probability of metastatic progression (Peck et al., 2016). Moreover, our group has previously shown that SCD1 plays a role in the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells in culture (Mauvoisin et al., 2013), thereby hinting at a possible role for SCD1 in the metastatic process.

OA, the main product of SCD1 activity, has been shown to promote TNBC-derived MDA-MB-231 cell migration by a phospholipase C-dependent mechanism (Navarro-Tito et al., 2010). In addition, OA induces MDA-MB-231 cell proliferation by activating G protein-coupled receptor 40 (Hardy et al., 2005; Soto-Guzman et al., 2008). Phosphatidic acids, a family of labile signaling lipids produced by phospholipase D (PLD) activity, also stimulate TNBC cell migration and invasion (Sliva et al., 2000; Zheng et al., 2006). In a breast tumor xenograft model, tumor growth and metastasis are stimulated following phosphatidic acid overproduction (Henkels et al., 2013). Interestingly, the PLD2 enzyme isoform can be selectively activated by OA (Kim et al., 1999; Sarri et al., 2003). Therefore, the possibility of a conjunct role of SCD1 and PLD in breast tumorigenesis, particularly the PLD2 isoform, warrants exploration.

In the present study, we confirm that migration of the TNBC-derived MDA-MB-231 cell line is most responsive to OA compared to non-TNBC cell lines. PLD activity appears necessary for the effect of OA on MDA-MB-231 cell migration speed. Corresponding changes in cell morphology are associated to the modification of MDA-MB-231 cell migration properties following OA-treatment: cells are more elongated and undergo less directional changes during migration. Taken together, our results underline the key role of SCD1 activity, and delineate an OA-PLD-mTOR/p70S6K signaling pathway, in TNBC cell migration.

3.3. Material and Methods

Kaplan-Meier plots

The breast cancer Kaplan-Meier plotter (kmplot.com) (Gyorffy et al., 2010) was used to generate distant metastasis-free survival plots over a period extending up to 180 months. Patients were separated in two groups according to the median level of expression of SCD1 (Affymetrix probe ID: 200832_s_at), PLD1 (177_at) or PLD2 (209643_s_at) in their primary tumor. All breast cancers (n=1747), human epidermal growth factor receptor 2-positive cancers (n=126) and triple-negative breast cancers (n=45) were considered. To evaluate differences between groups, statistical analyses using the log-rank test and the proportional hazards model were made.

Datasets included in analysis: E-MTAB-365, E-TABM-43, GSE11121, GSE12093, GSE12276, GSE1456, GSE16391, GSE16446, GSE16716, GSE17705, GSE17907, GSE18728, GSE19615, GSE20194, GSE20271, GSE2034, GSE20685, GSE20711, GSE21653, GSE2603, GSE26971, GSE2990, GSE31448, GSE31519, GSE32646, GSE3494, GSE37946, GSE41998, GSE42568, GSE45255, GSE4611, GSE5327, GSE6532, GSE7390, GSE9195.

Cell culture and treatments

MDA-MB-231 breast cancer cells (MDA-MB-231-luc-D3H2LN; PerkinElmer, #119369), MCF-7 cells and T47D cells (were a gift from Dr J. J. Lebrun (McGill University, Montreal PQ, Canada) were grown in complete Eagle's minimum essential medium (EMEM) media (Wisent, #320-005-CL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 500 U/mL penicillin and 500 µg/mL streptomycin (LT Gibco, #15070063), and maintained in a 5% CO₂ incubator at 37°C. All treatments were done in serum-free EMEM media. Stocks of bovine serum albumin (BSA)-conjugated fatty acids were prepared at a 2:1 molar ratio (3.33mM fatty acid: 1.7mM BSA). Treatments with 50 µM oleic acid (OA; Sigma, #O-3008) and palmitoleic acid (POA; Cayman

chemical company, #10009871) were performed for 24h using BSA as vehicle and control. Treatments with 1 μ M SCD1 inhibitor (SCD1i) A939572 (Biofine International, #37062) or 10 μ M PLD2 inhibitor (PLD2i) VU0285655-1 (Avanti Polar Lipids, #857372) were performed for 4h while treatment with 200 nM rapamycin (Calbiochem EMD Biosciences, #53123-88-9) was performed for 24h using dimethyl sulfoxide (DMSO) as vehicle.

Kinetic wound healing assay

MCF-7, T47D and MDA-MB-231 cells were seeded in 24-well plates at a density of 5×10^4 cells per well. The next day, cells were treated for 24h with fatty acids (OA, POA) and rapamycin. Cells were treated with SCD1i, PLD2i or a combination of both inhibitors during the last 4h of the 24h treatment period. The confluent cell monolayer was scratched and wound recovery was monitored under 5% CO₂ and at 37°C. During this 12h live imaging period, images were acquired every 15 min using a Nikon Eclipse Ti inverted microscope. Wound area at each acquisition was measured using NIS-Elements software (Nikon). Wound recovery corresponds to the shrinking wound surface relative to the initial area. Individual cells (30 cells per treatment condition) were tracked with ImageJ software to determine cell migration speed and average distance between each acquisition step. The directionality ratio is the distance between initial and end point divided by the total migration path length. Cell trajectory tracings and vector diagrams were generated with ImageJ software.

Cell morphology

MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well (60-70% confluency) and grown on coverslips. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) while actin filaments were stained with Phalloidin-Alexa 488 (Cytoskeleton, #PHDG1-A). Images were captured through the cell nuclei (single confocal slice) using a Nikon Eclipse Ti

inverted microscope. Three independent experiments were performed with ~40 cells analyzed per experiment and per treatment condition. Area, perimeter and Ferret diameter (largest possible cell diameter) were measured with ImageJ software. The roundness index ($\text{perimeter}^2/4*\pi*\text{area}$) is a value from 0 to 1, where 1 symbolizes a perfect circle.

Protein extraction and Western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.5% Na-deoxycholate; 0.1% SDS; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 50 mM NaF) containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma, #P8340; #P0044). After centrifugation, proteins were recovered in the supernatant. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad, #5000006). Proteins were separated on SDS-PAGE transferred to PVDF membranes. Primary antibodies: phospho-mTOR Ser2448 (1:1000; Cell Signaling, #2971), phospho-p70S6K Thr389 (1:1000; Cell Signaling, #9205), mTOR (1:1000; Cell Signaling, #2972S), p70S6K (1:1000; Cell Signaling, #9202), phospho-Akt Ser473 (1:1000; Cell Signaling, #9271), SCD1 (1:1000; Abcam, #ab19862) or α -Tubulin (1 $\mu\text{g/ml}$; Abcam, #ab4074), were used. HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:1000; Cell Signaling, #7076S) and anti-rabbit IgG (1:4000 Cell Signaling, #7074) were used as secondary antibodies. Signals were revealed using the ECL substrate (Millipore, #WBKLS0100). In order to normalize and verify proteins amounts equality, membranes were finally stained with amido black solution (0.25% amido black, 45% MeOH, 45% ddH₂O, 10% glacial HOAc) and de-stained with the same solution without dye.

Foci forming assay

MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well and treated 48h with SCD1i, PLD2i or a combination of both inhibitors. After treatment, cells were grown in inhibitor-free EMEM media (detailed above) for up to 7 days in a 5% CO₂

incubator at 37°C to allow for large colonies to form. The colonies were fixed in ice-cold 100% methanol and stained with 0.2% crystal violet in a methanol-water (25:75) solution. Images (36 fields per condition) were acquired with a Nikon Eclipse Ti inverted microscope.

Cell viability assay

MDA-MB-231 cell viability was evaluated with a MTT formazan colorimetric assay (Sigma, #M2003). Cells were seeded at a density of 1.5×10^4 cells per well in EMEM media (detailed above). The next day, cells were treated with SCD1i, PLD2i or a combination of both inhibitors for 96h. Cells were transferred to fresh media containing 1 mM MTT and placed in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 4h. The formazan crystals were dissolved in lysis solution (10% SDS, 10mM HCl) overnight at 37°C and absorbance was measured at 570 nm with correction at 690 nm with BioTek Eon Microplate Spectrophotometer. MTT concentration is indicative of mitochondrial activity and, by extension, cell viability.

Transwell cell migration and invasion assays

MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 5×10^4 cells per well. The next day, cells were treated 4h with SCD1i, PLD2i or a combination of both inhibitors. Cells were trypsinized and transferred to a non-coated (migration) or Matrigel-coated (invasion) 8µm pore polycarbonate membrane insert (Corning, #3422) in serum-free EMEM media containing SCD1i, PLD2i or a combination of both inhibitors. EMEM media supplemented with 10% FBS was used as a chemoattractant in the bottom part of the chamber. Cells were allowed to migrate through the semi-permeable membrane for 6h. For invasion assays, cells were allowed to migrate through the Matrigel (and semi-permeable membrane) for 24h. Cells were fixed in 4% formaldehyde and nuclei stained with DAPI and counted with ImageJ. Images of the cells located on both sides of the semi-permeable membranes were acquired with a Nikon Eclipse Ti inverted

microscope. Images were superposed and cells were counted with ImageJ software (~2000 cells per treatment condition).

Statistical analysis

Unless specified otherwise, data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test was used in order to compare multiple groups at a time. A Student's t-test was used to compare two groups at a time. Generally, a one-tailed unpaired test was applied, except with data normalized to control where a "one sample" t-test was used. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Each independent experiment was completed with distinct cell cultures prepared on different days (independent replicates).

3.4. Results

SCD1 expression is specifically associated with morbid outcomes in metastatic triple-negative breast cancer patients

To evaluate the potential role of *SCD1* expression in metastatic breast cancer, we generated Kaplan-Meier plots of distant metastasis-free survival (DMFS) for breast cancer patients over a period extending up to 180 months using available gene expression dataset records ([Gyorffy et al., 2010](#)). These informatics analyses reveal that high *SCD1* expression in the primary tumor is significantly associated to an increased proportion of metastasis-related deaths among all breast cancers, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancers and TNBC patients (**Fig.3.1**). Morbid outcomes are correlated to *SCD1* expression in all breast cancers. Taken together, our DMFS analyses suggest a specific role for *SCD1* in breast cancer metastasis.

Oleic acid specifically stimulates TNBC cell migration

OA, a product of SCD1 enzymatic activity, is known to stimulate the migration of MDA-MB-231 breast cancer cells ([Angelucci et al., 2018](#); [Navarro-Tito et al., 2010](#)). To further characterize the impact of SCD1 activity on breast cancer cell migration, we performed wound healing assays in the presence of the two SCD1 products, OA and POA, to effectively mimic enzymatic over-activity (**Fig.3.2A**). OA specifically increases wound recovery by 1.5 fold in the three breast cancer cell lines tested, while POA had no effect (**Fig.3.2D-F**). Notably, both basal and OA-stimulated wound healing amplitude is more than 4 times higher in the TNBC-derived MDA-MB-231 line (40 to 59%) relative to the non-TNBC cell lines MCF7 and T47D (12 to 13%). Since wound healing in our assays could be due a combination of cell migration and cell proliferation, and given that OA is known to stimulate breast cancer cell proliferation ([Hardy et al., 2005](#)), we determined the specific contribution of cell migration to our assays by analyzing individual cell tracks. OA-stimulated cell migration is only observed in the TNBC MDA-MB-231 line (**Fig.3.2B,C**). Wound healing in other OA-stimulated cell lines was due to cell proliferation as basal and stimulated migration speed (as well as distance travelled between each image acquisition) are similar in the non-TNBC MCF-7 and T47D lines (**Fig3.2B,C**). Considering that MDA-MB-231 cells were the only ones whose migration was responsive to OA, we focused our investigation on this TNBC line.

To better understand the effect of OA treatment on MDA-MB-231 cell migration, we further analyzed individual cell tracks in our wound healing assays (**Fig3.3A**). OA increases the migration speed of individual cells (**Fig3.3C**) as reflected by an increase in the distance travelled between each microscope image acquisition (**Fig3.3D**). Intriguingly, the direction of cell migration is deregulated by OA treatment: while control and POA-treated cells typically adopt an overall migration pattern perpendicular to the wound (as determined from the final cell position relative to the

initial position, i.e. the cell displacement), most OA-treated cells tend instead to migrate diagonally relative to the wound (**Fig3.3B**). Moreover, OA treatment steadies the direction of cell migration by diminishing the frequency of directional changes, leading to a significant increase in the directionality ratio of MDA-MB-231 cell migration (**Fig3.3E**).

Modulation of SCD1 activity alters MDA-MB-231 cell morphology

Cancer cell morphology can be an indicator of migration behavior (Clark et Vignjevic, 2015). To better understand how SCD1 can modulate TNBC cell migration, we analyzed the morphology of MDA-MB-231 cells following treatment with OA or with A939572, a specific pharmacological inhibitor of SCD1 activity (**Fig.3.4A**). Compared to untreated control cells, OA tends to increase the cell surface area (p-value = 0.0770) while significantly expanding the cell perimeter (**Fig.3.4B,C**). Cells treated with the SCD1 inhibitor are rounded (less elongated) relative to control while OA-treated cells adopt a more elongated morphology as reflected by a longer maximum cell diameter (Ferret diameter) (**Fig.3.4D,E**). These cell shape changes are consistent with the modification of migration properties observed in OA-stimulated cell migration (**Fig3.3**), as elongated cells typically display diminished directional changes and increased migration speed (Petrie et al., 2009).

Oleic acid stimulates MDA-MB-231 migration through a PLD-mTOR/p70S6K pathway

PLD activity, particularly of the PLD2 isoform, has been implicated in the breast cancer metastatic process (Henkels et al., 2013). Moreover, OA stimulates the enzymatic activity of the PLD2 isoform, but not the PLD1 isoform (Kim et al., 1999; Sarri et al., 2003). Interestingly, Kaplan-Meier DMFS survival plots analyses reveal that high *PLD2* expression in the primary tumor is specifically associated to an increased proportion of metastasis-related deaths among TNBC patients (**Fig.3.5A-C**), similarly

to what we show for *SCD1* expression above (see **Fig.3.1**). *PLD1* expression however was not significantly associated to metastatic breast cancer patient outcomes (**Supplementary Fig.S3.1**).

Phosphatidic acids produced by PLD enzymes can activate and stabilize mTOR complexes (Foster, 2009; Toschi et al., 2009), which have been shown to play an important role in TNBC progression (Costa et al., 2018). To determine if OA-stimulated TNBC cell migration is dependent on mTOR and/or PLD2 activation, we performed wound healing assays in the presence of specific inhibitors. Indeed, both Rapamycin (a mTOR inhibitor) and VU0285655-1 (a PLD inhibitor with highest specificity for the PLD2 isoform) block the stimulating effect of OA on wound healing and even diminish wound recovery below the unstimulated control level (**Fig.3.5D**). We next sought to determine if mTOR activity in OA-stimulated TNBC cells is involved downstream of PLD2. Activating phosphorylation of mTOR (Ser2448) and its effector p70S6K (Thr389) in OA-treated MDA-MB-231 cells is blocked by the PLD2 inhibitor (**Fig.3.5E,F**), showing that OA stimulates mTOR/p70S6K signaling via PLD2 activity.

MDA-MB-231 cell migration is dependent on SCD1 and PLD activity

To further evaluate the role of SCD1 in TNBC cell migration, we determined the impact of SCD1 activity inhibition in several migration assays, alone and in combination with PLD2 activity inhibition. Treatments with the SCD1 inhibitor reduce wound healing more severely than PLD2 activity inhibition alone (**Fig.3.6A**), suggesting again that SCD1 activity is necessary for the contribution of PLD2 activity to our assays. In transwell migration and invasion assays however, the lowering effect of SCD1 and PLD2 inhibitors, both individually and in combination, on MDA-MB-231 cell behavior is undistinguishable (**Fig.3.6B,C**), confirming that SCD1 and PLD2 act in the same pathway regulating cell migration. Anti-proliferation effects, of the SCD1 inhibitor in particular, might account for the discrepancy observed between our

wound healing and cell migration assays, as cell proliferation contributes in part to wound healing. Therefore, we next ascertained the effect of these inhibitors on MDA-MB-231 cell proliferation. Though treatment with each inhibitor alone tends to diminish the number of foci (a measure of cell proliferation), only co-inhibition of SCD1 and PLD2 activities clearly diminishes both MDA-MB-231 cell proliferation and cell viability (**Fig.3.7**). Altogether, our inhibitor treatment experiment results are consistent with a pathway where SCD1 acts upstream of PLD2 to regulate cell migration.

3.5. Discussion

In this study, we probe the role of SCD1 activity in breast cancer cell migration. An interrelationship between *SCD1* expression, tumor grade and invasive histological classification was previously suggested in breast cancer tissue (Guo et al., 2014). Promotion of *SCD1* expression by growth factor signaling has also been associated with migration in breast cancer cell lines (Angelucci et al., 2015). Our Kaplan-Meier analyses confirmed that *SCD1* gene expression is linked to breast cancer metastasis in humans. Indeed, we associated high *SCD1* expression in the primary tumor to poor outcomes implicating metastasis, in all breast cancer (**Fig.3.1**). This association was also found for *PLD2* expression levels but only in TNBC patients. However, high or low PDL1 expression in the primary tumor are undistinguishable in all breast cancer patients (**Fig3.5A-C and Supplementary Fig.S3.2**). Furthermore, migration was specifically increased in TNBC-derived MDA-MB-231 cells following treatment with the main SCD1 product OA (**Fig.3.2A-C**), justifying a more detailed study on MDA-MB-231 cells. Intriguingly, POA (a minor SCD1 product compared to OA) had no effect on breast cancer cell migration. OA evidently has specific effects on migrating cells that POA cannot trigger. One possibility is that OA, and not POA, is used to

modify proteins regulating migration. Such specificity in the effect of OA versus POA has been reported in some proteins; e.g. Wnt ([Rios-Esteves et Resh, 2013](#)) and SREBP1 ([Lounis et al., 2017](#)). High SCD1 expression (and high enzymatic activity leading to OA overproduction) might be particularly relevant in the primary tumor as the three breast cancer cell lines investigated here, all derived from metastatic sites, shared similar SCD1 protein levels (**Supplementary Fig.S3.2**) despite reacting differently to OA in our migration assays.

