

Exploration des mécanismes impliquant les gouttelettes lipidiques et la stéaroyl- CoA désaturase (SCD) dans la progression du cancer

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade académique de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Au sein de l'Université de Liège
Faculté de Médecine – GIGA-Cancer

Cancer Metabolism and Tumor Microenvironment Group
Dr. Nor Eddine Sounni

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement
Professeur Agnès Noël

Promoteur : Nor Eddine Sounni

Par Coline Wéry
Master en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Année académique 2025-2026



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur **Nor Eddine Sounni**. Merci de m'avoir donné cette chance de travailler dans la recherche, au sein d'un laboratoire formidable et d'une équipe exceptionnelle. Ce projet de thèse s'est avéré être un véritable challenge avec de nombreux défis et des orientations inattendues. Tu m'as permis de développer mon autonomie, mes capacités d'adaptation et de découvrir mes limites. Je dois également te remercier d'avoir, malgré toi, servi d'entremetteur hors pair car sans toi, je n'aurais probablement pas rencontré l'homme merveilleux avec qui je partage ma vie aujourd'hui et fondé cette belle famille que nous construisons. Enfin, je te remercie d'avoir continué à soutenir ce projet même après mon départ, sans cela, je n'aurais potentiellement pas poursuivi ce combat jusqu'à aujourd'hui.

Mes remerciements vont également à **Agnès Noël** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire avec une telle bienveillance. Tu as réussi à créer un laboratoire avec une ambiance extraordinaire où se mêlent travail, collaboration, soutien et un soupçon de folie.

Je remercie la Professeure **Elisabeth Letellier** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Mes remerciements vont également aux membres de mon comité et de jury de thèse : les Professeurs **Franck Dequiedt**, **Agnès Noël**, **Olivier Feron**, **Pierre Close** et **Benaïssa Elmoualij**.

Je tiens également à remercier les assistantes avec qui j'ai eu le plaisir d'encadrer les travaux pratiques pendant deux années. Merci pour votre collaboration, votre disponibilité et la bonne ambiance partagée durant ces séances de travaux pratiques. Ces moments ont été très enrichissants, tant sur le plan humain que pédagogique. Un grand merci en particulier à **Alicia Demanche** avec qui j'ai pu encadrer les travaux pratiques de physiologie, gérer les bugs informatiques et les questions insolites des étudiants.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans la présence et le soutien des membres de l'équipe métabolisme, qui ont largement contribué à faire de ces années de doctorat une expérience

fantastique. Tout d'abord avec les Docteurs **Adrien Godfroid** et **Géraldine Luis** qui m'ont tout appris, les bons et les mauvais plans. Géraldine, tu auras été comme une grande sœur à la fois drôle et bienveillante en ce début d'aventure. Notre Docteur et médecin adoré, **Charles Pottier**. Tu es la gentillesse et sagesse incarnée, toujours prêt à aider et à rassurer. Qui aurait imaginé lorsque tu m'as accueillie mon premier jour, que tu serais 5 ans plus tard, le parrain de ma fille. Sans oublier **Aurélien, Alice, Mohammad, Robin** et **Quentin** qui ont rendu ce travail plus facile et sympathique grâce à leur aide et gentillesse. Enfin, et surtout **Laetitia Montero-Ruiz**. Au-delà d'être une technicienne hors pair, une MacGyver tout terrain et une animatrice de qualité, tu es une collègue extraordinaire. Merci mille fois pour ton aide, ta bienveillance, ton humour et tous ces moments passés à se raconter nos vies ! Je n'aurais pas pu rêver meilleure alliée dans cette aventure.

Un grand merci à notre équipe de super techniciennes **Laetitia, Nathalie, Erika, Sheila, Emilie** et **Isabelle**. Vous êtes le cœur de ce laboratoire et un puits de connaissances infini ! Merci pour toute votre aide, votre disponibilité et votre bonne humeur. En plus de vos compétences techniques, j'ai eu la chance de profiter de vos compétences en pâtisseries et de planquer une éventuelle bouteille d'alcool dans mon bureau au besoin. En bref, cela a été un réel plaisir de travailler à vos côtés et vous avez égayé mes journées.

Merci également à **Fabrice** et **Quentin** avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau, deux bons râleurs mais finalement toujours prêts à aider et bienveillants. Avec respectivement **Géraldine** et **Alice**, je pense que ce bureau a toujours gardé un étrange équilibre entre folie, râlerie et bienveillance.

Je tiens également à remercier **Hélène**, ce laboratoire ne tournerait pas sans ton aide. Merci pour tout le travail administratif ainsi que pour la gestion des commandes, toujours assurés avec efficacité et une chouette humeur.

Je remercie les Docteurs **Christine Gilles, Carine Munaut, Erik Maquoi, Christel Péqueux** et **Agnès Noël** pour leur expertise et leurs remarques constructives tout au long de mon doctorat. Un merci tout particulier à **Christel** qui m'a prise sous son aile pour le poste d'assistante, c'était une expérience enrichissante et mémorable.

Merci également à tous les autres membres du LBTD, pour l'ambiance exceptionnelle qui y règne, faite de blagues et de bienveillance au quotidien. J'ai particulièrement apprécié nos temps de midi où l'on pouvait parler de tout et surtout de n'importe quoi sans qu'on ne sache vraiment comment on en est arrivé sur des sujets aussi étranges.

Enfin, un énorme merci à ma famille qui m'a supportée pendant toutes ces années. **Maman** et **Benoit**, vous m'avez toujours écoutée avec un verre de porto et remotivée quand j'avais une journée difficile. Votre soutien et vos encouragements m'ont véritablement aidée à en arriver là aujourd'hui. Merci à mon **Papy**, même si tu n'es plus là aujourd'hui, cette thèse, je la défends pour toi. Tu m'as toujours poussée à assouvir ma curiosité et à vouloir aller plus loin. Le plus grand des mercis revient naturellement à **Adrien Godfroid**. Tu m'as épaulée et comprise comme personne ne le pouvait. Merci de m'avoir soutenue, écoutée, conseillée, réconfortée et guidée pendant ces années difficiles. Sans toi, j'aurais probablement baissé les bras mais je n'aurais surtout pas notre petite Élise adorée. Rien que pour t'avoir rencontré, je revivrais l'expérience mille fois. Merci.

Table des matières

Liste des abréviations	4
Préface.....	7
Introduction	8
Chapitre 1 : Le Cancer.....	8
Généralités.....	8
Les traitements anticancéreux.....	9
Résistance aux traitements anticancéreux.....	12
Classification, stade (staging) et grade (grading) des cancers.....	13
Caractéristiques du cancer	15
Chapitre 2 : L'hypoxie.....	19
Définition de l'hypoxie	19
Le facteur de transcription Hypoxia Inducible Factor (HIF)	20
Autres voies en réponse à l'hypoxie.....	22
Chapitre 3 : Production d'énergie.....	24
Effet Warburg	24
Cycle de Krebs.....	25
B-oxydation des lipides.....	26
Glutaminolyse	27
Chapitre 4 : Les acides gras.....	28
Synthèse des lipides	28
Rôles des lipides.....	34
Chapitre 5 : Les gouttelettes lipidiques dans le cancer	37
Biogenèse des gouttelettes lipidiques.....	38
Les gouttelettes lipidiques en réponse aux stress dans le cancer.....	41
Les protéines et enzymes partenaires des gouttelettes lipidiques et leur impact sur leur dynamique	43
Les sites de contact membranaire des LD	45
Les fonctions des LD	47
Liens entre la biogenèse des gouttelettes lipidiques et des peroxysomes.....	48
Compartimentalisation spatiale de la synthèse des LD	49
Chapitre 6 : L'acétylation.....	55
Régulation de l'acétylation	56
Les rôles cellulaires de l'acétylation.....	60
Les mécanismes fonctionnels de l'acétylation.....	63
Chapitre 7 : NPM1	67
La structure de NPM1.....	67
Les rôles de NPM1.....	69
NPM1 dans le cancer.....	72
L'acétylation de NPM1	73
Objectifs de thèse	75
Étude de l'importance de PLIN2 dans la formation des gouttelettes lipidiques en hypoxie et dans la progression tumorale	75
Étude du rôle de SCD dans la survie et la progression tumorale au-delà de sa fonction de désaturase	76
Étude de l'impact du métabolisme des lipides sur l'acétylation des protéines et ses conséquences.....	76
Résultats	78
Publication.....	79
Inhibition of SCD1 sensitizes cancer cells to histone deacetylase inhibitors.....	104

Supplementary data file	134
Discussion et perspectives	151
Régulation des gouttelettes lipidiques (LDs) par le stress hypoxique	151
Interaction entre PLIN2 et SCD1 et rôle dans la formation des LDs	152
Rôle de PLIN2 dans l'acétylation des protéines non histones.....	155
Rôle de SCD1 dans la désacétylation des protéines non histones	156
Régulation de la stabilité de NPM1 par SCD1	157
L'inhibition de SCD1 augmente la sensibilité des tumeurs aux inhibiteurs des HDAC	160
Conclusion.....	163
Bibliographie	166
Résumé	184
Abstract	185

Liste des abréviations

ACC : Acétyl-CoA Carboxylase
ACLY : ATP Citrate Lyase
ACSS2 : Acétyl-CoA Synthétase 2
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AKT : Protéine Kinase B
AML : *Acute Myeloid Leukemia*
AMPK : *AMP-Activated Protein Kinase*
ARN : Acide Ribonucléique
ATGL : Adipose Triglycéride Lipase
ATP : Adénosine Triphosphate
CA : *Carbonic Anhydrase*
CAA : *Cancer-Associated Adipocytes*
CAF : *Cancer-Associated Fibroblasts*
CBP : *CREB-Binding Protein*
CD36 : *Cluster of Differentiation 36*
CMA : *Chaperone-Mediated Autophagy*
CPT : Carnitine Palmitoyltransférase
CREB : *Cyclic-AMP Response Element Binding*
CTD : Domaine C-terminal
DAG : Diacylglycérol
DGAT : Diacylglycérol O-acyltransférase
EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*
EMT : Transition Épithélio-Mésenchymateuse
ER : *Endoplasmic Reticulum* (Réticulum endoplasmique)
FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide
FAO : *Fatty Acid Oxidation*
FASN : *Fatty Acid Synthase*
FIH : Facteur Inhibiteur d'HIF
GADPH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

GLUT : *Glucose Transporter*

GPAT : Glycérol-3-Phosphate Acyltransférase

GSH : Glutathion

GTP : Guanosine Triphosphate

HAT : Histone Acétyltransférase

HDAC : Histone Désacétylase

HIF : *Hypoxia-Inducible Factor*

HRE : *Hypoxia Response Element*

HSC70 : *Heat Shock Cognate 70*

IDH2 : Isocitrate Déshydrogénase 2

IDR : *Intrinsically Disordered Regions*

IKBA : *NFKB Inhibitor Alpha*

KAT : Lysine Acétyltransférase

KDAC : Lysine Désacétylase

KO : *Knockout*

LD : *Lipid Droplet* (Gouttelettes lipidiques)

LDL : *Low-Density Lipoprotein*

LDH(A) : Lactate Déshydrogénase

MDM2 : *Mouse Double Minute 2 Homolog*

mTORC : *mammalian Target of Rapamycin Complex*

MUFA : *Mono-unsaturated Fatty Acid*

Myc : *Myelocytomatosis Oncogene*

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène

NER : *Nucleotide Excision Repair*

NES : *Nuclear Export Signal*

NF-KB : *Nuclear Factor Kappa B*

NHEJ : *Non-Homologous End Joining*

NoLS : *Nucleolar Localization Signal*

NPM1 : Nucléophosmine

p300 : *E1A-Associated Protein p300*

p53 : *Tumor Protein p53*

PC : Phosphatidylcholine
PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*
PDH : Pyruvate Déshydrogénase
PDK : Pyruvate Déshydrogénase Kinase
PHD : *Prolyl-Hydroxylase Domain protein*
PI : Phosphatidylinositol
PLIN : Périlipine
PPARgamma : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*
PPV : Pré-peroxysomal vésicule
PS : Phosphatidylsérine
PUFA : *Poly-unsaturated Fatty Acid*
pVHL : *Von Hippel-Lindau tumor suppressor*
RE : Réticulum endoplasmique
ROS : *Reactive Oxygen Species*
SCD : Stéaroyl-CoA Désaturase
SE : Esters de stérols
SFA : *Saturated Fatty Acid*
SIRT : Sirtuine
SOD : Superoxyde Dismutase
SREBP : *Sterol Regulatory Element Binding Protein*
TAG : Triacylglycéride
TIP60 : *Tat-Interactive Protein 60 kDa*
UPR : *Unfolded Protein Response*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

Préface

L'introduction de cette thèse se compose de 8 chapitres présentant d'abord quelques généralités concernant les cancers, leurs caractéristiques et les différents traitements disponibles ainsi que des résistances connues. Le microenvironnement tumoral est ensuite décrit de manière générale avant de passer sur un chapitre discutant plus en détail la problématique de l'hypoxie dans les cancers. Nous détaillons plus amplement les acides gras en insistant sur le stockage des lipides et leurs utilisations. Les gouttelettes lipidiques sont ensuite décrites pour discuter leur biogenèse, leurs partenaires protéiques, leurs fonctions et leurs interactions. Le chapitre suivant se concentre sur la modification post-traductionnelle transitoire qu'est l'acétylation, en abordant sa régulation, ses rôles et ses mécanismes fonctionnels. Le dernier chapitre concerne la nucléophosmine (NPM1), une protéine multifonctionnelle, au sujet de sa structure, de ses nombreux rôles et des effets de son acétylation, notamment dans les cancers.

