



Université de Liège – Faculté de médecine

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

**ETUDE DU ROLE DE L'EGFR DANS LA
RÉGULATION DU MÉTABOLISME LIPIDIQUE DES
CELLULES DU CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF**

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme en

Master en Sciences Biomédicales

Florence BUNTINX

Promoteur : Dr. Nor Eddine Sounni

Membres du Jury :

Dr. Christophe Deroanne

Dr. Yvette Habraken

Dr. Olivier Peulen

Modérateur :

Dr. Rachelle Franzen

Année académique 2019-2020

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier les professeurs Agnès Noël et Didier Cataldo, responsables du Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (LBTD), de m'avoir accueilli et permis de réaliser mon mémoire au sein de leur laboratoire.

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, le Docteur Nor Eddine Sounni, pour son accueil au sein de son équipe, pour sa disponibilité et ses nombreux conseils qui ont permis l'élaboration de ce mémoire.

Je souhaite également remercier Géraldine Luis pour son suivi quotidien et son soutien dans la rédaction de mon mémoire.

Je voudrai remercier toute l'équipe du LBTD pour leur gentillesse et leur accueil. Je souhaite particulièrement remercier Laetitia pour sa patience, sa disponibilité et pour son accompagnement lors de mes manipulations. Je remercie également Anthony Genna pour son aide dans la rédaction de mon mémoire.

RESUME

Le cancer du sein triple négatif est un sous-type de cancer du sein, peu différencié, caractérisé par l'absence de récepteur aux oestrogènes, de récepteur à la progestérone et l'absence d'expression ou d'amplification de la protéine HER2. La mise en place d'un traitement représente un défi actuel à cause de l'hétérogénéité des TNBC et du manque de thérapie ciblée. Quelques marqueurs ont pu être identifiés dans le TNBC dont l'EGFR. Dans 50 à 70% des tumeurs TNBC, l'EGFR est exprimé et ceci constitue un mauvais pronostic. Cependant les inhibiteurs de l'EGFR ont un faible impact sur la survie globale des patientes. Les travaux de notre laboratoire ont montré que l'expression de SCD1 dans les cellules TNBC est associée à une prolifération, migration et croissance tumorale accrue chez la souris. De plus, un lien fut établi par l'étude de Zhang J. et al. entre l'EGFR et SCD1 dans le cancer du poumon. Au cours de ce travail, nous avons donc émis une hypothèse suggérant une régulation possible de SCD1 par EGFR dans les cellules TNBC. Nos résultats préliminaires *in vitro* ont identifié un lien entre EGFR et la régulation de SCD1 en normoxie, cependant les données *in vivo* montrent le contraire. Sachant que SCD1 est régulé par l'hypoxie, notre hypothèse de départ n'a pas pu être validée *in vivo*, ce qui exclut un rôle direct de EGFR dans la régulation de SCD1 dans les TNBC.

ABSTRACT

Triple negative breast cancer is a poorly differentiated subtype of breast cancer characterized by the absence of estrogen receptor, progesterone receptor and the absence of HER2 protein expression or amplification. Treatment initiation is a current challenge due to the heterogeneity of TNBC and the lack of targeted therapy. A few markers have been identified in TNBC, including EGFR. In 50-70% of TNBC tumours, EGFR is expressed and this is a poor prognosis. However, EGFR inhibitors have a small impact on overall survival. The work of our laboratory has shown that the expression of SCD1 in TNBC cells is associated with increased proliferation, migration and tumor growth in mice. In addition, an association was established by the study of Zhang J. et al. between EGFR and SCD1 in lung cancer. In the course of this work, we have therefore hypothesized a possible regulation of SCD1 by EGFR in TNBC cells. Our preliminary *in vitro* results identified a link between EGFR and the regulation of SCD1 in normoxia, however *in vivo* data show the opposite. Since SCD1 is regulated by hypoxia, our initial hypothesis could not be validated *in vivo*, which rules out a direct role of EGFR in the regulation of SCD1 in TNBC.

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ACC : Acétyl-coenzymeA carboxylase

AG : Acide gras

AGI : Acide gras insaturé

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGS : Acide gras saturé

B

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BL1 : Basal-like 1

BL2 : Basal-like 2

BLIA : Basal-like immune-activated

BLIS : Basal-like immune-suppressed

BRCA 1 : Breast Cancer 1

BRCA 2 : Breast Cancer 2

BTC : β -celluline

C

CDK : Cyclin-dependent kinase

D

DAB : 3, 3-Diaminobenzidine

DAG : Diacylglycérol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

E

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ER : Récepteur aux oestrogènes

F

FAS : Fatty Acid Synthase

FABP4 : Fatty Acid-Binding Protein 4

FBS : Fetal Bovin Serum

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

G

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

H

HB-EGF : Heparin-Binding EGF

HER2 : Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain

HIF- α : Hypoxia-inductible factor α

HRP : Horseradish peroxidase

HSC70 : Heat Shock Cognate 70

I

IHC : Immunohistochimie

IL-6 : Interleukine 6

IM : Immunomodulatory

IR : Récepteur à l'insuline

J

JAK : Janus Kinase

L

LAR : Luminal Androgen Receptor

M

M : Mesenchymal

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase

MSL : Mesenchymal stem like

N

NSCLC : Non-small-cell lung carcinoma

NST : carcinome invasif sans type particulier

P

PARP : Poly(ADP-ribose) polymerase

PD1 : Programmed cell death 1

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PDL1 : Programmed death-ligand 1

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PKC : Protein kinase C

PLC- γ : Phospholipase C- γ

PR : Récepteur à la progestérone

R

RB : Protéine du Retinoblastome

S

SCD1 : Stearoyl-coA Desaturase 1

siRNA : small interferent RNA

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SREBP-1 : Sterol regulatory element-binding proteins 1

STAT : Signal Transducer and Activators of Transcription

T

T-DM1 : Trastuzumab emtansine 1

TGF- α : Transforming Growth Factor α

TNBC : Cancer du sein triple négatif

TNF- α : Tumor necrosis factor α

V

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

W

WB : Western Blot

TABLE DES MATIERES

1. Introduction	1
1.1. Le cancer du sein	1
1.1.1. Généralités	1
1.1.2. Classification du cancer du sein	2
1.1.3. Traitements	5
1.2. Le cancer du sein triple négatif	7
1.2.1. Généralités	7
1.2.1.1. <i>Classification des TNBC</i>	8
1.2.1.2. <i>Traitements</i>	9
1.2.2. Marqueurs surexprimés dans le Cancer du Sein Triple Négatif (TNBC)	9
1.3. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	10
1.3.1. Généralités	10
1.3.2. Signalisation par l'EGFR	12
1.3.3. L'EGFR dans les cancers	13
1.3.4. L'EGFR et le métabolisme des lipides	15
1.3.4.1. <i>Généralités sur le métabolisme des lipides</i>	15
1.3.4.2. <i>SCD1</i>	16
1.3.4.3. <i>EGFR et métabolisme des lipides dans le cancer</i>	17
1.4. SCD1, EGFR et TNBC	20
1.5. L'obésité et le cancer du sein	21
1.5.1. Hormones du tissu adipeux et cancer du sein	23
1.5.1.1. <i>L'insuline</i>	23
1.5.1.2. <i>La leptine</i>	24
1.5.2. Obésité et SCD1	24
1.5.3. Régulation de SCD1	25
2. Objectif du travail	26
3. Matériels et Méthodes	27
3.1. Culture Cellulaire	27
3.2. Western Blot (WB)	27
3.2.1. Extraction et dosage des protéines	27
3.2.2. Préparation des échantillons	28
3.2.3. Préparation des gels	28
3.2.4. Migration	29
3.2.5. Transfert	29

3.2.6.	Immunodétection des protéines recherchées	30
3.2.7.	Contrôle de charge	31
3.3.	Transfection de SiRNA/EGFR dans les lignées cellulaires	32
3.3.1.	Ensemencement des cellules	32
3.3.2.	Préparation des SiRNA	32
3.3.3.	Transfection des SiEGFR	32
3.4.	Immunohistochimie ciblant EGFR et SCD1	33
3.4.1.	Fixation des tissus	33
3.4.2.	Inhibition des peroxydases endogènes	34
3.4.3.	Blocage des sites aspécifiques et perméabilisation	34
3.4.4.	Incubation en présence de l'anticorps primaire et secondaire	34
3.4.5.	Révélation à la DAB	35
3.4.6.	Quantification des marquages	36
3.4.7.	Analyses statistique	36
4.	Résultats	37
4.1.	Evaluation du niveau basal de l'EGFR total et de SCD1 dans les cellules du cancer du sein triple négative	37
4.2.	Transfection des cellules TNBC par des petits ARN interférents spécifiques contre l'EGFR	38
4.3.	Modulation de SCD1 par l'erlotinib sur les cellules TNBC	39
4.4.	Modulation de l'EGFR par inhibition de SCD1 dans les cellules TNBC	40
5.	Discussion et perspectives	42
5.1.	Evaluation du niveau basal de l'EGFR total et de SCD1 dans les cellules du cancer du sein triple négative	42
5.2.	Modulation de SCD1 par l'erlotinib sur les cellules TNBC	42
5.3.	Modulation de l'EGFR par inhibition de SCD1 sur les cellules TNBC	44
5.5.	Conclusions et perspectives	44
6.	Références	46

1. Introduction

1.1. Le cancer du sein

1.1.1. Généralités

Le cancer est l'une des premières causes de mortalité au monde. On énumère approximativement 9 millions de décès par an dans le monde [1]. Parmi l'ensemble des cancers, le cancer du sein est, actuellement, le deuxième cancer le plus répandu dans les pays développés après le cancer du poumon et devant le cancer du côlon. Il représente 25% des tumeurs malignes diagnostiquées chez la femme, ce qui en fait la tumeur la plus fréquemment rencontrée. On estime qu'une femme sur huit aura un cancer du sein au cours de sa vie, ce qui touche une proportion conséquente de la population féminine [1]. La FIGURE 1 montre l'incidence mondiale et le nombre de cas de cancers estimé dans le monde en 2018. Ainsi, près de 1.7 millions de personnes ont été diagnostiquées avec un cancer du sein. On comptabilise également plus d'un demi-million de décès dans la population mondiale. L'incidence mondiale du cancer du sein est en augmentation et est principalement due à l'augmentation du dépistage dans le monde mais aussi due aux changements de mode de vie dans les pays en développement. Cependant, la mortalité causée par le cancer du sein est en baisse dans les pays développés grâce au diagnostic précoce et aux nouvelles thérapies systémiques [2, 3]. La principale cause de mortalité du cancer du sein est le développement de métastases au niveau des os, des poumons, du foie ou encore de la peau [2]. En effet, pour un cancer non métastasé, sur 5 ans, les chances de survie sont de 98%, passant à 26% en présence de métastases [4].

L'identification des facteurs de risque est nécessaire à la mise en place de stratégies de prévention et de dépistage. Parmi les facteurs de risques, on retrouve deux facteurs particulièrement importants : l'âge et le sexe. Le cancer du sein touche essentiellement les femmes mais peut également toucher les hommes. L'incidence du cancer du sein augmente avec l'âge. Bien qu'il soit fréquent d'observer une tumeur mammaire métastatique chez les femmes pré-ménopausées, les femmes ménopausées, prenant un traitement hormonal ou non, sont plus à risque de développer un cancer du sein. D'autres facteurs de risques sont également à prendre en compte tels que l'obésité, le statut tabagique, la prise de traitements hormonaux ou non... [5] De plus, des études épidémiologiques indiquent que, ne pas avoir d'enfants ou avoir eu une grossesse tardive pourraient augmenter le risque de développer un cancer du sein [6].

Enfin, il existe également des prédispositions génétiques qui favorisent la survenue du cancer du sein. La majorité des variants génétiques existants ne sont pas associés à des risques élevés. Cependant, il existe des gènes qui sont à haut risque de provoquer un cancer du sein. En effet, environ 5% des cancers du sein diagnostiqués sont liés à une hérédité en raison d'une mutation sur le gène *Breast cancer 1* (BRCA1) ou *Breast cancer 2* (BRCA2). BRCA1 est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules mammaires [7, 8]. Ce gène induit l'expression de la protéine BRCA 1 qui est impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN et le maintien de son intégrité. BRCA2 est également un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la réplication de l'ADN. Les mutations des gènes BRCA retrouvées dans les cancers du sein sont à l'origine d'une croissance cellulaire exagérée et non contrôlée ainsi qu'une altération des mécanismes de réparation de l'ADN. Il est à noter que les femmes qui présentent une mutation d'un gène suppresseur de tumeur telle que BRCA 1 ou 2 ont 70% de risque supplémentaire de développer un cancer du sein invasif [8].

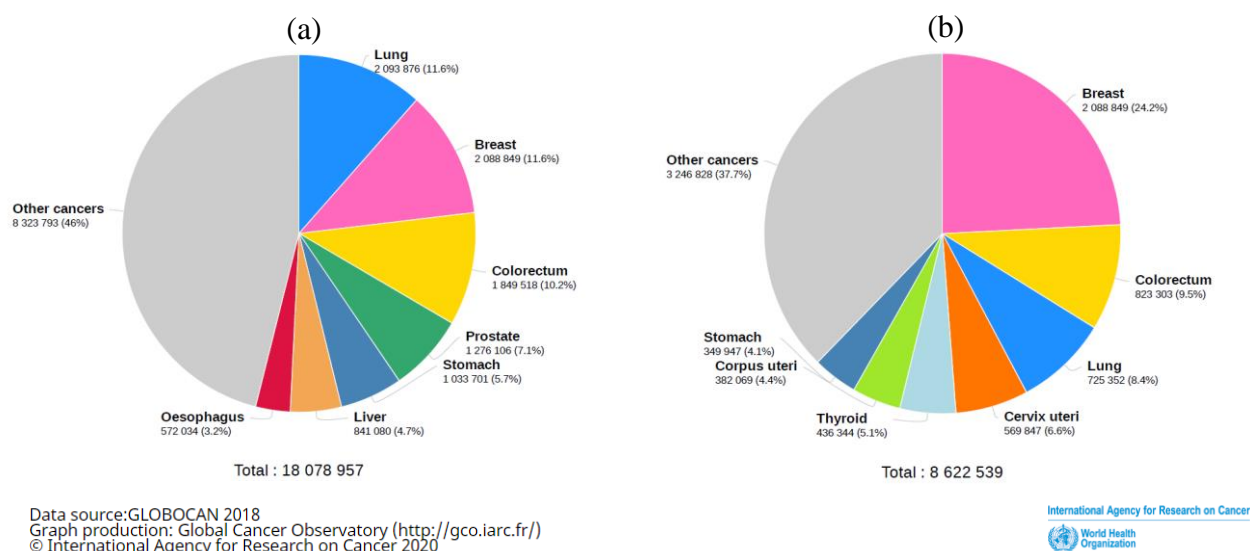


FIGURE 1 - (a) Incidence mondiale des cancers chez l'homme et la femme. (b) Incidence mondiale des cancers chez la femme. Graphique obtenu sur le site de l'Organisation mondiale de la santé. Figure provenant du site Global Cancer Observatory.

1.1.2. Classification du cancer du sein

Le cancer du sein est une tumeur maligne qui s'est premièrement développée dans les cellules du sein et qui pourrait ensuite former des métastases à distance. Les cellules provoquant fréquemment le développement du cancer sont les cellules glandulaires (sécrétant le lait) et les cellules canalaire (drainant le lait des lobules vers le mamelon). Cependant, une petite proportion des cancers du sein provient du tissu adipeux ou fibreux [9].

Afin de déterminer le meilleur traitement et le meilleur suivi, les pathologistes renseignent les informations suivantes : le statut des nodules, la taille de la tumeur, le type histologique et le statut des tests immunohistochimiques des récepteurs hormonaux. Grâce à la combinaison de ces différents paramètres, les tumeurs des patientes peuvent être classées dans différents sous-types [10]. Ces différents facteurs permettent de guider la prise de décisions et la sélection du traitement adapté. La prise en charge dépend donc de la disponibilité des facteurs pronostiques, prédictifs et pathologiques [11].

La première identification de tumeur mammaire se fait selon l'histologie. Deux catégories histologiques ont été identifiées : la première reprend les carcinomes dits *in situ* parmi lesquels se distinguent les carcinomes canauxiaux *in situ* et les carcinomes lobulaires *in situ*. Les carcinomes *in situ* sont principalement confinés au niveau de l'épithélium du sein. La deuxième catégorie histologique comprend les carcinomes invasifs. Ce sont des tumeurs mammaires qui infiltrant le tissu conjonctif du sein et qui ont un haut potentiel métastatique. Dans le but d'améliorer la compréhension des carcinomes invasifs, ceux-ci ont été subdivisés en différents sous-types histologiques [12]. Cette classification repose sur la morphologie des cellules présentes au sein du carcinome. Elle repose également sur la vitesse de croissance et le degré de différenciation des cellules par rapport au tissu normal. La classification des sous-types du carcinome invasif reprend principalement : le carcinome canalaire invasif, le carcinome lobulaire invasif, la forme mixte incluant les deux types cellulaires ou encore des sous-types plus rares tels que le carcinome tubulaire, le carcinome médullaire [13]. Le carcinome canalaire invasif, récemment renommé carcinome invasif sans type particulier (NST), est le sous-type le plus fréquemment rencontré. Il représente 40 à 75% des cas de carcinomes invasifs. Les autres sous-types sont morphologiquement distincts du carcinome canalaire invasif [11].

Une deuxième classification repose sur la méthode de Bloom et Richardson, réévalué par Elston et Ellis [14, 15]. La modification apportée par Elston et Ellis permet une meilleure reproductibilité du classement des carcinomes mammaires invasifs [16]. Ce système a pour objectif de classer les carcinomes selon leur type histologique. Ainsi, des scores sont attribués suivant 3 critères histologiques. Le premier critère correspond au pléomorphisme nucléaire c'est-à-dire la variabilité de la taille, de la forme et de la coloration du noyau. Le deuxième critère se base sur le nombre de mitoses observées au sein du tissu. Le troisième critère repose sur l'architecture cellulaire et plus précisément sur la proportion de formation des tubules. Pour chaque critère, un score de 1 à 3 est établi où 3 représente : un degré élevé de pléomorphisme, un nombre élevé de cellules en mitose et une mauvaise formation des tubules. L'ensemble des

scores de ces 3 critères permet donc d'établir un score final pour chaque tumeur [13]. Ainsi, le score final permet de classer les tumeurs mammaires en 3 grades histologiques : les tumeurs de grade 1 sont les plus différenciées et les moins agressives tandis que les tumeurs de grade 3 sont les moins différenciées et les plus agressives. Le grade 2 est évalué comme un grade intermédiaire [11, 17]. Il existe une association étroite entre le grade histologique et la survie des patientes. Les cancers de grade 3 ont tendance à récidiver et à former des métastases relativement tôt. Ces tumeurs de grade 3 augmentent fortement le risque de décès. Les cancers de grade 1 ont plutôt tendance à avoir un bon pronostic après la prise en charge avec un faible risque de récidives et de décès. Concernant les tumeurs de grade 2, le pronostic reste variable au début du suivi mais les patientes atteintes de tumeur de stade 2 ont tendance à récidiver sur le long terme. Trente à soixante pourcent des carcinomes invasifs sont des tumeurs de grade 2. C'est pourquoi il est nécessaire de subdiviser le grade 2 afin d'évaluer le pronostic de la tumeur [11, 16].