Tumor cell morphology is related to their aptitude to migrate ([Petrie et al., 2009](#)). Cell detachment from the primary tumor and adoption of a lengthened morphology is preliminary to invasion ([Friedl et Alexander, 2011](#); [Friedl et Wolf, 2003](#); [Krakhmal et al., 2015](#)). We previously suggested that SCD1 is implicated in the transformation of MDA-MB-231 cells from an epithelial to a mesenchymal phenotype ([Mauvoisin et al., 2013](#)). Accordingly, with a role for SCD1 in breast cancer cell morphology changes contributing to metastasis, we show in this current study that inhibition of SCD1 enzymatic activity induces a rounded, less elongated phenotype in MDA-MB-231 cells (**Fig.3.4**). Since SCD1 enzymatic activity is directly correlated, at least in liver tissue ([Miyazaki et al., 2000](#)), to the level of mono-unsaturated fatty acids like OA – and since OA is the major SCD1 product ([Miyazaki et al., 2001](#)) – we used OA treatment to mimic SCD1 over-activity. OA treatment resulted in elongated, spindle-shaped MDA-MB-231 cells (**Fig.3.4**). This elongated cell morphology is consistent with the increased speed (**Fig.3.2B,C and 3.3C,D**) and diminished directional changes observed during migration (**Fig.3A,B**). OA treatment steadied the direction of cell migration (**Fig.3.3E**), perhaps by rendering migrating cells less pliable and/or less responsive to extracellular cues ([Berzat et Hall, 2010](#)). It seems paradoxical that wound recovery was more extensive following OA treatment although cells did not tend to migrate perpendicular to the wound and instead migrated diagonally to it. Presumably, the treated cell's streamlined movement and increased speed more than compensated for their lack of directional variation. Of interest, lysophosphatidic acid, a lipid class

whose composition often incorporates OA, has also been reported to diminish the directional variation of migrating MDA-MB-231 cells, but it did not increase migration speed ([Weiger et al., 2013](#)). Further investigations will be required to determine if this contrasting effect on migration speed stems from differential cellular processing of these lipids: OA versus oleoyl lysophosphatidic acid. We also characterized the effect of SCD1 activity on TNBC cell invasion through an extracellular matrix (Matrigel). Consistent with the fact that knockdown of *SCD1* expression diminishes MDA-MB-231 cell invasion ([Mauvoisin et al., 2013](#)), inhibition of SCD1 activity also reduced it (**Fig.3.6C**). Overall, our results clearly implicate SCD1 activity as a stimulating factor in MDA-MB-231 breast cancer cell motility.

We also used the VU0285655-1 compound to inhibit PLD2 activity in our assays. A caveat to our approach is that, at the concentration used (10 μ M), this compound can also inhibit PLD1 activity ([Lavieri et al., 2009](#)). Therefore, we cannot exclude the possibility that some of the effects we observed were due to combined inhibition of PLD1 and PLD2. The effects of SCD1 or PLD2 inhibition were undistinguishable in transwell migration/invasion assays suggesting a common signaling pathway (**Fig.3.6B,C**). Yet, in our wound healing assays, SCD1 inhibition had a stronger impact than PLD2 inhibition (**Fig.3.6A**). Perhaps the impact of SCD1 activity on the direction of cell migration underlies part of this phenomenon. Also, since cell proliferation can be a contributing factor to our wound healing assays, and both SCD1 and PLD are known to contribute to the proliferation of breast cancer cell lines ([Chen, Y. et al., 2003](#); [Henkels et al., 2013](#); [Igal, 2016](#); [Luyimbazi et al., 2010](#)), we reasoned that anti-proliferation effects from the inhibitors might account for their differential effects on wound healing. We estimated the impact of our inhibitors on cell proliferation with a foci formation assay. Interestingly, both SCD1 and PLD2 inhibitors tended to diminish foci formation, but this effect only became significant when administered together (**Fig.3.7A**). Simultaneous exposition to the two inhibitors appeared to be somewhat cytotoxic, as conjunct SCD1 and PLD2 inhibition also decreased cell viability

(Fig.3.7B). The diminished MDA-MB-231 proliferation we observed after SCD1/PLD2 co-inhibition might therefore not be entirely caused by reduced enzymatic activity but be caused in part by pharmacological cytotoxicity. As conjunct SCD1/PLD2 activity inhibition diminishes both MDA-MB-231 cell proliferation and migration, it might constitute a valid *in vivo* approach for the control of breast cancer progression.

We aimed to delineate the molecular events underlying the effect of SCD1 activity on MDA-MB-231 cell behavior. The SCD1 product OA can be incorporated into membrane phospholipids that are then processed by PLD to generate phosphatidic acids **(Fig.3.8)** (Cazzolli et al., 2006). Alternatively, PLD2 can be selectively activated by OA (Kim et al., 1999; Sarri et al., 2003). Therefore, we explored the possibility of a sequential mechanism linking SCD1 and PLD activity. We showed that OA stimulated the migration of MDA-MB-231 cells implicating PLD and mTOR suggesting that mTOR is downstream of PLD **(Fig.3.5D-F)**. Furthermore, phosphorylation of mTOR/p70S6K following OA treatment was dependent on PLD activity. The mTOR/p70S6K axis was presumably activated by the products of PLD activity: phosphatidic acids (Foster, 2009). In a manner consistent with this scenario, co-inhibition of SCD1 and PLD was not additive in our MDA-MB-231 migration/invasion assays **(Fig.3.6)**, suggesting that they act in the same molecular pathway. Though the effect of OA on MDA-MB-231 cell behavior was dependent on PLD activity and could result from an activation of PLD2 by OA, we cannot exclude the possibility that SCD1 and PLD could also act on TNBC cell migration through parallel pathways, some of which have been suggested. For example, through lipid desaturation, SCD1 could influence cell membrane fluidity and signaling activity (Coomans de Brachene et al., 2017), which might in turn affect cell migration independently of PLD. OA has also been reported to be involved in other phospholipase-dependent signaling pathways stimulating MDA-MB-231 cell migration. Indeed, pharmacological inhibition of diacylglycerol-generating

phospholipase C blocked OA-stimulated scratch wound closure via arachidonic acid production (Navarro-Tito et al., 2010). Interestingly, arachidonic acid and diacylglycerols are metabolites that can be derived from phosphatidic acids. As arachidonic acid has also been shown to promote MDA-MB-231 cell migration (Navarro-Tito et al., 2008), these phosphatidic acid metabolites might contribute to the activation of the mTOR/p70S6K axis controlling wound closure in our assays.

Taken together, our results strongly suggest that SCD1, through its OA product, stimulates TNBC progression by activating cancer cell migration, invasion and proliferation. OA stands out as a major signaling lipid (as POA as no effect) modulating cancer cell migration through a PLD2-mTOR complex 1 pathway schematically presented in Figure 3.8.

Acknowledgements: We thank Denis Flipo (UQAM) for confocal microscopy guidance as well as Ji Min Guo (Harvard Medical School, Boston) for advice and tools with survival analysis through Kaplan-Meier plots. We also thank David Rhains (Montreal Heart Institute) for critical reading of the manuscript.

Disclosure statement: The authors declare that they have no conflict of interest with the contents of this article.

3.6. Figures

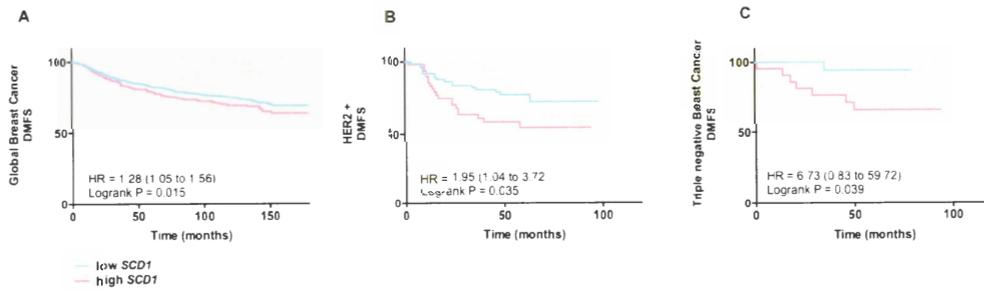


Figure 3.1. *SCD1* expression is associated with morbid outcomes in metastatic breast cancer patients.

Distant metastasis-free survival (DMFS) Kaplan-Meier plots of (A) all (Global) breast cancer, (B) human epidermal growth factor 2-positive (HER2+) breast cancer and (C) triple-negative breast cancer patients. Patients were divided into 2 groups based on the level of *SCD1* expression measured by microarray gene expression profiling of their primary tumor (low expression in light blue; high expression in pink) (Gyorffy et al., 2010). Hazard ratios (HR) were calculated with a 95% confidence interval and p-values were expressed as logrank P.

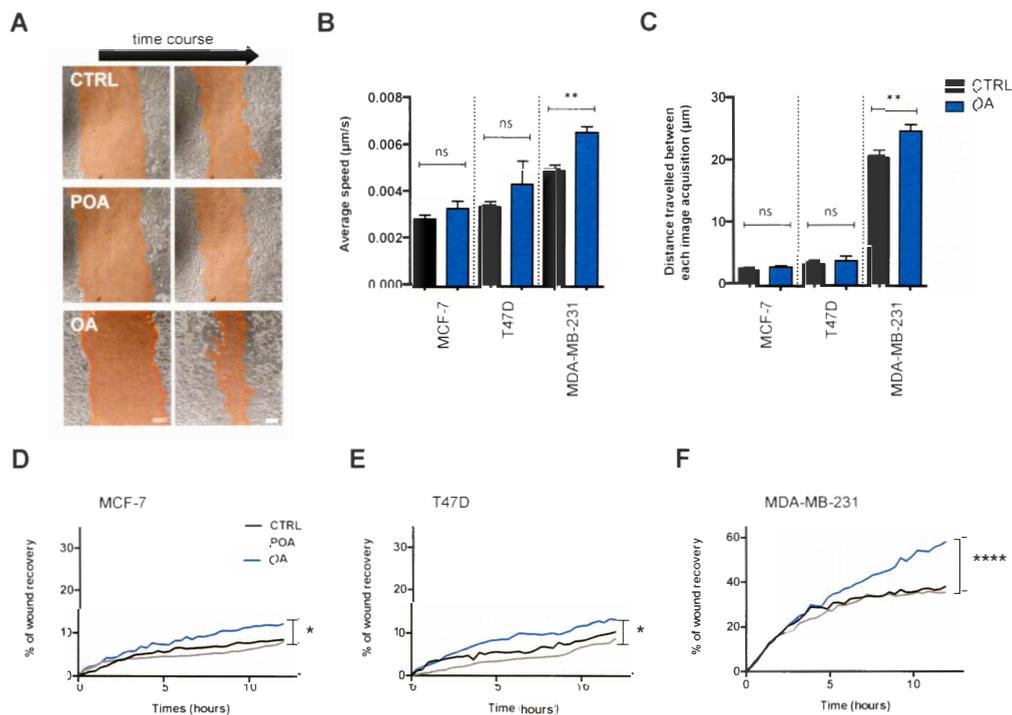


Figure 3.2. Oleic acid stimulates scratch wound closure in several breast cancer cell lines.

Wound recovery after scratch through a monolayer of various breast cancer cell lines was monitored every 15 min during a 12h time course. (A) Representative images of scratch wounds through a monolayer of MDA-MB-231 cells at the beginning (*left panels*) and at the end of the time course (*right panels*). Cells were treated with palmitoleic acid (POA; 50 μ M), oleic acid (OA; 50 μ M) or BSA as control (CTRL). Wound area is highlighted in red. Scale bars = 100 μ m. (B,C) Analysis of individual cell motility after scratch (10 cells per experiment) in three untreated breast cancer cell lines: MCF-7 (n=5 independent replicates), T47D (n=3) and MDA-MB-231 cells (n=4). (B) Average cell speed. (C) Distance travelled by tracked cells between each image acquisition. (D-F) Wound recovery as function of time in (D) MCF-7 (10 individual cells per experiment, n=4 independent replicates), (E) T47D (n=3) and (F) MDA-MB-231 cells (n=7). Results are expressed as percentage of wound recovery relative to the initial wound area. P-values: **** <0.0001, ** <0.01, * <0.05, ns = not significant.

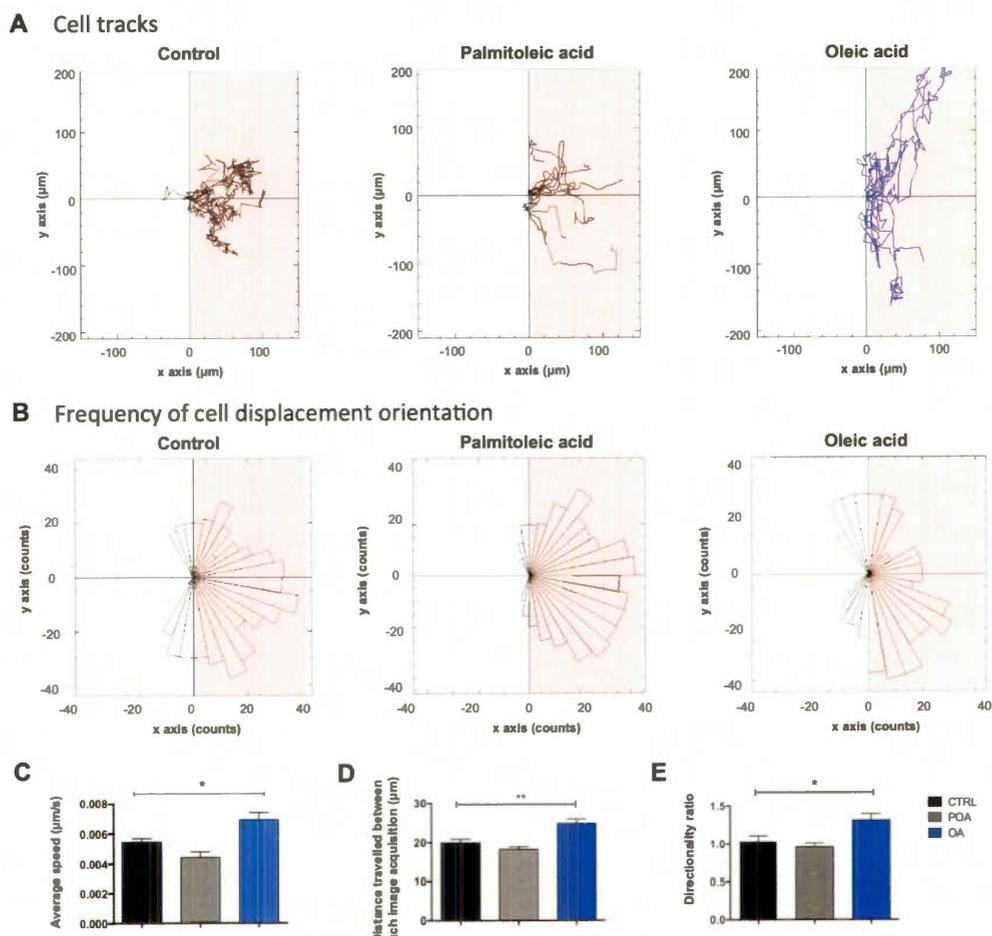


Figure 3.3. Oleic acid increases MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell migration speed and directionality.

Analysis of individual MDA-MB-231 cell migration trajectories during wound recovery after scratch (10 cells per experiment, $n=3$ independent replicates). Cells were treated with palmitoleic acid (POA; $50 \mu\text{M}$), oleic acid (OA; $50 \mu\text{M}$) or BSA as control (CTRL) and monitored every 15 min during a 12h time course. Wound area is highlighted in red. **(A)** Vector diagrams of cell trajectories from one representative experiment. **(B)** Frequency of overall cell displacement orientation (Rose plots) relative to the scratch wound. **(C)** Average cell speed. **(D)** Distance travelled by tracked cells between each image acquisition. **(E)** Directionality ratio normalized to vehicle control (increased directionality corresponds to diminished directional changes during migration). P-values: ** <0.01 , * <0.05 .

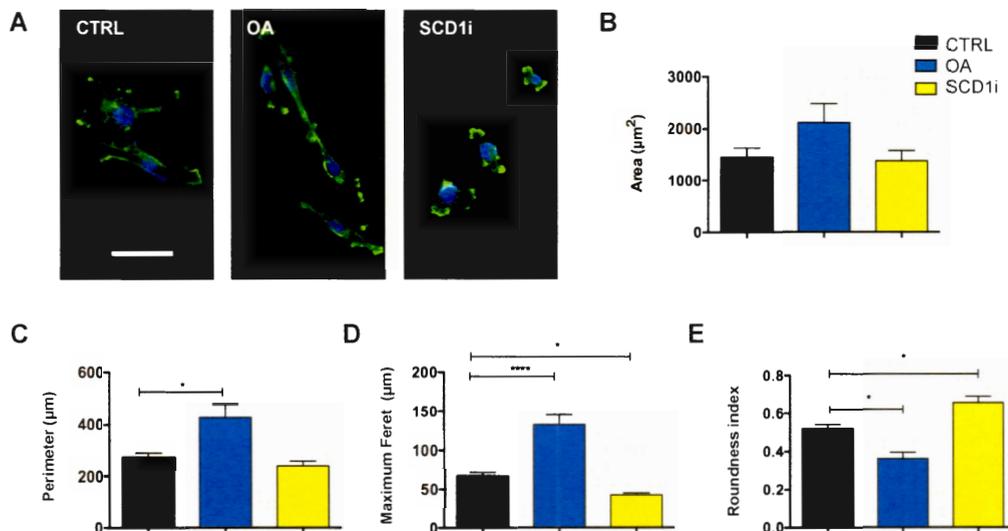


Figure 3.4. SCD1 activity alters MDA-MB-231 cell morphology.