La présentation des objectifs est suivie des résultats regroupés dans un papier actuellement soumis. Ce papier reprend 3 axes principaux : (1) une étude des effets de l'hypoxie sur l'expression de la Périlipine 2 (PLIN2) et de la Stéaroyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) et leurs conséquences sur la prolifération tumorale in vitro et in vivo ainsi que l'effet de l'inhibition de PLIN2 sur l'oxydation des acides gras ; (2) une étude de l'inhibition de PLIN2 et SCD1 sur la synthèse des lipides et l'acétylation des protéines et s'intéressant aux interactions exercées par SCD1 sur NPM1 et l'HDAC2 et (3) une étude de l'effet combiné d'une inhibition de SCD1 et des désacétylases dans la progression tumorale. Des résultats supplémentaires sont décrits dans les *Supplemental data* du papier où l'on peut retrouver une étude sur la relation entre PLIN2 et SCD1, l'expression de marqueurs de mort cellulaire dans des tumeurs en absence de PLIN2 ou SCD1 ainsi que des informations supplémentaires sur les résultats des analyses des acétylomes.

Ce manuscrit se termine par une discussion, des perspectives et une conclusion du travail.

Je vous souhaite d'avance une agréable lecture.

Introduction

Chapitre 1 : Le Cancer

Généralités

L'appellation « cancer » nous vient d'Hippocrate (400 av. J-C) qui a comparé l'aspect de tumeurs du sein avec la forme d'un crabe, dit cancer en latin.

Les cancers représentent l'une des causes majeures de mortalité, en étant notamment responsables de près de 10 millions de décès dans le monde en 2020. Ils constituent en réalité un large groupe de maladies caractérisées par une propagation non contrôlée de cellules anormales, dites tumorales. Ces cellules peuvent survenir de diverses façons au cours du temps. Elles ont généralement subi plusieurs lésions successives les conduisant à échapper aux différents mécanismes de contrôle de l'organisme. Ces lésions peuvent provenir de causes externes comme d'autres maladies, le mode de vie de l'individu ou l'environnement mais des causes internes sont également à considérer. Certaines mutations génétiques sont connues pour augmenter le risque de développer un cancer et se transmettent donc de génération en génération sans pour autant déclencher la maladie¹. Les processus liés au dysfonctionnement cellulaire sont causés par une accumulation d'erreurs lors de la réplication de l'ADN. L'absence de mécanismes de réparation peut altérer le contrôle de la prolifération cellulaire, conduisant à une division anarchique. Ces cellules cancéreuses forment une tumeur qui, en plus de facteurs liés au microenvironnement comme l'immunité, peut évoluer vers un phénotype agressif, avec l'acquisition de caractéristiques migratoires et invasives, entraînant une dissémination vers d'autres organes^{2,3}.

L'Organisation Mondiale de la Santé nous informe que les 3 cancers les plus courants en 2022 étaient les cancers du poumon, du sein et colorectal mais que ceux qui sont responsables du plus grand nombre de décès sont les cancers du poumon, colorectal et du foie⁴.

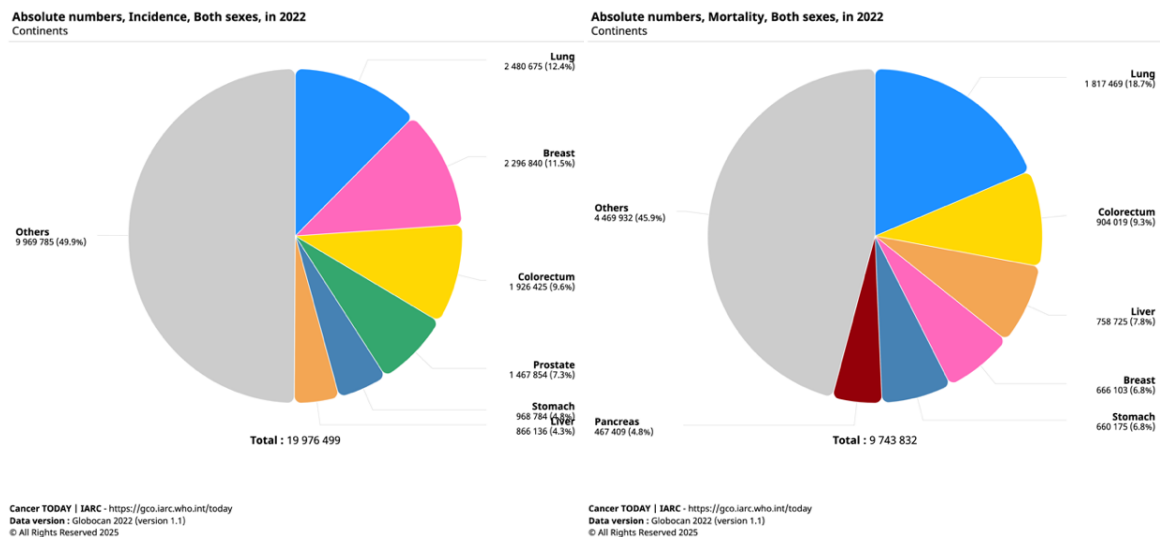


Figure 1 : Pie charts représentant la proportion des différents cancers (à gauche) et de leur mortalité (à droite) dans la population mondiale. International Agency for Research on Cancer (WHO) ⁴.

Les traitements anticancéreux

Il existe désormais de nombreux traitements possibles pour combattre les différents cancers. Ces derniers peuvent se retrouver dans 5 catégories : la chirurgie, les chimiothérapies, les radiothérapies, les thérapies ciblées et l'immunothérapie. De plus en plus de molécules et de combinaisons potentielles apparaissent chaque année.

La chirurgie : Elle consiste à retirer la tumeur ainsi que certains tissus adjacents. Elle peut être curative, lorsque le cancer est limité à la tumeur et n'a pas encore formé de métastases. Il existe également la chirurgie palliative qui sert principalement à ralentir la progression du cancer et à améliorer la qualité de vie du patient. La chirurgie est régulièrement combinée à d'autres traitements, soit avant ou après, afin de réduire la taille de la tumeur ou de détruire les cellules cancéreuses potentiellement encore présentes (la maladie résiduelle). Le traitement par chirurgie n'est cependant pas toujours possible si la tumeur est trop grosse, trop petite ou encore si l'état général ne le permet pas. Toutefois, la chirurgie pourrait exposer le tissu à une hypoxie sévère et à un stress mécanique, conduisant à une dérégulation des marqueurs tumoraux (cancer hallmarks) dans la tumeur primaire ainsi que dans le tissu normal adjacent, comme cela a été rapporté dans différents cancers ⁵. D'autres traitements ont donc été mis en place pour pallier, dans la mesure du possible, à ces problèmes.

La chimiothérapie : Il s'agit d'un traitement systémique qui consiste en l'administration de composés chimiques ralentissant ou bloquant la croissance tumorale. Il existe 4 grandes familles de médicaments de chimiothérapie : les antimétabolites (ex : gemcitabine), les agents alkylants (ex : cisplatine), les modificateurs de l'ADN (ex : doxorubicine) et les poisons du fuseau (ex : paclitaxel) ⁶. Elle peut être appliquée seule ou en combinaison avec d'autres traitements comme la chirurgie ou la radiothérapie. Le caractère systémique de ce traitement est connu pour atteindre non seulement les cellules cancéreuses mais également les cellules saines de l'organisme, entraînant ainsi de nombreux effets secondaires indésirables.

La radiothérapie : Ce traitement utilise des rayonnements ionisants de haute énergie afin d'endommager l'ADN et ainsi empêcher la multiplication des cellules cancéreuses ⁷. À nouveau, ce traitement affecte les cellules saines et induit donc des effets secondaires indésirables. Cependant, contrairement à la chimiothérapie, la radiothérapie peut être plus localisée. Elle est également fréquemment utilisée en combinaison avec d'autres traitements comme la chimiothérapie ou la chirurgie. La radiothérapie peut être administrée de manière externe avec des machines qui projettent des faisceaux à travers le corps ou elle peut être interne via l'utilisation d'un implant placé à proximité du cancer. Enfin, il existe également la radiothérapie par radio-isotopes qui sont administrés oralement ou par injection et qui circulent ensuite dans le sang.

L'hormonothérapie : C'est une forme de thérapie visant à bloquer l'action ou la production des hormones spécifiques qui stimulent la croissance de certains cancers hormonosensibles ⁸. Cette thérapie est fréquente dans certains cancers du sein et de la prostate car les cellules cancéreuses voient leur croissance stimulée par des hormones. Dans le contexte du cancer du sein, on reconnaît des tumeurs positives aux œstrogènes et/ou à la progestérone. Ces tumeurs peuvent être traitées par hormonothérapie de 3 manières différentes : l'arrêt de l'activité ovarienne, le blocage des récepteurs aux œstrogènes (agents anti-estrogènes modulant la réponse ou dégradant les récepteurs) et l'inhibition de l'aromatase. Dans le cadre du cancer de la prostate, on agit plutôt sur les anti-androgènes ou sur une castration pour bloquer la production d'hormone masculine. L'hormonothérapie peut donc être utilisée pour combattre certains cancers dépendants de ces hormones et permet ainsi d'avoir un traitement un peu

plus ciblé que d'autres comme la chimiothérapie. Elle comporte cependant des effets secondaires et n'est malheureusement pas toujours utilisable puisqu'elle dépend d'une dépendance des cellules cancéreuses.

L'immunothérapie : C'est le traitement ciblé le plus révolutionnaire de ces dernières décennies, il consiste à réactiver le système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Pour cela, il existe plusieurs techniques. Il existe des anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses de manière à signaler leur présence au système immunitaire. Cette technique ne fonctionne que si la tumeur présente le récepteur ou l'antigène reconnu par l'anticorps. On l'utilise régulièrement dans le traitement de lymphomes en ciblant des marqueurs lymphocytaires tels que CD20. On trouve aussi les inhibiteurs de checkpoints immunitaires, ils vont ainsi empêcher les cellules cancéreuses de présenter, par exemple, la protéine PD-L1, exprimée par les cellules de notre corps pour éviter que le système immunitaire n'attaque son propre organisme. Ainsi, l'inhibition du système immunitaire provoquée par la tumeur est annulée et il peut donc s'attaquer aux cellules cancéreuses. Cette méthode est envisageable pour de nombreux types de cancer car les interactions ciblées par ces immunomodulateurs sont relativement communes. D'autres formes d'immunothérapie consistent à prélever les cellules immunitaires, les activer et les amplifier avant de les réinjecter au patient, on les appelle les cellules CAR-T. On retrouve cette technique majoritairement pour traiter des leucémies et des lymphomes mais elle ne montre pas de résultats encourageants face aux tumeurs solides. L'utilisation de cytokines pour renforcer le système immunitaire de manière générale est également utilisée mais présente des inconvénients non négligeables tels que de la toxicité, une réponse faible et une spécificité relative. Des vaccins thérapeutiques ont également pour vocation de stimuler le système immunitaire à l'encontre des cellules tumorales mais cette approche est encore majoritairement en développement ⁹.