C'est ainsi qu'une troisième classification a été mise en place pour pallier aux lacunes de la classification histologique. Celle-ci est basée sur des tests immunohistochimiques et a été établie selon l'expression de 3 biomarqueurs cellulaires : le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2). Ainsi, trois classes de cancers du sein ont été définies : (1) les cancers hormonosensibles c'est-à-dire positifs pour les récepteurs ER et/ou PR, (2) les cancers HER2 positifs, (3) les cancers du sein triple-négatifs (TNBC) dans lesquels les 3 biomarqueurs ne sont pas exprimés [18, 19].

Afin de peaufiner la classification basée sur les marqueurs cellulaires, des méthodes de profilage d'expression génique basées sur l'utilisation de puces d'ADN complémentaires ont permis de compléter la classification immunohistochimique [9, 20, 21]. Cinq sous-types intrinsèques majeurs ont été identifiés grâce aux signatures moléculaires : (1) Luminal A, (2) Luminal B, (3) HER2 positif, (4) de type basal ("Basal-like") et (5) de type normal ("Normal-like") [10] [19]. Un dernier sous-type moléculaire intrinsèque a également été identifié et a été appelé "Claudin-low". Ce sous-type est caractérisé par une faible expression génique des protéines claudines (appartenant aux jonctions serrées) [22]. Les différentes classifications du cancer du sein, ainsi que les différents biomarqueurs exprimés sont repris FIGURE 2.

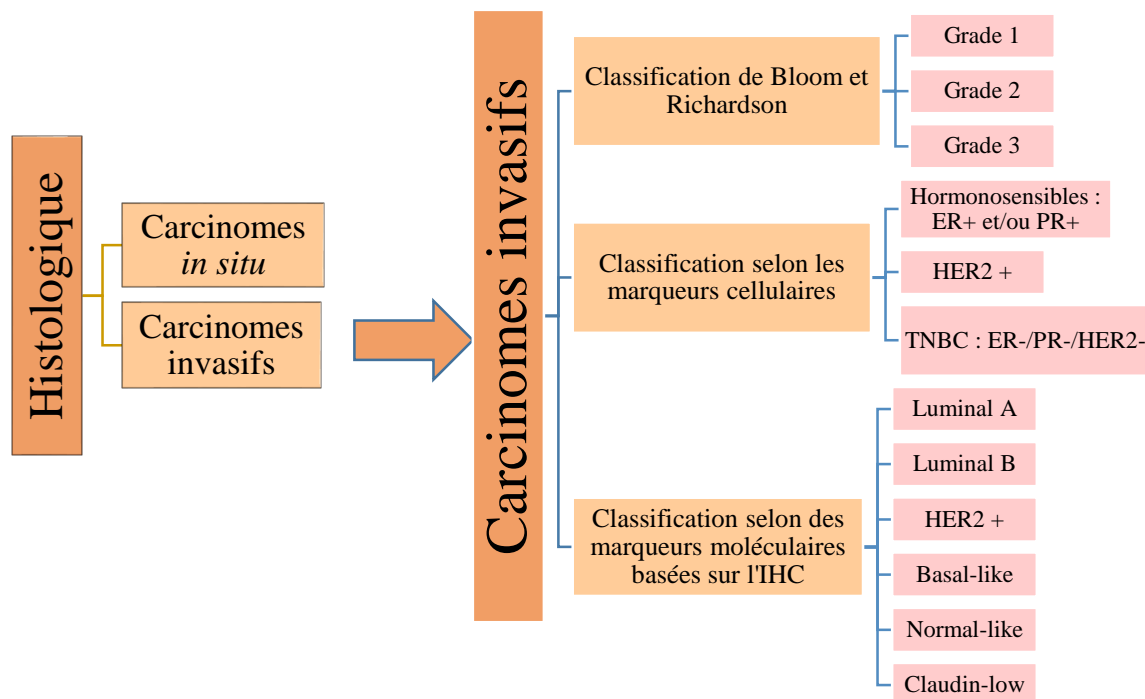


FIGURE 2 - Classification générale du cancer du sein. La classification histologique distingue les carcinomes *in situ* des carcinomes invasifs. Parmi les carcinomes invasifs, trois grandes classifications ont été définies. Une première basée sur l'aspect histologique de la tumeur (Classification de Bloom et de Richardson). Une deuxième basée sur les marqueurs cellulaires (Classification selon les marqueurs cellulaires) et une troisième basées sur des marqueurs moléculaires (Classification des sous-types basés sur l'immunohistochimie) [10, 12, 17, 18, 19].

1.1.3. Traitements

La classification des tumeurs mammaires a permis une meilleure prise en charge des patientes. Les traitements actuels dépendent principalement des caractéristiques de la tumeur comme le type de la tumeur, la présence de récepteurs hormonaux à la surface des cellules ou encore la présence de métastases. La mise en place du traitement nécessite une coordination entre plusieurs disciplines comme la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et les traitements ciblés [23]. Le taux de réponse de ces traitements sur les tumeurs primaires sont compris entre 60 et 80% tandis qu'il s'approche de 50% pour les tumeurs métastatiques [24, 25]. Cependant, le taux de récurrence dans les 5 ans est compris entre 20 et 70% [26]. La résistance aux traitements représente la première cause de rechute et augmente le risque de mortalité précoce [27]. Les traitements actuels reposent sur la présence ou l'absence des différents biomarqueurs mais dépendent également du sous-type identifié.

Le but des traitements dirigés contre les cancers non métastatiques est d'éradiquer la tumeur primaire. L'un des objectifs de la thérapie est d'éviter toute récurrence. Deux thérapies sont

envisagées pour les tumeurs non métastatiques : une thérapie locale et une thérapie systémique. Les thérapies systémiques adjuvantes comprenant la chimiothérapie, les traitements ciblés et les traitements endocriniens permettent une amélioration de la thérapie locale [23]. Celle-ci consiste à une ablation de la tumeur par chirurgie ainsi qu'un prélèvement ou une ablation des ganglions lymphatiques axillaires. La thérapie systémique dépend quant à elle du sous-type de cancer et se distingue en deux sous-groupes dépendant du moment d'admission. On retrouve les traitements préopératoires, appelés néo-adjuvant, et les traitements postopératoires, appelé adjuvant [28].

La FIGURE 3 présente les différentes thérapies systémiques indiquées pour chaque sous-type de cancers. Les cancers hormonosensibles sont principalement traités par thérapie endocrinienne qui maîtrise la croissance tumorale, favorisée par les œstrogènes. Les médicaments anti-œstrogéniques sont administrés en fonction du statut ménopausique de la patiente. Deux traitements sont principalement utilisés : le tamoxifène et l'inhibiteur de l'aromatase. Le tamoxifène inhibe par compétition la liaison des œstrogènes aux récepteurs tandis que l'inhibiteur de l'aromatase diminue la production des œstrogènes circulantes en inhibant la conversion des androgènes en œstrogènes [28, 29]. Le tamoxifène est préférentiellement administré aux femmes pré-ménopausées. Le tamoxifène est administré pendant une durée de 5 ans, ce qui permet de réduire le taux de récurrence au cours des 5 premières années par rapport à l'absence de traitement endocrinien [30]. Quant à l'inhibiteur de l'aromatase, il est principalement administré, pendant 5 ans, chez les femmes post-ménopausées (y compris les femmes ménopausées par suppression ovarienne). L'inhibiteur de l'aromatase est plus efficace que le tamoxifène en ce qui concerne le taux de récurrence. Ce traitement peut être administré à la suite d'un traitement au tamoxifène [31]. De plus, considérée comme essentielle pour prévenir la récurrence, la chimiothérapie est ajoutée à ces traitements. Elle reste essentielle et constitue un complément important chez les patientes [29, 31].

Concernant les cancers de type HER2 positif, le trastuzumab est largement préconisé au vu de sa grande efficacité sur la croissance tumorale. Le trastuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre un domaine extracellulaire de HER2 et qui bloque l'activité de cette protéine. Afin d'améliorer le taux de survie et d'éviter la récurrence, le trastuzumab est également utilisé en association avec une chimiothérapie [28, 32]. Cependant, lorsqu'une résistance au trastuzumab se développe, d'autres inhibiteurs de HER2 sont utilisés tels que le trastuzumab emtansine (T-DM1), le lapatinib, neratinib ou encore le pertuzumab [33, 34, 35].

Le cancer triple négatif est un cancer très hétérogène pour lequel il existe peu de thérapies spécifiques. Les traitements actuels restent peu efficaces et la chimiothérapie est toujours le seul traitement proposé. Le cancer du sein triple négatif, sujet de ce travail, sera abordé plus en détails par la suite.

Enfin, les thérapies utilisées dans le cas des cancers métastatiques ont pour but de prolonger la survie des patientes en raison du manque de traitements efficaces. Les traitements mis en place sont principalement administrés en tant que soin palliatif. Ceux-ci sont identiques à ceux présentés dans le cadre des cancers non métastatiques. Malheureusement, ce type de cancer reste incurable pour la majorité des patientes touchées [28, 36].

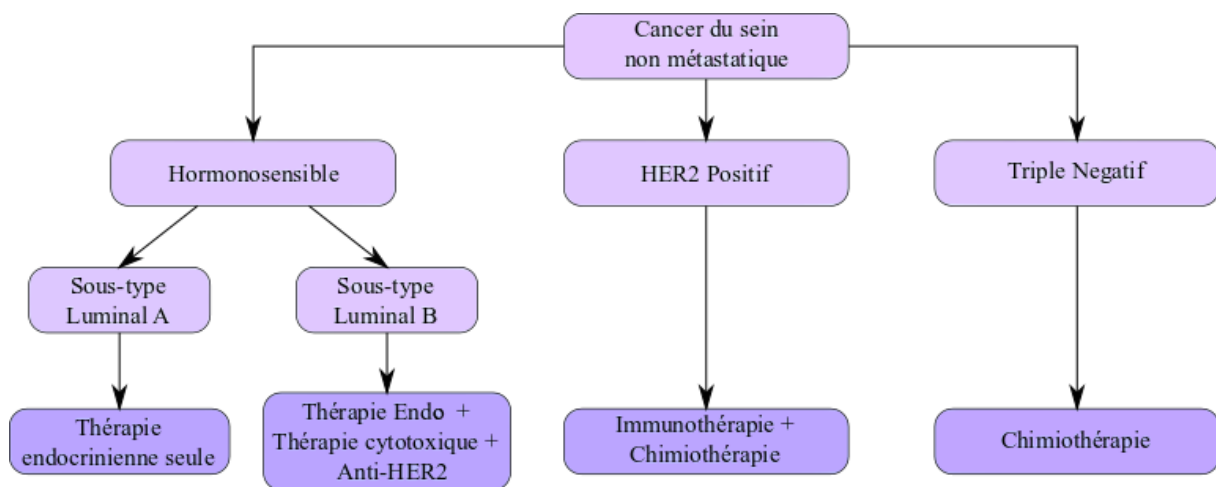


FIGURE 3 - Les différentes stratégies de traitements pour chaque sous-type de cancers.

1.2. Le cancer du sein triple négatif

1.2.1. Généralités

Le TNBC est un type de cancer du sein hétérogène et relativement peu différencié. Il est caractérisé par l'absence des récepteurs aux œstrogènes, des récepteurs à la progestérone et par l'absence d'expression ou d'amplification de la protéine HER2. Les TNBC représentent 12 à 17% des carcinomes du sein et touchent principalement les femmes plus jeunes. Le TNBC est associé à un pronostic défavorable, par rapport aux cancers du sein hormonosensibles, en raison de leur agressivité et de leur taux de prolifération élevé [37, 38]. Les tumeurs TNBC sont souvent de plus grandes tailles lors du diagnostic. De plus, le taux de récurrence locale est élevé avec une apparition précoce des métastases chez ces patientes. Dès lors, ils ont un potentiel métastatique plus important. Le taux de survie associé est plus faible en comparaison aux autres types. De plus, la majorité des tumeurs TNBC sont de grades histologiques supérieurs. En

s'intéressant à la génétique, les tumeurs triple négatives sont régulièrement associées aux mutations BRCA1 et en moindre mesure aux mutations BRCA2 [10]. Septante-cinq pourcent des femmes présentant une mutation au BRCA1 ont un TNBC, un "basal-like" ou bien les deux [39].

1.2.1.1. Classification des TNBC

L'hétérogénéité des TNBC et le manque de thérapie ciblée représente un problème majeur pour la mise en place d'un traitement de précision. C'est pourquoi, il est intéressant d'établir une classification des différents sous-types du TNBC afin d'optimiser la prise en charge des patientes [38]. Si l'on se réfère à la classification selon les sous-types moléculaires intrinsèque (basées sur l'immunohistochimie), le TNBC peut être classé dans la catégorie "basal-like". En effet, la majorité des TNBC (70 à 80%) appartiennent au sous-type "basal-like". De plus, la majorité des sous-types "basal-like" font partie des TNBC. Le sous-type "basal-like" est caractérisé par une absence ou un faible niveau des ER et une absence de surexpression de la protéine HER2. Cependant, tous les TNBC ne sont pas des tumeurs "basal-like" de par la présence d'autres signatures moléculaires. L'inverse est également vrai car 18 à 40% des sous-types basal ne présentent pas les caractéristiques du TNBC [39]. De nouveaux sous-types intrinsèque ont été mis en évidence comme le "claudin-low" parmi lesquels certains triple négatifs peuvent y être classés.

Une première classification des TNBC a été proposée et s'est basée sur l'identification de molécules exprimées dans ces cancers [40]. Dans un premier temps, 6 sous-types de TNBC ont été identifiés au moyen de l'analyse de l'expression des gènes. Chaque sous-type présentait une biologie unique : "Basal-like 1" (BL1), "Basal-like 2" (BL2), "Immunomodulatory" (IM), "Mesenchymal" (M), "Mesenchymal-stem-like" (MSL) et "Luminal androgen receptor" (LAR) [40]. A la suite de cette classification, un sous-type supplémentaire a complété la classification existante : "Unstable" [41].

Par la suite, l'analyse de l'expression d'ARN et d'ADN a permis d'obtenir une classification cliniquement pertinente. Les TNBC ont été classés en fonction de leurs caractéristiques moléculaires et 4 sous-types stables ont été identifiés : "Basal-like immun-suppressed" (BLIS), "Basal-like immun-activated" (BLIA), "Luminal androgen receptor" (LAR) et "Mesenchymal" [42]. Il est important de noter que le pronostic clinique de chacun des 4 sous-types varie. Le BLIS affiche le pire résultat en terme de pronostic tandis que le BLIA présente le meilleur [43]. La classification de *Burstein et al.* a été affinée grâce à une analyse des transcrits provenant de

lymphocytes infiltrants. Ainsi la nouvelle classification prend en compte la présence de cellules stromales et immunitaires normales dans l'environnement tumoral [44, 45].

1.2.1.2. Traitements

A l'heure actuelle, la chimiothérapie et la chirurgie reste les seules thérapies proposées pour la majorité des tumeurs triples négatives. En effet, l'absence de molécules exprimées et spécifiques de ces tumeurs rend le traitement difficile [45]. Il n'existe pas de thérapies ciblées et approuvées pour le TNBC. Néanmoins, des recherches approfondies sont en cours pour tenter d'identifier des cibles spécifiques et potentiellement utiles pour un traitement plus efficace. Plusieurs études se sont penchées sur les récepteurs tyrosine-kinase tel que l'« Epidermal Growth Factor Receptor » (EGFR), le « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor » (VEGFR), le Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) ou encore le Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR). D'autres études se sont également intéressées aux molécules comme la Poly ADP-ribose polymérase (PARP) mais aussi à des voies de signalisation comme la voie PI3K-Akt-mTOR [46]. D'autres recherches se sont également penchées sur des molécules impliquées dans le contrôle immunitaire tel que la protéine « Programmed cell death 1 » (PD1) et son ligand « Programmed death-ligand 1 » (PD-L1) [47].

Plusieurs inhibiteurs des cibles moléculaires ont été testés mais actuellement aucun traitement ne s'est avéré efficace. Certains résultats sont prometteurs et la classification des différents sous-types de TNBC aide à diriger les recherches vers des cibles thérapeutiques potentielles. L'analyse de l'ADN a permis une identification de certains gènes amplifiés dans les différents sous-types de TNBC. Cela rendrait une possibilité de classement selon l'expression de molécule et non plus sur l'absence de biomarqueurs dans ces tumeurs. La grande hétérogénéité des TNBC constitue un frein important dans l'efficacité des traitements [48]. C'est pourquoi, il est essentiel d'identifier des marqueurs exprimés dans le TNBC et qui pourront servir de cibles potentiels dans le TNBC.

1.2.2. Marqueurs surexprimés dans le Cancer du Sein Triple Négatif (TNBC)

Actuellement, quelques marqueurs ont pu être identifiés dans le TNBC pour améliorer la prise en charge des patientes en terme de pronostic et de traitements. Ainsi, 50 à 70% des tumeurs TNBC expriment l'EGFR et ceci constitue un mauvais pronostic pour les patientes. Etant donné le faible impact des inhibiteurs de l'EGFR sur la survie globale des patientes, des recherches se sont axées sur des alternatives telles que les enzymes lipogéniques. Parmi les

enzymes lipogéniques, la « Fatty Acid Synthase » (FAS) a fait l'objet d'un intérêt particulier car elle est impliquée dans la synthèse *de novo* des lipides. La FAS n'est pas exprimé dans les tissus normaux hormis les tissus lipogéniques où son expression est régulée par l'alimentation [49]. Ainsi, la FAS a été identifiée comme un biomarqueur et une cible potentielle dans plusieurs carcinomes y compris dans le carcinome du sein [49, 50]. Son expression est élevée dans le cancer et son blocage induit l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans les tumeurs TNBC, la FAS a une expression globalement plus élevée dans 45% des tumeurs humaines. Une différence a pu être mise en évidence entre les classifications Basal-like et mesenchymal-like. L'expression de la FAS est plus élevée dans les cas Basal-like que dans les cas mesenchymal-like. De plus, l'expression élevée de la FAS est significativement associée à un statut ganglionnaire positif, marqueur le plus puissant pour prédire les rechutes [49, 51, 52].

D'autres marqueurs impliqués dans le métabolisme des lipides ont également été mis en évidence dans le TNBC. L'expression positive de la « Fatty acid-binding protein 4 » (FABP4) est également associée à une survie plus courte [53].

Pour finir sur les marqueurs du TNBC, le facteur « Hypoxia-inductible factor α » (HIF- α) joue un rôle important dans le TNBC. Au sein de la tumeur, les cellules cancéreuses peuvent se retrouver en hypoxie et expriment le facteur HIF- α . Cependant, il a été démontré que HIF- α est également exprimé en condition normoxique ce qui en fait un marqueur potentiel dans le TNBC [54]. Son expression élevée est un mauvais résultat clinique et est associée à un mauvais pronostic dans les cas de cancer du sein [55]. L'HIF serait impliqué dans la reprogrammation métabolique des TNBC [56].

1.3. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

1.3.1. Généralités

Le récepteur de l'« Epidermal Growth Factor » (EGFR) est un récepteur tyrosine kinase. Ses fonctions sont importantes pour la physiologie des cellules épithéliales. Il stimule la prolifération, la différenciation et la motilité des cellules épithéliales, ce qui permet d'assurer la croissance épithéliale et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium [57]. En condition pathologique, il représente un élément clé dans la tumorigenèse de tumeurs du poumon, du sein ou encore du glioblastome [58]. L'EGFR appartient à la famille des ErbB, constituée de 4 récepteurs transmembranaires : (1) EGFR/ErbB1, (2) ErbB2/HER2/Neu, (3) ErbB3/HER3 et (4) ErbB4/HER4. Les récepteurs de cette famille contiennent tous un domaine extracellulaire

sur lequel peut venir se fixer un ligand, un domaine transmembranaire ancrée dans la membrane plasmique et un domaine intracellulaire. Celui-ci contient un segment responsable de l'activité kinase du récepteur (FIGURE 4).