(A) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells treated with OA ($50 \mu\text{M}$), SCD1 inhibitor A939572 (SCD1i; $1 \mu\text{M}$) or BSA and DMSO as control (CTRL). Cell actin filaments are labelled in green. Nuclei are labelled in blue. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. Quantification of (B) cell area, (C) cell perimeter, (D) maximum Feret diameter (longest cell diameter), and (E) roundness index (where 1 = perfect circle). Approximately 120 cells were analyzed per treatment condition (~ 40 cells per condition, $n=3$ independent replicates). P-values: **** <0.0001 , * <0.05 .

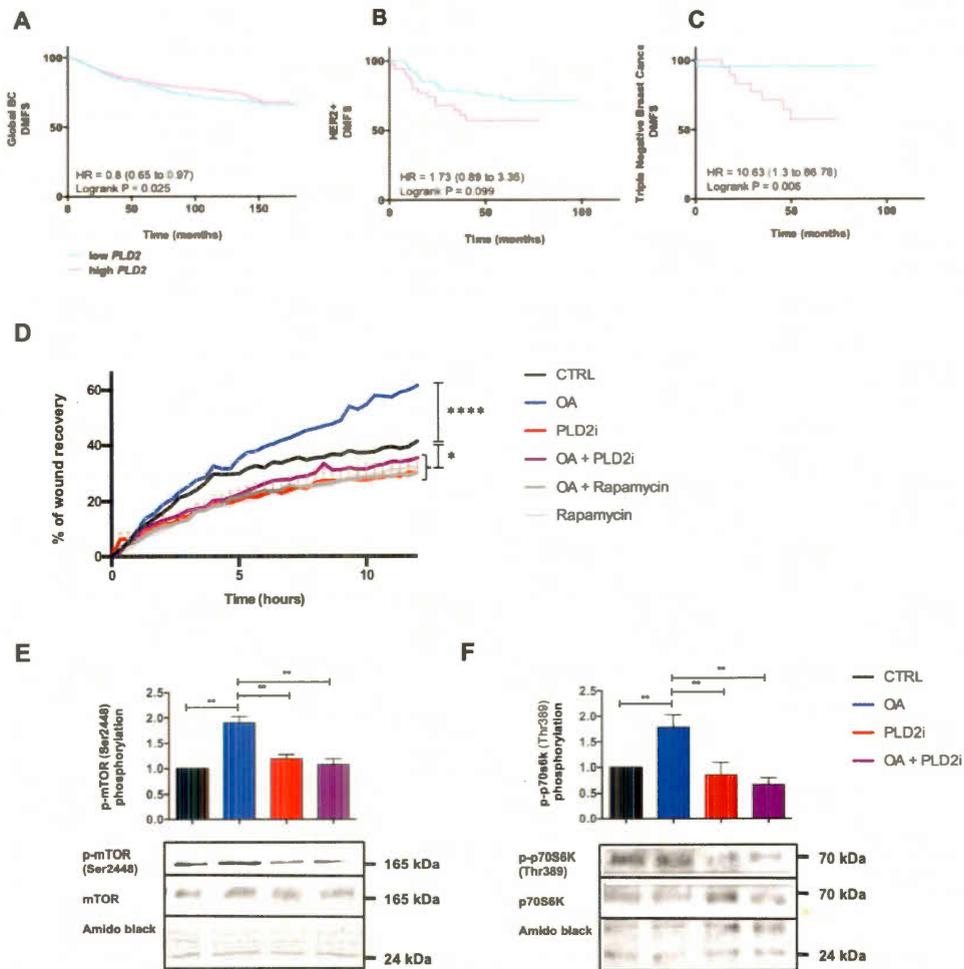


Figure 3.5. Oleic acid promotes MDA-MB-231 wound recovery via PLD and mTOR activities.

Distant metastasis-free survival (DMFS) Kaplan-Meier plots of (A) all (Global) breast cancer, (B) human epidermal growth factor receptor 2-positive (HER2+) breast cancer and (C) triple-negative breast cancer patients. Patients were divided into 2 groups based on the level of *PLD2* expression measured by microarray gene expression profiling of their primary tumor (low expression in light blue; high expression in pink) (Gyorffy et al., 2010). Hazard ratios (HR) were calculated with a 95% confidence interval and p-values were expressed as logrank P. (D) Wound recovery of MDA-MB-231 cells treated with oleic acid (OA; 50 μ M), PLD2 inhibitor VU0285655-1 (PLD2i; 10 μ M), mTOR inhibitor rapamycin (200 nM) or BSA and DMSO as control (CTRL). Results are expressed as percentage of wound recovery during time, relative to the initial wound area (n=6 independent replicates). (E,F) Phosphorylation of mTOR (Ser2448)

and p70S6K (Thr389) relative to total protein levels in treated MDA-MB-231 cells for 4 independent replicates. Levels were normalized to vehicle control for each independent replicate. Representative Western blots (phospho-protein and total protein) are included for each experiment. Loading controls (Amido black) are also provided. P-values: **** <0.0001, ** <0.01, * <0.05.

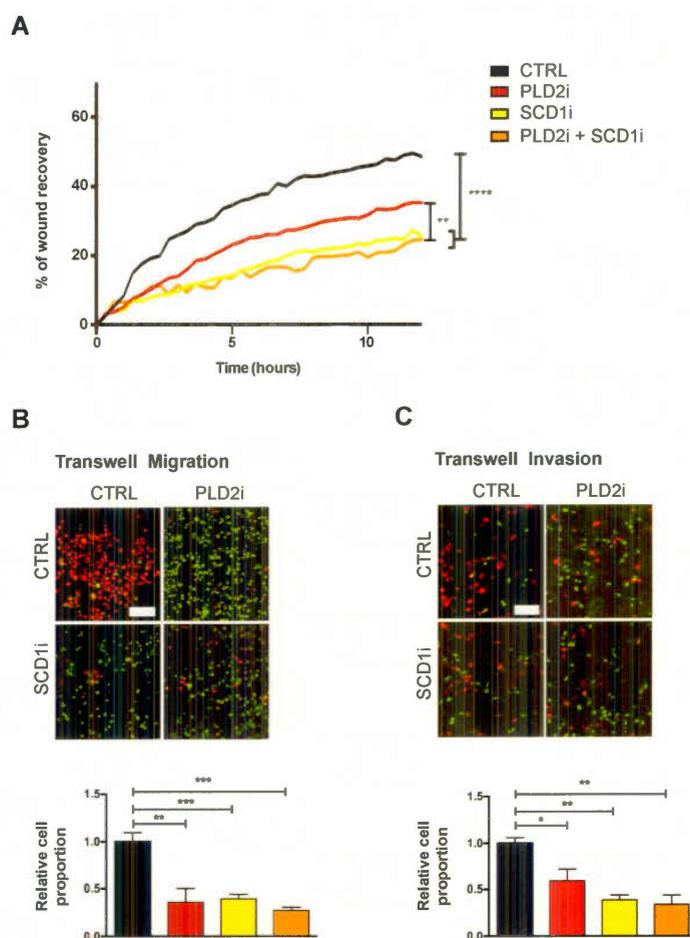


Figure 3.6. MDA-MB-231 cell migration depends on the activity of SCD1 and PLD2 enzymes.

MDA-MB-231 cells were treated with PLD2 inhibitor VU0285655-1 (PLD2i; 10 μ M), SCD1 inhibitor A939572 (SCD1i; 1 μ M) or DMSO as control (CTRL). (A) Scratch wound recovery as a function of time. Results are expressed as percentage of wound recovery relative to the initial wound area (n=8 independent replicates). (B,C) Representative images of transwell migration and invasion (through Matrigel) assay results. Nuclei of cells that crossed the semi-permeable membrane (labelled in red) were superposed with nuclei of cells that did not cross the semi-permeable membrane (labelled in green). The proportion of cells having crossed the membrane relative to vehicle control is presented in the bottom panels (n=4 independent replicates). P-values: **** < 0.0001, *** < 0.001, ** < 0.01, * < 0.05.

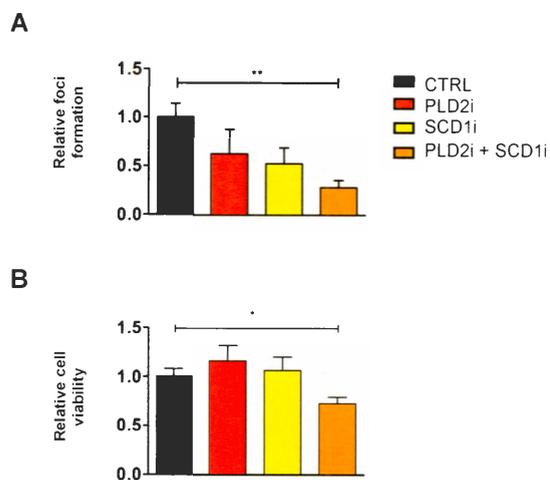


Figure 3.7. Concomitant inhibition of SCD1 and PLD activity decreases MDA-MB-231 cell proliferation and impedes cell viability.

MDA-MB-231 cells were treated with PLD2 inhibitor VU0285655-1 (PLD2i; 10 μ M), SCD1 inhibitor A939572 (SCD1i; 1 μ M) or DMSO as control (CTRL). (A) Foci formation and (B) cell viability (MTT reduction assay) relative to vehicle control (n=4 independent replicates). P-values: ** < 0.01, * < 0.05.

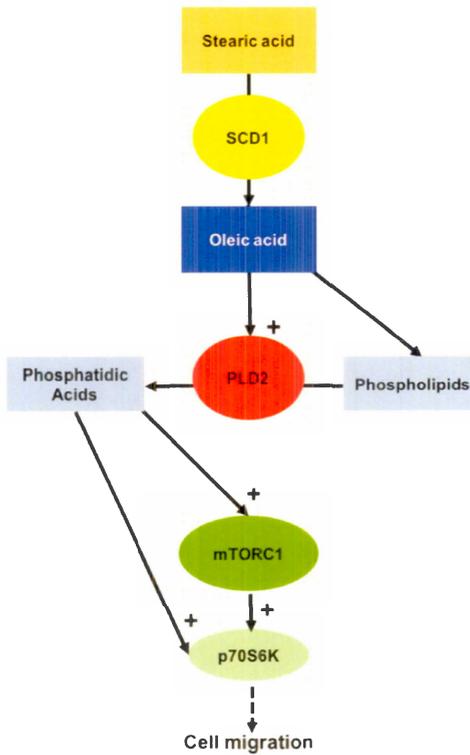
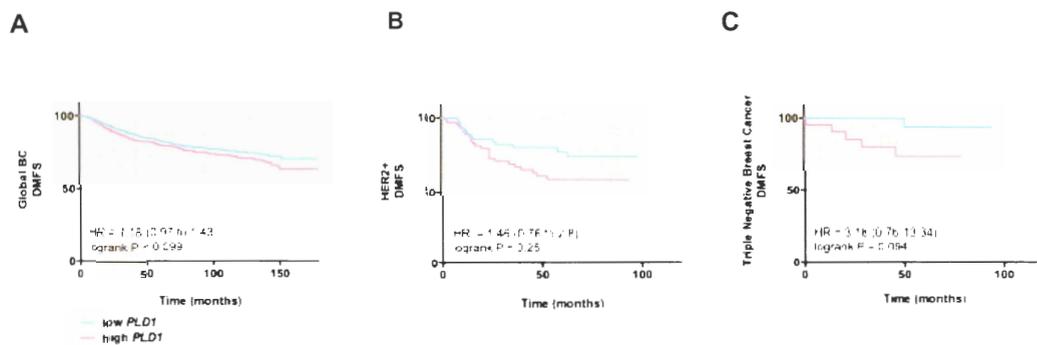


Figure 3.8. Hypothetical model of SCD1 and PLD2 activity in triple-negative breast cancer cell migration.

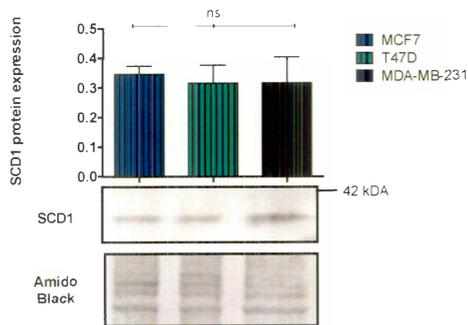
Oleic acid, the main SCD1 product, can specifically activate PLD2. Oleic acid is also incorporated into cell phospholipids. PLD2 generates phosphatidic acids from phospholipids. Phosphatidic acids then activate the mTOR/p70S6K pathway. In this manner, MDA-MB-231 cell migration can be modulated by a PLD2-mTOR/p70S6K signaling pathway.

3.7. Supplementary Figures



Supplementary Figure 3.1. *PLD1* gene expression is not significantly associated to metastatic breast cancer patient outcomes.

Distant metastasis-free survival (DMFS) Kaplan-Meier plots of (A) all (Global) breast cancer, (B) human epidermal growth factor receptor 2-positive (HER2+) breast cancer and (C) triple-negative breast cancer patients. Patients were divided into 2 groups based on the level of *PLD1* expression measured by microarray gene expression profiling of their primary tumor (low expression in light blue; high expression in pink) (Gyorffy et al., 2010). Hazard ratios (HR) were calculated with a 95% confidence interval and p-values were expressed as logrank P.



Supplementary Figure 3.2. SCD1 protein expression is similar in the three breast cancer cell lines tested.

Quantification of SCD1 protein expression in MCF7, T47D and MDA-MB-231 cell extracts (n=3 independent replicates). A representative Western blot is included. Loading controls (Amido Black) are also provided. ns = non-significant.

CHAPITRE IV

MÉTHODOLOGIE DES RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

4.1. Culture cellulaire et traitements

La lignée cellulaire MDA-MB-231 dérivée d'un adénocarcinome mammaire humain a été utilisée comme modèle. Il s'agit d'une lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif hautement métastatique. Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM (Wisent Bio Products[®], #320-005-CL) avec du sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent Bio Products[®], #080-150) à 10 % ainsi qu'avec des antibiotiques (pénicilline 500 U/ml et streptomycine 500 µg/ml) (LT Gibco[®], #15070063), et incubées à 37 °C avec un pourcentage de CO₂ de 5 %.

La lignée MCF-7 dérivée d'un adénocarcinome et la lignée T47D dérivée d'un carcinome canalaire ont été utilisées comme contrôle. Ce sont des lignées ER+/PR+. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent Bio Products[®], #319-010-CL) supplémenté avec du FBS à 10 % et avec des antibiotiques (pénicilline 500 U/ml et streptomycine 500 µg/ml) (LT Gibco[®], #15070063), et incubées à 37 °C avec un pourcentage de CO₂ de 5 %.

Tous les traitements subséquents ont été réalisés dans des milieux EMEM ou DMEM (selon le type cellulaire) sans sérum. Des traitements avec de l'acide oléique 50 µM (Sigma[®], #O-3008) et 50 µM d'acide palmitoléique (Cayman chemical[®], #10009871)

ont été effectués pendant 24 h en utilisant la sérum-albumine de boeuf (BSA) (purifiée sans acide gras) comme véhicule et contrôle (ratio molaire acide gras/BSA 2mol/1mol, pour 50 μM d'acide gras dans 16.65 μM). Des traitements avec 1 μM d'inhibiteur de SCD1 (SCD1i) A939572 (Biofine International[®], #37062) ont été effectués pendant 4 h en utilisant du DiMéthyl-SulfOxyde (DMSO) comme véhicule et contrôle. Les cellules ont également été traitées avec l'inhibiteur de PLC γ : (i.) le U73122 (Cayman Chemical[®], #70740) à une concentration de 3 μM pendant 4 h. Les cellules ont également été traitées avec l'inhibiteur de PI3K et (ii.) le LY294002 (Cell signaling technology[®], #9901) à une concentration de 2 μM pendant 4 h avec du DMSO comme véhicule et contrôle.

4.2. Étude du potentiel migratoire par recouvrement de la plaie (scratch test)

Le « scratch test » une technique simple qui permet d'étudier le pouvoir migratoire des cellules. Les cellules MDA-MB-231, MCF-7 et T47D ont étéensemencées à une densité de 1.0×10^5 cellules par puits dans des plaques de 24 puits dans du milieu EMEM supplémenté en FBS et antibiotiques. Après incubation pendant 24 h, les cellules ont été mises en carence pour 24 h (EMEM sans FBS) pour être ensuite traitées 24 h aux acides gras et/ou avec plusieurs inhibiteurs pendant 4 h (Acide oléique, SCD1i, PI3ki, PLC γ i). Les contrôles consistaient en un traitement au DMSO (véhicule des traitements pharmacologiques) et au BSA (véhicule des acides gras). Après une durée de 48 h après l'ensemencement, une blessure a été réalisée à l'aide d'un embout de pipette p200. Les débris cellulaires ont été éliminés par rinçage avec du milieu EMEM sans FBS. Le suivi de la migration cellulaire a été fait par acquisition d'images à intervalles de 15 min dans du milieu supplémenté en antibiotiques pendant 12 h en se focalisant sur la blessure et en utilisant un objectif 100 x (10x10) monté sur un

microscope inversé (Nikon[®] Eclipse Ti). Le pourcentage de cicatrisation de la blessure en fonction des différentes conditions a été ensuite analysé afin d'étudier la distance parcourue par l'ensemble du tapis cellulaire (logiciel « NIS éléments » de Nikon[®]).