Les thérapies ciblées : Entre autres, l'hormonothérapie et l'immunothérapie citées plus haut. De nombreuses thérapies ciblées visant des cibles spécifiques sont actuellement utilisées en clinique ou en cours de développement. Ces traitements ont pour but d'agir sur des molécules impliquées dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses. La thérapie ciblée inhibant HER2, notamment avec Herceptin, a prouvé son efficacité dans le cancer du sein HER2 positif.

Les thérapies ciblées utilisent des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines de surface (anti-VEGFR, anti-HER2, etc.) ou ciblant les ligands des récepteurs, comme le VEGF. Elles comprennent également de petites molécules inhibitrices du domaine tyrosine kinase des récepteurs membranaires, telles que le lapatinib, inhibant HER2/EGFR, ou le sunitinib, inhibant VEGFR2 ¹⁰. Une technique tuant directement les cellules cancéreuses utilise des inducteurs de l'apoptose pour la déclencher et parfois re-sensibiliser ces cellules aux chimiothérapies ¹¹. Ces thérapies présentent également des effets secondaires considérables mais restent malgré tout plus spécifiques que la chimiothérapie du fait de leur action ciblée.

Résistance aux traitements anticancéreux

La résistance aux traitements anticancéreux représente l'un des plus gros challenges auxquels la recherche contre le cancer fait face. Ce phénomène, qui peut être intrinsèque comme acquis, limite grandement l'efficacité de nombreuses thérapies anticancéreuses puisqu'il peut survenir dans tous les types de tumeurs et pour tout type de traitement. De nombreux mécanismes moléculaires permettent à la résistance aux traitements de se mettre en place. Parmi eux, on retrouve l'influence de la reprogrammation métabolique puisque les cellules cancéreuses présentent fréquemment une grande flexibilité métabolique provenant de leur capacité à utiliser différents substrats ou à les métaboliser différemment ¹². À titre d'exemples, on peut retrouver comme mécanismes, l'utilisation du pyruvate de par son rôle dans la glycolyse et le métabolisme oxydatif ¹³ ou encore l'accumulation de gouttelettes lipidiques pouvant ensuite servir à la phosphorylation oxydative. Le microenvironnement est également un facteur clé du développement des résistances aux thérapies, que ce soit par le biais des cellules présentes à proximité des cellules tumorales ou par les conditions physico-chimiques qui le constituent. Les cellules cancéreuses peuvent soit entrer en compétition avec les cellules saines de leur environnement soit entrer en collaboration avec ces cellules en les influençant pour pouvoir continuer leur progression (ex : CAF et Cancer Associated Adipocytes). Lorsque l'on considère les principaux paramètres physico-chimiques du microenvironnement impliqués dans le développement cancéreux, on retrouve l'hypoxie, l'acidose et le stress oxydatif ¹⁴. Concernant l'hypoxie, elle est responsable de nombreuses adaptations favorisant la progression cancéreuse en promouvant l'angiogenèse, la reprogrammation métabolique ainsi que l'invasion cancéreuse par le biais du facteur de

transcription HIF1. Certaines des voies activées par ce facteur ont montré une implication dans plusieurs mécanismes de résistance aux traitements. Un pH extracellulaire acide va encourager la migration, l'échappement à l'apoptose et des modifications épigénétiques favorables aux cellules malignes. L'acidose tumorale va accentuer la glycolyse au sein des cellules tumorales, désorganiser la formation de vaisseaux sanguins et lymphatiques et perturber la respiration mitochondriale, favorisant l'apparition de résistances ¹⁵. L'homéostasie rédox est également un facteur clé du microenvironnement car elle impacte de nombreuses fonctions physiologiques. En effet, tout est une question d'équilibre et le stress oxydatif peut s'avérer à double tranchant. La production de ROS qui en découle aide à la progression et au développement cancéreux, à moins d'atteindre un niveau trop élevé qui peut finir par détruire les cellules. Ainsi, les traitements anticancéreux jouant sur le stress oxydatif peuvent s'avérer inefficaces lorsque la production de ROS n'est pas suffisante pour tuer directement les cellules et va, au contraire, induire un seuil de tolérance plus important au sein de ces cellules, les rendant plus solides face au stress oxydatif ¹⁶. Un autre aspect de la résistance au traitement est le dérèglement des voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie cellulaire. À titre d'exemple, on retrouve la voie PI3K/AKT/mTOR affectant le métabolisme du glucose et favorisant ainsi l'adaptation des cellules cancéreuses à des conditions de stress telles que celles engendrées par la chimiothérapie.

Classification, stade (staging) et grade (grading) des cancers

La classification désigne le système utilisé pour organiser les types de cancers en fonction de leur origine (tissu ou organe d'origine) et de leurs caractéristiques biologiques. Elle se fait majoritairement par examen anatomo-pathologique. Cet examen consiste en l'observation microscopique d'une biopsie de tumeur et permet de déterminer s'il s'agit d'une tumeur maligne ou non, son type ainsi que son grade.

Le stade (staging) évalue l'étendue du cancer dans le corps, c'est-à-dire sa taille, son extension locale et la présence ou non de métastases. Il détermine la gravité de la maladie et guide les médecins vers des traitements adaptés. Le système le plus utilisé pour définir le stade est la classification TNM (T : Taille et extension de la tumeur primaire ; N : Atteinte des ganglions lymphatiques ; M : Présence ou absence de métastases à distance). Ces informations

permettent d'établir un pronostic du patient face au cancer. La partie T concernant la tumeur tient compte de sa taille et de son invasion de l'organe ou du tissu avoisinant. Plus sa valeur augmente, plus la tumeur est grosse et/ou invasive. Le facteur N indique si le cancer a atteint un ou plusieurs ganglions lymphatiques et tient également compte de la mesure dans laquelle ceux-ci sont infiltrés. Une valeur NO indique qu'aucun ganglion ne montre de signe d'infiltration par des cellules cancéreuses. Le facteur M informe sur l'état métastatique de la maladie, il est de zéro s'il n'y a pas de métastase détectée et de 1 s'il y en a. D'autres informations peuvent être fournies par des lettres minuscules qui peuvent indiquer le type de cancer ou leur localisation.

Le TNM peut ensuite être synthétisé en stades (I à IV, parfois subdivisés en sous-stades comme IIIA, IIIB). À titre d'exemple le Stade I est utilisé pour désigner une tumeur localisée, alors que le Stade IV est souvent utilisé pour indiquer la présence de métastases à distance.

Le grade (grading) évalue l'apparence des cellules cancéreuses au microscope et leur degré de différenciation par rapport aux cellules normales. Il permet d'évaluer l'agressivité du cancer et sa vitesse probable de croissance. Un cancer de bas grade (grade 1) se compose de cellules différenciées qui ressemblent encore aux cellules normales, le tissu reste structuré et ces cellules cancéreuses progressent relativement lentement. Dans le cancer de haut grade (grade 3), les cellules sont peu différenciées ou indifférenciées, et possèdent une croissance rapide.

Le site histologique correspond au tissu d'origine de la tumeur et va influencer son nom. La majorité des tumeurs proviennent du tissu épithélial et sont appelés des carcinomes. En fonction de la nature du tissu épithélial, ce nom peut être adapté. Dans le cas d'une tumeur développée dans du tissu épithélial glandulaire, on parle d'un adénocarcinome. C'est notamment le type de tumeur que l'on retrouve dans les cancers du sein, de la prostate, des ovaires, des poumons et bien d'autres. Les sarcomes proviennent du tissu conjonctif et notamment musculo-squelettique. Ils sont plus rares et se retrouvent notamment dans les cancers des os. Les lymphomes sont des cancers provenant des cellules immunitaires et sont majoritairement localisés dans les ganglions. Les leucémies proviennent de cellules de la moelle osseuse, tout comme les myélomes. La différence se situe dans le type de cellule de moelle (blastés et plasmocytes, respectivement) ainsi que dans la localisation même de la

maladie puisque la leucémie se retrouve dans le sang tandis que les myélomes restent dans la moelle.

Caractéristiques du cancer

Les caractéristiques des cancers décrites par Hanahan et Weinberg désignent des capacités acquises par les cellules cancéreuses qui permettent leur survie et prolifération. Hanahan et Weinberg ont d'abord décrit 6 caractéristiques avant de les augmenter au nombre de 8¹⁷. Ces 8 caractéristiques sont compatibles avec un grand nombre de cancers et comprennent :

- Maintien d'une signalisation de prolifération
- Évasion aux suppresseurs de croissance
- Résistance à la mort cellulaire
- Immortalité répliative
- Induction de l'angiogenèse
- Activation de l'invasion et de la formation de métastases
- Reprogrammation du métabolisme cellulaire
- Évasion au système immunitaire

Récemment, Hanahan a rajouté à ces caractéristiques des cancers, des **caractéristiques permissives**¹⁸. Ces dernières comprennent le **microenvironnement tumoral**, l'instabilité du génome et l'inflammation pro-tumorale auxquelles il rajoute la plasticité phénotypique, la reprogrammation épigénétique, le microbiome polymorphique et les cellules en sénescence.

Le maintien de la signalisation de prolifération est un facteur essentiel des cellules cancéreuses. Les cellules normales voient leur prolifération strictement régulée par la production de facteurs de croissance et de leurs récepteurs associés. Cette régulation assure l'homéostasie cellulaire et par conséquent, le maintien du tissu et de son architecture. Les cellules cancéreuses dérégulent ces signaux pour permettre la croissance et les divisions cellulaires. Ce maintien de la signalisation survient de diverses manières. Certaines mutations permettent l'activation continue de ces signaux tandis que d'autres agissent sur la suppression de leur inhibition. Comme par exemple, une altération des voies de transduction en aval de

l'activation du récepteur, comme la voie RAS/MAPK, empêchant ainsi l'arrêt de la croissance

19.

L'évasion aux supprimeurs de tumeur est principalement connue pour 2 gènes, celui du rétinoblastome (RB) et celui de TP53. Les protéines qui en résultent jouent un rôle de surveillance afin d'éviter la propagation de cellules anormales en causant leur mort avant qu'elles ne puissent proliférer. De manière générale, RB est dépendant de signaux extracellulaires tandis que TP53 est dépendant de signaux intracellulaires. Leur but est de bloquer la division cellulaire si les circonstances ne sont pas favorables. Par exemple, des erreurs dans le génome, des stress, des problèmes d'approvisionnement en glucose ou en oxygène vont causer l'arrêt du cycle cellulaire et induire l'apoptose. De nombreux cancers présentent des mutations dans ces protéines pour pouvoir échapper à cette surveillance et ainsi, les cellules cancéreuses peuvent continuer leur prolifération ²⁰.

La résistance à la mort cellulaire survient par la perte ou le contournement des voies conduisant à l'apoptose de la cellule. Ces voies ont pour but d'induire l'apoptose en cas de dommages faits à la cellule ou dans les cas où l'environnement extracellulaire ne serait pas convenable. Cette résistance à la mort se joue également par la dérégulation de l'autophagie. Elle peut soit participer à la progression cancéreuse en aidant la cellule à compenser des carences en nutriments mais peut aussi tuer les cellules cancéreuses. La mort cellulaire par nécrose, contrairement à l'apoptose, va envoyer un signal pro-inflammatoire qui va recruter des cellules du système immunitaire. Ces dernières peuvent favoriser l'angiogenèse et la prolifération des cellules cancéreuses annexes.

L'immortalité répliquative permet aux cellules cancéreuses de ne pas rentrer en sénescence ou de mourir comme les cellules normales. Cela est permis par l'expression de la télomérase qui va rallonger les télomères après la division cellulaire. Dans des cellules normales, la télomérase est très peu exprimée afin que les télomères s'érodent jusqu'à induction de sénescence ou d'apoptose. La combinaison d'une surexpression de la télomérase, associée à une répression des mécanismes induisant la sénescence fournit aux cellules cancéreuses un moyen d'assurer une immortalité leur permettant de se répliquer à l'infini.

L'induction de l'angiogenèse est un facteur important de la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses ont besoin d'oxygène et de nutriments, tout comme elles ont besoin d'évacuer les déchets. Au plus la tumeur grossit, au plus les cellules cancéreuses se retrouvent en situation de stress et nécessitent donc l'innervation de vaisseaux sanguins dans la tumeur. Les cellules cancéreuses excrètent donc des molécules pro-angiogènes très tôt lors de la formation de la tumeur, favorisant leur approvisionnement et assurant leur survie.