En plus des récepteurs liés à la membrane, des formes solubles des ErbB sont retrouvées et n'ont ni domaine transmembranaire ni domaine intracellulaire. Il est probable que ces formes solubles proviennent de l'épissage alternatif de l'ARN messager de l'EGFR. Ces formes solubles peuvent également provenir d'un clivage des récepteurs à la surface cellulaire ou bien de la combinaison de l'épissage alternatif et du clivage. En ce qui concerne l'EGFR, les deux voies sont responsables de la formation des formes solubles. Ces formes solubles auraient potentiellement un intérêt en tant que biomarqueur diagnostique mais ne font pas l'objet de ce travail [59, 60].

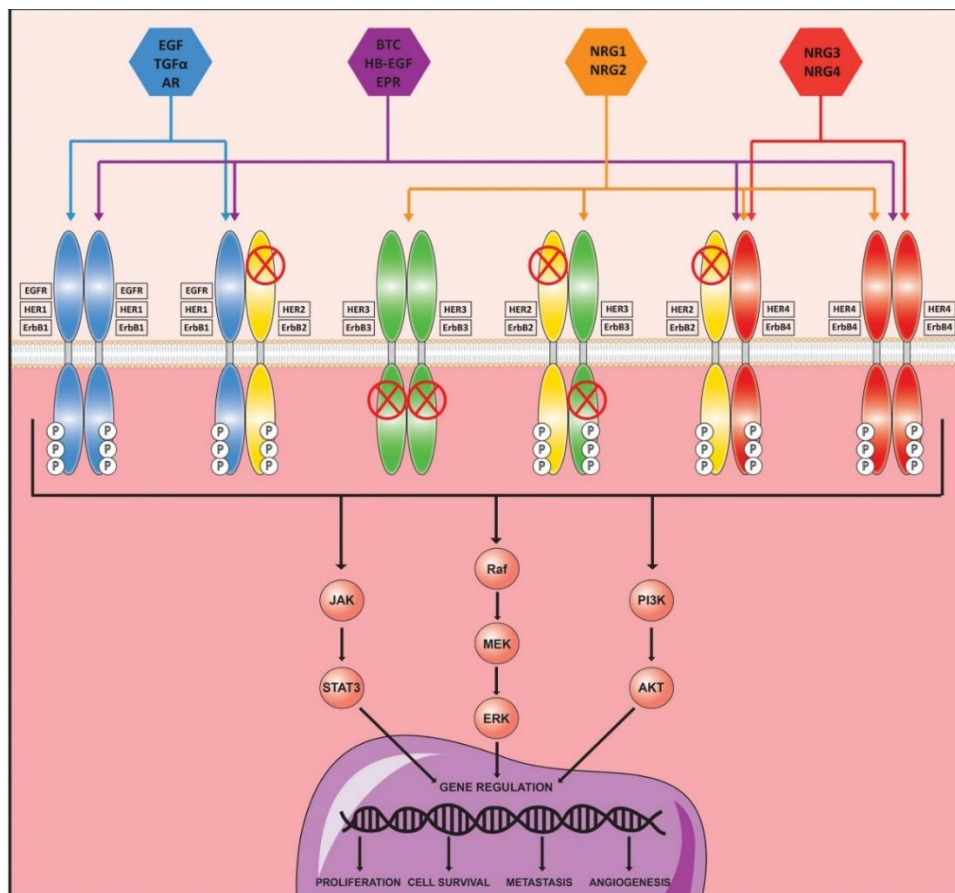


FIGURE 4 - Famille ErbB des récepteurs tyrosines kinases. La famille comprend 4 récepteurs : EGFR/HER1/ErbB1 (bleu), HER2/ErbB2 (jaune), HER3/ErbB3 (vert), HER4/ErbB4 (rouge). Les récepteurs de cette famille ont tous un domaine extracellulaire sur lequel le ligand peut venir se fixer, une région transmembranaire, un domaine tyrosine kinase. Il est intéressant de noter que ErbB3 (vert) ne possède pas d'activité tyrosine kinase. Image reprise dans l'article de Pellat, A., Vaquero, J. et al. [61].

1.3.2. Signalisation par l'EGFR

L'activation de la voie de signalisation peut se faire de façon dépendante ou indépendante d'un ligand [58]. Plusieurs ligands de l'EGFR existent et peuvent réguler la signalisation de manière différente. Parmi les ligands, on retrouve : l'« Epidermal Growth Factor » (EGF), le « Transforming Growth Factor alpha » (TGF- α), l'« Heparin-Binding EGF » (HB-EGF), la β -celluline (BTC), l'amphiréguline, l'épiréguline et l'épigène [59]. La signalisation induite par ces différents ligands varie et a un impact différent sur le devenir du récepteur mais également sur la progression du cancer.

La liaison du ligand à l'EGFR induit une dimérisation du récepteur et une autophosphorylation des tyrosines de la queue C-terminale en intracellulaire [59]. Dans le cas de l'EGFR, la dimérisation est asymétrique c'est-à-dire que le ligand se fixe sur un des deux bras du récepteur dimérisé. La dimérisation peut se faire avec un autre EGFR (homodimérisation) ou bien avec un autre récepteur de la famille des ErbB (hétérodimérisation). L'autophosphorylation des résidus tyrosine intracellulaires permet l'internalisation du ligand fixé au récepteur [59, 60]. Le complexe est internalisé par endocytose qui peut avoir lieu via deux voies: une dépendante des clathrines et l'autre non [58]. Ainsi, le ligand détermine le devenir du récepteur internalisé. Le complexe récepteur-ligand peut être recyclé au niveau de la membrane cellulaire mais peut également fusionner avec le lysosome dans lequel le complexe sera dégradé. Cette voie est empruntée quand le ligand est l'EGF. En revanche, la voie de recyclage est privilégiée dans le cas où le ligand est le TGF- α [62].

L'activité du complexe démarre dès l'autophosphorylation des tyrosines. Une cascade de voies en découle et les effets associés dépendent du ligand. Parmi les voies principales, on retrouve : (1) la voie PI3K/Akt ; (2) la voie Ras/Raf/MAPK ; (3) la voie PLC- γ ; (4) la voie STAT. Les différentes cascades de signalisation permettent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration cellulaire ou encore des activités anti-apoptotiques (FIGURE 5). Dans le cadre pathologique, ces voies de signalisation peuvent donner un avantage conséquent à la tumeur en favorisant la survie tumorale, l'invasion, angiogenèse et/ou le développement des métastases [59, 60].

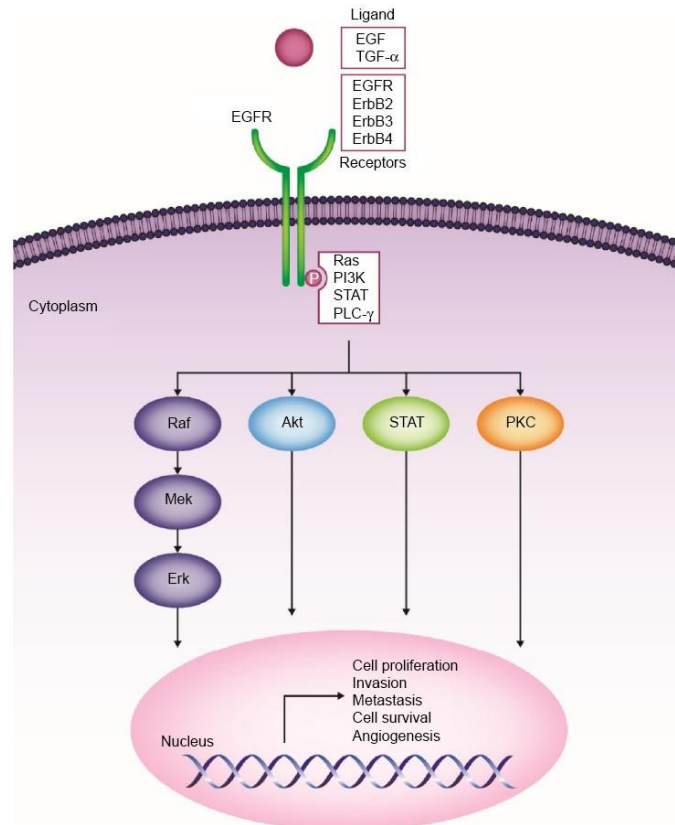


FIGURE 5 - Les différentes voies de signalisation découlant de l'activation des récepteurs de la famille ErbB et les effets sur l'expression génique. Akt: Protéine kinase B; EGF: Epidermal growth factor; Erk: extracellular signal-related kinase; Mek. Image provenant de l'article de Sacco A. et al. [60].

1.3.3. L'EGFR dans les cancers

Les récepteurs EGFR sont exprimés à la surface des cellules normales et sont étudiés dans le but de s'en servir comme cible thérapeutique anticancéreuse. En effet, les EGFR sont exprimés anormalement dans de nombreuses tumeurs épithéliales. L'EGFR est également un élément clé dans les tumeurs malignes et favorise leur survie [63, 64].

En condition normale, l'activation de l'EGFR conduit à la prolifération, différenciation, migration et adhésion cellulaire. De plus, il est impliqué dans la régulation de l'apoptose [65]. Ces mécanismes sont souvent dérégulés dans les cellules tumorales. Ce dérèglement est particulièrement retrouvé dans le cancer du cou, sein, rein, foie, vessie, colon ou encore le poumon [64, 66, 67].

Dans le cancer, les récepteurs mutés ou altérés peuvent devenir de véritables oncogènes qui conduisent à une transformation cellulaire. L'activation des récepteurs recrute et phosphoryle plusieurs substrats intracellulaires dirigeant vers des voies mitogènes ou autres activités

favorisant la formation tumorale. Plusieurs mécanismes sont responsables de l'activité aberrante du récepteur EGFR : (1) la surexpression des récepteurs, (2) l'amplification génique, (3) une mutation activatrice qui verrouille le récepteur dans un état d'activation perpétuelle, (4) la surexpression des ligands et/ou (5) la perte des mécanismes de régulation négative [68]. Ces différents mécanismes sont spécifiques à chaque tumeur rencontrée. Par exemple, la surexpression du récepteur EGFR est présente dans de nombreuses tumeurs solides dans lesquelles plus de 40% des cellules expriment l'EGFR. La surexpression peut être liée à l'amplification des copies des gènes de l'EGFR. Cette amplification est particulièrement observée dans certains cancers tels que le carcinome pulmonaire non à petites cellules (NSCLC), le cancer du sein ou encore le glioblastome [65].

La surexpression de l'EGFR est également associée à l'agressivité tumorale. Cette agressivité est fréquemment rencontrée dans les TNBC. Cinquante pourcent des cas de TNBC montrent une surexpression de l'EGFR et est prédicteur de mauvais pronostic. L'amplification génique de l'EGFR est retrouvée dans 6% des cas de cancer du sein [69]. Ainsi, l'EGFR constitue une cible particulièrement intéressante dans la thérapie anti-cancéreuse. De nombreux traitements ont été développés dans le but de cibler l'EGFR. Les premiers traitements utilisés pour cibler EGFR sont les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase. Ces inhibiteurs ciblent la partie intracellulaire du récepteur et font partie d'une famille de petites molécules qui rentrent en compétition avec l'ATP sur le site catalytique de la kinase. Cette liaison empêche l'autophosphorylation du récepteur et donc la signalisation qui en découle. Parmi ces inhibiteurs, les molécules les plus utilisées dans les essais cliniques sont : (1) Erlotinib, (2) Géfitinib, (3) Lapatinib. Les deux premiers inhibiteurs sont réversibles et sont relativement efficaces pour des tumeurs avec une mutation activant EGFR. Cependant, une résistance en découle souvent à cause d'une mutation secondaire du récepteur [65, 69]. Le lapatinib est un double inhibiteur qui cible les domaines d'EGFR et de HER2. Cette molécule a été approuvée pour le sous-type HER 2 mais n'est pas efficace pour le TNBC [70].

Une autre stratégie de traitements a été d'utiliser des anticorps monoclonaux spécifiques de l'EGFR. Parmi ces traitements, le cetuximab et le panitumumab ont été mis en avant et utilisés dans des études cliniques [71]. Il s'est avéré qu'ils étaient efficaces pour inhiber l'activité de l'EGFR en se liant au récepteur, empêchant la liaison des ligands. Malgré l'efficacité sur l'activité tyrosine kinase du récepteur, les différents médicaments ont peu d'effets sur les tumeurs solides. Le seul cancer pour lequel ces médicaments sont efficaces est le cancer du

poumon non à petites cellules c'ad un type de cancer possédant des mutations activatrices du récepteur [58, 72].

Cependant, ces traitements s'avèrent être peu efficaces dans les TNBC. Même en présence de l'inhibiteur de l'EGFR, une activation du récepteur est toujours détectée. Cette phosphorylation constante est étroitement corrélée à la résistance aux traitements inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase [73].

Dès lors, la question se pose de savoir si une voie ne dépendant pas de l'activité tyrosine kinase et de la liaison du ligand au récepteur pourrait être la cause de la résistance au traitement. De plus, un lien fut établi entre l'EGFR et le métabolisme des lipides au sein du cancer du poumon [74]. C'est pourquoi, le métabolisme des lipides attire l'attention en vue de l'implication de l'EGFR dans la signalisation conduisant à la régulation des enzymes impliquées dans la voie des acides gras, éléments essentiels à la prolifération et à la migration des cellules cancéreuses.

1.3.4. L'EGFR et le métabolisme des lipides

1.3.4.1. Généralités sur le métabolisme des lipides

Les lipides sont des composants essentiels pour les cellules. Les acides gras (AG) font partie des lipides et sont à la base de la formation des lipides dits complexes : les phospholipides, les triglycérides ou encore les esters de cholestérol [75]. Ces AG sont des éléments de structure essentiels pour la formation de la membrane biologique. De plus, les lipides sont également impliqués dans la signalisation cellulaire en réponse à divers stimuli [76]. Par exemple, certains sphingolipides, dérivés de la céramide comme la sphingosine-1-phosphate, sont impliqués dans la croissance cellulaire et l'apoptose. Les céramides sont les précurseurs de sphingolipides complexes comme la sphingomyéline ou la sphingosine-1-phosphate. La conversion des céramides mène à la libération du diacylglycérol (DAG), résultant de l'hydrolyse de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) par la phospholipase C. Le DAG est un messager secondaire impliqué dans l'activation de la protéine kinase C (PKC), elle-même impliquée dans la prolifération cellulaire [77]. L'activation de phosphatases activées par les céramides conduit à la régulation de protéines impliquées dans l'apoptose telles que la famille des protéines « B cell lymphoma 2 » (Bcl-2) [77]. Les prostaglandines sont également un autre exemple de lipides impliqués dans la signalisation cellulaire [76]. Les prostaglandines, dérivés de l'acide arachidonique, sont des médiateurs lipidiques impliqués dans l'immunité et

l'inflammation [78]. On retrouve également les oestrogènes, la testostérone ou encore les hormones stéroïdiennes, impliqués dans la reproduction et dans le métabolisme [76].

Les AG peuvent être classés selon leur degré de saturation c'est-à-dire le nombre de double liaison sur la chaîne hydrocarbonée. En effet, parmi les acides gras, certains sont saturés (AGS) et ne présentent pas de double liaison tandis que d'autres acides gras sont insaturés (AGI) et comportent une ou plusieurs doubles liaisons. Au sein de ces acides gras insaturés, les AG sont classés en fonction du nombre de doubles liaisons : les acides gras monoinsaturés (AGMI ou MUFA) ne présentent qu'une seule double liaison tandis que les acides gras polyinsaturés (AGPI ou PUFA) [79]. Les sources essentielles permettant le maintien du taux d'AG sont : (1) l'alimentation, (2) la synthèse *de novo* et (3) le catabolisme des lipides. La synthèse *de novo* des AG a principalement lieu dans des tissus lipogéniques comme le foie, le tissu adipeux ou encore dans les glandes mammaires. La synthèse des acides gras monoinsaturés (MUFA) se produit à partir des AGS, présents dans l'alimentation ou bien obtenus à partir d'une synthèse *de novo*. A l'opposé des acides gras monoinsaturés, les acides gras polyinsaturés (PUFA) sont obtenus dans l'alimentation, ils sont dits « essentiels » car les mammifères sont incapables de les synthétiser [79, 80].

La synthèse *de novo* des lipides commencent à partir de l'acétyl-coA. Celui-ci s'associe à l'oxaloacétate afin de former le citrate qui est capable d'entrer dans la mitochondrie. Ce citrate est ensuite clivé en acétyl-coA et oxaloacétate. L'acétyl-coA entre dans la biosynthèse des acides gras pour aboutir à la formation de palmitate (C16 :0) grâce à différentes enzymes. Ces enzymes impliquées dans la lipogénèse comme le « Fatty Acid Synthase » (FAS), l'Acétyl-coenzymeA Carboxylase (ACC) ou encore la « Stearoyl-CoA Desaturase 1 » (SCD1) permettent la formation de palmitate (C16 :0) et jouent également un rôle important dans la progression de nombreux cancers [81]. Une particularité de SCD1 est que cette enzyme est régulée par l'EGFR dans le cancer du poumon [74].

1.3.4.2. SCD1

SCD1 est une enzyme limitante et critique dans la synthèse des acides gras. Cette enzyme d'environ 40 kDa catalyse la transformation des acides gras saturés en acides gras monoinsaturés en insérant une double liaison *cis* en position $\Delta 9$. Le rapport des AGS et des AGMI est nécessaire au bon maintien de l'équilibre de la fluidité membranaire et la signalisation des lipides des cellules [82, 83]. SCD1 assure la transformation des AGS en AGMI au niveau du réticulum endoplasmique [84, 83]. En effet, SCD1 est un régulateur du rapport

AGS/AGMI. Les deux substrats préférentiels de l'enzyme sont l'acide palmitique et l'acide stéarique qui seront transformés en acide oléique et palmitoléique. Les produits obtenus sont souvent des composants essentiels et nécessaires à la formation du cholestérol, des triglycérides et des phospholipides [85].

SCD1 est retrouvé dans pratiquement tous les tissus humains adultes, mais on le retrouve particulièrement dans le foie et dans le tissu adipeux. Plusieurs facteurs permettent de réguler l'expression du gène SCD1 parmi lesquels on peut identifier deux grands types de régulation : la régulation hormonale et la régulation nutritionnelle [86]. Parmi les facteurs impliqués dans la régulation hormonale, on peut citer les facteurs suivants : l'insuline, la leptine, les œstrogènes, les facteurs de croissance (EGF, FGF, ...). Ceux-ci modulent l'expression du gène de SCD1 positivement ou négativement. L'exemple de la leptine sera considéré plus loin dans ce travail car elle joue un rôle primordial dans l'obésité. La régulation nutritionnelle, quant à elle, peut influencer l'expression de SCD1 au moyen de différents éléments. Parmi ceux-ci, on retrouve le glucose ou encore les acides gras polyinsaturés [86].