4.3. Extraction protéique, dosage et immunobuvardage

Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay - Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 1 %, Na-désoxycholate 0,5 %, EGTA 20 mM, DTT 1 mM) contenant des inhibiteurs de phosphatases ainsi que des inhibiteurs de protéases (Sigma[®]; #P8340: cocktail inhibant les résidus sérine, cystéine, and metallo-protéases). Les lysats cellulaires ont été centrifugés et le surnageant contenant les protéines en solution a été prélevé.

Le dosage de la concentration protéique a été réalisé selon la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)). Les échantillons protéiques ont été préparés avec une quantité égale de protéines (30 µg) dans un tampon de chargement et de dénaturation protéique Laemmli (H₂O, Tris 0.5M, Glycérol, SDS, Beta-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol) avant de procéder à la technique d'immunobuvardage.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE (tampon de migration : Tris 0.25M, Glycine 1.92M, SDS 1%, H₂O) puis transférées sur une membrane de PolyFluorure de VinyliDiène (PVDF) par transfert humide (tampon de transfert : Tris 0.25M, Glycine 1.92M, H₂O). La membrane a ensuite été bloquée avec une solution de lait 5 % dans du Tris Buffer Saline – Tween (TBS-Tween) pendant une heure à température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires anti-SCD1 (Abcam[®], #ab19862, IgG souris, 1:1000) dans du lait 5 % TBS-Tween pendant une nuit à 4 °C. Trois lavages de 10 min ont été réalisés. Les membranes ont ensuite été exposées aux anticorps secondaires IgG de souris

conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (Abcam ®, #ab6728, 1:2000) dilués dans du lait 5 % TBS-Tween pendant 1 h à température ambiante. Trois lavages de 10 min ont été réalisés. Les membranes ont été révélées après exposition à une solution de luminol par exposition au révélateur FusionxFx7 associé logiciel Fusion (Vilber Lourmat®). Un amido-black a été réalisé pour évaluer la quantité totale de protéines cellulaires déposées dans chaque puits.

4.4. Étude de la morphologie par immunofluorescence

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées sur lamelle de verre et traitées avec l'acide oléique ou l'inhibiteur de SCD1 avec comme contrôles des traitements à la BSA et au DMSO (véhicules), respectivement. L'expérience a également été réalisée en inhibant l'activité de PLD2 à l'aide d'un inhibiteur spécifique, le VU0285655-1 (Avanti Polar Lipids ®, #857372, 10 µM). Les cellules ont ensuite été fixées avec le paraformaldéhyde 4 %, les noyaux colorés au 4',6-diamidino-2-phénylindole à une concentration de 300 nM dans une solution de NaCl de 150 mM (DAPI, fluorescence bleue ; (Cayman Chemical® , #500001) et les filaments de F-actine ont été colorés avec la Phalloïdine-488 à 33 nM dans une solution de NaCl 150 mM (Cytoskeleton ®, #PHDG1-A) fluorescence verte). Les cellules ont également été traitées avec un anticorps primaire anti-FAK phosphorylée (Abcam®, pY397 EP2160 #ab81296) et un anticorps secondaire qui émet une fluorescence rouge (Abcam® Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 nm #ab150080). Cinq images ont ensuite été capturées à l'aide d'un microscope confocal (Nikon A1)®. Les images ont été quantifiées et analysées avec le logiciel ImageJ.

4.5. Analyses statistiques

Selon les expériences effectuées, il a été nécessaire d'analyser les résultats à l'aide de tests statistiques. Des tests de Student avec un coefficient α de confiance de 0,05 (5 %) représentant des intervalles de confiance de 95 % ont été réalisés. Des tests ANOVA à une variable (One-Way ANOVA) ont été réalisés comme alternatives aux tests t de Student. Le test t est utilisé pour déterminer si deux moyennes sont identiques ou différentes. L'ANOVA est utilisé lors de la comparaison de trois moyennes ou plus. Concernant l'étude des courbes de survie de Kaplan Meier, les données relatives aux patientes sont séparées par la médiane en 2 groupes selon l'expression du gène *SCD1* (basse ou haute) dans les tumeurs primaires. Afin d'évaluer les différences entre les groupes, les analyses statistiques utilisent le test du log Rank P qui est un test dérivé du test χ^2 qui permet de tester l'indépendance entre deux variables aléatoires. Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel d'analyses GraphPad Prism.

CHAPITRE V

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

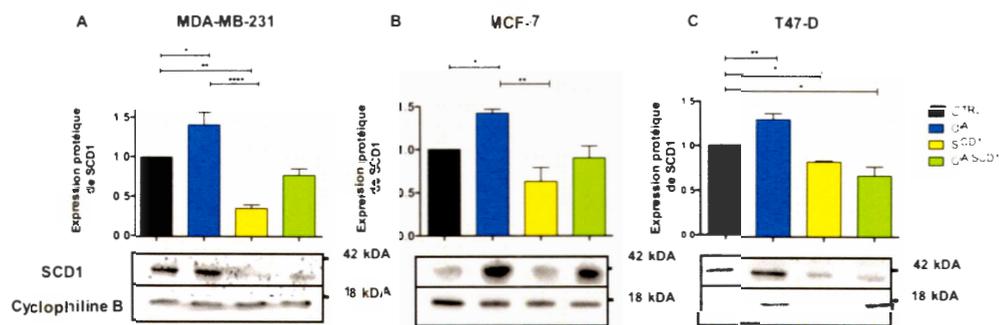


Figure supplémentaire 5.1. La modulation de l'activité de SCD1 régule son expression dans les lignées cellulaires de cancer du sein

Les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231, MCF-7 et T47D ont été traitées avec de l'acide oléique (OA; 50 μ M), l'inhibiteur de SCD1 ; (SCD1i, 1 μ M), une combinaison OA/SCD1i ou traité au DMSO et à la BSA en tant que véhicules (CTRL). Les niveaux d'expression de la protéine SCD1 dans les 3 lignées cellulaires ont été évalués. Une membrane représentative est présentée pour chaque lignée cellulaire. 3 expériences indépendantes ont été réalisées. P-value: **** <0,0001; ** <0,001; * <0,01.

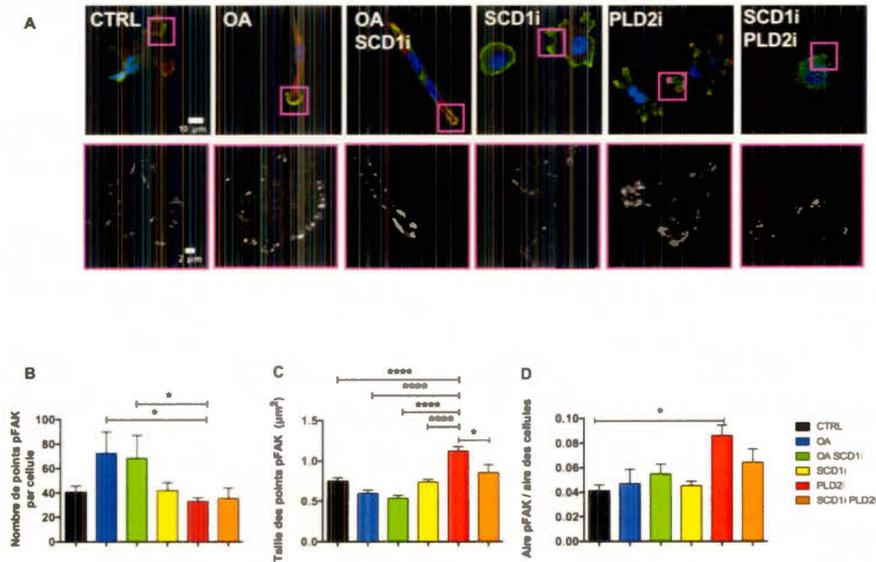


Figure Supplémentaire 5.2. L'activité de PLD2 joue un rôle sur la régulation de la phosphorylation de la protéine FAK

Les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 ont été traitées à l'acide oléique (OA; 50 μM), l'inhibiteur de SCD1 (SCD1i; 1 μM), l'inhibiteur de PLD2 (PLD2i; 10 μM) ou au DMSO et à la BSA en tant que véhicules (CTRL). (A) Images de microscopie confocale de la phosphorylation de la protéine FAK par immunofluorescence. Les filaments d'actine cellulaire sont marqués en vert. Les noyaux sont colorés en bleu. Barre d'échelle en haut du panneau = 150 μm, Barre d'échelle en bas du panneau = 2 μm. (B) Quantification de la phosphorylation de FAK par cellule, (C) de la taille des points de phosphorylation de FAK (μm²), (D) du ratio de l'aire occupée par la phosphorylation de FAK sur l'aire de la cellule correspondante. 120 cellules ont été analysées par condition de traitement (3 expériences indépendantes).

P-value: **** <0,0001, * <0,05.

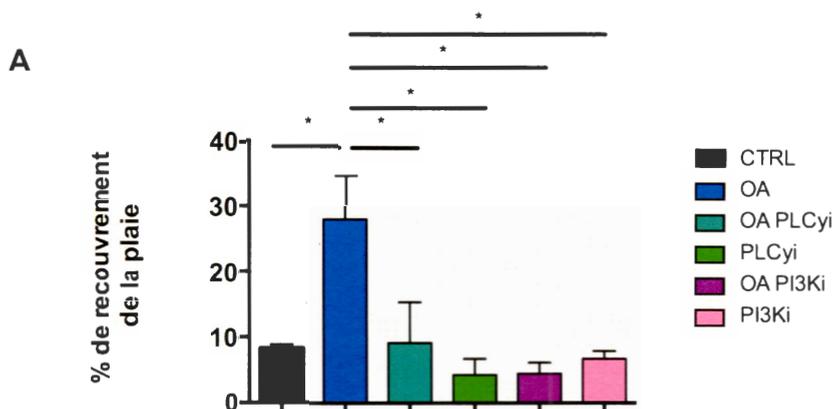


Figure Supplémentaire 5.3. L'acide oléique augmente la migration des MDA-MB-231 en régulant les voies PLC et PI3K

Les cellules de lignée MDA-MB-231 ont été traitées avec de l'acide oléique (OA; 50 μ M), les inhibiteurs de PLC γ (PLC γ i ; 3 μ M) et de PI3K (PI3Ki ; 2 μ M) pendant 4h ou avec une combinaison DMSO/BSA en tant que véhicules (CTRL). Les cellules ont ensuite été suivies à 15 min d'intervalle pendant 12 h. **(A)** Représentation de l'aire sous la courbe du pourcentage de recouvrement de la plaie en fonction du temps dans la lignée cellulaire MDA-MB-231. Les résultats sont exprimés en pourcentage de recouvrement de la plaie par rapport à la surface initiale de la plaie. 3 expériences indépendantes ont été réalisées. P-value: * $<0,05$

CHAPITRE VI

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

La modulation de l'activité de SCD1 régule son expression

Précédemment, il a été observé que l'acide oléique augmente la migration cellulaire dans les trois lignées : MDA-MB-231, T47D et MCF-7 et que l'inhibition de SCD1 la diminue chez les MDA-MB-231 (**Lingrand *et al.* ; Fig. 3.4 B, C**), la quantité protéique de SCD1 a donc été quantifiée en fonction des traitements à l'acide oléique et à l'inhibiteur de SCD1, dans les trois lignées (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.2 A, B**) (**SuppFig. 5.2. A-C**). Le profil est similaire dans les trois lignées. En effet, lorsque que les cellules sont traitées à l'acide oléique, principal produit de SCD1, la quantité protéique de SCD1 augmente alors qu'on obtient un résultat contraire en présence de l'inhibiteur de SCD1 (SCD1i). De plus, lorsque les cellules sont traitées à la fois à l'acide oléique (OA) et avec SCD1i, la quantité protéique de SCD1 est diminuée par rapport au contrôle (CTRL) mais augmente par rapport aux cellules traitées uniquement avec l'inhibiteur de SCD1. Ces résultats suggèrent que la modulation de la quantité de produit de SCD1 par traitement à l'acide oléique ou par son inhibiteur spécifique régule l'expression de SCD1.

PLD2, via son activation par l'acide oléique active la phosphorylation de la protéine FAK

Nos travaux suggèrent que l'acide oléique agirait en amont de la voie de signalisation PLD2/mTOR (Lingrand *et al.* ; Fig.3.5 B-D), et il a précédemment été montré que les PLD sont impliquées dans la signalisation mitogène par la voie des Rho GTPases. Il a été clairement établi que les protéines de cette famille (Rho GTPases) régulent la dynamique de la membrane, le trafic de l'actine et qu'elles favorisent la formation du complexe FAK-paxilline associé à une augmentation de la motilité cellulaire (Foster et Xu, 2003; Pribic et Brazill, 2012). L'effet de l'acide oléique a donc été testé afin de déterminer si cet acide gras agit ou non sur la signalisation de la protéine FAK. Lorsqu'on traite avec l'acide oléique, le nombre de points de phosphorylation de FAK augmente et cela avec l'acide oléique seul ou avec l'acide oléique en présence de l'inhibiteur de SCD1 (SCD1i). Or, il n'y a pas de différence entre la condition SCD1i et le contrôle. Cette augmentation du nombre de points de phosphorylation suggère que l'acide oléique stimule l'attachement de la cellule au support, ce qui pourrait suggérer une augmentation de la migration cellulaire. En effet, il a précédemment été démontré que la phosphorylation de FAK au niveau du résidu tyrosine-397 est associée à une augmentation de la migration (Huvencers et Danen, 2009; Reiske et al., 1999).. En ce qui concerne le traitement à l'inhibiteur de la PLD2, le nombre de points de phosphorylation de FAK diminuent en présence de l'inhibiteur de la PLD2 mais occupent une plus grande surface. De manière intéressante, un profil contraire est obtenu lorsqu'on les cellules sont traitées à l'acide oléique et à l'inhibiteur de PLD2. En effet, en présence d'acide oléique le nombre de points de phosphorylation de FAK augmente mais la surface occupée diminue. Ces résultats suggèrent une régulation de la phosphorylation de FAK par une voie dépendante de l'acide oléique et de la PLD2 (SuppFig. 5.2. A-D). Lorsque les cellules sont traitées avec des inhibiteurs de SCD1 et PLD2, les points de phosphorylation de la protéine FAK diminuent grandement mais la morphologie cellulaire est affectée (arrondie) en présence des deux inhibiteurs ce

qui suggère une faible capacité à migrer ou une mort cellulaire précoce (**FigSupp.5.2 A ; Lingrand *et al.* ; Fig.3.2 A, B**)).

L'acide oléique augmente la migration des MDA-MB-231 en régulant la voie PI3K

Il a été démontré que la signalisation à travers la voie PI3K/mTOR joue un rôle important dans la progression du cancer du sein triple négatif (Costa et al., 2018). Pour déterminer si la migration des cellules de cancer du sein stimulées par l'acide oléique dépend de l'activation de la PI3K, des tests de cicatrisation des plaies (« *scratch tests* ») ont été effectués en présence d'inhibiteurs spécifiques sur la lignée cellulaire MDA-MB-231. La stimulation de la migration par l'acide oléique est totalement abrogée en présence de l'inhibiteur de PI3K (**FigSupp. 5.3**). Ces résultats suggèrent que la stimulation de la migration cellulaire par l'acide oléique est dépendante de l'activité par PI3K.

L'acide oléique augmente la migration des MDA-MB-231 en régulant la voie PLC γ

Cependant, il a précédemment été démontré qu'une autre voie de signalisation est impliquée dans le processus de migration des cellules MDA-MB-231 : une voie de signalisation régulée par l'activité de PLC γ (Navarro-Tito et al., 2010). Pour déterminer si la migration des cellules de cancer du sein stimulées par l'acide oléique dépend de l'activation de la PLC γ , des tests de cicatrisation des plaies en présence d'inhibiteurs spécifiques ont été effectués sur la lignée cellulaire MDA-MB-231. De manière intéressante, le composé U73122, qui est un inhibiteur pharmacologique spécifique de PLC γ , a bloqué l'effet stimulant de l'acide oléique sur le recouvrement de la plaie (**FigSupp. 5.3**). Il est intéressant de souligner qu'en présence de la combinaison acide oléique/inhibiteur de la PLC γ , la migration est diminuée mais de

manière moins drastique par rapport aux autres conditions (PLC γ i, PI3Ki et OA/PI3Ki). Ces résultats suggèrent que la migration cellulaire dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 est régulée en partie par la PLC γ .

CHAPITRE VII

DISCUSSION

L'expression et l'activité de SCD1 sont associées à un mauvais pronostic dans un contexte de cancer du sein triple négatif

Le but de cette étude était d'évaluer l'importance de l'activité de SCD1 dans la migration des cellules de cancer du sein métastatiques. Une corrélation entre l'expression de *SCD1*, le grade tumoral (grade III) et la classification histologique invasive a été précédemment décrite dans les tissus du cancer du sein (Peck et al., 2016). L'analyse des courbes de survie de Kaplan-Meier ont confirmé que l'expression du gène *SCD1* est liée à la formation de métastase chez les patients atteints du cancer du sein. En effet, une expression élevée de *SCD1* dans la tumeur primitive est corrélée au décès des patients impliquant la formation de métastases (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.1**). Malgré la nécessité de compléter ces résultats avec d'autres études comme des études cliniques, nous pensons que *SCD1* pourrait être un marqueur prédictif de formation de métastases. Pour caractériser l'impact de l'activité SCD1 sur la progression métastatique *in vitro*, nous avons effectué des tests de migration sur des cellules de cancer du sein en présence des deux produits de SCD1: l'acide oléique et l'acide palmitoléique. L'activité de SCD1 est directement corrélée aux niveaux d'acides gras mono-insaturés présents dans la cellule puisque son rôle est de synthétiser ces deux acides gras mono-insaturés, (Miyazaki et al., 2000). C'est pourquoi nous avons utilisé l'acide oléique et l'acide palmitoléique pour mimer l'activité de SCD1 *in vitro*.