L'activation de l'invasion et la formation de métastases commencent par une invasion locale des cellules cancéreuses qui s'étendent au sein de leur organe de naissance. Elle est suivie d'une intravasation vers des vaisseaux sanguins ou lymphatiques leur permettant de transiter parmi ceux-ci et de coloniser par extravasation de nouveaux organes. Ce changement d'interactions intercellulaires est caractérisé par une transition épithélio-mésenchymateuse pendant laquelle les cellules normales, interagissant avec leurs voisines par des jonctions, perdent ces dernières et gagnent en mobilité. Lors de la colonisation d'un nouvel organe, elles peuvent renverser cette transition pour former une nouvelle tumeur connue comme une métastase.

La reprogrammation du métabolisme cellulaire sert à maintenir le rythme de croissance et de prolifération des cellules cancéreuses. Elles ont besoin de ressources pour maintenir leur progression tout en faisant face à de sérieuses carences. Ainsi, les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme de diverses manières. La plus connue est l'effet Warburg dans lequel la glycolyse devient prioritaire même en conditions aérobies. Pour soutenir cette production d'énergie, la cellule augmente également sa proportion de transporteurs de glucose. La reprogrammation du métabolisme permet également à la cellule cancéreuse de survivre à des conditions de stress importants et de s'y adapter.

L'évasion face au système immunitaire permet aux cellules cancéreuses d'être quasiment indétectables et ainsi éviter leur élimination. Elles peuvent présenter des récepteurs reconnus par le système immunitaire de manière à passer pour des cellules saines.

Deux nouvelles caractéristiques ont été ajoutées récemment : l'instabilité du génome et l'inflammation.

L'instabilité du génome est un des facteurs majeurs permettant aux cellules cancéreuses d'échapper aux multiples mécanismes de contrôle de l'organisme. C'est justement à cause de multiples mutations, notamment celles qui perturbent la machinerie de maintenance de l'ADN, que les cellules cancéreuses peuvent devenir hors de contrôle et modifier leur comportement.

L'inflammation pro-tumorale favorise les caractéristiques vues précédemment, elle amène des facteurs de croissance, des angiogènes, des signaux amenant à l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse. Elle peut également soutenir l'apparition de mutations en amenant des espèces réactives de l'oxygène et autres mutagènes.

Chapitre 2 : L'hypoxie

Définition de l'hypoxie

L'hypoxie est une condition créée par le manque d'oxygène dans un tissu et qui survient dans près de 50% des régions tumorales. À titre d'exemple, la pression en oxygène dans une tumeur mammaire est de 10 mmHg tandis que la pression dans le tissu sain est généralement à 65 mmHg ²⁴. Ce phénomène naturel s'explique notamment par 2 composantes, une diminution de l'apport d'oxygène par les vaisseaux sanguins et une augmentation de sa consommation par des cellules hautement prolifératives ²⁵.

L'hypoxie va induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par la production de facteurs angiogènes ²⁶. Cependant, dans un contexte tumoral, l'équilibre pro- et anti-angiogènes n'est pas respecté. Par conséquent, ces nouveaux vaisseaux ont fréquemment des malformations qui les rendent anormalement perméables et perturbent le flux sanguin ²⁵. De plus, l'hypoxie influence la morphologie des cellules endothéliales et par conséquent réduit la diffusion de l'oxygène dans les tissus environnants ²⁷. Ainsi, dans une tumeur, on retrouve des zones ayant différents niveaux d'hypoxie allant de moins sévère à sévère et pouvant conduire à de la nécrose. Les tumeurs peuvent également subir des cycles d'hypoxie et de réoxygénation modulant ainsi leur comportement et leur agressivité ²⁸. L'hypoxie est également connue pour augmenter la production de ROS par les mitochondries ²⁹. L'activation des voies protégeant les cellules contre les ROS, le glutathion et la thiorédoxine, est essentielle pour maintenir la stabilité génétique, le fonctionnement des protéines, la fluidité membranaire et donc la viabilité cellulaire ^{30 31}.

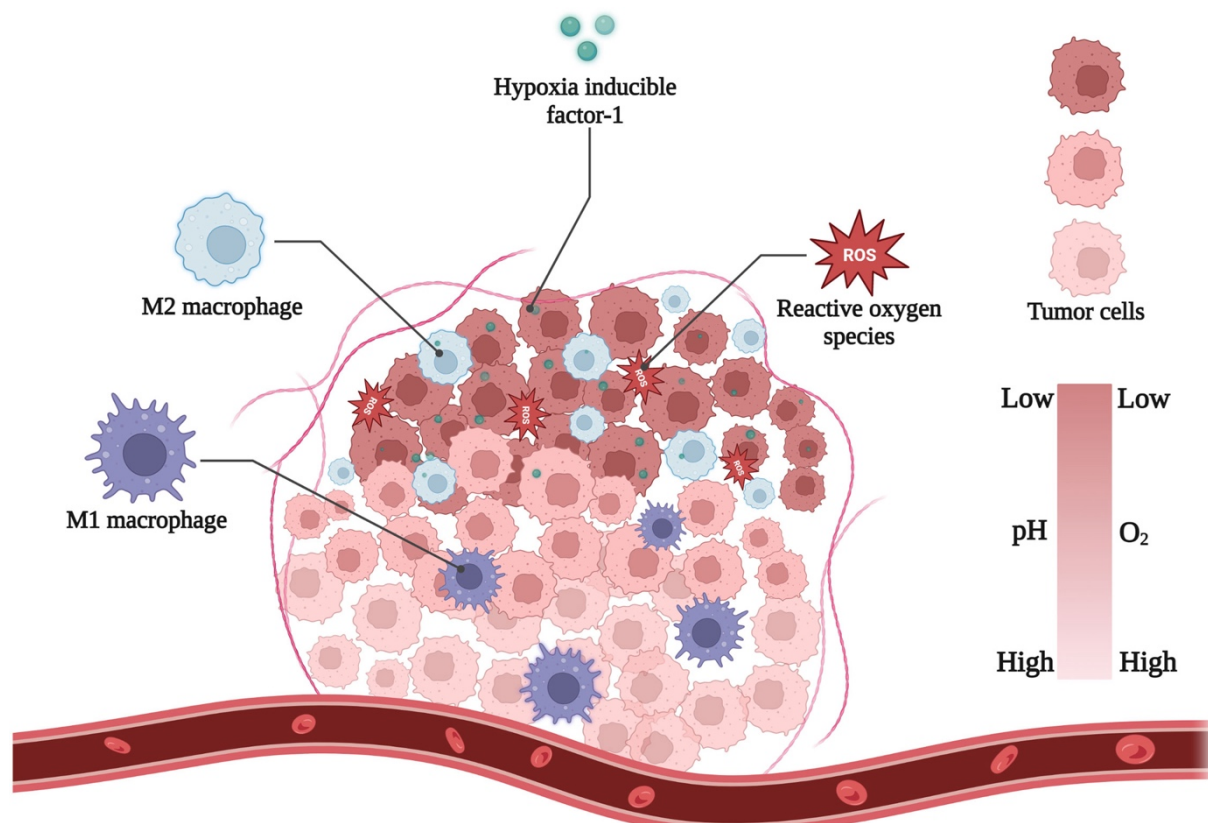
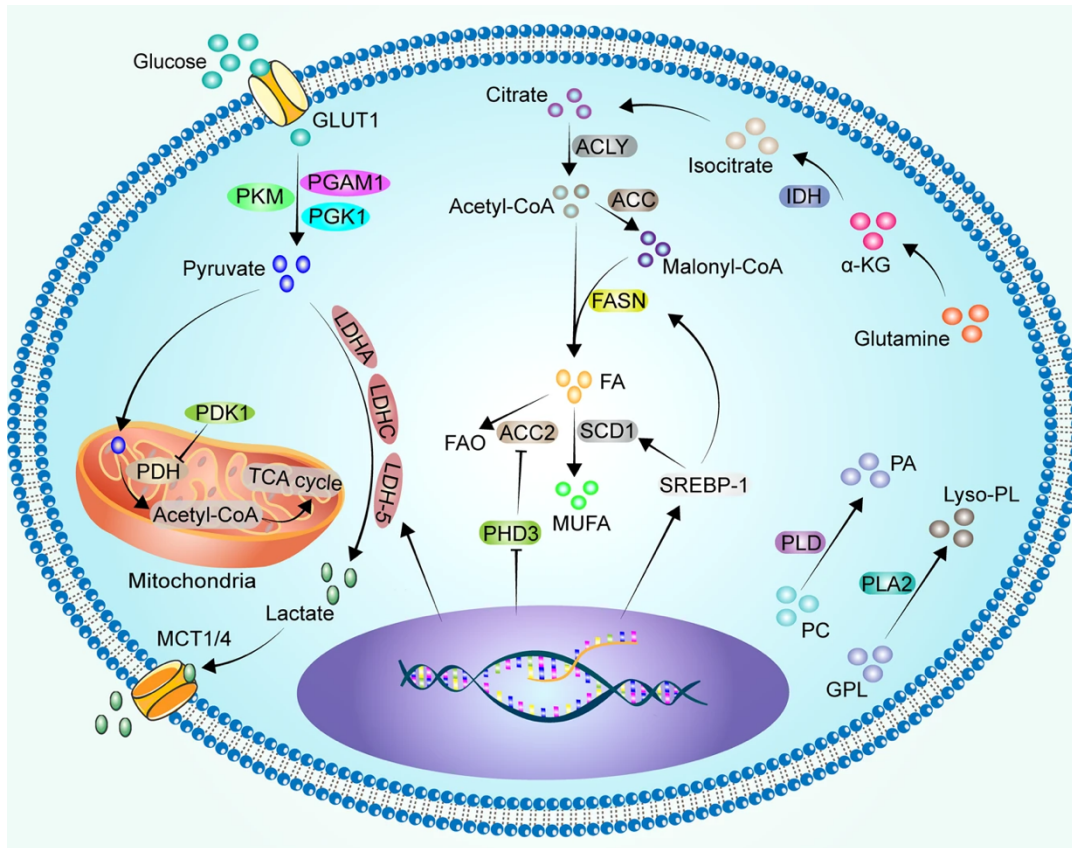


Figure 3 : Représentation schématisée de l'hypoxie et acidose tumorales ³².

Le facteur de transcription Hypoxia Inducible Factor (HIF)

HIF se compose de 2 sous-unités. Une sous-unité beta qui est stable mais inutile sans une sous-unité alpha. Cette sous-unité alpha existe sous 2 formes et leur stabilité est dépendante du niveau d'oxygène. En effet, l'hydroxylation de la sous-unité alpha par des HIF proly-hydroxylases (PHDs), dont l'activité enzymatique nécessite la présence d'oxygène, provoque leur ubiquitination par pVHL puis leur dégradation par le protéasome ³¹. Un second contrôle de HIF se fait par l'hydroxylation d'un résidu asparagine en position C-terminale faite par le Facteur Inhibant HIF (FIH) ³³. Cette modification empêche HIF de transactiver certaines de ses cibles ³⁴. Ces deux contrôles ont des sensibilités différentes au niveau de l'oxygène et permet une réponse graduée plutôt qu'une réponse de tout ou rien ³⁵. Ainsi, lorsque HIF est stabilisé et fonctionnel, il peut agir sur des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) ³⁶.



Les 2 sous-unités alpha ont des spécificités différentes. HIF1A est ubiquiste tandis que HIF2A se retrouve dans les hépatocytes et les cellules endothéliales ³⁸.

Parmi les diverses régulations induites par HIF, on retrouve presque toutes les enzymes de la glycolyse, des transporteurs de glucose, des enzymes impliquées dans la prolifération, des protéines impliquées dans la chaîne de transport d'électrons, des boucles de régulation négatives,...³¹

Le fonctionnement de HIF est également modulé par des microARN tels que miR-23a, miR-549 et miR-182 qui agissent respectivement sur PHD, HIF et FIH1 ^{39–41}. HIF1 influence l’EMT de différentes manières, notamment en régulant TWIST1, TGF-B et Notch. HIF2 influence également l’EMT par la voie PI3k/Akt (NFKB) ⁴².

L'hypoxie est un régulateur important de l'angiogenèse. En effet, HIF1A active la voie de signalisation VEGF en se liant au HRE de son promoteur ⁴³. HIF2A quant à lui, agit sur d'autres voies (ANGPT2, PIGF, PGDF-B,...) ⁴⁴. Ainsi, HIF1A favorise la croissance de vaisseaux et HIF-2alpha agit sur leur maturation ⁴⁵. HIF1A peut activer certains miRNA qui agissent sur la

migration des cellules endothéliales mais aussi lancer la sécrétion de miRNA dans des vésicules extracellulaires qui vont cibler des macrophages de manière à ce que ces derniers produisent des facteurs pro-angiogènes ⁴⁶. HIF1A peut également influencer la lymphangiogenèse par activation du récepteur c-Met et indirectement, par activation de la voie VEGF-C/VEGFR-3 ⁴².