1.3.4.3. EGFR et métabolisme des lipides dans le cancer

Les cellules cancéreuses ont besoin d'une synthèse accrue en lipides pour former les membranes biologiques. Les acides gras nécessaires à la synthèse des lipides dans les cellules cancéreuses peuvent être obtenus via la voie exogène ou via la synthèse *de novo* [87]. Ainsi, plusieurs études ont mis en avant que le métabolisme des lipides était altéré dans les cellules cancéreuses, et plus particulièrement, la synthèse *de novo* des lipides, composants principaux des membranes [88]. Une synthèse anormale des lipides permet aux cellules cancéreuses d'augmenter leur vitesse de répllication et de croissance. Les macromolécules essentielles à la formation des membranes sont les phospholipides ou encore le cholestérol qui sont obtenus à partir d'AG. Les AGS sont les substrats essentiels à la formation des AGMI, eux-mêmes essentiels à la formation des membranes. Les enzymes impliquées dans la synthèse des AGS et des AGMI font l'objet d'un intérêt particulier dans le traitement du cancer [74].

Le rôle de l'EGFR dans le cancer est déjà largement documenté. Cependant, son implication dans le métabolisme des lipides peut être intéressant à étudier afin de comprendre les éventuels mécanismes de résistance aux inhibiteurs de l'EGFR. Il existe plusieurs liens entre la synthèse des lipides et l'EGFR. Comme mentionné précédemment, la liaison du ligand à l'EGFR déclenche des cascades de signalisation telle que PI3K/Akt, MAPK. Celle-ci est une voie

essentielle à la compréhension du lien entre l'EGFR et le métabolisme des lipides. Cette voie de signalisation est impliquée à différents niveaux (FIGURE 6) [89]. L'activation d'EGFR stimulant PI3K/Akt permet de réguler le flux de glucose et de glutamine, éléments essentiels au métabolisme cellulaire et à la lipogenèse. La conversion du glucose en pyruvate permet à celui-ci de générer un acétyl-coA qui rentre dans la mitochondrie et génère le citrate, précurseur des acides gras. Les cellules cancéreuses tirent profit des mécanismes cellulaires en régulant à la hausse les transporteurs du glucose mais également les enzymes impliquées dans la synthèse des lipides. De plus, elles sont capables de synthétiser des lipides *de novo* via différentes voies ce qui confère aux cellules cancéreuses une indépendance face à la synthèse classique des lipides [75, 89, 90].

La voie PI3K/Akt dépendant de l'EGFR peut également réguler le facteur de transcription « Sterol regulatory element-binding proteins 1 » (SREBP-1) [91]. SREBP-1 est un facteur de transcription qui régule les gènes nécessaires à la synthèse des lipides mais également les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides [75]. Certaines études ont montré que SREBP jouait un rôle dans le cancer [92]. SREBP-1 régule des gènes tels que le gène permettant l'expression de la « Fatty Acid Synthase » (FASN), le gène codant pour l'« Acetyl-coenzyme A carboxylase » ou encore le gène codant pour l'enzyme SCD1 [93]. L'activation à la hausse de SREBP-1 peut être une des raisons de l'augmentation de SCD1 dans le cancer afin d'augmenter la production des AGMI et AGPI, essentiels à la formation des membranes plasmiques [89].

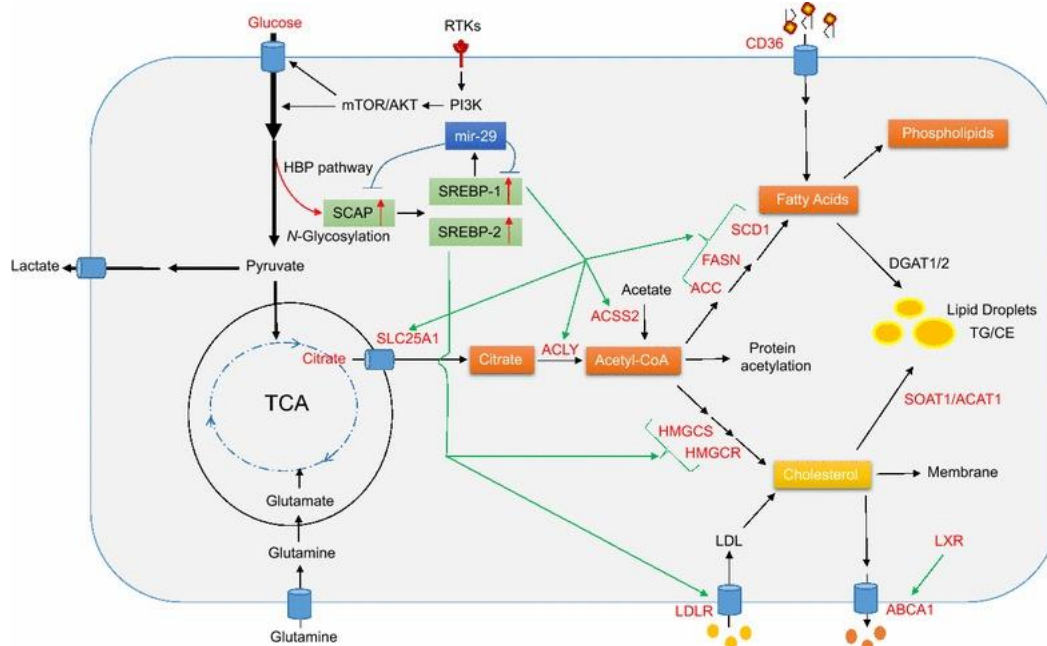


FIGURE 6 – La signalisation de l'EGFR active la voie PI3K/Akt. Cette voie est impliquée dans la régulation du flux de glucose et de glutamine, éléments essentiels au métabolisme des lipides médiés par SREBP-1 [75]. Image provenant de la revue Cheng C, Geng F., et al.

SCD1 est un élément du métabolisme lipidique impliqués dans le cancer. Plusieurs études ont montré que SCD1 est surexprimé dans de nombreux cancers tels que le cancer de la prostate, colorectal, du sein ou encore du poumon [74, 94]. SCD1 joue un rôle dans la prolifération cellulaire mais également dans le caractère invasif des cellules cancéreuses [83]. SCD1 représente un des régulateurs majeurs du rapport entre les acides gras monoinsaturés et les acides gras saturés, et particulièrement dans le cancer. L'inhibition de SCD1 empêche la formation des AGMI et donc à la prolifération cellulaire, mais induit également une surproduction d'AGS qui ont une cytotoxicité sur les cellules induisant l'apoptose. Cette cytotoxicité est connue sous le nom de lipotoxicité [95]. Cependant, cette accumulation excessive des AGS due à l'inhibition de SCD1 régule négativement leur production en inhibant l'enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC) responsable de la formation d'AGS (FIGURE 7) [96].

SCD1 a été étudié dans le cancer du poumon et a montré un intérêt particulier. Des études récentes ont montré que SCD1 modulait la voie PI3K/Akt avec Akt capable de phosphoryler un grand nombre de protéines, ce qui en fait probablement un élément clé dans le métabolisme des cellules cancéreuses (FIGURE 7). Cette voie PI3K/Akt, activée par l'EGFR, est surexprimée dans les cellules du cancer du poumon chez lesquelles l'expression de SCD1 était également augmentée [97].

Une relation a été établie entre EGFR et SCD1 et a montré que l'EGFR activé se lie et stabilise SCD1 en phosphorylant une de ses tyrosines. La tyrosine Y55 est la tyrosine importante dans la phosphorylation de SCD1 par EGFR et permet la stabilisation de SCD1. La stabilisation de SCD1 via EGFR permet à l'enzyme de continuer à produire des AGMI nécessaires à la prolifération et la survie des cellules cancéreuses du poumon. De plus, l'inhibition de l'activité de SCD1 a conduit à une réduction de la phosphorylation induite par EGFR provoquant une suppression de l'activité des cibles d'EGFR telles que Akt, ERK,... (FIGURE 7) [74, 97]. Chacun exerce une régulation sur l'autre. Ainsi SCD1 s'est vu être un complément intéressant à ajouter au traitement ciblant EGFR.

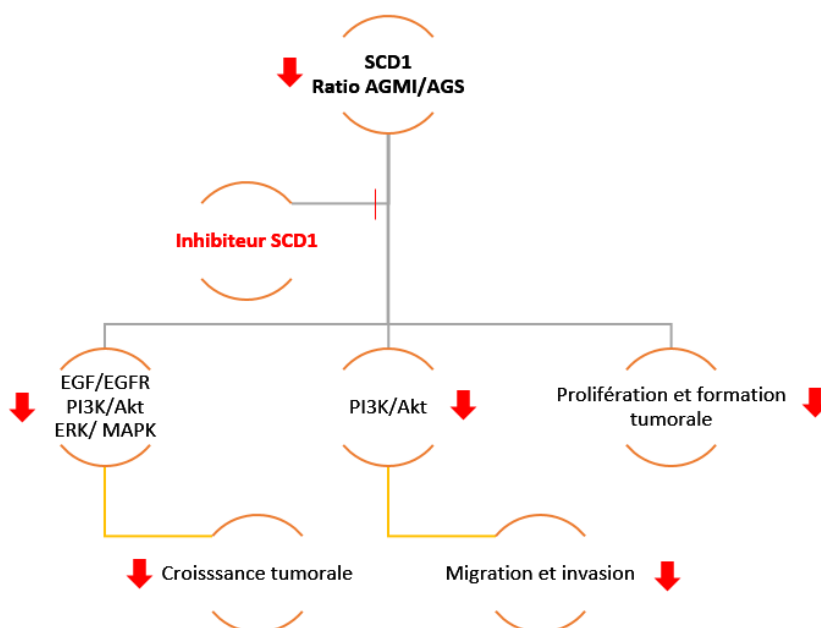


Figure 7 - Rôle de SCD1 dans les voies métaboliques et l'effet de l'inhibiteur de SCD1 sur la migration et la prolifération tumorale.

1.4. SCD1, EGFR et TNBC

SCD1 est impliqué dans le développement, la progression ou encore la prolifération des cellules cancéreuses [98]. Son rôle au sein du métabolisme permet de penser qu'il est intéressant d'étudier SCD1 dans le cancer du sein triple négatif.

Certaines études ont évalué la corrélation entre le niveau d'expression de SCD1 et la survie chez des patientes atteintes du TNBC. L'activité de SCD1 avait été mesurée au moyen de l'indice de saturation en acide gras dans le sérum de patientes présentant un cancer du sein. Un indice de saturation élevé signifiait que l'activité de SCD1 est diminuée et associée à une diminution du risque de développer un cancer du sein [83].

Par la suite, l'expression de SCD1 a été mesurée dans les cancers du sein primitifs [83]. L'étude a permis de montrer que des niveaux d'expression de SCD1 plus élevés sont associés à l'âge des patientes. Chez des patientes plus âgées, le sous-type de cancer le plus rencontré est le cancer du sein HR+. L'étude montrait que le niveau d'expression de SCD1 était plus élevé dans les cancers HER2+ et les cancers ER+ que dans les TNBC.

Cependant, en ce qui concerne la survie des patientes, une analyse de survie a montré qu'un niveau élevé de SCD1 était associé à une survie plus courte comparé aux patientes chez lesquels le niveau de SCD1 est plus bas. Cependant, dans le TNBC, la survie des patientes est plus courte

ce qui montre que SCD1 est un régulateur important dans le cancer du sein et l'étude de son activité dans le TNBC peut s'avérer pertinente [83].

1.5. L'obésité et le cancer du sein

L'obésité est définie par un indice de masse corporelle supérieur ou égal à 30 kg/m². L'obésité augmente le risque de développer de nombreux cancers comme le cancer colorectal, ovarien, rénal mais aussi le cancer du sein [99]. Dans le cas du cancer du sein, l'obésité chez une femme augmente de 67% le risque de développer un TNBC ou encore de 73% le risque de développer un cancer du sein de type Luminal B par rapport à une femme de poids normal [100].

Chez les femmes pré-ménopausées, l'obésité diminue significativement l'incidence de risque des différents sous-types de cancer du sein retrouvés post-ménopausées, y compris le TNBC [101]. Tandis que chez les femmes ménopausées, l'obésité et le surpoids augmente le risque de cancer ER+ et/ou PR+ c'est-à-dire hormonosensible [102]. De ce fait, il a été considéré qu'il existe un lien entre obésité et cancer du sein qui réside dans le taux d'oestrogènes circulants. Chez les patientes pré-ménopausées, les oestrogènes sont principalement synthétisés par l'ovaire. En revanche chez les femmes ménopausées, les oestrogènes circulants sont synthétisés par le tissu adipeux via une enzyme aromatasase. Il a été démontré que les oestrogènes, par le tissu adipeux, pourrait augmenter le risque de cancer du sein [103, 104, 105]. En effet, cette aromatasase est notamment présente dans le tissu adipeux entourant le sein mais est également retrouvé dans le tissu tumoral. De plus, les adipocytes sécrètent des cytokines (TNF α et IL-6) capables d'exercer une action autocrine ou paracrine sur l'aromatasase permettant une conversion des androgènes en oestrogènes. Ces taux élevés en oestrogènes circulants ne sont pas retrouvés en condition physiologique normale chez la femme ménopausée et provoque une augmentation du risque de cancer du sein hormonosensible ER+/PR+ [104, 105].

A contrario, l'obésité des femmes pré-ménopausées est principalement liée à une hyperinsulinémie, une hyperandrogénie. Les taux de leptine présent chez la femme obèse sont particulièrement élevés et constitue un facteur de risque. Le statut hormonal de ces femmes diffère et sous-entend qu'une voie non médiée par les hormones sexuelles est impliquée dans le risque de cancer du sein [102].

Le tissu adipeux est considéré comme un organe endocrinien à part entière et sécrète un certain nombre de molécules telles que des hormones (par exemple la leptine, les oestrogènes), des cytokines pro-inflammatoires, des adipokines, des facteurs de croissance, etc. Les cytokines

pro-inflammatoires sont des molécules engagées dans le métabolisme énergétique qui ont aussi un impact majeur dans le cancer [106]. Le tissu adipeux entourant les différents organes sécrète des molécules qui peuvent exercer une action paracrine et impacter les cellules cancéreuses du sein [100].

En outre, le tissu adipeux exerce une fonction de stockage d'énergie sous forme de lipides, et plus particulièrement sous la forme de triglycérides. L'obésité est associée à un stockage excessif et incontrôlé des lipides conduisant à un dysfonctionnement du métabolisme tel qu'une insulino-résistance ou une dyslipidémie. L'obésité chez les femmes, quel que soit leur statut ménopausique, est un mauvais pronostic clinique et représente un risque de mortalité accrue car elle favorise l'état inflammatoire chronique de basse intensité et le stress oxydatif [104, 105]. D'une part, cette inflammation de bas grade augmente modestement les facteurs clés de l'inflammation mais ne permet pas la manifestation de signes cliniques ce qui passe inaperçu et favorise le développement tumoral. D'autre part, le stress oxydatif module l'activité des cytokines inflammatoires qui ont un impact positif sur la tumeur et la réponse immunitaire. Ainsi, les molécules sécrétées par le tissu adipeux comme les AG libres ou encore la leptine stimulent des éléments clés du système immunitaire comme les macrophages. Les macrophages résidents du tissu adipeux sécrètent une série de cytokines telles que TNF, IL-6, ... et permettent le recrutement d'autres cellules du système immunitaire. Les médiateurs inflammatoires remanient le microenvironnement tumoral induisant une reprogrammation du métabolisme des cellules cancéreuses et immunitaires [101, 107].

Il existe deux sous-types de macrophages appelés M1 et M2. Les macrophages M1 sont les macrophages activés par la voie classique c'est-à-dire activés par les cytokines de type 1 ou les produits microbiens. Les macrophage M2 sont des macrophages activés par une voie alternative. Ils sont différents aussi bien au niveau de leurs récepteurs membranaires qu'au niveau de leur activité ou de leur synthèse de cytokines [107]. Les macrophages M1 ont un besoin important en AG, essentiels pour leur activation et dirigent le métabolisme vers la biosynthèse des AG, tandis que les macrophages M2 orientent leur métabolisme vers la synthèse d'acétyl-CoA et la biosynthèse du cholestérol. La reprogrammation du métabolisme lipidique par les macrophages dépend de stimuli provenant du microenvironnement. La vitesse de synthèse des AG est contrôlée par le facteur de transcription SREBP mais également via les lipides exogènes. En effet, les lipides exogènes circulants, fortement présents dans l'obésité, peuvent déclencher une activité inflammatoire dépendante des macrophages. Ainsi, les lipides endogènes et exogènes sont impliqués dans l'activité inflammatoire [108].

Pour établir un lien entre l'obésité et le cancer, les cellules cancéreuses subissent des changements métaboliques favorisant des phénotypes lipogéniques. De plus, la fréquence des cellules myéloïdes suppressives, dont font partie les macrophages, est augmentée dans l'obésité et ces observations ont également été mises en évidence dans différents cancers [108].

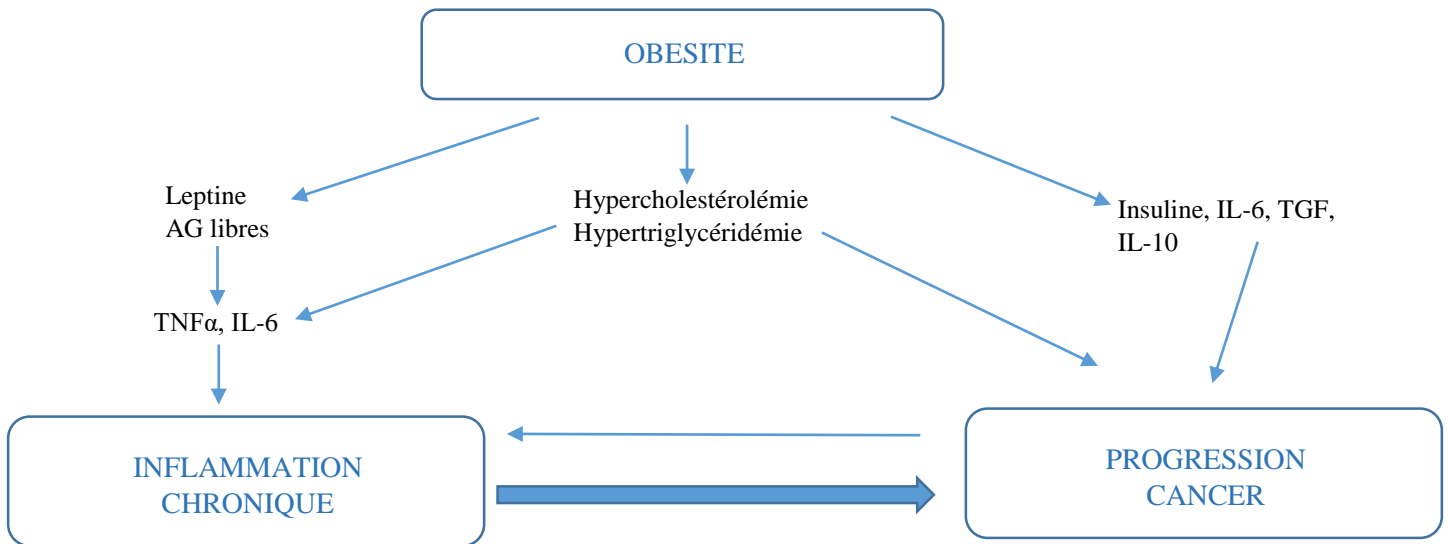


FIGURE 8 - Lien entre obésité, inflammation chronique et progression tumorale. Image adaptée de l'article de Blevé A. et al. [108]

1.5.1. Hormones du tissu adipeux et cancer du sein

1.5.1.1. L'insuline

L'obésité est associée au syndrome métabolique. Il est fréquent d'observer une résistance à l'insuline chez les personnes obèses. Cette résistance à l'insuline augmente le taux d'insuline provoquant une hyperinsulinémie chronique [109]. En outre, le syndrome métabolique observé chez les personnes obèses est également caractérisé par une dyslipidémie, notamment une hypercholestérolémie [100].