Plusieurs équipes ont démontré que l'acide oléique stimule la migration des cellules de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231 ([Angelucci et al., 2018](#); [Navarro-Tito et al., 2010](#)). Dans notre étude, les lignées utilisées comme modèles de cancer du sein sont les MDA-MB-231, les T47D et les MCF-7 ([Lingrand et al. ; Fig.3.2](#)). Les MDA-MB-231 sont des cellules de cancer du sein triple négatif, alors que les T47D et MCF-7, sont toutes deux positives pour les récepteurs œstrogène et progestérone (ER+ ; PR+). Nos résultats montrent que seul l'acide oléique augmente spécifiquement la migration cellulaire dans les cellules de cancer du sein ([Lingrand et al. ; Fig.3.2](#)). Curieusement, l'acide palmitoléique (un produit mineur de SCD1 par rapport au l'acide oléique) n'a eu aucun effet sur la migration des cellules du cancer du sein. L'acide oléique pourrait avoir des effets spécifiques sur les cellules en migration que l'acide palmitoléique ne peut pas déclencher. Une possibilité est que l'acide oléique, et non l'acide palmitoléique, soit utilisée pour modifier les protéines régulant la migration. Une différence d'expression protéique de SCD1 aurait également pu réguler le potentiel migratoire. Or, l'expression protéique basale de SCD1 est à un même niveau dans les trois lignées étudiées ([Lingrand et al. ; Fig.3.2A,B ; Figure supplémentaire 3.1](#)).

A première vue, l'acide oléique augmente la migration dans les 3 lignées cellulaires, cependant, les MCF-7 et T47D migrent moins par rapport aux MDA-MB-231 que ça soit au niveau basal ou en présence d'acide oléique. En effet, le pourcentage de recouvrement de la plaie est 3 à 4 fois plus grand dans les lignées MDA-MB-231 comparé aux T47D et aux MCF-7 ([Lingrand et al. ; Fig.3.2A, B](#)). Étant donné que le recouvrement de la plaie (scratch test) pourrait être due à la combinaison de la migration cellulaire et de la prolifération cellulaire, et que l'OA est réputée stimuler la prolifération des cellules cancéreuses du sein), nous avons déterminé le rôle spécifique de la migration cellulaire dans nos analyses en analysant le trajet des cellules individuelles. La migration cellulaire stimulée par l'acide n'est observée que dans la lignée MDA-MB-231 ([Lingrand et al. ; Fig.3.2B,C](#)). Le recouvrement de la plaie dans

d'autres lignées cellulaires stimulées par l'acide oléique est due à la prolifération cellulaire car la vitesse de migration basale et stimulée (ainsi que la distance parcourue entre chaque acquisition d'image) sont similaires dans les lignées MCF-7 et T47D (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.2B,C**). Il est connu que les T47D et les MCF-7 ont un pouvoir invasif (et migratoire) beaucoup moins important que les MDA-MB-231 (Yersal et Barutca, 2014; Zajchowski et al., 2001). Premièrement, il a précédemment été décrit que la morphologie des T47D et les MCF-7 est beaucoup plus arrondie que celle des MDA-MB-231 qui ont un phénotype plus « étoilé » avec des prolongements plus importants qui favorisent la migration cellulaire. Par ailleurs, les T47D et les MCF-7 ne sont pas des modèles de cancer du sein triple négatifs selon leur classification moléculaire (**Tableau 1.2**)(Yersal et Barutca, 2014; Zajchowski et al., 2001). Selon Gordon et al., les cellules MCF-7 et T47D ont un phénotype luminal exprimant différents marqueurs associés à des cellules de types épithéliales (présence de Muc1, E-cadhérine, CK18 et DSc2 et absence des intégrines $\alpha6\beta4$, de la MMP-7 et de la vimentine (Gordon et al., 2003). Au contraire, les MDA-MB-231 présentent un phénotype mésenchymal puisqu'elles n'expriment pas les marqueurs épithéliaux mais plutôt les marqueurs mésenchymateux (perte d'E-cadhérine et de Muc1, expriment les intégrines $\alpha6\beta4$). De plus, dans cette même étude, la capacité invasive de ces lignées cellulaires a été analysée : les cellules avec des marqueurs mésenchymateux comme les MDA-MB-231 présentent une capacité invasive nettement plus élevée que les MCF-7 et T47D (Gordon et al., 2003). Finalement, cette différence de potentiel migratoire observée pourrait être expliquée par le fait que les MDA-MB-231 sont des cellules issues d'un cancer du sein triple négatif qui est connu pour être beaucoup plus invasif comparativement aux autres sous-types de cancer du sein (cancers du sein positifs aux récepteurs à la progestérone et à l'œstrogène)(Zajchowski et al., 2001). Dans cette étude, l'ensemble de nos résultats suggèrent une corrélation positive entre les cancers métastatiques et l'expression élevée de *SCD*. Considérant que les cellules MDA-MB-231 étaient les seules dont la migration était sensible à l'acide oléique, nous

avons concentré notre étude sur cette lignée pour la suite de nos investigations. (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.1; Fig.3.2**).

La migration et la morphologie cellulaires dépendent de l'activité de SCD1

Comme la migration et l'invasion de la matrice extracellulaire sont des événements clés impliqués dans la formation des métastases (van Zijl et al., 2011; Xue et al., 2006), nous avons étudié le potentiel migratoire des cellules MDA-MB-231 après la modulation de l'activité enzymatique de SCD1. L'acide oléique, principal produit de SCD1, accélère le recouvrement de la plaie conformément à la littérature, (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.2 B**) (Navarro-Tito et al., 2010) tandis que l'inhibition de SCD1 la diminuait (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.6 A**) (Angelucci et al., 2018; Navarro-Tito et al., 2010). L'effet de l'activité de SCD1 sur l'invasion des cellules MDA-MB-231 à travers une matrice extracellulaire (Matrigel) a également été caractérisé. Conformément au fait que le ralentissement de l'expression de SCD1 diminue l'invasion de cellules MDA-MB-231 (Mauvoisin et al., 2013), l'inhibition de l'activité de SCD1 la également réduite (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.6 C**). Globalement, ces résultats impliquent clairement l'activité de SCD1 en tant que facteur de stimulation de la motilité des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.

De plus, le suivi individuel des cellules a montré que la vitesse de migration est augmentée en présence d'acide oléique (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.3 C, E, F**). L'acide oléique « dérègle » également la direction de la migration cellulaire dans nos tests (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.3 D, G**). Le recouvrement de la plaie est plus important après un traitement par l'acide oléique mais les cellules ont tendance à ne pas migrer perpendiculairement à la plaie, ce qui semble paradoxal (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.3D**). En effet, les cellules migrent vers une direction qui n'est pas optimale par rapport à la cicatrisation de la plaie et persistent dans la direction qu'elles « choisissent ». Il est fortement possible que la morphologie très polarisée de la cellule ainsi que sa vitesse accrue entraînent le manque de variation directionnelle des cellules en présence

d'acide oléique (les cellules migrent en persistant dans une seule et même direction). Par ailleurs, l'acide lysophosphatidique, une classe lipidique similaire à l'acide oléique, a également été signalé comme diminuant la variation directionnelle des cellules MDA-MB-231 en migration, mais n'a pas affecté la vitesse de migration (Weiger et al., 2013). De plus, la morphologie des cellules tumorales est liée à leur capacité à migrer : le détachement des cellules de la tumeur primaire et l'adoption d'une morphologie allongée (fusiforme) sont préliminaires à l'invasion (Friedl et Alexander, 2011; Friedl et Wolf, 2003; Krakhmal et al., 2015). Notre équipe a précédemment démontré que SCD1 est impliquée dans la transformation des cellules du cancer du sein vers un type cellulaire mésenchymateux (Mauvoisin et al., 2013). Dans cette même étude, les cellules ont une morphologie plus arrondie lorsque l'expression de *SCD1* est réprimée. De plus, l'inhibition de l'activité enzymatique de SCD1 entraîne un arrondissement des cellules MDA-MB-231, alors que les cellules traitées à l'acide oléique ont une apparence fusiforme (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.4**). Cette morphologie cellulaire allongée est cohérente avec la vitesse de migration plus importante lorsque la migration cellulaire est stimulée par l'acide oléique : les cellules vont plus vite et plus loin (**Lingrand *et al.* ; Fig.3.3**). Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent fortement qu'une importante activité de SCD1 stimule la motilité des cellules du cancer du sein MDA-MB-231.

L'expression et l'activité de SCD1 sont régulées par son produit : l'acide oléique

De manière intéressante, la morphologie des cellules traitées avec la combinaison acide oléique et SCD1i confirmerait que le traitement des cellules à l'acide oléique permet bien de mimer l'activité de SCD1. En effet, lorsqu'on traite les cellules avec de l'acide oléique et l'inhibiteur de SCD1, on retrouve une morphologie cellulaire similaire aux cellules traitées à l'acide oléique seul. Ceci démontre également que l'acide oléique exogène, sous la forme d'un acide gras libre, est capable de pénétrer librement dans les cellules et contribue aux mêmes mécanismes que l'acide oléique

endogène (lié directement à l'activité de SCD1) dans un contexte de morphologie cellulaire (**FigSupp. 5.2 A ; (Lingrand *et al.* ; Fig. 3.4 A-D)**) (Miyazaki et al., 2000). De manière intéressante, lorsque les cellules sont traitées à l'acide oléique, la quantité protéique de SCD1 augmente alors qu'on obtient un résultat contraire en présence de l'inhibiteur de SCD1 (SCD1i). L'acide oléique agissant en augmentant l'expression de SCD1, cette enzyme pourrait agir indépendamment sur une autre constituante cellulaire qui impacterait la migration cellulaire. De plus, le traitement des MDA-MB-231 par l'acide oléique pourrait possiblement augmenter l'activité basale de SCD1. Il est connu que de nombreux facteurs développementaux, alimentaires, hormonaux et environnementaux régulent l'expression de *SCD1* (Mauvoisin et Mounier, 2011). En effet, la régulation de *SCD1* est très diverse et son expression pourrait affecter plusieurs variables physiologiques clés, notamment l'adiposité et le cancer (Mauvoisin et Mounier, 2011). Dans la présente étude, l'expression protéique de SCD1 en présence de son inhibiteur pharmacologique spécifique (A939572) a été quantifiée : la quantité protéique de SCD1 a diminué dans les trois lignées cellulaires de cancer du sein (**FigSupp. 5.1**). Ceci a par ailleurs été aussi remarqué par l'équipe de Dai et ses collaborateurs, bien que leurs observations ont été faites dans des cellules de glioblastomes (Dai, S. et al., 2017). Notre équipe a précédemment démontré que l'activité de SREBP1, au niveau transcriptionnel, est augmentée par l'acide oléique dans les hépatocytes n'exprimant pas SCD1 (Lounis *et al.*, 2017). Un résultat similaire est observé dans les cellules de cancer du sein avec une augmentation de la quantité protéique de SCD1 quand les cellules sont traitées à l'acide oléique (**FigSupp. 5.1**). Ces résultats suggèrent que l'expression protéique de SCD1 est régulée par son produit (l'acide oléique) via l'activation de SREBP1. Pour vérifier ce résultat, il serait pertinent de mesurer la translocation de SREBP1 dans le noyau en présence ou non d'acide oléique.

SCD1 et PLD2 régulent la migration cellulaire par la voie de signalisation PLD2/mTOR

Le cancer étant une pathologie complexe, il est possible que de nombreuses voies de signalisation impliquées dans le métabolisme énergétique et la migration agissent de concert. Dans cette étude, l'activité de SCD1 semble réguler la migration des cellules de cancer du sein triple négatif, et c'est pourquoi nous avons cherché à mieux caractériser les voies moléculaires impliquant SCD1 dans la migration cellulaire dans la lignée MDA-MB-231. Premièrement, la co-inhibition de SCD1 et de PLD2 n'est pas additive dans les tests de migration et d'invasion chez les MDA-MB-231 (**Lingrand et al. ; Fig.3.5**), ce qui suggère qu'ils agissent dans la même voie moléculaire. L'activité PLD, en particulier de l'isoforme PLD2, a été impliquée dans le processus métastatique du cancer du sein. En effet, l'extinction *PLD2* dans les cellules cancéreuses du sein diminue la motilité cellulaire *in vitro* et les lésions métastatiques dans les modèles de xénogreffes (Henkels et al., 2013). De plus, l'acide oléique stimule l'activité enzymatique de l'isoforme PLD2, mais pas celle de PLD1 (Kim et al., 1999; Sarri et al., 2003). De manière similaire à l'expression de *SCD1*, une haute expression de *PLD2* dans la tumeur primaire est spécifiquement corrélée à une diminution de la survie des patientes associée au développement des métastases dans un contexte de cancer du sein triple négatif (**Lingrand et al. ; Fig. 3.1 A,B,C; Fig.3.5 A,B,C**). L'expression de *PLD1* n'est toutefois pas associée de manière significative aux résultats pour les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique (**Figure supplémentaire 3.2**). Puisque PLD2 peut être sélectivement activée par l'acide oléique (Kim et al., 1999), cette relation possible entre l'activité de SCD1 et l'activité de PLD2 a été explorée dans notre étude. L'acide oléique augmente la migration des cellules MDA-MB-231 via l'activité de PLD2 et de mTOR (**Lingrand et al ; Fig. 3.5 D-F**). De plus, la phosphorylation de mTOR/p70S6K à la suite du traitement par l'acide oléique dépend de l'activité de la PLD2 (**Lingrand et al ; Fig. 3.5 D-F**). L'axe mTOR/p70S6K aurait vraisemblablement été activé par le produit de l'activité de la

phospholipase D, l'acide phosphatidique ce qui est bien documentée dans la progression du cancer du sein (Chen, Y. et al., 2003); Foster (2009); (Lehman et al., 2007; Toschi et al., 2010). Bien que l'effet de l'acide oléique sur l'activité de PLD2 observé dans nos analyses soit possiblement direct, nous ne pouvons exclure l'alternative que SCD1 et PLD2 puissent également agir sur la migration des cellules de cancer du sein triple négatif par des voies parallèles comme par exemple la protéine GPR40 qui pourrait être activée par l'oléate exogène (Hardy et al., 2000). Une autre possibilité à envisager est que l'acide oléique soit d'abord incorporé dans les phospholipides qui sont ensuite métabolisés par les PLD pour générer de l'acide phosphatidique (Lingrand *et al.* ; Fig.3.8) (Cazzolli et al., 2006).

L'acide oléique augmente la migration des MDA-MB-231 via la PI3K

La Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est un acteur intéressant dans la régulation de la migration des cellules cancéreuses, (Lehman et al., 2007; LoPiccolo et al., 2008; Sliva et al., 2000). Il est connu que la PI3K se situe en amont de mTOR dans la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (Porta et al., 2014). De plus, il a précédemment été montré que la PI3K constitue un lien moléculaire entre l'acide phosphatidique et mTOR (Lehman et al., 2007; LoPiccolo et al., 2008; Sliva et al., 2000). En effet, l'acide phosphatidique qui est le produit de PLD2 active mTOR directement ou par un mécanisme dépendant de la PI3K associé à la protéine kinase B (PKB)(O'Neil et al., 2009). Or, dans notre étude, les résultats suggèrent que la stimulation de la migration cellulaire par l'acide oléique est dépendante de l'activité de la PI3K (FigSupp. 5.3). En effet, la stimulation de la migration cellulaire par l'acide oléique est abrogée en présence de l'inhibiteur de PI3K. L'acide oléique stimulerait donc la migration des cellules MDA-MB-231 via les activités PLD2/mTOR ou encore la voie combinée PLD2-PI3K-mTOR (Lingrand *et al.* ; Fig.3.5 D-F). De plus, dans les cellules MDA-

MB-231, l'acide oléique stimule la prolifération cellulaire en activant PI3K via le récepteur GPR40 ce qui est cohérent avec nos résultats (Hardy et al., 2000).

D'un autre point de vue, une voie de signalisation complémentaire à la voie PLD2/mTOR impliquant la PI3K pourrait réguler la migration cellulaire. Comme vu précédemment, une diminution de la migration cellulaire stimulée à l'acide oléique est observée lorsqu'on traite les cellules à l'acide oléique et à l'inhibiteur de la PI3K, le composé LY294002 (**FigSupp. 5.3**). Or, il a été montré que ce même inhibiteur de PI3K est capable d'inhiber la migration via l'implication de la protéine d'adhésion focale FAK de manière dose-dépendante chez les cellules ovariennes CHO (Reiske et al., 1999). Cependant, la liaison de PI3K avec la protéine FAK est nécessaire pour que FAK favorise la migration cellulaire (Reiske et al., 1999). Par conséquent, la stimulation de la migration par l'acide oléique pourrait également être dépendante de la voie de signalisation PI3K/FAK.

La migration cellulaire stimulée par l'acide oléique est partiellement régulée par la phospholipase C γ (PLC γ)

Il a été rapporté que l'acide oléique est impliqué dans d'autres voies de signalisation dépendantes des phospholipases comme la phospholipase A et la phospholipase C stimulant la migration des cellules MDA-MB-231 (Navarro-Tito et al., 2008; Navarro-Tito et al., 2010). L'inhibition pharmacologique des phospholipases A et C, générant respectivement de l'acide arachidonique et du diacylglycérol, bloque également le recouvrement de la plaie par « *scratch test* » stimulé par l'acide oléique (Navarro-Tito et al., 2010), résultats que nous confirmons dans cette étude pour la phospholipase C γ (PLC γ) inhibée spécifiquement par le composé U73122 (**FigSupp. 5.3**). Cependant, dans notre étude, l'inhibition de la PLD2 en présence ou non d'acide oléique diminue la migration cellulaire à un même niveau (**Lingrand et al. ; Fig.3.5 A**). En revanche, lorsque les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de PLC γ seul, la migration cellulaire a tendance à être davantage diminuée comparée à la condition traitée à l'acide oléique

et à l'inhibiteur de PLC γ (**FigSupp 5.3**). Ces résultats suggèrent que l'acide oléique pourrait réguler la migration cellulaire partiellement par la PLC γ . De plus, une autre équipe a également montré que la PLC pourrait être impliquée dans la migration et la prolifération cellulaire induite par l'acide linoléique (produit de l'acide oléique formé suite à des désaturations successives) dans les cellules du cancer du sein (Serna-Marquez et al., 2013). Dans un contexte de la progression tumorale, la PLC activée peut générer deux seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3), en hydrolysant le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. La libération de calcium induite par le DAG et l'IP3 du réticulum endoplasmique peut activer la protéine kinase C (PKC α et δ), qui stimule l'activité de la PLD2 par phosphorylation directe ou indirecte (Chen, J. S. et Exton, 2005; Han et al., 2002; Park et al., 2012). La PLD2 peut donc recruter et activer de multiples molécules en aval comme par exemple le complexe mTOR ou les protéines d'adhésion focales. Ces résultats suggèrent que l'acide oléique pourrait réguler la migration cellulaire en partie par la voie PKC/PLC γ et la PLC γ pourrait réguler par la suite la PLD2. De plus, nos résultats sont compatibles avec la possibilité que l'acide oléique active la voie GPR40/Gq/PLC dans les cellules MDA-MB-231 (Hardy et al., 2000).