HIF1A peut aussi être modulé par la quantité d'alpha-cetoglutarate de manière à influencer les cascades de signalisation intracellulaires telles que AMPK, AKT, la génération de ROS et les microARNs. L'hydroxyglutarate peut stimuler les prolyl-hydroxylases et déstabiliser HIF1 ⁴⁷.

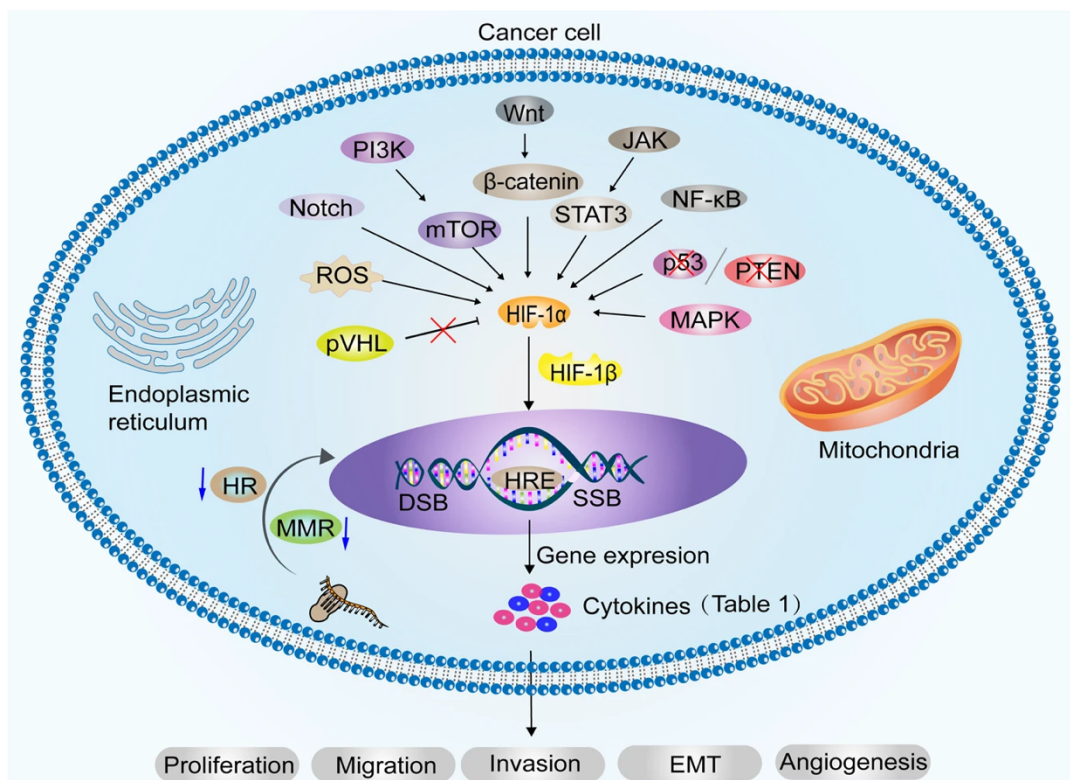


Figure 5 : Représentation des différentes voies reliées à l'hypoxie par HIF1A ³⁷.

Autres voies en réponse à l'hypoxie

L'oxygène sert de cofacteur ou de substrat pour bon nombre d'enzymes. Dans un environnement hypoxique, le pyruvate se localise dans le cytoplasme et est converti en lactate par la lactate déshydrogénase. Cela permet la régénération de NAD⁺ pour assurer un suivi de la glycolyse en hypoxie ⁴⁸. Le taux élevé de glycolyse permet aux intermédiaires glycolytiques de servir pour la production de NADPH et nucléotides et ainsi, assurer une biosynthèse suffisante pour croître et proliférer ⁴⁹. Ce mécanisme est connu sous le nom de l'effet Warburg dans lequel les cellules cancéreuses métabolisent le glucose par glycolyse en condition

oxygénée⁵⁰. Parmi les enzymes catalysant des étapes limitantes, on peut trouver l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase qui sont régulées allostériquement pour réguler le flux glycolytique⁵¹⁻⁵³. Le switch induit par l'hypoxie est attribué au contrôle allostérique de ces enzymes par l'ATP qui est ensuite suivi par une adaptation plus long-terme par le biais de HIF⁵⁴. Dans une cellule normale en hypoxie, la phosphorylation oxydative est inhibée, causant un niveau réduit d'ATP et donc une réduction du ratio ATP/AMP. L'inhibition allostérique de la phosphofructokinase induite par l'ATP est donc affaiblie et enclenche son pouvoir catalytique pour promouvoir la voie de la glycolyse⁵⁵. On observe un effet similaire pour la pyruvate kinase en hypoxie, la diminution de la quantité d'ATP lève l'inhibition allostérique et augmente la production de pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate⁴⁷.

Chapitre 3 : Production d'énergie

En conditions normoxiques, le glucose est converti en pyruvate via la glycolyse. Celui-ci est transporté dans la mitochondrie par le MPC « mitochondrial pyruvate carrier », puis transformé en acétyl-CoA grâce à la pyruvate déshydrogénase (PDH)⁶². L'acétyl-CoA alimente le cycle de Krebs, permettant la production d'équivalents réducteurs nécessaires à la phosphorylation oxydative et donc à la synthèse d'ATP. En hypoxie, l'oxygène devient limitant et le pyruvate est principalement réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH).

Effet Warburg

Les cellules cancéreuses privilégient la fermentation lactique même en présence d'oxygène. La glycolyse aérobie permet une production rapide d'ATP malgré un faible rendement⁶³, l'augmentation de métabolites précurseurs⁶⁴ ainsi qu'une protection relative contre les ROS dérivés de la phosphorylation oxydative⁶⁵.

En hypoxie, cet effet est renforcé par deux mécanismes dépendant de HIF1 dont (i) une augmentation de LDH 15 ; (ii) une inhibition de PDH via la PDK, ce qui empêche la formation d'acétyl-CoA⁴⁹.

L'hypoxie augmente l'utilisation du glucose par la surexpression des transporteurs de glucose (GLUT) et par la production de lactate pour compenser la perte d'efficacité de la phosphorylation oxydative. HIF active de nombreux gènes glycolytiques : GLUT1/3, hexokinase II, phosphofructokinase, GAPDH, PDK, LDH³¹.

L'excès de protons H⁺ issus de la fermentation est exporté par MCT4 (cible HIF1A) et par le transporteur de sodium et de protons (NHE1), soutenus par les anhydrases carboniques CA9 et CA12 qui exportent les protons sous forme de CO₂ vers le milieu extracellulaire⁴². HIF peut également organiser des enzymes glycolytiques dans des "clusters" d'enzymes glycolytiques, «corps G ou glycolytic bodies», ce qui rend la glycolyse plus rapide et plus efficace⁴⁷.

La production accrue de ROS en hypoxie nécessite une gestion du couple NADP⁺/NADPH essentiel à la détoxification via le glutathion ³¹. Enfin, HIF peut réduire la prolifération via p21, mais des voies telles que mTOR ou Notch peuvent maintenir une prolifération élevée sous hypoxie ⁶⁶.

HIF1A module l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la glycolyse. On y retrouve notamment les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3, l'hexokinase II, la phosphofructokinase, l'aldolase, la GAPDH,... ⁴⁷.

Cycle de Krebs

La mitochondrie assure l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative et diverses biosynthèses. Le cycle génère, pour chaque acétyl-CoA : 3 NADH, 1 FADH₂, 1 GTP/ATP et du CO₂ ⁶². Le NADH et FADH₂ donnent leur électron à la chaîne de transport mitochondriale (ETC). Dans le **complexe I**, l'oxydation du NADH produit le FMN_{H2} qui transfère les électrons vers CoQ et permet le pompage de 4 protons. En hypoxie, la disponibilité de l'ubiquinone oxydée est réduite ⁶⁷. Le **complexe II (SDH)** est lié au cycle de Krebs, il transfère les électrons du succinate au CoQ. En hypoxie, il peut fonctionner en sens inverse selon les ratios succinate/fumarate et UQ/UQH₂ ⁶⁷. Le **complexe III** transfère les électrons au cytochrome c et pompe 4 protons. En hypoxie, il ne peut fonctionner que si un accepteur alternatif est disponible ⁶⁷. Le **cytochrome c** assure le transfert entre les complexes III et IV. Dans le **complexe IV** l'oxygène est réduit en eau en utilisant 4 électrons et 4 protons. Enfin, l'ATP-synthase (**Complexe V**) produit l'ATP depuis le gradient électrochimique ⁶⁸.

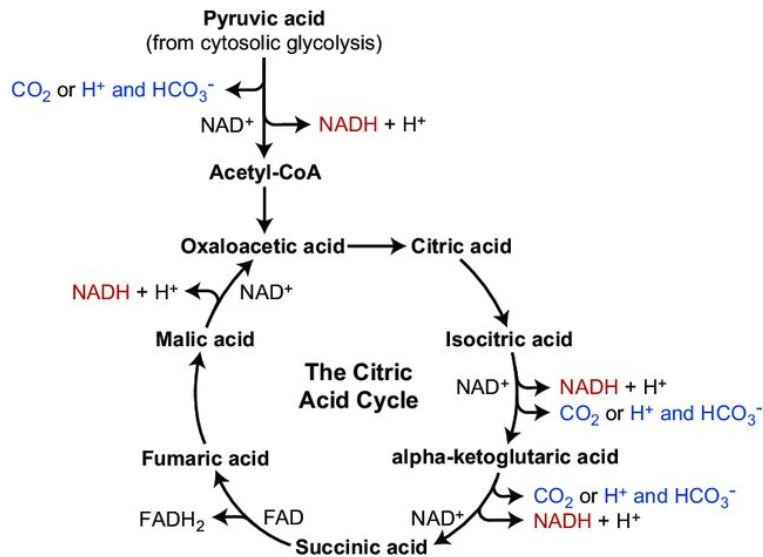


Figure 6 : Représentation du cycle de Krebs ⁶⁹.

B-oxydation des lipides

La β -oxydation est souvent augmentée dans les cancers pour répondre aux besoins énergétiques et participer à la résistance thérapeutique ⁷⁴⁻⁷⁸. AMPK active CPT1A et les voies PPAR, renforçant la β -oxydation ⁷⁹, tandis que HIF1A la réprime en diminuant CPT1A pour limiter les ROS ⁸⁰. La combinaison d'activateurs d'AMPK et d'agonistes de PPAR améliore certaines immunothérapies ⁸¹, alors que les inhibiteurs de CPT1A peuvent induire la ferroptose ⁸² ou contrer la résistance ⁸³. Les acides gras sont activés via ACS puis importés dans la mitochondrie via CPT1A. Chaque cycle de β -oxydation retire deux carbones et produit 1 NADH, 1 FADH₂ et 1 acétyl-CoA. Le palmitate permet par exemple la production de 129 ATP. Les acides gras insaturés nécessitent des étapes enzymatiques supplémentaires pour passer en configuration trans. Les chaînes longues, moyennes ou courtes sont oxydées par différentes déshydrogénases (VLCAD, LCAD, MCAD...). En hypoxie, la PHD3 ne peut plus activer ACC2, ce qui réduit le malonyl-CoA et lève l'inhibition de la β -oxydation, renforcée par AMPK. Ce phénomène est aussi observé en conditions acides ⁸⁴. HIF2A diminue l'expression de CPT1, favorisant l'accumulation lipidique ⁸⁵.

Glutaminolyse

La glutamine alimente le cycle de Krebs, la synthèse de nucléotides, d'acides aminés et d'acides gras. MYC stimule la glutaminase, augmentant l'utilisation de glutamine, même en hypoxie ⁸⁶. Cela accroît les ROS et la consommation d'oxygène déjà limitée.

En hypoxie, les transporteurs SLC sont augmentés pour orienter la glutamine vers la voie de carboxylation réductive, permettant la production d'acétyl-CoA indispensable aux lipides malgré la limitation du cycle de Krebs ⁸⁵.