L'hyperinsulinémie est définie par une augmentation de l'insuline dans le sang. Elle est également responsable de l'augmentation du glucose et des triglycérides. L'insuline étant une hormone active au sein du métabolisme, elle stimule la croissance cellulaire *in vitro*. Dans les tissus métaboliques tels que le foie ou le tissu adipeux, l'insuline est capable de se fixer à son récepteur à l'insuline (IR) et déclenche une série de voies de signalisation dont PI3K/Akt. Dans les tissus non métaboliques, l'insuline se fixe également sur son IR mais induit d'autres cascades de signalisation dont Ras, Raf, MAPK [100].

Dans le cas du TNBC, l'activation de PI3K/Akt/mTOR par l'insuline représente un mauvais pronostic et est associé à une biologie agressive du TNBC. Pour rappel, la voie PI3K/Akt est responsable de l'augmentation de l'absorption du glucose et donc de la glycolyse aérobie. La glycolyse aérobie est largement favorisée dans les TNBC au détriment de la phosphorylation oxydative. Ainsi, l'insuline favoriserait l'agressivité des TNBC [101].

1.5.1.2. La leptine

La leptine est une hormone produite par le tissu adipeux et joue un rôle indéniable dans l'obésité. La leptine est une hormone régulant l'appétit par son effet sur le cerveau. L'obésité amène une résistance à la leptine provoquant une augmentation de ses taux sanguins. Ces hauts taux circulants de leptine sont observés chez les patients obèses [100]. Les gènes de la leptine sont exprimés dans le tissu mammaire normale et sont indispensables au bon développement de la glande mammaire. Dans les cellules cancéreuses du sein, les récepteurs à la leptine sont exprimés et sont activés par fixation de la leptine. Ceci active des voies de signalisation telles que PI3K/Akt, la voie JAK/STAT ou encore la voie ERK/MAPK [100, 109].

Dans le TNBC, la leptine active des voies de signalisation favorisant l'agressivité du TNBC dont la voie STAT, NF- κ B et Wnt. Ces voies de signalisations sont à la base de l'invasion cancéreuse et sont responsables d'un mauvais pronostic [101].

1.5.2. Obésité et SCD1

Un certains nombres d'enzymes surexprimées dans le cancer sont également surexprimées dans les adipocytes. Ces enzymes sont sous le contrôle de plusieurs facteurs pro-inflammatoires [106]. Parmi ces enzymes, on retrouve SCD1, particulièrement impliqué dans l'obésité et dans le cancer. SCD1 est exprimé de manière accrue dans certains cancers dont le carcinome pulmonaire et est impliqué dans le développement des cellules cancéreuses. Ainsi, l'inhibition de SCD1 permettait d'altérer la survie cellulaire des lignées du carcinome pulmonaire [110]. Dans le cadre d'une étude pour la mise en place d'un traitement de l'obésité, SCD1 a été identifié comme essentiel à la formation de la graisse corporelle. En effet, les souris déficientes en SCD1 étaient maigres, résistantes à l'obésité et sensibles à l'insuline [111].

1.5.3. Régulation de SCD1

Il existe deux régulations de l'expression des gènes de SCD1 : la régulation hormonale et la régulation nutritionnelle. Les effecteurs positifs de la transcription de SCD1 sont l'insuline, le cholestérol et les glucides. Par opposition, les oestrogènes, la leptine ou les AGPI sont des inhibiteurs de SCD1.

L'insuline est un puissant activateur de SCD1 qui induit son expression. Dans le tissu adipeux, l'insuline induit une cascade moléculaire permettant l'activation de SREBP1, facteur de transcription de SCD1. Dans le foie, l'insuline active la voie de PI3K/Akt qui cible également des facteurs de transcription capables de moduler l'expression du gène de SCD1. Etant donné que les cellules cancéreuses du sein expriment des IR, la fixation de l'insuline (augmentée en cas d'obésité) pourrait induire une cascade moléculaire dépendante de PI3K/Akt aboutissant à l'augmentation de SCD1 dans les tissus cancéreux mammaires [86].

Outre la régulation hormonale, l'aspect nutritionnel est également important et régule l'expression de SCD1. Les AGS sont des activateurs de SCD1 et à l'opposé, les AGPI sont de puissants inhibiteurs de SCD1. Les AGS sont les substrats de l'enzyme et sont donc convertis en AGMI. Ces AGS sont des lipides particulièrement présents chez les personnes obèses et il n'est donc pas étonnant que l'expression de SCD1 soit augmentée. Cependant, les AGPI sont de puissants inhibiteurs qui ont un effet direct sur SREBP-1 en diminuant son abondance dans le noyau. De plus, les AGPI sont capables de bloquer l'activité d'Akt [86, 93].

2. Objectif du travail

Les travaux antérieurs de notre laboratoire ont mis en évidence l'importance de la voie EGFR dans la progression du cancer du sein triple négatif (TNBC). Il est clair que la signalisation via l'EGFR joue un rôle clé dans la pathogenèse des TNBC [69]. Cependant l'utilisation des inhibiteurs de EGFR en clinique s'est révélée inefficace [69, 70, 73]. Une observation récente au sein du laboratoire d'accueil a montré que les cellules TNBC présentent un phénotype lipogénique caractérisé par une surexpression d'une enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras (AG) insaturés, appelée SCD1 « Steroyl-CoA desaturase ».

Les travaux de notre laboratoire ont montré que l'expression de SCD1 dans les cellules TNBC est associée à une prolifération, migration et croissance tumorale accrue chez la souris. Une inhibition de SCD1 *in vitro* et *in vivo* abolit ses effets et ralentit la croissance tumorale des cellules MDA-MB231. Ces mêmes cellules surexpriment EGFR à leur surface et celui-ci régule leur prolifération via la protéine du rétinoblastome (RB) et CDK4/6 [112].

Sachant que le lien entre EGFR et SCD1 existe dans le cancer du poumon, nous avons émis une hypothèse suggérant une régulation possible de SCD1 par EGFR dans les cellules TNBC [74]. **La régulation de l'expression de SCD1 par EGFR dans les cellules du cancer du sein TNBC n'a pas encore été étudiée jusqu'à présent.**

La première étape du projet consiste à analyser *in vitro* l'expression de SCD1 et d'EGFR dans les lignées TNBC à savoir MDA-MB231, MDA-MB468, HS-578T et BT549. Ensuite, une sous-régulation de l'expression de l'EGFR par une approche de siRNA dans les cellules TNBC a été utilisée afin de mettre en évidence la stabilité de l'EGFR au sein des cellules TNBC. Cette sous-régulation permet également la mise en évidence d'une éventuelle modulation de l'expression de SCD1. La deuxième étape consiste à analyser par immunohistochimie l'expression de SCD1 et EGFR dans des xénogreffes de cellules TNBC issues de souris traitées avec un inhibiteur d'EGFR ou un inhibiteur de la voie du VEGF.

Par la suite, le but est d'étudier l'effet de l'hypoxie sur l'expression et/ou la stabilisation de SCD1 dans les cellules EGFR^{-/-} et dans les cellules EGFR^{+/+}. En effet, dans d'autres travaux réalisés au laboratoire, l'hypoxie semblerait entraîner la surexpression de SCD1.

Pour terminer, l'objectif est de tester l'effet de la combinaison d'un inhibiteur d'EGFR et d'un inhibiteur de SCD1 sur la prolifération, la migration et la formation des sphéroïdes des cellules TNBC *in vitro*.

3. Matériels et Méthodes

3.1. Culture Cellulaire

Les lignées du cancer du sein TNBC utilisées (cellules MDA-MB231, MDA-MB468, HS578T, BT549) proviennent de l'ATCC. Les cellules MDA-MB231, MDA-MB468, HS578T ont été mises en culture dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life technologies, 10938-025, Paisley, UK). Les cellules BT549 ont été cultivées dans du milieu RPMI (RPMI Medium 1640, Thermo Fisher Scientific 21875-034, Waltham, États-Unis). Les deux milieux ont été supplémentés avec du Fetal Bovin Serum 10% (Fetal Bovin Serum, Life technologies, 10270-106, Paisley, UK), de la Penicillin-Streptomycin 1% (Penicilin Streptomycin, Life technologies, 15140-122, Paisley, UK) et de la L-glutamine 1% (L-glutamine 200mM (100x), Life technologies, 25030-024, Paisley, UK). Toutes les cellules ont été mises en culture à 37°C dans un incubateur sous atmosphère humide 5% de CO₂ et 21% d'oxygène. Toutes les lignées cellulaires ont été traitées avec un inhibiteur du protéasome MG-132 (MG132-proteasome inhibitor, Abcam, ab141003, Cambridge, États-Unis).

Les lignées cellulaires MDA-MB231 et MDA-MB468 ont été traitées avec de l'erlotinib (10µM) (E-4007 Erlotinib, Hydrochloride Salt, >99% - 2g, LC Laboratories, Woburn, États-Unis) pendant 24h à l'incubateur à 37°C sous atmosphère humide 5% de CO₂ et 21% d'oxygène. La concentration stock d'erlotinib était de 1mM et a été diluée à 1/100 afin d'être mise en contact avec les cellules. De plus, les lignées cellulaires ont également été traitées avec un inhibiteur de SCD1 (100µM) (SCD1 inhibitor, Abcam, ab142089, Cambridge, États-Unis). La concentration stock de l'inhibiteur de SCD1 était de 10µM et un volume de 30µL a été ajouté dans chaque boîte de culture pour chacune des lignées

3.2. Western Blot (WB)

3.2.1. Extraction et dosage des protéines

Pour extraire les protéines, les différentes lignées cellulaires ont été lysées avec du Lysis Buffer 1X (Cell signaling Technology, 9803S, Danvers, États-Unis) complété par un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche, 04693116001, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Bâle, Suisse) et un mélange d'inhibiteurs de phosphatases (PhoStop, Roche, 04906837001 Phosphatases Inhibitor Cocktail Tablets, Bâle, Suisse). Les lysats cellulaires ont

été récupérés à l'aide d'un scraper et transférés dans des eppendorfs. Les eppendorfs ont été placés sur glace pendant 30 min et ensuite centrifugés 10 min à 13000 rpm à 4°C. A la fin de la centrifugation, le surnageant contenant les protéines a été récupéré. Les protéines ont été stockées au congélateur à -20°C. Le dosage des protéines a été réalisé en utilisant le kit "DC Protein Assay" (Bio-Rad Laboratories 500-0116, Hercules, CA, Etats-Unis). La plaque contenant les protéines a été lue par un spectrophotomètre, de longueur d'onde de 750nm (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

3.2.2. Préparation des échantillons

Les extraits protéiques ont été dilués pour obtenir une quantité de 20 µg de protéines dans chaque échantillon. Le tampon de chargement (Tableau 2) a été ajouté aux échantillons et représente un cinquième du volume total de chaque échantillon. Ces échantillons ont été placés au bain-marie à 95°C dans le but de dénaturer les protéines.

3.2.3. Préparation des gels

Les gels de polyacrylamide utilisés pour la migration des échantillons (SDS-Page) sont composés d'un gel de séparation contenant 10% d'acrylamide, essentiel à la bonne séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire et d'un gel de compression contenant 4% d'acrylamide permettant d'aligner les protéines sur un même front de migration (Tableau 1).

Tableau 1 - Liste et volumes des réactifs utilisés pour les gels de séparation et de compression nécessaire à la réalisation d'un Western Blot.

Réactifs	Gel de séparation 10% d'acrylamide	Gel de compression 4% d'acrylamide
Eau MiliQ	7.14 mL	6.4 mL
Tris 1.5M pH8.8	3.75 mL	-
Tris 0.5M pH6.8	-	2.5 mL
Acrylamide/Bis 40% 37.5 :1	3.9 mL	1.04 mL
Sodium Dodécyl Sulfate 10% (SDS 10%)	150 µL	100 µL
Persulfate d'ammonium 200 mg/mL	75 µL	100µL
Temed	5 µL	10 µL

Référence des réactifs :

- Tris (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen 15504-020, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).
- Acryamide/Bis 40% 37.5 :1 (Serva, 1068101, Heidelberg, Allemagne).
- SDS (Merck 1137601000, Darmstadt, Allemagne).
- Persulfate d'ammonium 200mg/mL (Sigma-Aldrich A-6761, St-Louis, MO, Etats-Unis).
- Temed (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine, Sigma-Aldrich T9281, St-Louis, MO, Etats-Unis).

3.2.4. Migration

Le marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, 26619, Waltham, Etats-Unis) a été déposé dans le puit de gel de polyacrylamide. Les échantillons ont également été déposés dans les puits du gel de polyacrylamide. Les gels ont été placés dans une cuve Bio-Rad. La cuve a été remplie avec du tampon de migration (Tableau 2) et la migration se poursuit pendant 10 min à 50 volts puis 2 H à 100 volts à température ambiante.

3.2.5. Transfert

A la fin de la migration, les protéines sont transférées depuis le gel sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PerkinElmer NEF1002001PK, Waltham, Etats-Unis). Les gels ont été placés en sandwich contre la membrane de polyvinylidene. La membrane a été activée au méthanol pour permettre la fixation des protéines à sa surface. L'ensemble est entouré de papiers Whatman (GE Healthcare 3017-915, Chicago, Etats-Unis) de chaque côté, entourés également par des éponges en feutre. Le montage a ensuite été transféré dans une cuve contenant du tampon de transfert c'est-à-dire un mélange de tampon de transfert 5X (Tableau 2) dilué avec de l'eau et du méthanol. Le temps de transfert des protéines depuis le gel vers la membrane est d'1h à 100 volts.

3.2.6. Immunodétection des protéines recherchées

La membrane contenant les protéines a été incubée avec une solution de blocage pendant 2h sous agitation à température ambiante. Cette solution de blocage est composée de lait en poudre 5% dilué dans une solution de lavage (Tableau 2). La solution de blocage permet de saturer la membrane avec des protéines afin de bloquer les antigènes aspécifiques. Après saturation, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage sous agitation, OVN, à 4°C. La liste des anticorps primaires ainsi que les différentes informations au sujet des anticorps primaires utilisés lors des expériences se trouve Tableau 3. Les membranes ont été lavées dans une solution de lavage dans le but de retirer l'excédent d'anticorps non fixés aux antigènes. Le lavage a été fait sous agitation et répété 3 fois 5 min. Après les lavages, la membrane a été incubée avec une solution de lait 5% contenant l'anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxidase (HRP) sous agitation, pendant 1h et à température ambiante. La liste des anticorps secondaires ainsi que les différentes informations au sujet des différents anticorps secondaires utilisés se trouve Tableau 4. Dans le but de visualiser les protéines sur la membrane, la détection des complexes antigènes-anticorps a été réalisée par réaction de chemiluminescence au moyen d'un kit "Pierce ECL Western Blotting Substrate " (Thermo Fisher Scientific, 32106, Waltham, Etats-Unis) selon les instructions du fabricant. Enfin la lecture de la membrane a été réalisée grâce à une caméra (LAS-4000, Fujifilm, Tokyo, Japon).

Tableau 2 - Composition des différentes solutions utilisées en WB.

Tampon de chargement	Tampon de migration 10X	Tampon de transfert 5X	Solution de lavage 10X
Tampon Tris 0.5M pH6.8 SDS 10% Bleu de bromophénol Glycérol β -mercaptoéthanol 12,5%	Tris Glycine SDS 10% Eau MiliQ	Tris Glycine Eau MiliQ	Tris NaCl Tween 20 Eau MiliQ

Tableau 3 - Liste des anticorps primaire et les informations correspondantes utilisés en Western Blot.

Cible	Blocage	Origine	Dilution	Poids Moléculaire attendu	Référence
EGFR Total (D38B1)	Lait 5%	Lapin	1/1000	175 kDa	Cell Signaling 4267
SCD1 (M38)	Lait 5%	Lapin	1/1000	37 kDa	Cell Signaling 2438
EGFR phosphorylé (PTYR1092)	Lait 5%	Lapin	1/1000	170 kDa	Sigma Aldrich SAB4300063
GAPDH	Lait 5%	Souris	1/10000	30 – 40 kDa	Chemicon International MAB374
HSC70 (B-6)	Lait 5%	Souris	1/10000	70 kDa	Santa Cruz Technology Sc-7298

Tableau 4 - Liste des anticorps secondaires et les informations correspondantes utilisés en Western Blot.

Cible	Origine	Dilution	Référence
Anti-lapin	Goat anti-rabbit IgG/HRP	1/2000	Cell Signaling 7074
Anti-souris	Horse anti-mouse IgG/HRP	1/2000	Cell Signaling 7076

3.2.7. Contrôle de charge

A la fin des diverses détections de protéines sur la membrane, un contrôle de charge est réalisé sur cette même membrane. Le but est de savoir si les échantillons ont été chargés de façon identique dans les différents puits, mais permet également d'affirmer que les protéines ont correctement été transférées du gel vers la membrane de polyvinylidène. L'intérêt du contrôle de charge est de mettre en évidence une protéine étroitement conservée au sein des cellules. Les contrôles de charge utilisés sont la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase), une enzyme ubiquitaire et le HSC70 (Heat Shock Cognate 70kDa), une protéine chaperonne. La GAPDH et HSC70 permettent une interprétation optimale des résultats obtenus sur la membrane.

3.3. Transfection de SiRNA/EGFR dans les lignées cellulaires

3.3.1. Ensemencement des cellules

Les cellules MDA-MB231, MDA-MB468, HS578T ont été décrochées à l'aide de la trypsine à partir de disques de routine et ont été récoltées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life technologies, 10938-025, Paisley, UK) enrichi avec du FBS 10% et les cellules BT549 ont été trypsinisées et récoltées dans du milieu de culture RPMI (RPMI Medium 1640, Thermo Fisher Scientific 21875-034, Waltham, Etats-Unis) également enrichi en FBS 10%. Les cellules récoltées dans un falcon ont été centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes et ont été re-suspendues dans leur milieu enrichi respectif. Par la suite, les cellules ont été suspendues dans une solution de bleu de Trypan composée de 50% de bleu de Trypan et de 50% de suspension cellulaire. Le mélange a été placé sur une lame de KOVA afin de procéder aux comptages des cellules présentes dans la suspension. A la suite du comptage des cellules, celles-ci ont pu êtreensemencées dans des plaques 6 puits. Le nombre de cellulesensemencées varie en fonction de la lignée. Pour les lignées HS578T et BT549, le nombre de cellulesensemencées souhaité est de 720.000 cellules par puit. Pour les lignées MDA-MB231 et MDA-MB468, le nombre de cellulesensemencées souhaité est de 1.350.000 cellules par puit.

3.3.2. Préparation des SiRNA

Avant de réaliser la transfection, les siRNA ont été suspendus dans de l'eau DEPC (UltraPure™ DEPC-Treated Water, Thermo Fisher Scientific, 750023, Waltham, États-Unis). Les différents siRNA ont été suspendus dans un mélange d'eau et de tampon d'annihilation. Le mélange a été mis à incuber pendant 2 min à 95°C au bain-marie. Le mélange a été gardé à température ambiante pendant 1h. Les échantillons ont été stockés au congélateur à -20°C.