L'acide oléique activerait la PLD2 et augmente la motilité par la voie FAK

Dans un contexte de cancer du sein triple négatif, une haute expression de *PLD2* est corrélée à une diminution de la survie associée à la survenue des métastases (**Lingrand et al. ; Fig. 3.5 A**). Il a précédemment été démontré que la surexpression de *PLD2* peut entraîner une réorganisation du cytosquelette d'actine, qui joue un rôle important dans la motilité cellulaire (Knapek et al., 2010) alors que l'inactivation de *PLD2* entraîne un arrêt de la migration cellulaire dans notre étude. La production d'acide phosphatidique, le produit métabolique de la *PLD2*, activerait mTOR/S6K, ce qui influencerait les mouvements cellulaires (Foster, 2007; Gomez-Cambronero, 2010; Liu et al., 2006). De plus, il est également possible qu'une activité accrue de la *PLD*

active la phosphorylation des protéines d'adhésion focales : la protéine FAK et la paxilline. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la phosphorylation de FAK lorsque les cellules sont traitées à l'acide oléique (et une diminution de la phosphorylation de FAK lorsqu'on traite avec l'inhibiteur de PLD2) puisque l'acide oléique peut spécifiquement activer PLD2 (Kim et al., 1999). Comme mentionné précédemment, nos résultats suggèrent que l'acide oléique stimule l'activité de la PLD2. (**Lingrand et al. ; Fig.3.5 D,E,F ; FigSupp. 5.2**) (Kim et al., 1999). De plus, l'acide oléique pourrait également favoriser l'augmentation de la phosphorylation du résidu tyrosine 397 de FAK (Navarro-Tito et al., 2008). Des études antérieures ont montré que la formation du complexe entre la paxilline et la protéine FAK conduisait à la phosphorylation des résidus Tyr 31 et Tyr 118 de la paxilline (Bellis et al., 1995; Petit et al., 2000). Dans les cellules MDA-MB-231, la phosphorylation des résidus Tyr de la paxilline est associée à une motilité importante. Cependant, la formation du complexe FAK-paxilline associée à une diminution de l'activité d'Erk est une conséquence de l'activité accrue de la PLD2. Cela provoque des changements dans les adhérences focales, conduisant à une motilité importante (Pribic et Brazill, 2012). Dans notre étude, la phosphorylation de FAK est modulée en présence de l'acide oléique et de l'inhibiteur de PLD2 (**FigSupp. 5.2**). À la lumière de ces résultats, la migration cellulaire des MDA-MB-231 pourrait être expliquée par le fait que l'acide oléique active directement la PLD2 et, que par cet intermédiaire, il active la protéine FAK. Une autre équipe a suggéré que l'acide oléique interviendrait dans la production d'acide arachidonique, pour activer la phosphorylation de FAK et la migration cellulaire à travers la voie PLC γ dans les cellules MDA-MB-231 (Navarro-Tito et al., 2008). Or, comme décrit précédemment, la PLD2 peut être régulée par des métabolites de la PLC γ (Chen, J. S. et Exton, 2005; Han et al., 2002; Park et al., 2012). Ces résultats nous suggèrent alors que l'acide oléique, pourrait réguler la PLD2 directement ainsi que via la PLC γ , et qu'ils pourraient augmenter la migration cellulaire via la voie de signalisation associée à la protéine FAK. Pour compléter cette étude, il serait pertinent

d'étudier la phosphorylation de la protéine FAK lorsque les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de PLC γ et l'acide oléique.

SCD1 et PLD2 sont impliqués dans la prolifération des cellules MDA-MB-231

Finalement, pour mieux comprendre l'effet des traitements inhibiteurs dirigés spécifiquement contre SCD1 et PLD2 sur les cellules MDA-MB-231, leur impact sur la prolifération cellulaire a été mesuré. En accord avec le fait que SCD1 et PLD2 contribuent toutes deux à la prolifération cellulaire dans les lignées cellulaires de cancer du sein (Chen, Y. et al., 2003; Henkels et al., 2013; Luyimbazi et al., 2010), leur inhibition conjuguée diminue la viabilité des cellules MDA-MB-231 et la formation de colonies (« *foci formation assay* ») (Lingrand et al. ; Fig.3. 7). Ces effets anti-prolifératifs pourraient expliquer l'écart entre les résultats de migration cellulaire par recouvrement de la plaie (Lingrand et al. ; Fig. 3.6 A) et les essais de migration et d'invasion par transwell. En effet, l'inhibition de SCD1 a un impact plus fort que l'inhibition PLD2 dans les essais de « *scratch test* » comparés aux tests de migration et d'invasion transwell (Lingrand et al. ; Fig.3. 6B, C) où les inhibitions de SCD1 et PLD2 sont indiscernables. L'inhibiteur de SCD1 a tendance à avoir un impact plus important sur la prolifération que l'inhibiteur de PLD2 (Lingrand et al. ; Fig. 3.7 A), notamment dans le test de formation de colonies. L'effet de l'inhibiteur de SCD1 est probablement plus fort dans les essais impliquant la prolifération cellulaire, car il peut avoir un impact sur de multiples voies convergentes vers ce processus. En effet, SCD1 est impliqué dans la régulation du métabolisme et des voies de signalisation de la croissance de la tumeur dans différents cancers (Igal, 2010). Par ailleurs, il a été démontré que l'acide oléique déclenche la prolifération des cellules MDA-MB-231 par activation du récepteur GPR40 (Hardy et al., 2005). Dans cette même étude, cet effet sur la prolifération était associé à l'activité de la PI3K (Hardy et al., 2000; Hardy et al., 2005). Néanmoins, puisque SCD1 et PLD2 peuvent affecter la prolifération cellulaire par la promotion de la phosphorylation de mTOR (Chen, Y. et al., 2003;

et al., 2005). Néanmoins, puisque SCD1 et PLD2 peuvent affecter la prolifération cellulaire par la promotion de la phosphorylation de mTOR (Chen, Y. et al., 2003; Scaglia et Igal, 2008), il n'est pas surprenant que leur inhibition conjuguée amplifie cet effet de manière additive, comme le soulignent nos résultats (**Lingrand et al. ; Fig.3.5; Fig.3.7**).

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans cette étude suggèrent que l'activité de SCD1, à travers son principal produit, l'acide oléique, pourrait stimuler la progression du cancer du sein triple négatif, y compris la migration, l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses. L'acide oléique est un lipide de signalisation majeur, qui semble réguler la migration des cellules cancéreuses principalement par la voie de signalisation PLD2-PI3K/mTOR (**Lingrand et al. ; Fig.7.1**). Par conséquent, nous suggérons que l'acide oléique active spécifiquement la PLD2 en agissant en tant que « coordinateur » capable de réguler finement plusieurs signaux à mesure qu'ils surviennent en aval. Bien que l'effet de l'acide oléique sur l'activité de la PLD2 observé dans cette présente étude soit probablement direct, la possibilité que SCD1 et PLD2 puissent également agir sur la migration des cellules de cancer du sein par une voie complémentaire ne peut être exclue comme précédemment décrit. Selon nos résultats préliminaires, il est possible que la migration cellulaire stimulée par l'acide oléique implique aussi la voie PLC γ /FAK comme le propose le modèle en **Figure 7.1**.

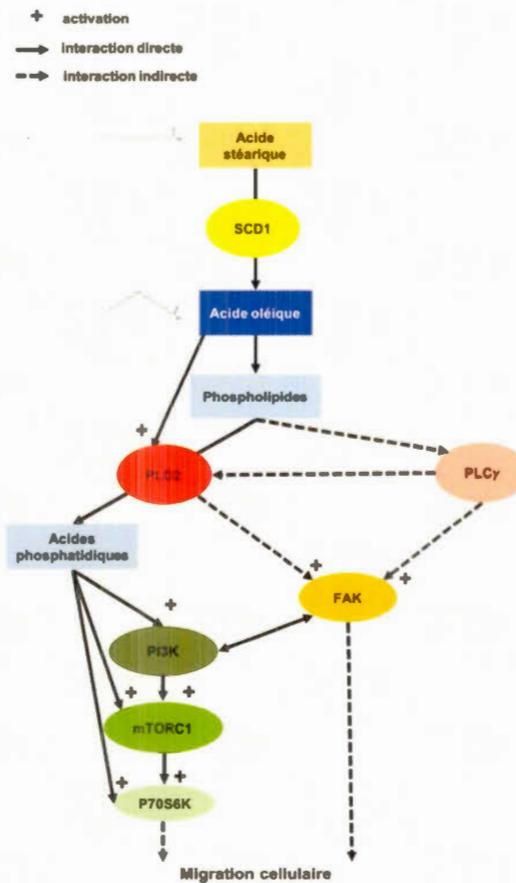


Figure 7.1. Modèle et simplifié de l'activité de SCD1 et de PLD2 dans la régulation de la migration des cellules de cancer du sein triple négatif.

L'acide oléique, le principal produit de SCD1, active spécifiquement PLD2. L'acide oléique est aussi incorporé dans les phospholipides. PLD2 génère les acides phosphatidiques à partir des phospholipides. Les acides phosphatidiques activent ensuite la voie de signalisation PI3K/mTOR/p70S6K. De plus, PLD2, activé par l'acide oléique pourrait réguler la migration cellulaire via les protéines d'adhésion focales FAK. De plus, une autre phospholipase, la PLC γ pourrait moduler la migration cellulaire par la voie de signalisation FAK. Cependant, ces deux voies pourraient se réguler entre elles d'une part car la PLC γ régule les PLD et que d'autre part la protéine FAK a besoin d'interagir avec la PI3K pour stimuler la migration cellulaire. Dans l'ensemble, la migration cellulaire est régulée par les voies de signalisation PLD2-PI3K-mTOR/p70S6K et la voie PLC γ /FAK, ces deux voies étant stimulées au préalable par le principal produit de SCD1 : l'acide oléique

CONCLUSION

Premièrement, la recherche réalisée durant ce projet de maîtrise a permis de mieux comprendre les rôles de SCD1 en lien avec plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement des métastases. Nos résultats suggèrent fortement que SCD1 et son principal produit, l'acide oléique, stimulent la progression du cancer du sein triple négatif en activant la migration, l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses. L'acide oléique semble être un lipide de signalisation majeur, modulant la migration des cellules cancéreuses via une voie PLD2/PI3K/mTOR. De plus, ces résultats préliminaires suggèrent une régulation de la migration par l'acide oléique par la PLC γ /FAK. En prenant en compte la modification de la morphologie cellulaire en présence d'acide oléique et de l'inhibiteur de SCD1, il serait intéressant de regarder ce qui se passe d'un point de vue mécanistique au niveau de la régulation du cytosquelette d'actine dans les différentes voies de signalisation impliquant par exemple la voie des Rho GTPases. Pour cela les niveaux d'expression protéique d'un panel de Rho GTPases (CD42, Rac1, RhoA) pourraient être étudiés par immunobuvardage avec pour conditions des traitements à l'acide oléique et avec l'inhibiteur de SCD1. En parallèle, les lamellipodes des cellules pourraient être mis en évidence par immunofluorescence en marquant l'actine et les GTPases (CD42, Rac1 ou RhoA en fonction des résultats de l'immunobuvardage). Le but étant d'observer si l'OA induit ou non une augmentation de ces GTPases (et SCD1 une diminution).

Par ailleurs, il a été montré que l'inhibition de l'activité de SCD1 induit une diminution de la migration et de l'invasion des cellules MDA-MB-231 hautement métastatiques

et modifie également leur morphologie en réduisant leur caractère mésenchymal. Ces résultats nous suggèrent que l'inhibition de SCD1 pourrait être utilisée comme traitement anti-métastatique dans un contexte du cancer du sein, il serait donc intéressant de les valider *in vivo*. En effet, des souris transgéniques MMTV - PyMT (Mouse Mammary tumor virus Polyomavirus Middle T) qui génèrent des tumeurs primaires au niveau de la glande mammaire (et des métastases) pourraient être croisées avec des souris où *SCD1* est inactivée dans la glande mammaire (système Cre-Lox) (Flowers et al., 2012). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de SCD1 avec un composé qui n'est pas dirigé vers un tissu spécifique entraîne des effets secondaires indésirables (Zhang et al., 2013). C'est pourquoi les laboratoires ont développé un inhibiteur *in vitro* et *in vivo* anti-SCD1 dirigé contre l'activité tumorale spécifiquement (T-3764518) (von Roemeling et al., 2013). Ce traitement a été combiné à un inhibiteur de mTOR validé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA, *Food and Drugs Administration*). De manière intéressante, ce traitement s'est avéré efficace sur des modèles de tumeurs métastatiques de rein et des modèles de xénogreffes dérivées de patients atteints d'un cancer du rein métastatique (von Roemeling et al., 2013). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de SCD1 pourrait être utilisée comme traitement anti-métastatique dans un contexte du cancer du sein. Il serait dès lors intéressant de les valider, au long terme, au travers d'essais cliniques.

RÉFÉRENCES

- Alloatti, A., Gupta, S., Gualdrón-Lopez, M., Nguewa, P. A., Altabe, S. G., Deumer, G., Uttaro, A. D. (2011, Aug 26). Stearoyl-CoA desaturase is an essential enzyme for the parasitic protist *Trypanosoma brucei*. *Biochem Biophys Res Commun*, 412(2), 286-290. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.084
- Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A. et Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An Overview. *Methods Mol Biol*, 1835, 69-105. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_3
- Angelucci, C., D'Alessio, A., Iacopino, F., Proietti, G., Di Leone, A., Masetti, R. et Sica, G. (2018, May 11). Pivotal role of human stearyl-CoA desaturases (SCD1 and 5) in breast cancer progression: oleic acid-based effect of SCD1 on cell migration and a novel pro-cell survival role for SCD5. *Oncotarget*, 9(36), 24364-24380. doi: 10.18632/oncotarget.25273
- Angelucci, C., Maulucci, G., Colabianchi, A., Iacopino, F., D'Alessio, A., Maiorana, A., Sica, G. (2015, May 12). Stearyl-CoA desaturase 1 and paracrine diffusible signals have a major role in the promotion of breast cancer cell migration induced by cancer-associated fibroblasts. *Br J Cancer*, 112(10), 1675-1686. doi: 10.1038/bjc.2015.135
- Arous, C., Naimi, M. et Van Obberghen, E. (2011, Apr). Oleate-mediated activation of phospholipase D and mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates proliferation and rapamycin sensitivity of hepatocarcinoma cells. *Diabetologia*, 54(4), 954-964. doi: 10.1007/s00125-010-2032-1
- Austin, D., Hamilton, N., Elshimali, Y., Pietras, R., Wu, Y. et Vadgama, J. (2018, Sep 21). Estrogen receptor-beta is a potential target for triple negative breast cancer treatment. *Oncotarget*, 9(74), 33912-33930. doi: 10.18632/oncotarget.26089
- Bellis, S. L., Miller, J. T. et Turner, C. E. (1995, Jul 21). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 270(29), 17437-17441.