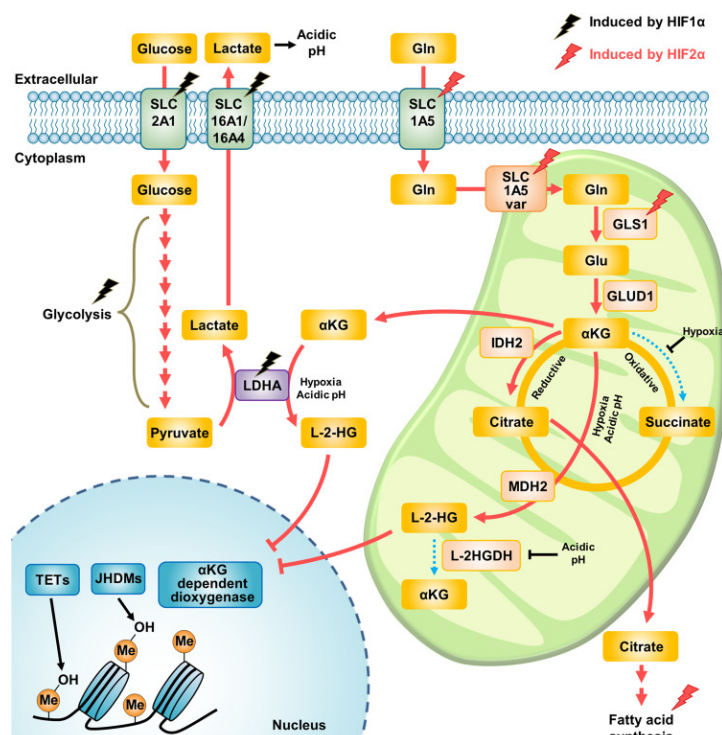


Figure 7 : Le contrôle du métabolisme de la glutamine en conditions hypoxiques ⁸⁵.

Chapitre 4 : Les acides gras

Synthèse des lipides

La lipogenèse de novo assure la synthèse d'acides gras, elle consiste en la succession d'une série de réactions en cycle et permettant l'ajout de 2 carbones, issus de l'acétyl-CoA, à la chaîne d'acides gras en cours de synthèse. Cette série commence avec la conversion du citrate en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY). Cet acétyl-CoA est ensuite carboxylé par l'acétyl CoA carboxylase (ACC) en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA ainsi produit est converti en palmitate par la fatty acid synthase (FASN) qui peut continuer à ajouter les atomes de carbones pour rallonger la chaîne d'acide gras ⁸⁷.

Cette synthèse peut être régulée par de nombreux intervenants. Le *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) est un facteur de transcription agissant sur la synthèse des acides gras et la synthèse du cholestérol. On peut noter dans ses cibles les promoteurs de l'ATP citrate lyase, l'ACC, FASN ou encore SCD1 ⁸⁸. ACLY connecte la glycolyse avec le métabolisme des lipides puisqu'elle clive le citrate en acétyl-CoA et oxaloacétate. Les acétyl-CoA synthases permettent l'activation des acides gras en fatty acyl-CoA pour les rendre éligibles pour la suite des étapes de formation des acides gras. L'ACC responsable de la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA est finement régulée par phosphorylation via l'AMPK, en réponse aux besoins énergétiques cellulaires ⁸⁸.

Dans les cellules cancéreuses, la synthèse des lipides est profondément altérée. On observe une surexpression de FASN ⁸⁹, ACC et SCD1, favorisant ainsi la production d'acides gras monoinsaturés et l'accumulation de gouttelettes lipidiques (LD) ⁹⁰. Ces altérations sont souvent induites par des voies de signalisation telles que PI3K/AKT ou Myc qui activent les gènes lipogéniques et renforcent la synthèse lipidique même en conditions de stress ^{91 92}. L'hypoxie stimule également la lipogenèse via l'activation de HIF1-alpha, favorisant l'accumulation de LD et la résistance à la ferroptose ⁹³.

Par ailleurs, la reprogrammation lipidique dans le cancer ne se limite pas à la croissance tumorale : elle participe activement à l'échappement immunitaire ⁹⁴. Les lipides produits

peuvent reprogrammer les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral, notamment les macrophages et les monocytes, en inhibant leur capacité à activer les lymphocytes T cytotoxiques ⁹⁵. Des lipides spécifiques, comme les sphingolipides, sont utilisés pour masquer les signaux de danger et éviter la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire ⁹².

Stockage des lipides

Les acides gras sont généralement stockés dans des structures cellulaires spécialisées appelées les gouttelettes lipidiques « lipid droplets » (LD). Les gouttelettes lipidiques sont formées par une double couche phospholipidique et de périlipines qui constituent une famille de protéines spécialisées dans leur formation. D'ailleurs, il n'existe actuellement aucune gouttelette lipidique connue qui soit dépourvue de toute périlipine ⁹⁶. Les périlipines se retrouvent majoritairement à la surface membranaire des gouttelettes lipidiques et régulent l'accès à ces dernières ⁹⁶. Il existe actuellement 5 périlipines connues provenant de 5 gènes, numérotés de 1 à 5 selon leur ordre de découverte. Seule la périlipine 1 présente des variants d'épissage connus, sous les noms de périlipines 1A, 1C et 1D ⁹⁶. La théorie actuelle concernant l'apparition de ces 5 gènes encodant des périlipines serait une éventuelle duplication du génome. Les périlipines 1 et 2 sont exclusives des gouttelettes lipidiques tandis que les périlipines 3, 4 et 5 peuvent rester stables dans le cytoplasme ^{97,98}. Il y a cependant une hypothèse selon laquelle les périlipines 3 et 5 sont en réalité associées à des particules lipoprotéiques ⁹⁹.

Les périlipines, comme les autres protéines associées aux gouttelettes lipidiques, présentent des structures tertiaires contenant des hélices amphipatiques alpha ⁹⁷. Plus précisément, chez les périlipines cette séquence comporte 11 mer. La périlipine 1 contient 3 séquences d'acides aminés hydrophobiques avec une proline centrale qui médie le ciblage vers les gouttelettes lipidiques, indépendamment de la séquence 11-mer ^{100,101}.

Il a été démontré que les périlipines retrouvées à la surface des différentes gouttelettes lipidiques dépendent des lipides stockés dans lesdites gouttelettes ¹⁰². Les périlipines 1A, 2 et 5 se retrouvent généralement sur des gouttelettes lipidiques enrichies en triacylglycérols

(TAG) tandis que les périlipines 1C, 1D et 4 sont plus fréquentes sur les gouttelettes lipidiques enrichies en esters de cholestérol ¹⁰³.

Au niveau de la localisation des différentes périlipines, les périlipines 2 et 3 sont relativement ubiquistes et sont les périlipines les plus similaires au niveau de leur séquence. La périlipine 5 est exprimée de façon spécifique dans des tissus dans lesquels les acides gras sont transportés dans les mitochondries en vue de leur oxydation ⁹⁹. Cela survient principalement dans les muscles cardiaque et squelettique mais également dans le foie et le tissu adipeux brun ¹⁰⁴. La périlipine 1 a la même séquence amino-terminale que les périlipines 2, 3 et 5 mais elle est différente en son domaine terminal ¹⁰¹. On la retrouve principalement dans les adipocytes et un peu dans les cellules stéroïdogènes. La périlipine 4, quant à elle, est majoritairement exprimée dans le tissu adipeux blanc et à moindre mesure, dans les mêmes tissus que la périlipine 5. Cette périlipine 4 est également celle qui s'éloigne le plus des autres en terme de similarité de séquence ^{99,105}.

PLIN2 : La périlipine 2 est exprimée de manière ubiquiste et est considérée comme une périlipine majeure des gouttelettes lipidiques car elle est généralement présente en absence de périlipine 1 ou 5 ¹⁰⁶. La périlipine 2 n'a qu'un effet léger dans le contrôle de la lipolyse, elle n'est pas régulée via phosphorylation par le PKA et ne recrute pas des lipases au niveau des gouttelettes de manière efficace ¹⁰⁶. Il a cependant été montré que la surexpression de PLIN2 diminue l'accès d'ATGL aux gouttelettes lipidiques en la séparant de son coactivateur ABHD5 ¹⁰⁷. Ainsi, PLIN2 jouerait potentiellement un rôle d'atténuation de la lipolyse ¹⁰⁸. La mobilisation des lipides neutres dans les hépatocytes peut passer par la séquestration des LD positives pour PLIN2 dans les autophagosomes avec par la suite une livraison des LD aux lysosomes où les TAG sont hydrolysés par les lipases lysosomales, mécanisme appelé macrolipophagie ^{109,110}. La lipolyse autophagique requiert le retrait des PLIN1 et 2 qui constituent des barrières physiques ¹¹¹. Concernant PLIN1, elle bloque l'association de Rab7 avec les LD tandis que sa phosphorylation provoque un changement conformationnel et ainsi, PLIN1 ne protège plus les LD ¹⁰¹.

La demi-vie des périlipines 1 et 2 est fortement dépendante de leur liaison aux LD. Lorsqu'elles sont liées, leur demi-vie est de 72 heures tandis que libres, elles sont dégradées soit par la

voie du protéasome, soit par le lysosome ⁹⁹. PLIN1 n'est cependant pas ubiquiste comme PLIN2, on la retrouve donc dans les cellules adipeuses tandis que PLIN2 et PLIN3 se trouvent dans les cellules non adipeuses ⁹⁷. PLIN2 peut-être retiré des LD par le CMA (*chaperone-mediated autophagy*) qui dégrade des protéines spécifiques et traverse la membrane lysosomale via LAMP-2A ¹¹². Il apparaît que PLIN2 peut être phosphorylée par l'AMPK seulement après colocalisation entre PLIN2 et HSC70 sur les LD ¹¹³.

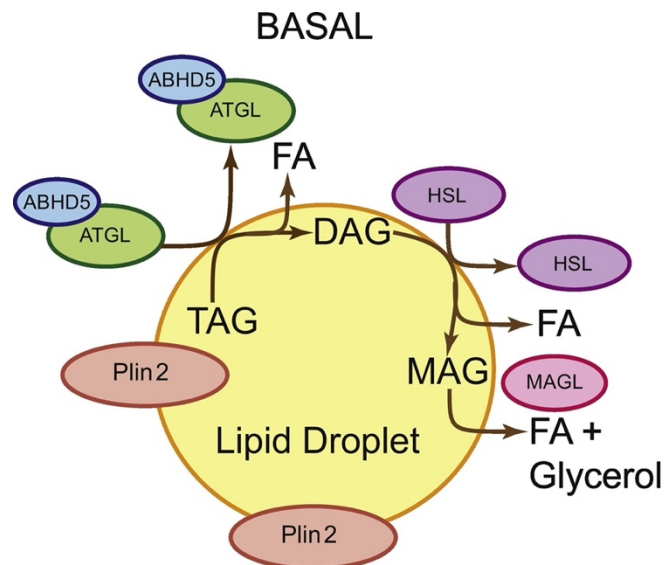


Figure 8 : Schématisation du fonctionnement de PLIN2 sur une gouttelette lipidique ¹¹⁴.

Désaturation des lipides par SCD1

La stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1), également appelée fatty acyl-CoA delta-9 désaturase, est une enzyme résidente du réticulum endoplasmique. Elle catalyse la première double liaison en position cis-delta-9 de certains acides gras saturés (SFA), notamment le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA qu'elle transforme respectivement en palmitoléoyl-CoA et oléoyl-CoA, des acides gras mono-insaturés (MUFA) ^{115,116}. Ces MUFA participent à la synthèse des phospholipides, triglycérides, esters de cholestérol et esters wax, influençant la fluidité membranaire, le métabolisme lipidique et l'adiposité ¹¹⁷. Chez l'homme, on en trouve 2 différentes, SCD1 et SCD5. SCD1 est ubiquitaire avec une expression accentuée dans le cerveau, le foie, le cœur et les poumons tandis que SCD5 se retrouve dans les fibroblastes et les cellules cancéreuses ¹¹⁸. La première étape de la désaturation est le retrait d'un hydrogène hors d'un groupe méthylène d'une chaîne acylée. Cette réaction coûte cher en énergie (2 électrons du NADH) et requiert un intermédiaire d'oxygène qui sera réduit en eau ¹¹⁹. Pour

être désaturés, les acides gras libres doivent d'abord obtenir un groupement CoA ou être estérifiés ¹¹⁹. Les désaturases peuvent également présenter des actions d'acétylénase, méthoxydases, ketolases et décarbonylases ¹²⁰.