3.3.3. Transfection des SiEGFR

Les siRNA, siCTL et siEGFR, utilisés avaient été préalablement annihilés. En parallèle, deux mélanges ont été préparés : le premier contenant du milieu DMEM non enrichi et différents pools de siRNA (3 pools contrôles et 3 pools de siRNA ciblant EGFR), le deuxième contenant du milieu DMEM non enrichi et de la Lipofectamine (RNAiMax Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 13778-075, Waltham, États-Unis). Les deux mélanges ont été ajoutés l'un à l'autre, dans un ordre particulier : la solution contenant le RNAiMAX dans la solution contenant

les siRNA. Les mélanges sont restés 5 min à température ambiante. Les séquences des différents pools de siRNA se trouvent Tableau 5.

Les lignées cellulaires MDA-MB231, MDA-MB468 ont été traitées avec des siRNA contrôles ou des siRNA ciblant EGFR (siEGFR). Un volume de 250 µL a été ajouté dans chaque puit. Les cellules traitées ont été mises à l'incubateur à 37°C. Le premier temps de retrait des cellules de l'étuve est de 24h. Une extraction des protéines a été réalisée comme décrite à la section 3.2.2. Le deuxième temps de retrait des cellules est de 48h. Une extraction de protéines a également été réalisée.

Tableau 5 - Séquences des siRNA utilisées lors de la transfection.

	Séquences des siCTL (contrôle) SENS	Séquences des siEGFR SENS
Pool n°1	UGGUUUACAUGUCGACUAA	CAAAGUGUGUACGGAAUA
Pool n°2	UGGUUUACAUGUUGUGUGA	CCAUAAAUGCUACGAAUAA
Pool n°3	UGGUUUACAUGUUUCUGA	GUAACAAGCUCACGCAGUU

3.4. Immunohistochimie ciblant EGFR et SCD1

3.4.1. Fixation des tissus

Les coupes des tissus de souris obtenues par greffe hétérotopique de cellules MDA-MB231 injectées en sous-cutané ont été déparaffinées pendant 15 min dans du xylène et ont ensuite été hydratées pendant un court instant dans des bains d'alcool de concentrations décroissantes. Ces étapes ont été réalisées au moyen du Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems, Diegem, Belgique). Les lames ont ensuite été immergées dans un tampon Target Retrieval Solution dilué 1X (Agilent/Dako, Ref 1699, Santa Clara, Etats-Unis) et ont été mises pendant 11 min à 126°C et à la pression de 1,4 bar dans l'autoclave (Classic Prestige Medical 210004, Blackburn, Angleterre). Les lames doivent être refroidies à la sortie de l'autoclave pendant 20 min. A la suite du refroidissement, les lames ont été rincées 2 fois dans de l'eau distillée. Ensuite, chaque tissu des lames a été entouré par un stylo hydrophobe (Agilent Dako, Dako pen, Santa Clara, Etats-Unis).

Les différentes drogues utilisées pour le traitement des souris sont l'erlotinib, un placebo ou le sunitinib (Sunitinib SUTENT SU-11248, Malate Salt, >99% - 4mg/mL, Lc Laboratories, Woburn, Etats-Unis).

3.4.2. Inhibition des peroxydases endogènes

La solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% été préparée à partir d'une solution stock de H₂O₂ 30% (Carlroth, Wasserstoffperoxid 30%, ROTIPURAN, Karlsruhe, Allemagne) diluée dans de l'eau distillée. Chaque coupe a été traitée avec 150µL de cette solution de peroxyde d'hydrogène 0,3% pendant 20 min à température ambiante et dans une chambre humide, fermée. Les peroxydases sont neutralisées par le peroxyde d'hydrogène en vue de la coloration au 3, 3-Diaminobenzidine (SignalStain(R) DAB substrate kit, Cell Signaling Technology, 8059S, Danvers, Etats-Unis). L'objectif est de neutraliser les peroxydases endogènes provenant du sang qui pourraient être responsables du bruit de fond sur la coupe. Le DAB est oxydé par les peroxydases en un produit coloré permettant la détection de l'anticorps secondaire. A la suite de cette étape, les coupes ont de nouveau été rincées dans de l'eau distillée. Les rinçages ont été réalisés 2 fois.

3.4.3. Blocage des sites aspécifiques et perméabilisation

La solution de blocage a été réalisée à partir d'une solution Animal Free Blocking Solution diluée à 1/5 avec de l'eau distillée (Cell Signaling Technology, 15019L, Danvers, Etats-Unis). Cette solution de blocage contient du sérum animal. Le sérum permet de recouvrir la coupe histologique avec des protéines appartenant à l'animal chez qui l'anticorps secondaire a été produit. Ainsi, la solution de blocage permet de saturer les antigènes aspécifiques de la coupe afin de garantir la bonne fixation de l'anticorps primaire sur son antigène. Le sérum permet de recouvrir la coupe pour empêcher l'anticorps secondaire de se fixer aspécifiquement sur le tissu. Chaque coupe a été traitée avec 150µL de cette solution pendant 20 min à température ambiante.

3.4.4. Incubation en présence de l'anticorps primaire et secondaire

Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire dilué dans la solution DAKO diluent (Dako REALTM antibody diluent, S2022, Santa Clara, Etats-Unis). La liste des anticorps utilisés est reprise sur le Tableau 6. Les coupes sont incubées avec la solution contenant l'anticorps primaire pendant 1h à température ambiante.

Tableau 6 - Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunohistochimie.

Cible	Origine	Dilution	Référence
EGFR phosphorylé	Lapin	1/25	Sigma-Aldrich™ SAB4300063
SCD1	Souris	1/100	Abcam ab19862

Les coupes ont été rincées dans la solution de lavage PBS dans le but de retirer l'excédent d'anticorps non fixés aux antigènes. Le lavage a été répété 5 fois pendant 5 min. Après les lavages, les coupes ont été incubées avec une solution contenant l'anticorps secondaire couplé à la HRP, pendant 30 min et à température ambiante. L'anticorps secondaire fait partie d'une solution déjà prête à l'emploi. La solution utilisée est le Dako ENVISION + System-HRP (DAKO, Labelled Polymer, K4003, Santa Clara, Etats-Unis). Les informations relatives à l'anticorps secondaire se trouvent Tableau 7. Les coupes ont été rincées avec une solution de PBS à l'issue de l'incubation avec l'anticorps secondaire. Le rinçage a été répété 5 fois pendant 5 min.

Tableau 7 - Liste des anticorps secondaires utilisés pour l'immunohistochimie

Cible	Origine	Référence
Anti-lapin	Goat anti-rabbit ENVISION/ HRP	DAKO envision K4003

3.4.5. Révélation à la DAB

Dans le but de visualiser l'immunomarquage sur les coupes, la détection des complexes antigènes-anticorps a été réalisée au moyen de la coloration du DAB. La solution permettant la révélation de la coloration des protéines d'intérêt a été préparée en mélangeant du PBS et de la solution stock DAB. Les coupes ont été traitées avec cette solution pendant 5 min jusqu'à l'obtention d'une coloration révélatrice du marquage. La réaction est arrêtée en trempant les coupes dans de l'eau distillé. Ensuite, les coupes ont été contre colorées dans la solution hématoxyline pour marquer les noyaux pendant 1 min et ont été rincées à l'eau courante pendant 5 min. A la suite du rinçage, les coupes ont été déshydratées à l'air libre pendant 10 min et ont été montées sur coupe grâce au kit de montage (Eukitt mounting medium, Sigma Aldrich, 03989, Missouri, Etats-Unis).

3.4.6. Quantification des marquages

Une analyse des images a été réalisée au moyen du programme Matlab. Le script Matlab analyse chaque pixel de l'image en caractérisant sa couleur par une intensité de rouge, vert ou bleu (système RGB). En fonction du marquage choisi, les zones à identifier sont les zones pour lesquelles l'intensité de rouge, de vert ou de bleu sont supérieures au seuil défini. Ces pixels sont conservés pour l'analyse. Si au contraire, l'intensité de rouge, de vert ou de bleu est inférieure au seuil choisi, ceux-ci sont occultés de l'image. Seul subsistent les points marqués par une intensité de rouge et de bleu supérieur aux deux seuils. Une fois l'analyse de chaque image réalisée, le logiciel Matlab définit une densité pour chaque image (pixel/mm²).

Ce système permet donc de réaliser des masques sur chaque image en mettant en évidence les marquages à l'hématoxyline éosine ainsi que le marquage réalisé avec le DAB/HRP couplé à l'anticorps. La superposition des deux masques permet la quantification des pixels par millimètre au carré.

3.4.7. Analyses statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, Californie, Etats-Unis). Les différences entre les groupes ont été établies par un test de Mann-Whitney. Les niveaux de signification sont définis : ns, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$.

4. Résultats

4.1. Evaluation du niveau basal de l'EGFR total et de SCD1 dans les cellules du cancer du sein triple négative

L'EGFR est un oncogène clé dans différents cancers de par sa capacité d'activation de facteurs favorisant le développement tumoral [59]. Un lien entre EGFR et SCD1 a pu être établi dans le cancer du poumon [74]. A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse qu'un tel lien pourrait également exister dans les TNBC. Dès lors, le niveau basal de l'EGFR et de SCD1 a été évalué dans quatre lignées cellulaires humaines de TNBC : MDA-MB231, MDA-MB468, BT549 et HS578T. Les cellules MDA-MB468 sont des cellules qui présentent une amplification du gène de l'EGFR ainsi qu'une surexpression de la protéine EGFR ce qui en fait un bon modèle pour les cas de TNBC surexprimant l'EGFR. Le niveau basal des protéines a été établi par Western Blot. Le Western Blot a permis de montrer une expression de l'EGFR et de SCD1 dans les quatre lignées cellulaires (FIGURE 9).

L'expression de SCD1 n'a pas été détectée dans les lignées MDA-MB231 et MDA-M468 lors du Western Blot réalisé. Cependant, une bande a pu être observée dans les lignées HS578T et BT549.

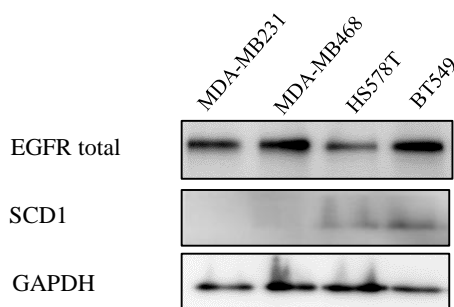


FIGURE 9 - Expression de l'EGFR et de SCD1 dans les cellules MDA-MB231, MDA-MB468, HS578T et BT549 non traitées à l'inhibiteur du protéasome. Le contrôle de charge a été réalisé par mise en évidence de la GAPDH.

Sachant que la protéine SCD1 est une oxygénase dont la stabilité pourrait être régulée par l'oxygène et par le protéasome, nous avons incubé les cellules MDA-MB231 et les cellules MDA-MB468 en présence d'un inhibiteur du protéasome avant de vérifier sa stabilité par Western Blot. Ce traitement a permis de stabiliser la protéine et a permis de détecter son niveau basal dans les deux lignées MDA-MB231 et MDA-MB468 (FIGURE 10).

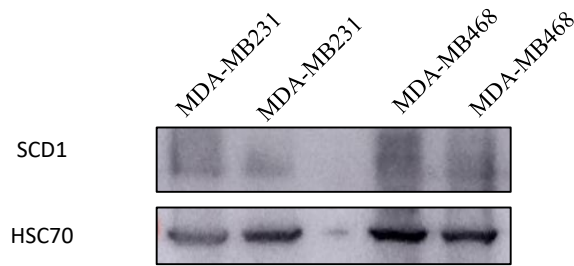


FIGURE 10 - Expression de SCD1 dans les cellules MDA-MB231 et MDA-MB468 traitées à l'inhibiteur du protéasome. Le contrôle de charge a été réalisé par mise en évidence de HSC70.

4.2. Transfection des cellules TNBC par des petits ARN interférents spécifiques contre l'EGFR

Afin d'évaluer l'influence d'EGFR sur l'expression de SCD1, l'expression d'EGFR a été réduite par des petits ARN interférents spécifiques. Chaque lignée a été traitée pendant 24h et 48h. Nous avons évalué le niveau de protéine de SCD1 après inhibition de l'EGFR par WB.

Les transfections ont montré une inhibition de l'EGFR dans les deux lignées cellulaires. L'extinction de l'EGFR a été efficace et l'inhibition est complète après 48h. Cependant, le Western Blot dirigé contre SCD1 n'a pas permis de mettre en évidence SCD1 (FIGURE 11). Par la suite, la même transfection et détection aurait dû être réalisée dans les lignées HS578T et BT549, qui expriment SCD1. De plus, les conditions actuelles ont été réalisées sans inhibiteur du protéasome. Il serait intéressant de réaliser la même expérience en présence de l'inhibiteur du protéasome afin de détecter SCD1.

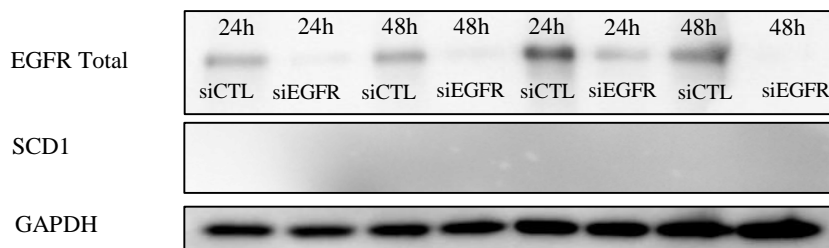


FIGURE 11 – Expression de l'EGFR et de SCD1 dans les lignées cellulaires de MDA-MB231 et MDA-MB468 transfectées par des siRNA pendant 24h et 48h. Le contrôle de charge a été réalisé par mise en évidence de la GAPDH.

4.3. Modulation de SCD1 par l'erlotinib sur les cellules TNBC

L'erlotinib est un anticancéreux qui cible l'activité de l'EGFR. L'objectif est de déterminer le niveau d'expression de SCD1 des cellules traitées à l'erlotinib.

Deux conditions ont été mises en place afin d'observer SCD1. Lors d'une première expérience, les cellules avaient été traitées à l'erlotinib en condition standard c'est-à-dire à l'incubateur 37°C en normoxie (21% d'oxygène). Lors de l'analyse par Western Blot (WB), SCD1 s'est avéré être moins exprimé lorsque les cellules sont traitées avec de l'erlotinib (FIGURE 12). La deuxième condition fut de placer les cellules en hypoxie car SCD1 aurait tendance à être surexprimé en hypoxie (résultat préliminaire de Coline Wery, doctorante au LBTD). Il serait intéressant de reproduire cette expérience dans les mêmes conditions mais en mettant les cellules en hypoxie 1% pendant 24h à 37°C en présence d'Erlotinib.

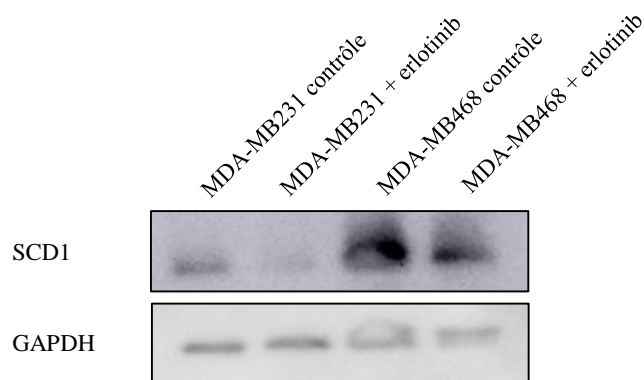


FIGURE 12 - Expression de SCD1 dans les lignées MDA-MB231 et MDA-MB468 en condition de normoxie. La première condition représente les cellules non traitées à l'erlotinib (contrôle) et la deuxième condition représente les cellules traitées à l'erlotinib. Le contrôle de charge a été réalisé par mise en évidence de la GAPDH.

Afin de visualiser SCD1 dans les tumeurs, des cellules MDA-MB231 ont été injectées chez des souris en sous-cutané afin de faire des greffes hétérotopiques. Les souris portent des greffes MDA-MB231 et les animaux sont traités soit avec un placebo soit avec l'erlotinib (FIGURE 14). La quantification par le logiciel Matlab ainsi que l'analyse statistique par le logiciel Prism 7.0 indique que SCD1 est plus exprimé dans les tumeurs des souris traitées à l'erlotinib en comparaison aux tumeurs issues des souris traitées avec le véhicule (placebo) (FIGURE 13 et 14). Le résultat observé à la FIGURE 14 est contradictoire avec la FIGURE 12, *in vitro*. Dans ce contexte, il est important d'indiquer la complexité de l'étude *in vivo* qui tient compte d'un environnement hypoxique causé par le traitement et qui peut induire une surexpression de SCD1. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de EGFR dans des cellules incubées en hypoxie *in vitro*.

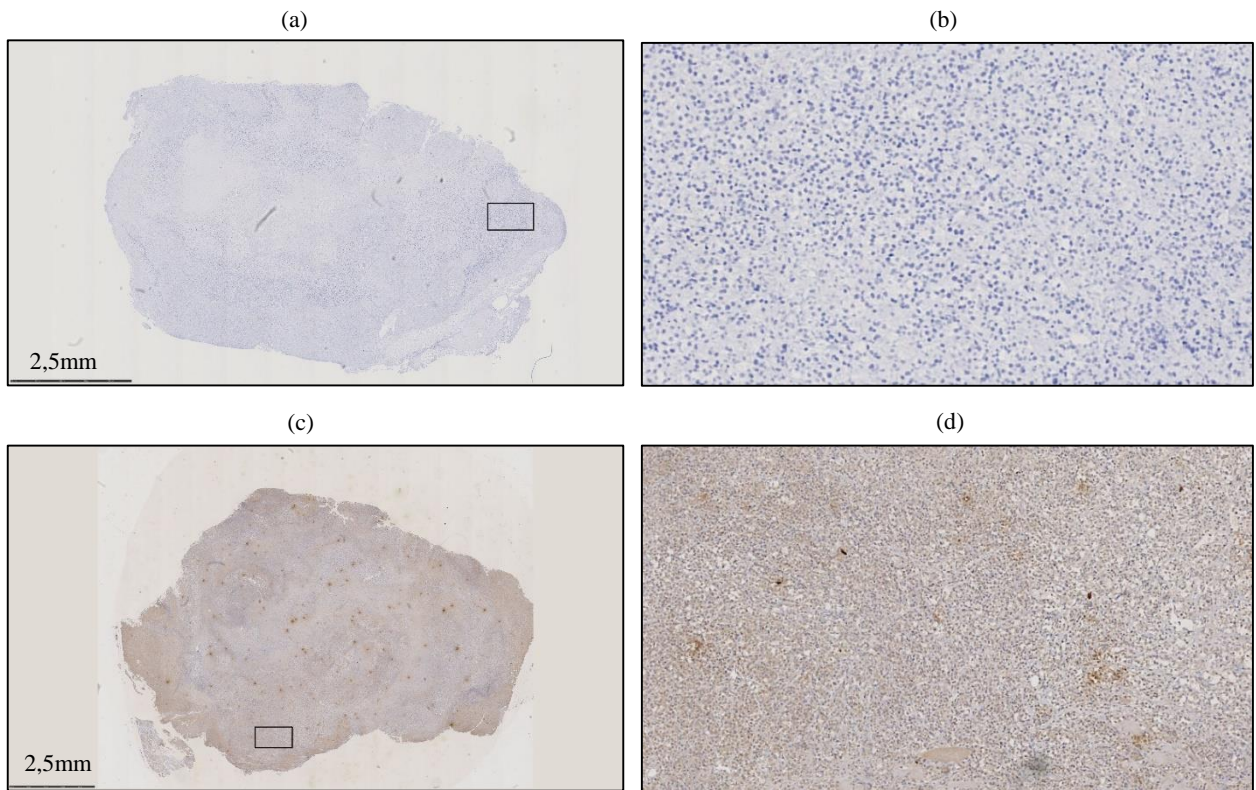


FIGURE 13 – Marquage IHC de SCD1 sur coupe. (a) Coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 chez des souris traitées avec un placebo. (b) Grossissement 200X de la coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 chez des souris traitées avec un placebo. (c) Coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 chez des souris traitées à l'erlotinib (d) Grossissement 200X de la coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 chez des souris traitées à l'erlotinib.