- Berzat, A. et Hall, A. (2010, Aug 18). Cellular responses to extracellular guidance cues. *EMBO J*, 29(16), 2734-2745. doi: 10.1038/emboj.2010.170
- Besins, T. (1982, Jun). [Morphology and anatomy of the breast]. *Soins Chir Gen Spec*, (16), 3-5.
- Boarder, M. R. (1994, Feb). A role for phospholipase D in control of mitogenesis. *Trends Pharmacol Sci*. 15(2), 57-62.
- Bradford, M. M. (1976, May 07). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brown, J. M. et Rudel, L. L. (2010, Jun). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 inhibition and the metabolic syndrome: considerations for future drug discovery. *Curr Opin Lipidol*, 21(3), 192-197. doi: 10.1097/MOL.0b013e32833854ac
- Bruntz, R. C., Lindsley, C. W. e: Brown, H. A. (2014, Oct). Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Rev*, 66(4), 1033-1079. doi: 10.1124/pr.114.009217
- Burridge, K., Turner, C. E. et Romer, L. H. (1992, Nov). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol*, 119(4), 893-903.
- Cai, S., Sun, P. H., Resaul, J., Shi, L., Jiang, A., Satherley, L. K., . . . Ye, L. (2017, Mar). Expression of phospholipase C isozymes in human breast cancer and their clinical significance. *Oncol Rep*, 37(3), 1707-1715. doi: 10.3892/or.2017.5394
- Canadian Cancer Society's Advisory Committee ; Toronto, O. C. C. S. (2016). Canadian Cancer Statistics 2016. *Cancer Statistics*. , <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-statistics-publication/?region=qc>
- Castro, L. F., Wilson, J. M., Goncalves, O., Galante-Oliveira, S., Rocha, E. et Cunha, I. (2011, May 19). The evolutionary history of the stearyl-CoA desaturase gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 11, 132. doi: 10.1186/1471-2148-11-132
- Cazzolli, R., Shemon, A. N., Fang, M. Q. et Hughes, W. E. (2006, Aug). Phospholipid

signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life*, 58(8), 457-461. doi: 10.1080/15216540600871142

- Chajes, V., Hulten, K., Van Kappel, A. L., Winkvist, A., Kaaks, R., Hallmans, G., . . . Riboli, E. (1999, Nov 26). Fatty-acid composition in serum phospholipids and risk of breast cancer: an incident case-control study in Sweden. *Int J Cancer*, 83(5), 585-590.
- Chajes, V., Thiebaut, A. C., Rotival, M., Gauthier, E., Maillard, V., Boutron-Ruault, M. C., . . . Clavel-Chapelon, F. (2008, Jun 1). Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol*, 167(11), 1312-1320. doi: 10.1093/aje/kwn069
- Charras, G. et Paluch, E. (2008, Sep). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(9), 730-736. doi: 10.1038/nrm2453
- Chen, J. S. et Exton, J. H. (2005, Aug 12). Sites on phospholipase D2 phosphorylated by PKC α . *Biochem Biophys Res Commun*, 333(4), 1322-1326. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.048
- Chen, J. S., Wang, Q., Fu, X. H., Huang, X. H., Chen, X. L., Cao, L. Q., . . . Zhang, L. J. (2009, Feb). Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatol Res*, 39(2), 177-186. doi: 10.1111/j.1872-034X.2008.00449.x
- Chen, Y., Zheng, Y. et Foster, D. A. (2003, Jun 19). Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells. *Oncogene*, 22(25), 3937-3942. doi: 10.1038/sj.onc.1206565
- Chumachenko, P. A. et Anokhina, M. A. (1977, Feb). [Cyclic changes in the morphology of the developing female breast]. *Akush Ginekol (Mosk)*, (2), 23-26.
- Clark, A. G. et Vignjevic, D. M. (2015, Oct). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*, 36, 13-22. doi: 10.1016/j.ccb.2015.06.004
- Clevers, H. (2006, Nov 03). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.018
- Coomans de Brachene, A., Dif, N., de Rocca Serra, A., Bonnineau, C., Velghe, A. I., Larondelle, Y., . . . Demoulin, J. B. (2017, Mar). PDGF-induced fibroblast

growth requires monounsaturated fatty acid production by stearoyl-CoA desaturase. *FEBS Open Bio*, 7(3), 414-423. doi: 10.1002/2211-5463.12194

Costa, R. L. B., Han, H. S. et Gradishar, W. J. (2018, Jun). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat*, 169(3), 397-406. doi: 10.1007/s10549-018-4697-y

Dai, S., Yan, Y., Xu, Z., Zeng, S., Qian, L., Huo, L., . . . Gong, Z. (2017). SCD1 Confers Temozolomide Resistance to Human Glioma Cells via the Akt/GSK3beta/beta-Catenin Signaling Axis. *Front Pharmacol*, 8, 960. doi: 10.3389/fphar.2017.00960

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J. et Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*, 5(10), 2929-2943.

Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. et Ullrich, A. (1997, Dec 1). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*, 16(23), 7032-7044. doi: 10.1093/emboj/16.23.7032

Demicheli, R., Retsky, M. W., Swartzendruber, D. E. et Bonadonna, G. (1997, Nov). Proposal for a new model of breast cancer metastatic development. *Ann Oncol*, 8(11), 1075-1080.

Eliyatkin, N., Yalcin, E., Zengel, B., Aktas, S. et Vardar, E. (2015, Apr). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*, 11(2), 59-66. doi: 10.5152/tjbh.2015.1669

Ellis, C. N. (2010). *Inherited Cancer Syndromes: Current Clinical Management* Springer New York.

Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A. et Lluch, A. (2012, Oct). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005

Exton, J. H. (1997, Jun 20). New developments in phospholipase D. *J Biol Chem*, 272(25), 15579-15582.

Falvella, F. S., Pascale, R. M., Gariboldi, M., Manenti, G., De Miglio, M. R., Simile, M. M., . . . Feo, F. (2002, Nov). Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to

hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis*, 23(11), 1933-1936.

- Fan, J., Kamphorst, J. J., Mathew, R., Chung, M. K., White, E., Shlomi, T. et Rabinowitz, J. D. (2013, Dec 3). Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol Syst Biol*, 9, 712. doi: 10.1038/msb.2013.65
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. et Chen, J. (2001, Nov 30). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294(5548), 1942-1945. doi: 10.1126/science.1066015
- Flowers, M. T., Ade, L., Strable, M. S. et Ntambi, J. M. (2012, Aug). Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity. *J Lipid Res*, 53(8), 1646-1653. doi: 10.1194/jlr.M027508
- Flowers, M. T. et Ntambi, J. M. (2009, Feb). Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. *Biochim Biophys Acta*, 1791(2), 85-91. doi: 10.1016/j.bbailip.2008.12.011
- Foster, D. A. (2007, Jan 1). Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res*, 67(1), 1-4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3016
- Foster, D. A. (2009, Sep). Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1791(9), 949-955. doi: 10.1016/j.bbailip.2009.02.009
- Foster, D. A. et Xu, L. (2003, Sep). Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res*, 1(11), 789-800.
- Friedl, P. et Alexander, S. (2011, Nov 23). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 147(5), 992-1009. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016
- Friedl, P. et Gilmour, D. (2009, Jul). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(7), 445-457. doi: 10.1038/nrm2720
- Friedl, P. et Wolf, K. (2003, May). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 362-374. doi: 10.1038/nrc1075
- Friedl, P. et Wolf, K. (2010, Jan 11). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, 188(1), 11-19. doi: 10.1083/jcb.200909003

- Fritz, V., Benfodda, Z., Rodier, G., Henriquet, C., Iborra, F., Avances, C., . . . Fajas, L. (2010, Jun). 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(6), 1740-1754. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1064
- Frohman, M. A. et Morris, A. J. (1996, Aug 01). Rho is only ARF the story. Phospholipid signalling. *Curr Biol*, 6(8), 945-947.
- Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A. et Marshall, C. J. (2008, Oct 14). DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr Biol*, 18(19), 1456-1465. doi: 10.1016/j.cub.2008.08.053
- Gao, W., Li, J. Z., Chan, J. Y., Ho, W. K. et Wong, T. S. (2012). mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer. *ISRN Otolaryngol*, 2012, 953089. doi: 10.5402/2012/953089
- Gomez-Cambronero, J. (2010, Jul 7). New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal*, 10, 1356-1369. doi: 10.1100/tsw.2010.116
- Gomez-Cambronero, J. (2014a, Jan). Phosphatidic acid, phospholipase D and tumorigenesis. *Adv Biol Regul*, 54, 197-206. doi: 10.1016/j.jbior.2013.08.006
- Gomez-Cambronero, J. (2014b, Aug 15). Phospholipase D in cell signaling: from a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis. *J Biol Chem*, 289(33), 22557-22566. doi: 10.1074/jbc.R114.574152
- Gordon, L. A., Mulligan, K. T., Maxwell-Jones, H., Adams, M., Walker, R. A. et Jones, J. L. (2003, Aug 10). Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype. *Int J Cancer*, 106(1), 8-16. doi: 10.1002/ijc.11172
- Gorelik, R. et Gautreau, A. (2014, Aug). Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nat Protoc*, 9(8), 1931-1943. doi: 10.1038/nprot.2014.131
- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. et Ullrich, A. (2001, Mar 26). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene*, 20(13), 1594-1600. doi: 10.1038/sj.onc.1204192

- Gulhati, P., Bowen, K. A., Liu, J., Stevens, P. D., Rychahou, P. G., Chen, M., . . . Evers, B. M. (2011, May 1). mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res*, *71*(9), 3246-3256. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4058
- Gunasinghe, N. P., Wells, A., Thompson, E. W. et Hugo, H. J. (2012, Dec). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, *31*(3-4), 469-478. doi: 10.1007/s10555-012-9377-5
- Guo, S., Wang, Y., Zhou, D. et Li, Z. (2014, Aug 05). Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. *Sci Rep*, *4*, 5959. doi: 10.1038/srep05959
- Gupta, G. P. et Massague, J. (2006, Nov 17). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, *127*(4), 679-695. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.001
- Gyorffy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budezies, J., Li, Q. et Szallasi, Z. (2010, Oct). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*, *123*(3), 725-731. doi: 10.1007/s10549-009-0674-9
- Han, J. M., Kim, J. H., Lee, B. D., Lee, S. D., Kim, Y., Jung, Y. W., . . . Ryu, S. H. (2002, Mar 8). Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase D2 by protein kinase C delta in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem*, *277*(10), 8290-8297. doi: 10.1074/jbc.M108343200
- Hannan, K. M., Thomas, G. et Pearson, R. B. (2003, Mar 1). Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochem J*, *370*(Pt 2), 469-477. doi: 10.1042/BJ20021709
- Hardy, S., Langelier, Y. et Prentki, M. (2000, Nov 15). 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*(22), 6353-6358.
- Hardy, S., St-Onge, G. G., Joly, E., Langelier, Y. et Prentki, M. (2005, Apr 8). Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem*, *280*(14), 13285-13291. doi: 10.1074/jbc.M410922200

- Henkels, K. M., Boivin, G. P., Dudley, E. S., Berberich, S. J. et Gomez-Cambronero, J. (2013, Dec 5). Phospholipase D (PLD) drives cell invasion, tumor growth and metastasis in a human breast cancer xenograph model. *Oncogene*, *32*(49), 5551-5562. doi: 10.1038/onc.2013.207
- Hensley, C. T., Wasti, A. T. et DeBerardinis, R. J. (2013, Sep). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest*, *123*(9), 3678-3684. doi: 10.1172/JCI69600
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. et Gotoh, Y. (2004, Jun). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*, *131*(12), 2791-2801. doi: 10.1242/dev.01165
- Holder, A. M., Gonzalez-Angulo, A. M., Chen, H., Akcakanat, A., Do, K. A., Fraser Symmans, W., . . . Meric-Bernstam, F. (2013, Jan). High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, *137*(1), 319-327. doi: 10.1007/s10549-012-2354-4
- Horikawa, M., Nomura, T., Hashimoto, T. et Sakamoto, K. (2008, Aug). Elongation and desaturation of fatty acids are critical in growth, lipid metabolism and ontogeny of *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem*, *144*(2), 149-158. doi: 10.1093/jb/mvn055
- Hsieh, A. C., Liu, Y., Edlind, M. P., Ingolia, N. T., Janes, M. R., Sher, A., . . . Ruggero, D. (2012, May 3). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*, *485*(7396), 55-61. doi: 10.1038/nature10912
- Huang, G. M., Jiang, Q. H., Cai, C., Qu, M. et Shen, W. (2015, Mar 28). SCD1 negatively regulates autophagy-induced cell death in human hepatocellular carcinoma through inactivation of the AMPK signaling pathway. *Cancer Lett*, *358*(2), 180-190. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.036
- Huang, J., Fan, X. X., He, J., Pan, H., Li, R. Z., Huang, L., . . . He, J. X. (2016, Jun 28). SCD1 is associated with tumor promotion, late stage and poor survival in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, *7*(26), 39970-39979. doi: 10.18632/oncotarget.9461
- Hudis, C. A. et Gianni, L. (2011). Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist*, *16 Suppl 1*, 1-11. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-01

- Huveneers, S. et Danen, E. H. (2009, Apr 15). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*, 122(Pt 8), 1059-1069. doi: 10.1242/jcs.039446
- Ide, Y., Waki, M., Hayasaka, T., Nishio, T., Morita, Y., Tanaka, H., . . . Setou, M. (2013). Human breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine(36ratio1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PLoS One*, 8(4), e61204. doi: 10.1371/journal.pone.0061204
- Igal, R. A. (2010, Sep). Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis*, 31(9), 1509-1515. doi: 10.1093/carcin/bgq131
- Igal, R. A. (2011, May 20). Roles of StearoylCoA Desaturase-1 in the Regulation of Cancer Cell Growth, Survival and Tumorigenesis. *Cancers (Basel)*, 3(2), 2462-2477. doi: 10.3390/cancers3022462
- Igal, R. A. (2016, Dec). Stearoyl CoA desaturase-1: New insights into a central regulator of cancer metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1861(12 Pt A), 1865-1880. doi: 10.1016/j.bbali.2016.09.009
- Karagiannis, G. S., Pastoriza, J. M., Wang, Y., Harney, A. S., Entenberg, D., Pignatelli, J., . . . Oktay, M. H. (2017, Jul 5). Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism. *Sci Transl Med*, 9(397). doi: 10.1126/scitranslmed.aan0026
- Karakas, C. (2011). Paget's disease of the breast. *J Carcinog*, 10, 31. doi: 10.4103/1477-3163.90676
- Keren, K., Pincus, Z., Allen, G. M., Barnhart, E. L., Marriott, G., Mogilner, A. et Theriot, J. A. (2008, May 22). Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature*, 453(7194), 475-480. doi: 10.1038/nature06952
- Kersten, S. (2001, Apr). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, 2(4), 282-286. doi: 10.1093/embo-reports/kve071
- Kim, J. H., Kim, Y., Lee, S. D., Lopez, I., Arnold, R. S., Lambeth, J. D., . . . Ryu, S. H. (1999, Jul 2). Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett*, 454(1-2), 42-46.
- Knapek, K., Frondorf, K., Post, J., Short, S., Cox, D. et Gomez-Cambronero, J. (2010,

- Sep). The molecular basis of phospholipase D2-induced chemotaxis: elucidation of differential pathways in macrophages and fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 30(18), 4492-4506. doi: 10.1128/MCB.00229-10
- Komiya, Y. et Habas, R. (2008, Apr). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75.
- Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V. et Perelmuter, V. M. (2015, Apr-Jun). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae*, 7(2), 17-28.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschlager, M. et Dolznig, H. (2013, Jan-Mar). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*, 752(1), 10-24. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001
- Kwan, M. L., Kushi, L. H., Weltzien, E., Maring, B., Kutner, S. E., Fulton, R. S., . . . Caan, B. J. (2009). Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res*, 11(3), R31. doi: 10.1186/bcr2261
- Labhsetwar, A. P. (1970, Aug). The role of oestrogens in spontaneous ovulation: evidence for positive oestrogen feedback in the 4-day oestrous cycle. *J Endocrinol*, 47(4), 481-493.
- Lamouille, S., Xu, J. et Derynck, R. (2014, Mar). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196. doi: 10.1038/nrm3758
- Lanigan, F., O'Connor, D., Martin, F. et Gallagher, W. M. (2007, Dec). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci*, 64(24), 3159-3184. doi: 10.1007/s00018-007-7386-2
- Laplane, M. et Sabatini, D. M. (2009, Oct 15). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 20), 3589-3594. doi: 10.1242/jcs.051011
- Laplane, M. et Sabatini, D. M. (2012, Apr 13). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017
- Lavieri, R., Scott, S. A., Lewis, J. A., Selvy, P. E., Armstrong, M. D., Alex Brown, H. et Lindsley, C. W. (2009, Apr 15). Design and synthesis of isoform-selective phospholipase D (PLD) inhibitors. Part II. Identification of the 1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one privileged structure that engenders PLD2

- selectivity. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(8), 2240-2243. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.02.125
- Lehman, N., Ledford, B., Di Fulvio, M., Frondorf, K., McPhail, L. C. et Gomez-Cambronero, J. (2007, Apr). Phospholipase D2-derived phosphatidic acid binds to and activates ribosomal p70 S6 kinase independently of mTOR. *FASEB J*, 21(4), 1075-1087. doi: 10.1096/fj.06-6652com
- Liao, Y. M., Sy, A. et Yen, Y. (2012, Oct). Markers for efficacy of mammalian target of rapamycin inhibitor. *Anticancer Res*, 32(10), 4235-4244.
- Liu, L., Chen, L., Chung, J. et Huang, S. (2008, Aug 28). Rapamycin inhibits F-actin reorganization and phosphorylation of focal adhesion proteins. *Oncogene*, 27(37), 4998-5010. doi: 10.1038/onc.2008.137
- Liu, L., Li, F., Cardelli, J. A., Martin, K. A., Blenis, J. et Huang, S. (2006, Nov 9). Rapamycin inhibits cell motility by suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways. *Oncogene*, 25(53), 7029-7040. doi: 10.1038/sj.onc.1209691
- Logullo, A. F., Nonogaki, S., Pasini, F. S., Osorio, C. A., Soares, F. A. et Brentani, M. M. (2010, Feb). Concomitant expression of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in breast ductal carcinoma: association with progression. *Oncol Rep*, 23(2), 313-320.
- Long, J. P., Li, X. N. et Zhang, F. (2016, Feb 10). Targeting metabolism in breast cancer: How far we can go? *World J Clin Oncol*, 7(1), 122-130. doi: 10.5306/wjco.v7.i1.122
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B. et Dennis, P. A. (2008, Feb-Apr). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, 11(1-2), 32-50. doi: 10.1016/j.drug.2007.11.003
- Los, D. A. et Murata, N. (2004, Nov 3). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2), 142-157. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.08.002
- Lounis, M. A., Bergeron, K. F., Burhans, M. S., Ntambi, J. M. et Mounier, C. (2017, Dec 1). Oleate activates SREBP-1 signaling activity in SCD1-deficient hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 313(6), E710-E720. doi: 10.1152/ajpendo.00151.2017