SCD1 peut être régulé par des mécanismes post-transcriptionnels, notamment par l'ubiquitination qui provoque sa dégradation par le protéasome ¹²¹, mais aussi par son taux de transcription. Son promoteur comporte de nombreux sites de liaisons pour différents facteurs de transcription (AP-2, SREBP, PPAR,...) ¹¹⁸.

SCD1 joue un rôle central dans la lipogenèse, la prolifération cellulaire et l'invasion tumorale. Son expression est régulée par la présence ou non de nutriments, de facteurs de croissance, d'hormones ainsi que par le ratio MUFA/PUFA ¹¹⁹. L'inhibition de SCD1 augmente le ratio SFA/MUFA en entraînant une augmentation de la quantité de SFA, suivie d'une plus forte lipotoxicité qui peut conduire à l'apoptose ¹²². La lipogenèse est également réduite suite à la réduction de substrat disponible pour les réactions de biosynthèse. Par conséquent, une augmentation des SFA réduit la lipogenèse et inhibe l'acétyl-CoA carboxylase ¹²³. Cette inhibition de SCD1 a d'autant plus d'effet sur les cellules qui présentent un taux de prolifération élevé.

Des souris *Scd1*^{-/-} présentent un phénotype sévère dû à une fragilité de la peau, une diminution de leur adiposité, une augmentation de leur consommation d'énergie et une surrégulation des enzymes de la beta-oxydation ¹²⁴.

La régulation de SCD1 s'effectue à plusieurs niveaux :

- **Transcriptionnel**, via des sites de liaison dans son promoteur pour des facteurs tels que **SREBP, PPAR, et AP-2** ^{119,125}.
- **Post-transcriptionnel**, notamment par **ubiquitination**, qui cible SCD1 pour sa **dégradation via le protéasome** ¹¹⁸.
- **Post-traductionnel**, par exemple via la **phosphorylation de la tyrosine 55** par **EGFR**, qui stabilise SCD1 en empêchant son ubiquitination ^{126 127}.

Dans le contexte tumoral, l'activation constitutive de la voie de biosynthèse des acides gras permet de répondre à la demande accrue en phospholipides membranaires ¹²⁸. Cela est dû à l'activation d'enzymes telles que l'adénosine triphosphate citrate lyase (ACLY), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FASN) ¹²⁹.

Pour se diviser, une cellule doit doubler son contenu membranaire pour maintenir le bon ratio taille/surface des cellules-filles. Dans les facteurs externes d'induction de la prolifération, on trouve la disponibilité des nutriments et les facteurs de croissance qui enclenchent la synthèse de composants lipidiques de la membrane ¹³⁰. On observe une régulation de SCD1 qui est induite par des mitogènes et qui est parallèle à l'activation de la synthèse des phospholipides et des cholestérols, suggérant une participation active des MUFA dans la biogenèse membranaire durant la réplication cellulaire ¹³¹.

Le métabolisme des cellules cancéreuses est caractérisé par une forte glycolyse aérobie et une biosynthèse accélérée des lipides. Cela offre davantage d'ATP et de métabolites. L'activation parallèle de la glycolyse et de la synthèse d'acides gras dans le cancer est couplée à la conversion SFA vers MUFA. Ainsi, les MUFA sont un produit du métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses. Pour cela, SCD1 y doit continuellement être actif pour maintenir un flux continu de métabolites glycolytiques.

La régulation de la lipogenèse par SCD1 fonctionnerait par 3 mécanismes :

- Le contrôle de la vitesse de biosynthèse des acides gras
- L'approvisionnement de MUFA pour la formation de macromolécules
- La modulation de voies de signalisation contrôlant les enzymes du métabolisme des lipides.

L'enzyme SCD1 a la capacité de réguler le métabolisme des lipides et la signalisation dans les cellules cancéreuses. Elle module la voie PI3K/AKT avec ERK pour réguler la biosynthèse des lipides, la croissance et la survie des cellules tumorales ¹²³. En effet, AKT et AMPK sont des intégrateurs de signaux qui gouvernent l'activité métabolique. L'absence de SCD1 diminue la phosphorylation d'AKT et donc son activité. AKT induit la lipogenèse médiée par le glucose par régulation transcriptionnelle et catalytique de multiples enzymes de la glycolyse et de la

synthèse d'acides gras. SCD1 a l'effet inverse sur AMPK qui, activé, sous-régule les voies de la lipogenèse par phosphorylation et stimule des réactions qui favorisent l'apport d'énergie, comme l'oxydation des acides gras ¹³².

La surexpression de SCD1 améliore la formation de gouttelettes lipidiques et contribue à éviter l'apoptose liée aux SFA. Ainsi, on peut présumer que SCD1 réduit le stress du réticulum endoplasmique induit par ces mêmes SFA ¹³³. Lorsque SCD1 est faiblement exprimé, les cellules cancéreuses perdent leur capacité à former une tumeur, suggérant que les MUFA sont requis pour le début de la formation tumorale ¹³⁴.

Rôles des lipides

Les membranes biologiques

Les membranes biologiques assurent une séparation entre les cellules et leur environnement ainsi qu'une compartimentalisation des différents organes cellulaires. Ces membranes présentent généralement un pourcentage relativement équivalent de protéines et de lipides avec moins de 10% de carbohydrates. Tous les lipides sont amphipatiques, ce qui permet la formation d'une bicouche imperméable aux substances hydrophiles. La composition protéique des différentes membranes cellulaires est spécifique de chaque type de membrane et détermine la fonction physiologique de ladite membrane. Dans le cadre de la membrane lipidique, les lipides jouent un rôle plus physique que physiologique puisqu'ils servent principalement de barrière. Cependant, certains dérivés de ces lipides peuvent servir de messagers intracellulaires qui seront abordés plus loin. L'intérêt de ces membranes cellulaires provient du fait que toutes ces molécules ne sont pas liées de manière covalentes, ces associations moléculaires font moins de 10nm et sont pourtant solides, mécaniquement parlant, tout en ayant des propriétés proches des fluides ¹⁴⁸.

Rôle des lipides dans la composition de la bicouche lipidique

La plupart des membranes biologiques contiennent une grande variété de lipides avec notamment les nombreuses formes de glycérophospholipides et de cholestérols. Chaque type de membrane possède sa propre composition dépendant de son rôle (membrane plasmique, d'organelle, ...) ainsi que de l'organisme dont elle provient. On retrouve cependant 4 lipides

principaux : le cholestérol, la phosphatidylcholine, la sphingomyéline, et la phosphatidyléthanolamine qui sont le plus souvent en plus grande quantité. On peut également y trouver des phosphatidylsérines, phosphatidylinositols, des acides phosphatidiques, des lysosphosphatidylcholines et des glycosphingolipides ¹⁴⁸.

Dans les cancers, on constate que l'organisation lipidique de la membrane est altérée de manière à favoriser la prolifération et la survie tumorale. Les phosphatidylsérines sont plus fréquentes sur la face externe de la membrane de manière à favoriser l'évasion au système immunitaire. Les cholestérols sont également plus importants au niveau membranaire dans les cellules cancéreuses, jouant un rôle dans la résistance aux traitements et améliorant la capacité métastatique des cellules ¹⁴⁹.

Les messagers intra- et extracellulaires

Dans le domaine de la transduction de signaux, les lipides représentent une grande proportion des messagers. Les messagers lipidiques les plus connus sont les hormones stéroïdiennes telles que le cortisol et les oestrogènes ¹⁵⁰. Une deuxième classe de messagers lipidiques est composée des eicosanoïdes produits par les tissus et qui, à cause de leur durée de vie courte, déclenchent une réponse à un endroit proche de leur origine de production tandis que les hormones agissent sur des cibles éloignées grâce à leur forte stabilité et leur capacité à voyager dans la circulation pendant de longues périodes ¹⁵¹.

Les seconds messagers intracellulaires

Lorsque le premier messager interagit avec un récepteur membranaire, il provoque généralement une activation de ce dernier pour générer un second messager à l'intérieur de la cellule pour pouvoir transmettre l'information aux systèmes biochimiques dont les activités doivent être modifiées pour obtenir l'effet physiologique souhaité. L'ampleur de cet effet est la plupart du temps proportionnel à la concentration du second messager.

Un des systèmes de signalisation par second messager les plus importants, est le système du phosphatidyl-inositol. Il emploie 2 lipides servant de seconds messagers, tous deux dérivés de ce phosphatidyl-inositol. Le diacylglycérol et le triphosphoinositol. Ici, le récepteur membranaire agit sur l'enzyme phospholipase C localisée à la face membranaire interne.

L'activation de cette enzyme cause l'hydrolyse d'un phospholipide membranaire mineur, le phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP₂), formant notamment du diacylglycérol. Tout en restant sur la bicouche lipidique, le diacylglycérol active une enzyme liée à la membrane, la protéine kinase C qui catalyse l'addition d'un groupement phosphate à une protéine soluble. Cette protéine est le premier intervenant d'une cascade de réactions amenant à la réponse physiologique de la cellule. L'autre produit de l'hydrolyse de la phospholipase C, le triphosphoinositol (PIP₃), provoque la libération de calcium hors de lieux de stockage intracellulaires. Ce calcium est ajouté à un triacylglycérol qui est requis pour l'activation de la protéine kinase C ¹⁴⁸. Dans les cancers, PIP₂ joue divers rôles parmi lesquels on retrouve la régulation du trafic vésiculaire, l'endocytose médiée par la clathrine, la réorganisation du cytosquelette et la signalisation mTOR ¹⁵². Pour PIP₃, il est connu pour ses effets sur la prolifération, la migration et la survie cellulaire ¹⁵³.

Chapitre 5 : Les gouttelettes lipidiques dans le cancer

Les gouttelettes lipidiques constituent un organelle essentiel à l'homéostasie des lipides. Lorsqu'une grande quantité d'acides gras exogènes est disponible, les cellules ont besoin de les stocker en vue d'une utilisation future ^{157,158}. Ces structures présentent une organisation simple, constituée d'une monocouche de phospholipides associés à diverses protéines et entourant un cœur de lipides neutres ^{157,158}. Elles permettent de stocker des esters de cholestérol et des triacylglycérols. Les esters de cholestérol sont utilisés dans la formation de nouvelles membranes ainsi que pour la synthèse de nombreuses hormones stéroïdiennes ¹⁵⁹. Les triacylglycérols, quant à eux, servent comme source d'énergie, comme précurseurs dans la formation de lipides de signalisation et servent à la synthèse de phospholipides membranaires. La synthèse de triacylglycérols dans l'organisme peut survenir suite à un pic d'insuline, influençant la prise de glucose qu'il faut ensuite transformer pour permettre son stockage ¹⁶⁰.

Lorsque l'organisme a besoin d'un apport en énergie, on observe une activation de la voie lipolytique dans les adipocytes via des hormones initiatrices et une augmentation de l'activité kinase. Cela provoque une phosphorylation des périlipines, lipases et cofacteurs associés. En conséquence, les lipases vont donc transloquer du cytoplasme vers les gouttelettes lipidiques. Des interactions inter-protéiques vont permettre d'assembler un complexe lipolytique sur les périlipines ^{99,161}. Dans les adipocytes, les gouttelettes lipidiques sont généralement recouvertes de PLIN2 pendant leur formation et ce dernier est progressivement remplacé par PLIN1 au cours de la maturation (Figure 9). Cela permet une augmentation du stockage de triacylglycérol car PLIN1 limite plus fortement la dégradation que PLIN2 ¹¹¹.

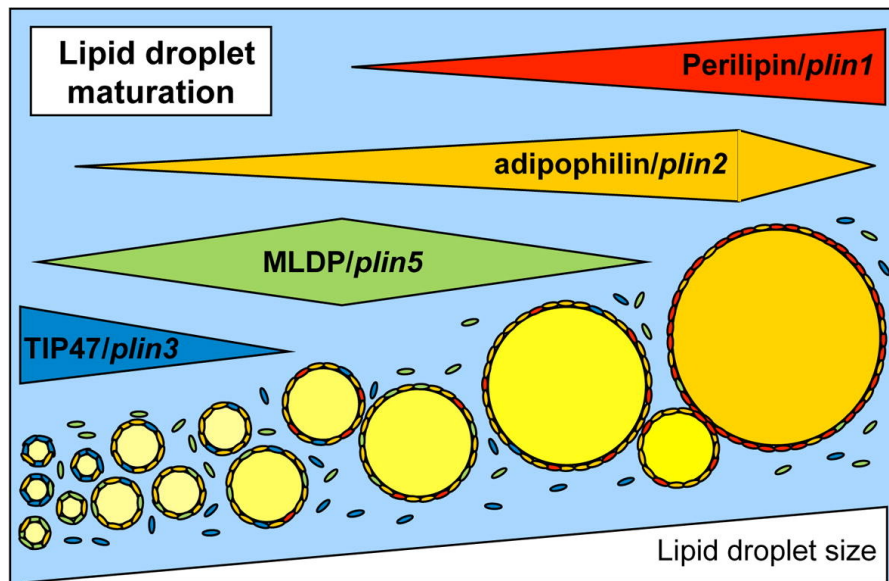


Figure 9 : Schéma adapté représentant la maturation des gouttelettes lipidiques ¹⁶².