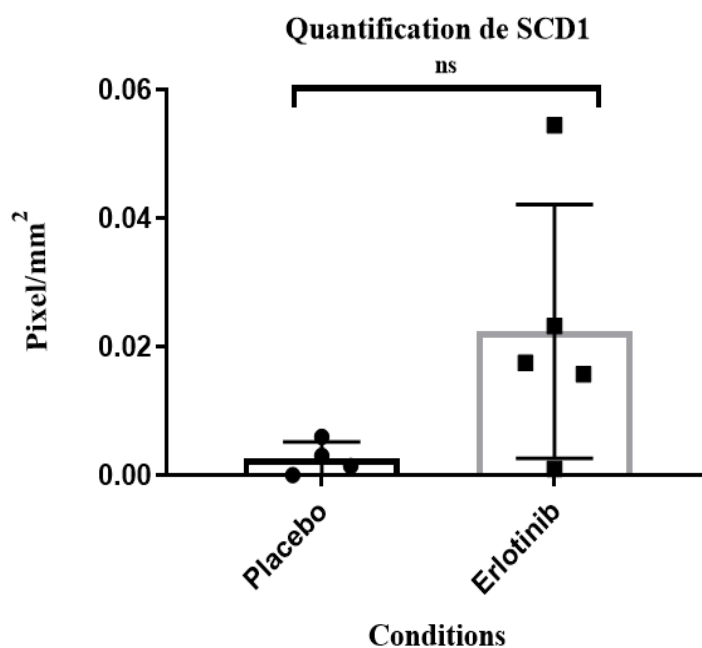


FIGURE 14 – Quantification de densité de marquage par IHC de SCD1 pour les groupes : souris traitées avec un placebo et souris traitées à l'erlotinib. ns, non significatif, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$. $n = 4$.

4.4. Modulation de l'EGFR par inhibition de SCD1 dans les cellules TNBC

Après avoir étudié la modulation de SCD1 par inhibition de l'EGFR, nous avons trouvé pertinent d'étudier l'effet de l'inhibition de SCD1 sur EGFR. Les résultats de la FIGURE 15 montre une production augmentée d'EGFR en présence de l'inhibiteur de SCD1 pour la lignée MDA-MB468. Par contre, un effet opposé de cet inhibiteur est observé sur les cellules MDA-MB231, marqué par une diminution de la production de SCD1.

Afin de mettre en évidence l'EGFR dans des tumeurs de souris soumises à un traitement qui induit l'hypoxie *in vivo*, le sunitinib, un antiangiogène ciblant les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), une immunohistochimie a été réalisée sur des xénogreffes de cellules MDA-MB231, traitées par le véhicule. Une transfection a été réalisée pour inhiber SCD1 (shCTL et shSCD1). Cette transfection a été réalisée au préalable par Géraldine Luis, doctorante au LBTD. Les souris sont traitées soit avec un placebo soit avec le sunitinib. Au sein de chacun des deux groupes, 2 conditions ont été réalisées : un groupe avec le véhicule shCTL et un deuxième groupe avec l'inhibition de SCD1 (shSCD1). Ainsi, on retrouve 4 conditions : (1) un groupe traité avec placebo et shCTL (2) un groupe traité avec placebo et shSCD1 (3) un groupe traité avec le sunitinib et un shCTL et (4) un groupe traité avec le sunitinib et shSCD1 (FIGURE 16). La quantification et analyse statistique nous permet de constater une augmentation de la production d'EGFR dans les tumeurs exprimant shRNA contre SCD1 en condition contrôle et en condition de traitement par le sunitinib (FIGURE 17). Ce résultat indique une régulation négative possible de l'EGFR par SCD1 *in vivo*. Une augmentation d'EGFR dans les tumeurs traitées par le sunitinib suggère une réponse potentielle à l'hypoxie exacerbée par ce traitement.

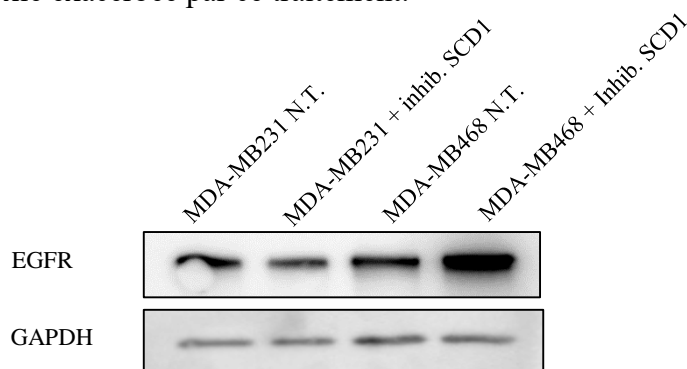


FIGURE 15 - Expression de EGFR dans les lignées MDA-MB231 et MDA-MB468. La première condition représente les cellules non traitées à l'inhibiteur de SCD1 (N.T.) et la deuxième condition représente les cellules traitées à l'inhibiteur de SCD1 (Inhib. SCD1). Le contrôle de charge a été réalisé par mise en évidence de la GAPDH.

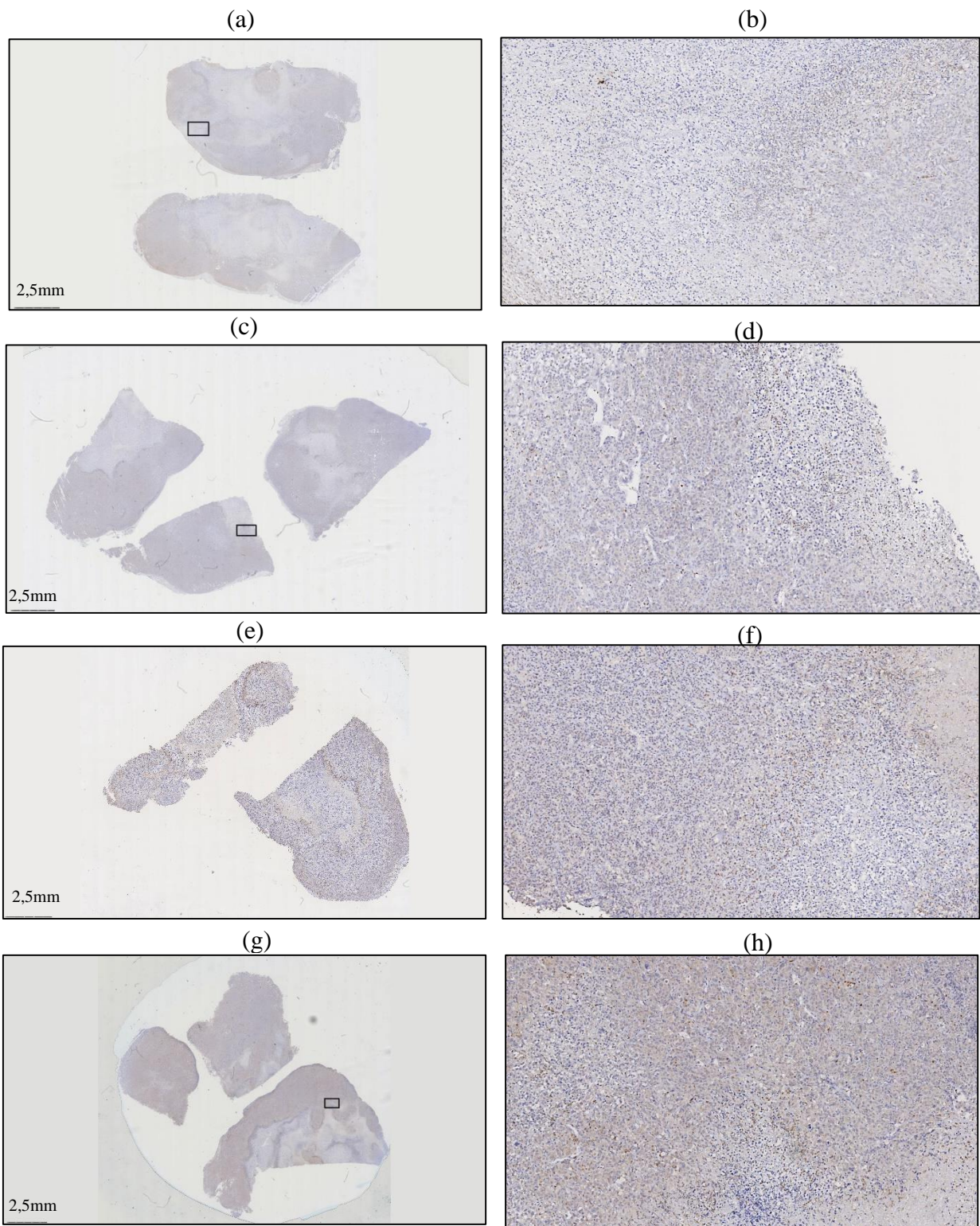


FIGURE 16 – Marquage IHC de EGFR phosphorylé. (a) Coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shCTL chez des souris traitées avec un placebo. (b) Grossissement 200X de la coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shCTL chez des souris traitées avec un placebo. (c) Coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shSCD1 chez des souris traitées avec un placebo. (d) Grossissement 200X de la coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shSCD1 chez des souris traitées avec un placebo. (e) Coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shCTL chez des souris traitées avec le sunitinib (f) Grossissement 200X de la coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shCTL chez des souris traitées avec le sunitinib (g) Coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shSCD1 chez des souris traitées avec le sunitinib (h) Grossissement 200X de la coupe de xénogreffe de cellules MDA-MB231 transfectées avec shSCD1 chez des souris traitées avec le sunitinib.

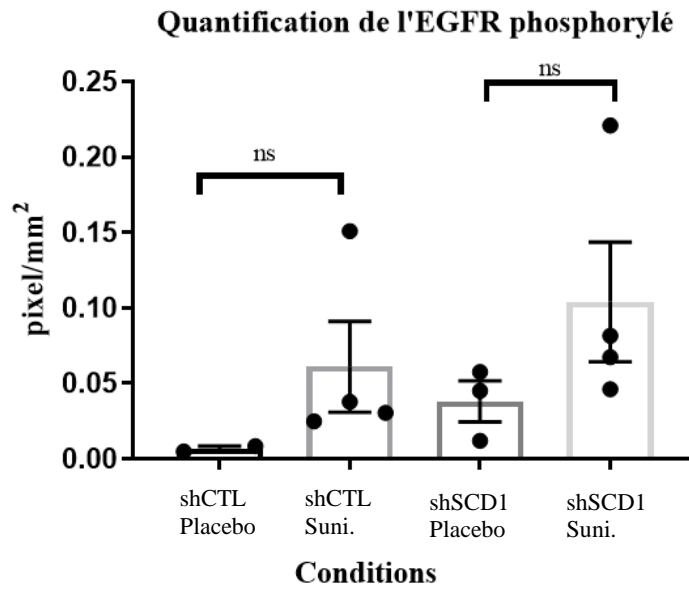


FIGURE 17 - Quantification de densité de marquage par IHC de l'EGFR phosphorylé pour les groupes : souris traitées avec le placebo et le véhicule shCTL (shCTL Placebo), souris traitées à la Sunitinib et le véhicule shCTL (shCTL Sunitinib), souris traitées avec le placebo et inhibition de SCD1 (shSCD1 Placebo), souris traitées avec le sunitinib et inhibition de SCD1 (shSCD1 Sunitinib). ns, non significatif, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$.

5. Discussion et perspectives

5.1. Evaluation du niveau basal de l'EGFR total et de SCD1 dans les cellules du cancer du sein triple négative

Au cours des différents résultats obtenus, nous avons pu constater que SCD1 était exprimé dans les lignées cellulaires de TNBC. Cependant, la mise en évidence de SCD1 nécessite une inhibition du protéasome (FIGURE 9, FIGURE 10). En effet, SCD1 est rapidement dégradé par le protéasome et son temps de demi-vie est d'environ 3h. En inhibant le protéasome, son temps de demi-vie augmente à 6h ce qui laisse plus de temps pour le mettre en évidence avant sa dégradation [113]. Malgré l'inhibition du protéasome, la mise en évidence de SCD1 reste approximative et dépend de la lignée cellulaire utilisée. Une étude de la stabilité de SCD1 dans ces lignées et l'analyse de l'activité des prolyl-hydroxylases (PHD) et des ubiquitinasés, pourrait permettre la mise en évidence d'un mécanisme complet de la stabilité et de l'activité de SCD1 dans les TNBC. SCD1 semble être induit par l'hypoxie, malgré que son activité nécessite la présence de l'oxygène pour induire la transformation des SFA en MUFA. Ce résultat est en accord avec des données du laboratoire démontrant qu'une réponse des cellules cancéreuses à un stress hypoxique est associée à une augmentation de l'expression de nombreux médiateurs lipidiques impliqués dans le stockage et la désaturation des lipides (Luis et Godfroid, 2020, Soumis)

5.2. Modulation de SCD1 par l'erlotinib sur les cellules TNBC

Comme le montrent les données, la détection de SCD1 varie en fonction des conditions de culture des cellules. La détection de SCD1 est différente en fonction de la présence ou non d'oxygène. Ainsi, les cellules MDA-MB231 et les cellules MDA-MB468 ont été traitées par l'erlotinib en normoxie. En normoxie, les cellules MDA-MB231 présentent une expression de SCD1 plus faible que les cellules MDA-MB468 lorsque les cellules ne sont pas traitées par un inhibiteur du protéasome (FIGURE 12). Lorsque les cellules sont traitées avec l'erlotinib, les résultats montrent une diminution d'expression de SCD1 qui feraient également pensé qu'il existe une corrélation entre le niveau d'EGFR et de SCD1. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats obtenus par l'équipe de Zhang J. et al. dans les lignées de cellules du cancer du poumon [74]. Une inhibition d'EGFR par siRNA a bien montré l'efficacité des siRNA utilisés contre l'EGFR mais aucun signal n'a été détecté pour SCD1 (FIGURE 11). Cependant,

il aurait fallu incubé les cellules avec un inhibiteur de protéasome pour mettre en évidence SCD1 et voir l'effet de l'inhibition d'EGFR sur son expression et sur sa stabilité. Ceci n'a pas été possible à refaire pendant cette période particulière.

Néanmoins, lorsque les cellules sont incubées en hypoxie, l'expression de SCD1 semble être modulée d'une façon différente (Résultats préliminaires de Coline Wery, doctorante au LBTD). A partir de ce résultat, il aurait été intéressant de réaliser l'expérience dans laquelle les cellules auraient été mises à l'hypoxie et traitées à l'erlotinib, simultanément. De plus, une comparaison aurait été intéressante grâce aux siRNA ciblant l'EGFR mais en présence de l'inhibiteur du protéasome car les anticorps ciblant SCD1 n'ont pas permis sa mise en évidence en absence de cet inhibiteur (FIGURE 11). De plus, il serait intéressant de cibler l'EGFR phosphorylé sur la tyrosine 1092 (Y1092) car une association clinique existerait entre EGFR phosphorylé Y1092 et SCD1 dans le cancer du poumon [74]. Il serait également intéressant de cibler EGFR total et d'observer leur expression en présence d'erlotinib pour établir un éventuel lien entre la fraction de l'EGFR active et SCD1. Les résultats espérés devraient diminuer l'expression de l'EGFR phosphorylé mais il serait intéressant de voir si son inhibition est complète ou non.

Enfin, lors de l'immunohistochimie en visible, les résultats montrent que SCD1 (FIGURE 14) est moins exprimé sur les coupes de souris traitées avec un placebo en comparaison aux coupes de souris traitées avec l'erlotinib. Ce résultat montre que l'erlotinib induirait une augmentation de SCD1 *in vivo*, ce qui est contradictoire avec le résultat *in vitro*. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que *in vivo*, une hypoxie induite par le traitement à l'erlotinib pourrait être à l'origine de l'augmentation de SCD1 dans les cellules tumorales (FIGURE 13 et 14).

Nous ne pouvons également pas exclure que l'inhibition de l'EGFR dans les lignées de TNBC pourrait permettre l'activation d'une autre voie de signalisation favorisant la surexpression de SCD1, comme un mécanisme d'adaptation de la tumeur au traitement par l'erlotinib *in vivo*. Ainsi celui-ci pourrait continuer à synthétiser des MUFA essentiels au développement de cellules tumorales. Il serait intéressant de voir comment une surexpression de l'EGFR impacterait l'expression de SCD1.

5.3. Modulation de l'EGFR par inhibition de SCD1 sur les cellules TNBC

Les données récoltées à partir d'IHC sur coupes de greffes ont permis de montrer différentes conditions. Au sein du groupe de souris traitées avec un placebo, l'inhibition de SCD1 (shSCD1) montre que l'EGFR phosphorylé est plus exprimé que lorsque SCD1 n'est pas inhibé (shCTL). Cela est également observé au sein du groupe de souris traitées avec le sunitinib. EGFR phosphorylé est plus exprimé lorsque SCD1 est inhibé (shSCD1). Ainsi une observation a pu être mise en évidence : l'EGFR phosphorylé est plus exprimé lorsque SCD1 est inhibé (FIGURE 16 et FIGURE 17).

En comparant les deux groupes de souris traitées à la sunitinib, l'inhibition de SCD1 tend à augmenter l'expression de l'EGFR phosphorylé. Deux conclusions peuvent être amenées quant à ces résultats : (1) SCD1 n'a pas d'influence sur l'EGFR dans les cellules tumorales de cancer du sein triple négative. (2) L'inhibition de SCD1 pourrait activer une voie de signalisation qui permettrait une sur-activation de l'EGFR favorisant la progression tumorale. Dès lors, il serait intéressant de réaliser des western blot et des immunohistochimies sur des voies de signalisation dérivant de SCD1 et de l'EGFR.

Tableau 8 - Tableau récapitulatif des expressions de SCD1 et EGFR en fonction des inhibitions.

	<i>IN VITRO</i>	<i>IN VIVO</i>
Inhibition de EGFR	Expression de SCD1 diminue	Expression de SCD1 augmente
Inhibition de SCD1	MDA-MB231 : Expression de EGFR diminue MDA-MB468 : Expression de EGFR augmente	Expression de EGFR phosphorylé augmente

5.5. Conclusions et perspectives

La voie de signalisation EGFR joue un rôle dans la progression des TNBC. Mon projet de mémoire était donc de caractériser la régulation de l'activité de SCD1 par EGFR ainsi que son mécanisme d'action dans les cellules TNBC. Nos résultats préliminaires *in vitro* ont

identifié un lien entre EGFR et la régulation de SCD1 en normoxie, cependant les données *in vivo* montrent le contraire. Sachant que SCD1 est régulé par l'hypoxie, notre hypothèse de départ n'a pas pu être validée *in vivo*, ce qui exclut un rôle direct de EGFR dans la régulation de SCD1 dans les TNBC.