- Lunaas, T. (1962, Aug). Urinary oestrogen levels in the sow during oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fertil*, 4, 13-20.
- Luyimbazi, D., Akcakanat, A., McAuliffe, P. F., Zhang, L., Singh, G., Gonzalez-Angulo, A. M., . . . Meric-Bernstam, F. (2010, Oct). Rapamycin regulates stearoyl CoA desaturase 1 expression in breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 9(10), 2770-2784. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0980
- Man, W. C., Miyazaki, M., Chu, K. et Ntambi, J. M. (2006, Jan 13). Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem*, 281(2), 1251-1260. doi: 10.1074/jbc.M508733200
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., . . . Weinberg, R. A. (2008, May 16). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027
- Mason, P., Liang, B., Li, L., Fremgen, T., Murphy, E., Quinn, A., . . . Carter, K. (2012). SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLoS One*, 7(3), e33823. doi: 10.1371/journal.pone.0033823
- Mauvoisin, D., Charfi, C., Lounis, A. M., Rassart, E. et Mounier, C. (2013, Jan). Decreasing stearoyl-CoA desaturase-1 expression inhibits beta-catenin signaling in breast cancer cells. *Cancer Sci*, 104(1), 36-42. doi: 10.1111/cas.12032
- Mauvoisin, D. et Mounier, C. (2011, Jan). Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie*, 93(1), 78-86. doi: 10.1016/j.biochi.2010.08.001
- McNamara, K. M., Oguro, S., Omata, F., Kikuchi, K., Guestini, F., Suzuki, K., . . . Sasano, H. (2017, Jan). The presence and impact of estrogen metabolism on the biology of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 161(2), 213-227. doi: 10.1007/s10549-016-4050-2
- Medes, G., Thomas, A. et Weinhouse, S. (1953, Jan). Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res*, 13(1), 27-29.
- Mego, M., Mani, S. A. et Cristofanilli, M. (2010, Dec). Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(12), 693-701. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.171

- Miyazaki, M., Kim, H. J., Man, W. C. et Ntambi, J. M. (2001, Oct 19). Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem*, 276(42), 39455-39461. doi: 10.1074/jbc.M106442200
- Miyazaki, M., Kim, Y. C., Gray-Keller, M. P., Attie, A. D. et Ntambi, J. M. (2000, Sep 29). The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem*, 275(39), 30132-30138. doi: 10.1074/jbc.M005488200
- Monaco, M. E. (2017, Apr 25). Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 8(17), 29487-29500. doi: 10.18632/oncotarget.15494
- Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S. et Puisieux, A. (2008, Aug 6). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 3(8), e2888. doi: 10.1371/journal.pone.0002888
- Mouneimne, G., Soon, L., DesMarais, V., Sidani, M., Song, X., Yip, S. C., . . . Condeelis, J. (2004, Aug 30). Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J Cell Biol*, 166(5), 697-708. doi: 10.1083/jcb.200405156
- Nashed, M., Chisholm, J. W. et Igal, R. A. (2012, Sep). Stearoyl-CoA desaturase activity modulates the activation of epidermal growth factor receptor in human lung cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237(9), 1007-1017. doi: 10.1258/ebm.2012.012126
- Navarro-Tito, N., Robledo, T. et Salazar, E. P. (2008, Nov 01). Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 314(18), 3340-3355. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.08.018
- Navarro-Tito, N., Soto-Guzman, A., Castro-Sanchez, L., Martinez-Orozco, R. et Salazar, E. P. (2010, Feb). Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(2), 306-317. doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.010
- Nguyen, D. X., Bos, P. D. et Massague, J. (2009, Apr). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 9(4), 274-284. doi: 10.1038/nrc2622
- Nieva, C., Marro, M., Santana-Codina, N., Rao, S., Petrov, D. et Sierra, A. (2012). The

lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PLoS One*, 7(10), e46456. doi: 10.1371/journal.pone.0046456

- Ntambi, J. M. (1999, Sep). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res*, 40(9), 1549-1558.
- Ntambi, J. M. et Miyazaki, M. (2004, Mar). Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res*, 43(2), 91-104.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M. et Dobrzyn, A. (2004, Nov). Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. *Lipids*, 39(11), 1061-1065.
- O'Neil, T. K., Duffy, L. R., Frey, J. W. et Hornberger, T. A. (2009, Jul 15). The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. *J Physiol*, 587(Pt 14), 3691-3701. doi: 10.1113/jphysiol.2009.173609
- Organization, W. H. (2015). Health statistics and information systems. *WHO Mortality Database*, <http://www.who.int/cancer/fr/>
- Oudard, S., Medioni, J., Ayllon, J., Barrascourt, E., Elaidi, R. T., Balcaceres, J. et Scotte, F. (2009, Jun). Everolimus (RAD001): an mTOR inhibitor for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 9(6), 705-717. doi: 10.1586/era.09.27
- Pala, V., Krogh, V., Muti, P., Chajes, V., Riboli, E., Micheli, A., . . . Berrino, F. (2001, Jul 18). Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian study. *J Natl Cancer Inst*, 93(14), 1088-1095.
- Paplomata, E. et O'Regan, R. (2014, Jul). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol*, 6(4), 154-166. doi: 10.1177/1758834014530023
- Park, J. B., Lee, C. S., Jang, J. H., Ghim, J., Kim, Y. J., You, S., . . . Ryu, S. H. (2012, Nov). Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12(11), 782-792. doi: 10.1038/nrc3379
- Patanaphan, V., Salazar, O. M. et Risco, R. (1988, Sep). Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis. *South Med J*, 81(9), 1109-1112.

- Peck, B., Schug, Z. T., Zhang, Q., Dankworth, B., Jones, D. T., Smethurst, E., . . . Schulze, A. (2016). Inhibition of fatty acid desaturation is detrimental to cancer cell survival in metabolically compromised environments. *Cancer Metab*, 4, 6. doi: 10.1186/s40170-016-0146-8
- Peng, X. et Frohman, M. A. (2012, Feb). Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. *Acta Physiol (Oxf)*, 204(2), 219-226. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02298.x
- Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C. E., Thiery, J. P. et Valles, A. M. (2000, Mar 6). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J Cell Biol*, 148(5), 957-970.
- Petrie, R. J., Doyle, A. D. et Yamada, K. M. (2009, Aug). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(8), 538-549. doi: 10.1038/nrm2729
- Popeijus, H. E., Saris, W. H. et Mensink, R. P. (2008, Jul). Role of stearoyl-CoA desaturases in obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*, 32(7), 1076-1082. doi: 10.1038/ijo.2008.55
- Porta, C., Paglino, C. et Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*, 4, 64. doi: 10.3389/fonc.2014.00064
- Pribic, J. et Brazill, D. (2012, Aug). Paxillin phosphorylation and complexing with Erk and FAK are regulated by PLD activity in MDA-MB-231 cells. *Cell Signal*, 24(8), 1531-1540. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.03.015
- Prvulovic, I., Kardum-Skelin, I., Sustercic, D., Jakic-Razumovic, J. et Manojlovic, S. (2010, Mar). Morphometry of tumor cells in different grades and types of breast cancer. *Coll Antropol*, 34(1), 99-103.
- Qiang, L., Kon, N., Zhao, W., Jiang, L., Knight, C. M., Welch, C., . . . Accili, D. (2015, Jun 23). Hepatic SirT1-Dependent Gain of Function of Stearoyl-CoA Desaturase-1 Conveys Dysmetabolic and Tumor Progression Functions. *Cell Rep*, 11(11), 1797-1808. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.025
- Reiske, H. R., Kao, S. C., Cary, L. A., Guan, J. L., Lai, J. F. et Chen, H. C. (1999, Apr 30). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem*, 274(18), 12361-12366.

- Ridley, A. J. (2011, Jun 24). Life at the leading edge. *Cell*, *145*(7), 1012-1022. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., . . . Horwitz, A. R. (2003, Dec 5). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, *302*(5651), 1704-1709. doi: 10.1126/science.1092053
- Rios-Esteves, J. et Resh, M. D. (2013, Sep 26). Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. *Cell Rep*, *4*(6), 1072-1081. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.027
- Rivera, V. M., Squillace, R. M., Miller, D., Berk, L., Wardwell, S. D., Ning, Y., . . . Clackson, T. (2011, Jun). Ridaforolimus (AP23573; MK-8669), a potent mTOR inhibitor, has broad antitumor activity and can be optimally administered using intermittent dosing regimens. *Mol Cancer Ther*, *10*(6), 1059-1071. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0792
- Ryan J. Petrie, A. D. D. a. K. M. Y. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *NATURE REVIEWS | Molecular cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2729
- Sala, G., Dituri, F., Raimondi, C., Previdi, S., Maffucci, T., Mazzeo, M., . . . Falasca, M. (2008, Dec 15). Phospholipase Cgamma1 is required for metastasis development and progression. *Cancer Res*, *68*(24), 10187-10196. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1181
- Santner, S. J., Dawson, P. J., Tait, L., Soule, H. D., Eliason, J., Mohamed, A. N., . . . Miller, F. R. (2001, Jan). Malignant MCF10CA1 cell lines derived from premalignant human breast epithelial MCF10AT cells. *Breast Cancer Res Treat*, *65*(2), 101-110.
- Sarri, E., Pardo, R., Fensome-Green, A. et Cockcroft, S. (2003, Jan 15). Endogenous phospholipase D2 localizes to the plasma membrane of RBL-2H3 mast cells and can be distinguished from ADP ribosylation factor-stimulated phospholipase D1 activity by its specific sensitivity to oleic acid. *Biochem J*, *369*(Pt 2), 319-329. doi: 10.1042/BJ20021347
- Saunus, J. M., McCart Reed, A. E., Lim, Z. L. et Lakhani, S. R. (2017, Jan 13). Breast Cancer Brain Metastases: Clonal Evolution in Clinical Context. *Int J Mol Sci*, *18*(1). doi: 10.3390/ijms18010152
- Savchenko, O. N. (1961). Oestrogen and pregnanediol excretion in the course of the

menstrual cycle in women of various age groups. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova*, 47, 1567-1576.

Scaglia, N., Chisholm, J. W. et Igal, R. A. (2009, Aug 27). Inhibition of stearylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One*, 4(8), e6812. doi: 10.1371/journal.pone.0006812

Scaglia, N. et Igal, R. A. (2008, Oct). Inhibition of Stearyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol*, 33(4), 839-850.

Schaller, M. D. et Parsons, J. T. (1994, Oct). Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6(5), 705-710.

Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. et Sieg, D. J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*, 71(3-4), 435-478.

Scott, S. A., Selvy, P. E., Buck, J. R., Cho, H. P., Criswell, T. L., Thomas, A. L., . . . Brown, H. A. (2009, Feb). Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat Chem Biol*, 5(2), 108-117. doi: 10.1038/nchembio.140

Seidensticker, M. J. et Behrens, J. (2000, Feb 2). Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1495(2), 168-182.

Serna-Marquez, N., Villegas-Comonfort, S., Galindo-Hernandez, O., Navarro-Tito, N., Millan, A. et Salazar, E. P. (2013, Feb). Role of LOXs and COX-2 on FAK activation and cell migration induced by linoleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*, 36(1), 65-77. doi: 10.1007/s13402-012-0114-4

Shannon, J., King, I. B., Moshofsky, R., Lampe, J. W., Gao, D. L., Ray, R. M. et Thomas, D. B. (2007, Apr). Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. *Am J Clin Nutr*, 85(4), 1090-1097.

Silva Figueiredo, P., Carla Inada, A., Marcelino, G., Maiara Lopes Cardozo, C., de Cassia Freitas, K., de Cassia Avellaneda Guimaraes, R., . . . Aiko Hiane, P. (2017, Oct 22). Fatty Acids Consumption: The Role Metabolic Aspects Involved in Obesity and Its Associated Disorders. *Nutrients*, 9(10). doi: 10.3390/nu9101158

- Sliva, D., Mason, R., Xiao, H. et English, D. (2000, Feb 16). Enhancement of the migration of metastatic human breast cancer cells by phosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 268(2), 471-479. doi: 10.1006/bbrc.2000.2111
- Sotgia, F., Martinez-Outschoorn, U. E. et Lisanti, M. P. (2013, Aug). Cancer metabolism: new validated targets for drug discovery. *Oncotarget*, 4(8), 1309-1316. doi: 10.18632/oncotarget.1182
- Soto-Guzman, A., Robledo, T., Lopez-Perez, M. et Salazar, E. P. (2008, Nov 6). Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 294(1-2), 81-91. doi: 10.1016/j.mce.2008.08.003
- Sounni, N. E., Cimino, J., Blacher, S., Primac, I., Truong, A., Mazzucchelli, G., . . . Noel, A. (2014, Aug 5). Blocking lipid synthesis overcomes tumor regrowth and metastasis after antiangiogenic therapy withdrawal. *Cell Metab*, 20(2), 280-294. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.022
- Steeg, P. S. et Theodorescu, D. (2008, Apr). Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 5(4), 206-219. doi: 10.1038/nncponc1066
- Stephens, P. J., Tarpey, P. S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D. C., . . . Stratton, M. R. (2012, May 16). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, 486(7403), 400-404. doi: 10.1038/nature11017
- Sumida, C., Graber, R. et Nunez, E. (1993, Jan). Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 48(1), 117-122.
- Swinnen, J. V., Brusselmans, K. et Verhoeven, G. (2006, Jul). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(4), 358-365. doi: 10.1097/01.mco.0000232894.28674.30
- Toschi, A., Lee, E., Thompson, S., Gadir, N., Yellen, P., Drain, C. M., . . . Foster, D. A. (2010, Dec 18). Phospholipase D-mTOR requirement for the Warburg effect in human cancer cells. *Cancer Lett*, 299(1), 72-79. doi: 10.1016/j.canlet.2010.08.006
- Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N. et Foster, D. A. (2009, Mar). Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol*, 29(6), 1411-1420. doi:

10.1128/MCB.00782-08

- Tsuji, T., Ibaragi, S. et Hu, G. F. (2009, Sep 15). Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res*, 69(18), 7135-7139. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1618
- Vacaresse, N., Lajoie-Mazenc, I., Auge, N., Suc, I., Frisach, M. F., Salvayre, R. et Negre-Salvayre, A. (1999, Nov 12). Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ Res*, 85(10), 892-899.
- Valastyan, S. et Weinberg, R. A. (2011, Oct 14). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024
- van Zijl, F., Krupitza, G. et Mikulits, W. (2011, Jul-Oct). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*, 728(1-2), 23-34. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.05.002
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. et Thompson, C. B. (2009, May 22). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809
- von Roemeling, C. A., Marlow, L. A., Wei, J. J., Cooper, S. J., Caulfield, T. R., Wu, K., . . . Copland, J. A. (2013, May 1). Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 19(9), 2368-2380. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3249
- Wang, J., Yu, L., Schmidt, R. E., Su, C., Huang, X., Gould, K. et Cao, G. (2005, Jul 08). Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(3), 735-742. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.013
- Warburg, O. (1956, Feb 24). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Warburg, O., Wind, F. et Negelein, E. (1927, Mar 7). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*, 8(6), 519-530.
- Weigelt, B., Peterse, J. L. et van 't Veer, L. J. (2005, Aug). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 5(8), 591-602. doi: 10.1038/nrc1670
- Weiger, M. C., Vedham, V., Stuelten, C. H., Shou, K., Herrera, M., Sato, M., . . . Parent, C. A. (2013). Real-time motion analysis reveals cell directionality as an

- indicator of breast cancer progression. *PLoS One*, 8(3), e58859. doi: 10.1371/journal.pone.0058859
- Weis, W. I. et Kobilka, B. K. (2018, Jun 20). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem*, 87, 897-919. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033910
- Wojciech, S., Ahmad, R., Belaid-Choucair, Z., Journe, A. S., Gallet, S., Dam, J., . . . Jockers, R. (2018, Mar 23). The orphan GPR50 receptor promotes constitutive TGFbeta receptor signaling and protects against cancer development. *Nat Commun*, 9(1), 1216. doi: 10.1038/s41467-018-03609-x
- Xue, C., Wyckoff, J., Liang, F., Sidani, M., Violini, S., Tsai, K. L., . . . Segall, J. E. (2006, Jan 1). Epidermal growth factor receptor overexpression results in increased tumor cell motility in vivo coordinately with enhanced intravasation and metastasis. *Cancer Res*, 66(1), 192-197. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1242
- Yersal, O. et Barutca, S. (2014, Aug 10). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 5(3), 412-424. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412
- Yoshida, K. et Soldati, T. (2006, Sep 15). Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci*, 119(Pt 18), 3833-3844. doi: 10.1242/jcs.03152
- Zajchowski, D. A., Bartholdi, M. F., Gong, Y., Webster, L., Liu, H. L., Munishkin, A., . . . Johnson, P. H. (2001, Jul 1). Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(13), 5168-5178.
- Zhang, Z., Sun, S., Kodumuru, V., Hou, D., Liu, S., Chakka, N., . . . Winther, M. D. (2013, Jan 24). Discovery of piperazin-1-ylpyridazine-based potent and selective stearyl-CoA desaturase-1 inhibitors for the treatment of obesity and metabolic syndrome. *J Med Chem*, 56(2), 568-583. doi: 10.1021/jm301661h
- Zhao, J. et Guan, J. L. (2009, Jun). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 35-49. doi: 10.1007/s10555-008-9165-4
- Zheng, Y., Rodrik, V., Toschi, A., Shi, M., Hui, L., Shen, Y. et Foster, D. A. (2006, Jun 9). Phospholipase D couples survival and migration signals in stress response

of human cancer cells. *J Biol Chem*, 281(23), 15862-15868. doi: 10.1074/jbc.M600660200

Zhou, H. et Huang, S. (2011, Feb). Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci*, 12(1), 30-42.

Zhou, M., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Liu, Z., Fodstad, O., . . . Tan, M. (2010, Feb 9). Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer*, 9, 33. doi: 10.1186/1476-4598-9-33

Zhu, Z. R., Agren, J., Mannisto, S., Pietinen, P., Eskelinen, M., Syrjanen, K. et Uusitupa, M. (1995). Fatty acid composition of breast adipose tissue in breast cancer patients and in patients with benign breast disease. *Nutr Cancer*, 24(2), 151-160. doi: 10.1080/01635589509514403