Nos résultats montrent qu'une inhibition du protéasome conduit à une stabilisation de SCD1. Cette observation originale pourrait être étudiée en profondeur dans la suite de ce travail. Nous étudierons la stabilité de SCD1 dans les lignées de TNBC par l'exploitation de la voie des prolyl-hydroxylases PHD1, 2 ou 3. Leur implication dans l'hydroxylation de SCD1 et son acheminement vers le protéasome sera étudié par l'utilisation de shRNA contre PHD dans les cellules de TNBC. L'effet de la signalisation par EGFR sera exploré dans ces cellules en normoxie. Nous explorerons également l'effet de l'inhibition de EGFR sur la synthèse des MUFA dans les TNBC et étudier le lien entre HIF-1 et SCD1 dans des lignées cellulaires de TNBC.

6. Références

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al., "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, pp. 394-424, 2018.
- [2] N. Harbeck and M. Gnant, "Breast cancer," *The Lancet*, vol. 389, pp. 1134-1150, 2017.
- [3] Siegel RL, Miller KD and Jemal, A, "Cancer statistics, 2018," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, pp. 7-30, 2018.
- [4] Kim K, Son M-Y, Jung C-R, et al. , "EHMT2 is a metastasis regulator in breast cancer.," *Biochemical and biophysical research communications.*, vol. 496, pp. 758-762, 2018.
- [5] Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, et al., "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer.," *Int J Biol Sci.*, vol. 13(11), no. 11, pp. 1387-1397, 2017.
- [6] L. Pearce, "Breast cancer.," *Nursing standard*, vol. 30, p. 15, 2016.
- [7] Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, et al., "BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2," *J BUON*, vol. 23(4), pp. 862-866, 2018.
- [8] Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, et al. , "The spectrum of genetic mutations in breast cancer.," *Asian Pacific journal of cancer prevention.*, vol. 16, pp. 2177-2185, 2015.
- [9] Fentiman IS and D'Arrigo C, "Pathogenesis of breast carcinoma," *International Journal of Clinical Practice*, vol. 58, pp. 35-40, 2004.
- [10] Uscanga-Perales GI, Santuario-Facio SK and Ortiz-López R, "Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity," *Medicina Universitaria*, vol. 18, pp. 105-114, 2016.
- [11] Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, et al., "Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade," *Breast cancer research : BCR*, vol. 12, pp. 207-207, 2010.
- [12] Hoda SA and Kaplan RE, "World Health Organization (WHO) Classification of Breast Tumours, 4th ed," *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 37, pp. 309-310, 2013.
- [13] Vuong D, Simpson PT, Green B, et al. , "Molecular classification of breast cancer," *Virchows Archiv*, vol. 465, pp. 1-14, 2014.
- [14] Elston CW and Ellis IO., "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up," *Histopathology*, vol. 19, p. 403 –10, 1991.
- [15] Bloom H and Richardson W, " Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer.," *Br J Cancer* , vol. 11, p. 359–377 , 1957.
- [16] Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, et al., "Gene expression profiling in breast cancer: Understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 98, pp. 262-272, 2006.
- [17] Elston CW and Ellis IO, "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up," *Histopathology*, vol. 19, pp. 151-152, 9 2002.
- [18] Dai X, Chen A and Bai Z, "Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling," *Scientific reports*, vol. 4, p. 6566, 2014.
- [19] Dai X, Li Y, Bai Z et al., "Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers," *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 14499-, 2015.
- [20] Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al., "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747-752, 2000.
- [21] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R et al., "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 19, pp. 10869-10874, 2001.
- [22] Prat A, Parker JS, Karginova O, et al., "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer," *Breast Cancer Research*, vol. 12, p. 68, 2010.
- [23] Maughan KL, Lutterbie MA and Ham PS, "Treatment of breast cancer," *Am Fam Physician*, vol. 81, no. 11, pp. 1339-1346, 2010.
- [24] Bartsch R, Wenzel C and Steger GG, "Trastuzumab in the management of early and advanced stage breast cancer.," *Biologics*, vol. 1, no. 1, pp. 19-31, 2007.
- [25] Vici P, Colucci G, Gebbia V, et al., "First-Line Treatment With Epirubicin and Vinorelbine in

- Metastatic Breast Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, pp. 2689-2694, 2002.
- [26] Goldhirsch A, Gelber RD and Castiglione M., "Relapse of breast cancer after adjuvant treatment in premenopausal and perimenopausal women: patterns and prognoses.," *J Clin Oncol.*, vol. 6, no. 1, pp. 89-97, 1988.
- [27] P. Van Pham, "Introduction to Breast Cancer," in *Breast Cancer Stem Cells & Therapy Resistance*, Cham, Springer International Publishing, 2015, pp. 1-4.
- [28] Waks AG and Winer EP, "Breast Cancer Treatment: A Review," *JAMA*, vol. 321, pp. 288-300, 2019.
- [29] Joshi H and Press MF., "22 - Molecular Oncology of Breast Cancer," in *The Breast (Fifth Edition)*, Fifth Edition ed., K. I. Bland, E. M. Copeland, V. S. Klimberg and W. J. Gradishar, Eds., Elsevier, 2018, pp. 282 - 307.
- [30] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, et al. , "Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials.," *Lancet*, vol. 378, no. 9793, pp. 771-784, 2011.
- [31] Dowsett M, Forbes JF, Bradley R, et al., "Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials," *The Lancet*, vol. 386, pp. 1341-1352, 2015.
- [32] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones Brian, et al., "Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 353, pp. 1659-1672, 2005.
- [33] Barok M, Joensuu H and Isola J., "Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance.," *Breast Cancer Res.*, vol. 16, no. 2, p. 209, 2014.
- [34] Ahmad A., "Current Updates on Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancers," in *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress*, A. Ahmad, Ed., Cham, Springer International Publishing, 2019, pp. 217-228.
- [35] Ahmad A and Sarkar FH, "Current Understanding of Drug Resistance Mechanisms and Therapeutic Targets in HER2 Overexpressing Breast Cancers," in *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Progress and Prospects*, A. Ahmad, Ed., New York: Springer New York, 2013, pp. 261-274.
- [36] Cardoso F, Bedard PL, Winer EP et al., "International guidelines for management of metastatic breast cancer: combination vs sequential single-agent chemotherapy," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, pp. 1174-1181, 2009.
- [37] Denkert C, Liedtke C, Tutt A et al., "Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies," *The Lancet*, vol. 389, pp. 2430-2442, 2017.
- [38] Jézéquel P, Kerdraon O, Hondermarck Hubert et al., "Identification of three subtypes of triple-negative breast cancer with potential therapeutic implications," *Breast cancer research : BCR*, vol. 21, pp. 65-14, 2019.
- [39] Foulkes WD, Smith IE and Reis-Filho JS, "Triple-Negative Breast Cancer Current Concepts," *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, p. 1938, 2010.
- [40] Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al., "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, pp. 2750-2767, 2011.
- [41] Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, et al., "Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, pp. 5533-5540, 2013.
- [42] Burstein MD et al., "Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, pp. 1688-1698, 2015.
- [43] Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al., "Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 21, pp. 1688-1698, 2015.
- [44] Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, et al. , "Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection," *PLoS one*, vol. 11, no. 6, p. e0157368, 2016.
- [45] Hubalek M, Czech T and Müller H, "Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer," *Breast Care*, vol. 12, pp. 8-14, 2017.
- [46] Cossu-Rocca P, Orrù S, Muroi MR, et al. , "Analysis of PIK3CA mutations and activation pathways in triple negative breast cancer," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 11, p. e0141763, 2015.
- [47] Collignon J, Lousberg L, Schroeder H and Jerusalem G, "Triple-negative breast cancer : treatment challenges and solutions," *Breast Cancer*, pp. 93-107, 2016.
- [48] Lee A and Djamgoz MBA, "Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel

- combination therapies," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 62, pp. 110-122, 2018.
- [49] Giro-Perafita A, Palomer S, Lum DH, et al., "Preclinical Evaluation of Fatty Acid Synthase and EGFR Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer," *Clinical cancer research*, vol. 22, no. 18, pp. 4687-4697, 2016.
- [50] Menendez JA and Lupu R, "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis," *Nature reviews. Cancer*, vol. 7, no. 10, pp. 763-777, 2007.
- [51] Giró-Perafita A, Sarrats A, Pérez-Bueno F, et al., "Fatty acid synthase expression and its association with clinico-histopathological features in triple-negative breast cancer," *Oncotarget*, vol. 8, no. 43, pp. 74391-74405, 2017.
- [52] Kuhajda FP, "Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway," *Cancer research (Chicago, Ill.)*, vol. 66, no. 12, pp. 5977-5980, 2006.
- [53] Kim S, Lee Y and Koo JS, "Differential Expression of Lipid Metabolism-Related Proteins in Different Breast Cancer Subtypes," *PLoS one*, vol. 10, no. 3, p. e0119473, 2015.
- [54] Bernardi R and Gianni L., "Hallmarks of triple negative breast cancer emerging at last," *Cell Res.*, vol. 24, no. 8, pp. 904-905, 2014.
- [55] Semenza GL., "Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 33, no. 4, pp. 207-214, 2012.
- [56] Lin A, Li C, Xing Z, et al., "The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 α signalling in triple-negative breast cancer," *Nature cell biology*, vol. 18, no. 2, pp. 213-224, 2016.
- [57] Schlessinger J., "Receptor tyrosine kinases: Legacy of the first two decades," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 6, no. 3, p. a008912, 2014.
- [58] Tan X, Lambert PF, Rapraeger AC et al., "Stress-Induced EGFR Trafficking: Mechanisms, Functions, and Therapeutic Implications," *Trends in Cell Biology*, vol. 26, no. 5, pp. 352-366, 2016.
- [59] Jones S and Rappoport JZ., "Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 51, pp. 23-28, 2014.
- [60] Sacco AG and Worden FP, "Molecularly targeted therapy for the treatment of head and neck cancer: A review of the ErbB family inhibitors," *OncoTargets and Therapy*, vol. 9, pp. 1927-1943, 2016.
- [61] Pellat A, Vaquero J and Fouassier L., "Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology," *Hepatology*, vol. 67, no. 2, pp. 762-773, 2018.
- [62] Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, et al., "Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor," *Traffic*, vol. 10, no. 8, pp. 1115-1127, 2009.
- [63] Sasaki T, Hiroki K and Yamashita Y, "The Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Metastasis and Microenvironment," *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 546318-8, 2013.
- [64] C. Yewale, D. Baradia, I. Vhora, S. Patil and A. Misra, "Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies," *Biomaterials*, vol. 34, pp. 8690-8707, 2013.
- [65] Nedergaard MK, Hedegaard CJ and Poulsen HS, "Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Solid Tumor Malignancies," *BioDrugs*, vol. 26, no. 2, pp. 83-99, 2012.
- [66] Wong SF, "Cetuximab : an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal," *Clin Ther*, vol. 27, no. 6, pp. 684-694, 2005.
- [67] Sharma SV, Bell DW, Settleman J et al., "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer," *Nat Rev Cancer*, vol. 7, no. 3, pp. 169-181, 2007.
- [68] Baselga J and Arteaga CL., "Critical Update and Emerging Trends in Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 25, pp. 2445-2459, 2005.
- [69] Sohn J, Liu S, Parinyanitikul N, et al., "cMET activation and EGFR-directed therapy resistance in triple-negative breast cancer," *Journal of Cancer*, vol. 5, no. 9, pp. 745-753, 2014.
- [70] Bourdeanu L, Liu E, Brint S, et al., "EGFR Resistance," in *Resistance to Targeted Therapies in Breast Cancer*, J. R. Prosperi, Ed., Cham, Springer International Publishing, 2017, pp. 103-116.
- [71] Mendelsohn J and Baselga J, "Epidermal growth factor receptor targeting in cancer.," *Semin Oncol.*, vol. 33, no. 4, pp. 369-385, 2006.
- [72] Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al., "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy.," *Science*, vol. 304, no. 5676, pp. 1497-1500, 2004.
- [73] Simiczjew A, Dratkiewicz E, Van Troys M, et al., "Combination of EGFR inhibitor lapatinib and

- MET inhibitor foretinib inhibits migration of triple negative breast cancer cell lines," *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 9, p. 335, 2018.
- [74] Zhang J, Song F, Zhao X, et al., "EGFR modulates monounsaturated fatty acid synthesis through phosphorylation of SCD1 in lung cancer.," *Mol Cancer.*, vol. 16, no. 1, p. 127, 2017.
- [75] Cheng C, Geng F, Cheng X and Guo D, "Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer," *Cancer Commun (Lond).*, vol. 38, no. 1, p. 27, 2018.
- [76] Guo D, Bell EH and Chakravarti A, "Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy," *CNS Oncology*, vol. 2, no. 3, pp. 289-299, 2013.
- [77] Saddoughi SA, Song P and Ogretmen B, "Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics.," *Subcell Biochem.*, vol. 49, pp. 413-440, 2008.
- [78] Boyce JA, "Eicosanoids in asthma, allergic inflammation, and host defense.," *Curr Mol Med.*, vol. 8, no. 5, pp. 335-349., 2008.
- [79] Lehner R and Quiroga AD, "Chapter 5 - Fatty Acid Handling in Mammalian Cells," in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*, Sixth Edition ed., N. D. Ridgway and R. S. McLeod, Eds., Boston, Elsevier, 2016, pp. 149-184.
- [80] Bond LM, Miyazaki M, O'Neill LM, et al., "Chapter 6 - Fatty Acid Desaturation and Elongation in Mammals," in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*, Sixth Edition ed., N. D. Ridgway and R. S. McLeod, Eds., Boston, Elsevier, 2016, pp. 185-208.
- [81] Aguilar PS and De Mendoza D, "Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans," *Molecular Microbiology*, vol. 62, no. 6, pp. 1507-1514, 2006.
- [82] Ntambi JM, "Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol.," *J Lipid Res.*, vol. 40, no. 9, pp. 1549-1558, 1999.
- [83] Holder AM, Gonzalez-Angulo AM, Chen H, et al., "High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival in breast cancer patients.," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 137, no. 1, p. 319-327, 2013.
- [84] Enoch HG, Catalá A and Strittmatter P., "Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid.," *J Biol Chem.*, vol. 251, no. 16, pp. 5095-5103, 1976.
- [85] Jiang G, Li Z, Liu F, et al., "Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1.," *J Clin Invest*, vol. 115, no. 4, pp. 1030-1038, 2005.
- [86] Mauvoisin D and Mounier C, "Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression," *Biochimie*, vol. 93, no. 1, pp. 78-86, 2011.
- [87] Koundouros N and Poulogiannis G, "Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer," *British journal of cancer*, vol. 122, no. 1, pp. 4-22, 2019.
- [88] Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, et al. , "Lipogenesis and lipolysis: The pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids," *Progress in lipid research*, vol. 52, no. 4, pp. 585-589, 2013.
- [89] Guo D, Bell EH, Mischel P et al. , "Targeting SREBP-1-driven lipid metabolism to treat cancer.," *Curr Pharm Des.*, vol. 20, no. 15, pp. 2619-2626, 2014.
- [90] Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, et al., "Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia.," *Nature*, vol. 481, no. 7381, pp. 380-384, 2011.
- [91] Guo D, Prins RM, Dang J, et al., "EGFR signaling through an Akt-SREBP-1-dependent, rapamycin-resistant pathway sensitizes glioblastomas to antilipogenic therapy.," *Sci Signal.*, vol. 2, no. 101, p. 82, 2009.
- [92] Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, et al., "PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP.," *Oncogene*, vol. 24, no. 43, pp. 6465-6481, 2005.
- [93] Horton JD, Goldstein JL and Brown MS., "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver.," *J Clin Invest.*, vol. 109, no. 9, pp. 1125-1131, 2002.
- [94] Ran H, Zhu Y, Deng R, et al. , "Stearoyl-CoA desaturase-1 promotes colorectal cancer metastasis in response to glucose by suppressing PTEN," *Journal of experimental & clinical cancer research*, vol. 37, no. 1, p. 54, 2018.
- [95] Nashed M., "Role of stearoyl-coA-desaturase-1 (SCD1) in the activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer cells," New Brunswick, New Jersey, 2011.
- [96] Matsui H, Yokoyama T, Sekiguchi K, et al., "Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) augments saturated fatty acid-induced lipid accumulation and

- inhibits apoptosis in cardiac myocytes.," *PLoS One.*, vol. 7, no. 3, p. e33283., 2012.
- [97] She K, Fang S, Du W, et al., "SCD1 is required for EGFR-targeting cancer therapy of lung cancer via re-activation of EGFR/PI3K/AKT signals.," *Cancer Cell Int.*, vol. 19, p. 103, 2019.
- [98] Lingrand M, Lalonde S, Jutras-Carignan A, et al., "SCD1 activity promotes cell migration via a PLD-mTOR pathway in the MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line.," *Breast Cancer*, vol. 27, no. 4, p. 594–606, 2020.
- [99] Arnold M, Pandeya N, Byrnes G, et al., "Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study.," *Lancet Oncol.*, vol. 16, no. 1, pp. 36-46, 2015.
- [100] Kang C, LeRoith D and Gallagher EJ, "Diabetes, Obesity, and Breast Cancer," *Endocrinology*, vol. Volume 159, no. 11, p. 3801–3812, November 2018.
- [101] Dietze EC, Chavez TA and Seewaldt VL, "Obesity and Triple-Negative Breast Cancer," *Disparities, Controversies, and Biology*, vol. 188, no. 2, pp. 280-290, February, 2018.
- [102] Turkoz FP, Solak M, Petekkaya I, et al., "Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients," *The breast*, vol. 22, no. 3, pp. 344-350, 2013.
- [103] Renehan A, Zwahlen M and Egger M., "Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology.," *Nat Rev Cancer*, vol. 15, no. 8, pp. 484-498, 2015.
- [104] Fortner RT, Katzke V, Kühn T et al. , "Obesity and Breast Cancer," in *Obesity and Cancer*, T. Pischon and K. Nimptsch, Eds., Cham, Springer International Publishing, 2016, pp. 43-65.
- [105] Cleary MP and Grossmann ME, "Obesity and Breast Cancer: The Estrogen Connection.," *Endocrinology*, vol. 150, no. 6, p. 2537–2542, 2009.
- [106] Fallone F, Deudon R, Muller C, et al. , "Breast cancer, obesity and adipose tissue: a high-risk combination," *Med Sci (Paris)*, vol. 34, no. 12, pp. 1079-1086, 2018.
- [107] Mege JL and Capo C, "La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes ?," *Med Sci. (Paris)*, vol. 26, no. 1, pp. 83-88, 2010.
- [108] Bleve A, Consonni FM, Durante B, et al. , "Lipid metabolism and cancer immunotherapy: 2 immunosuppressive myeloid cells at the crossroad," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, 2020.
- [109] Lorincz AM and Sukumar S, "Molecular links between obesity and breast cancer," *Endocrine-related cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 279-292, 2006.
- [110] Brown JM, Chung S, Sawyer JK, et al., "Inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis.," *Circulation*, vol. 118, no. 14, pp. 1467-1475, 2008.
- [111] Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, et al., "Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity.," *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 99, no. 17, pp. 11482-11486, 2002.
- [112] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al., "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.," *Clin Cancer Res.*, vol. 10, no. 16, pp. 5367-5374, 2004.
- [113] Kato H, Sakaki K and Mihara K, "Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase," *Journal of cell science*, vol. 119, pp. 2342-2353, 2006.