Les gouttelettes lipidiques ont initialement été observées à la fin des années 1890 mais n'ont commencées à être étudiées qu'après la découverte de la périlipine et de l'oléosine ¹⁶³. Non seulement les gouttelettes servent de lieu de stockage des acides gras mais elles ont également un rôle essentiel dans la survie à de nombreux stress cellulaires. Parmi ceux-ci, on compte la lipotoxicité, le stress du réticulum endoplasmique, l'oxydation et la famine ^{164,165}.

Biogenèse des gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques

Ce sont les gouttelettes lipidiques (LD) les plus connues et, par conséquent, les mieux caractérisées. Le modèle de biogenèse des gouttelettes le plus accepté est la synthèse, la nucléation et un bourgeonnement cytoplasmique associés à l'augmentation de lipides neutres dans le réticulum endoplasmique ¹⁵⁸. Il a pu être démontré que cette accumulation de lipides neutres est essentielle à la formation des gouttelettes lipidiques, notamment par l'ablation de la DGAT1 qui annihile la formation des gouttelettes et son expression qui restaure cette formation ¹⁶⁶. Lorsque l'on atteint une quantité suffisante de triacylglycérols, leur concentration est telle que ces derniers n'arrivent plus à se répartir uniformément entre les couches du réticulum endoplasmique. Ainsi, une sorte de lentille d'environ 30 à 60 nm se forme grâce au mécanisme de séparation de phase. Ce changement survient car, avec l'accumulation de lipides, il devient thermodynamiquement favorable pour ces derniers

d'interagir entre eux plutôt qu'avec les membranes à proximité ¹⁶⁷. Cette étape est cependant peu connue en termes moléculaires. On sait cependant que ce bourgeonnement membranaire est un processus différent de celui de la formation de vésicules sécrétoires du RE car il n'y a pas d'implication de COPII dans la courbure membranaire ¹⁶⁸. Elle pourrait être spontanée, comme influencée par des facteurs tels que la tension membranaire, la courbure de la membrane ainsi que la composition locale en protéines et en lipides ¹⁶⁹. Il y a cependant certaines protéines qui ont été associées à ce phénomène. On retrouve la seipine et des facteurs d'assemblage de gouttelettes lipidiques (LDAF1, NEM1,...) qui peuvent aider à définir le site de formation de la gouttelette lipidique (Figure 10) ^{170,171}. On y compte également des protéines plus associées aux lipides, comme PLIN3, la protéine transmembranaire de stockage des lipides (FIT2) et des partenaires de liaisons de formation de tubules du RE,... ¹⁷¹ Après la nucléation, les lipides neutres doivent dépasser la déformation de la barrière énergétique des feuilletts membranaires qui les encapsulent ¹⁷². Cela est favorisé par la seipine et PEX30 qui semblent organiser des domaines plus permissifs au phénomène de bourgeonnement par l'altération de phosphatidylcholine, phosphatidylinositol et de diacylglycérol ¹⁷³. En absence de seipine, la formation de LD est retardée et le taux d'incorporation de protéines et de lipides est réduit. En conséquence, on observe des LD avec des propriétés et des morphologies aberrantes ¹⁷⁴. Les seipines peuvent également stabiliser les ponts membranaires liant les LD et le RE. Une délétion de seipines associée à la délétion de PEX30 résulte en l'accumulation de lipides neutres dans le RE avec notamment une composition anormale (plus de PC, PI et DAG) et des problèmes de formation des peroxysomes ^{173,175}. Cette relation entre la composition de lipides, les seipines et PEX30 pourrait être possible grâce à la régulation de GPAT ¹⁷⁶. Au fur et à mesure du bourgeonnement, l'angle de contact entre la gouttelette et le reste du RE augmente graduellement jusqu'à l'éventuelle séparation de la gouttelette et du RE ¹⁶⁹.

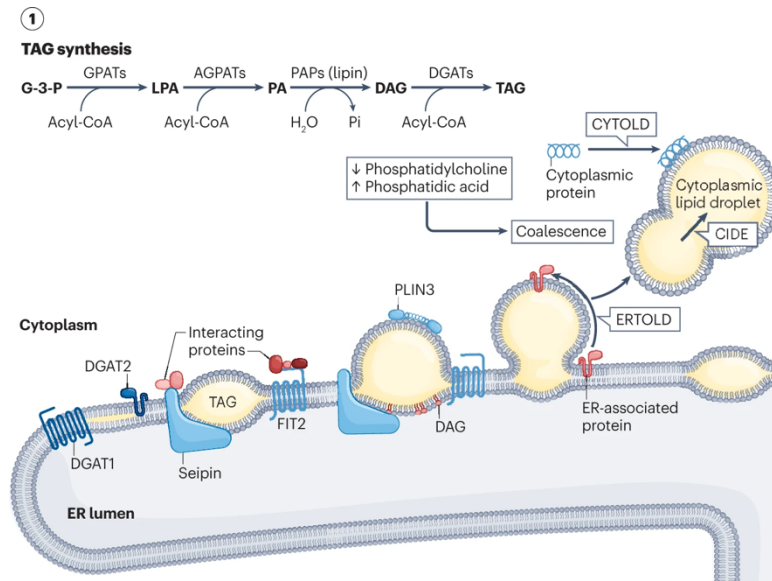


Figure 10 : Schéma adapté représentant la biogenèse d'une gouttelette lipidique à partir du RE ¹⁷⁷.

Un mécanisme clé de la biogenèse des gouttelettes lipidiques implique un processus dit de maturation d'Ostwald qui favorise le transfert de lipides neutres d'une plus petite gouttelette lipidique vers une autre, plus large et plus stable (Figure 10) ¹⁷⁸. Ce transfert se fait avec l'aide de la famille des effecteurs inducteurs de mort cellulaire DFFA-like (CIDE) qui forment des pores permettant de connecter les deux gouttelettes et de modérer le sens de transfert ¹¹¹. Une coalescence peut également survenir en cas de diminution du niveau de phosphatidylcholine et d'augmentation d'acide phosphatique ¹⁷⁹. Il existe parfois aussi des ponts membranaires reliant la gouttelette au RE et permettant à des protéines telles que GPAT4 ou ERTOLD de se relocaliser du RE vers les LD pour contribuer à la croissance de ces gouttelettes ¹⁸⁰.

Les gouttelettes lipidiques nucléaires

Dans certains types cellulaires, on peut observer des gouttelettes lipidiques localisées dans le noyau. Ces dernières peuvent avoir 2 origines connues, soit une biogenèse de novo au niveau de la membrane nucléaire, soit par englobissement de gouttelettes luminales provenant du réticulum nucléoplasmique de type I ¹⁸¹.

Par exemple, les cellules U2OS (ostéosarcome) qui ne présentent pas de seipine ont une diffusion libre des acides phosphatidiques dans la membrane nucléaire interne où la

surrégulation de la lipin-1 produisant le DAG favorise la formation de TAG ¹⁸². Il semblerait également que, dans les hépatocytes, les gouttelettes lipidiques luminales puissent s'accumuler dans le RE puis entrer dans le noyau par le réticulum nucléoplasmique de type I ¹⁸³.

Les gouttelettes lipidiques luminales

Ce sont les gouttelettes lipidiques les moins connues et étudiées. Leur formation correspond à un mélange entre la formation des LD cytoplasmiques et la formation des lipoprotéines ¹⁸⁴. Dans ce second cas, les triacylglycerols (TAG) sont transférés dans des précurseurs partiellement lipidés ApoB-free par un processus en 2 étapes, facilité par la MTP ¹⁸⁵. In fine, ces LD présentent un niveau faible de TAG et n'ont pas d'ApoB, de PLIN2 et d'albumine. À la place, elles contiennent ApoE, la triacylglycérol hydrolase, la carboxylesterase 1 et la MTP ¹⁸⁶.

Les gouttelettes lipidiques en réponse aux stress dans le cancer

Les gouttelettes lipidiques sont principalement connues pour leur rôle dans le stockage des lipides mais leur fonction première est plutôt d'assurer une réponse adaptée à différents stress tels que cités précédemment. Les substrats utilisés pour la synthèse de cholestérols et de triacylglycérols sont des lipides bioactifs qui peuvent, s'ils sont en excès, perturber certaines fonctions cellulaires ¹⁵⁸. De manière assez intuitive, le rôle des gouttelettes lipidiques face à la lipotoxicité est directement lié au stockage des lipides. Comme ces derniers peuvent perturber certaines fonctions cellulaires s'ils sont libres en excès dans le cytoplasme, il est nécessaire de les confiner dans un organelle approprié, les gouttelettes lipidiques ¹⁷⁹.

Un stress métabolique causé par une déprivation en nutriment ou par l'inhibition de mTORC1 peuvent déclencher l'autophagie qui augmente la libération d'acides gras par la dégradation de la membrane. Ainsi, DGAT1 convertit les acides gras en triacylglycérols qui favorisent la biogenèse des LD et protège les mitochondries des dommages lipotoxiques ¹⁸⁷. Il a également été observé que les LD participent directement à l'initiation de l'autophagie en assurant un apport en lipides requis pour la formation des autophagosomes et en maintenant leur composition en phospholipides ¹⁸⁸. La privation en nutriment, comme l'inhibition de mTORC1, augmente l'apport du contenu endosomal dans les lysosomes et favorise l'accumulation de

TAG de manière dépendante du lysosome. En somme, les cellules s'adaptent à la privation par l'augmentation du « turn over » membranaire, du flux d'acides gras et autres intermédiaires vers le RE pour les rentabiliser en TAG et LD ¹⁸⁹. Afin d'augmenter l'utilisation des acides gras, les LD et les mitochondries peuvent se relocaliser du centre du cytoplasme vers sa périphérie et interagir plus fortement entre elles grâce à l'activation de la signalisation AMPK ¹⁹⁰.

Le stress du RE augmente la lipogenèse et la synthèse de TAG avec un remodelage des phospholipides. Notamment, le stress du RE active les kinases activées par le mitogène qui active les phospholipases (cPLA2alpha) par phosphorylation et provoque ainsi la biogenèse de LD. Les LD formées peuvent alors participer à la régulation de la composition membranaire du RE ¹⁹¹ et au retrait de protéines présentant des problèmes de conformation ¹⁹².

Le stress oxydatif provenant des ROS est également associé à une augmentation de la biogenèse des LD. Les mécanismes qui y sont associés sont encore méconnus mais il semblerait que cela implique SREBP et le remodelage des phospholipides ¹⁹³. Les phospholipases peuvent libérer des PUFA membranaires pour les envoyer en stockage dans les LD où ils seront moins sensibles à la peroxydation ¹⁷⁷. Les ROS attaquent en priorité les doubles liaisons des PUFA, provoquant la peroxydation des lipides pouvant déclencher la mort cellulaire ¹⁹⁴. Le rôle des gouttelettes lipidiques dans la protection contre les ROS réside dans le fait que les phospholipases vont libérer des PUFA hors de la membrane plasmique pour qu'ils soient stockés dans les LD ¹⁹⁵. Si la quantité de PUFA à stocker devient trop importante pour les LD, les cellules cancéreuses sont prêtes pour rentrer en ferroptose ¹⁹⁶. Dans l'acidose, la formation de LD est induite par l'apport en acide gras extérieur par le transporteur CD36 et la synthèse de TAG par les DGAT ¹⁹⁷. Ces acides gras peuvent ensuite être oxydés pour assurer la production d'énergie ¹⁷⁷.

Dans le cadre des cancers, les LD peuvent effectivement servir de réserve de précurseurs utiles à la synthèse de lipides membranaires nécessaires à la croissance cellulaire. Cependant, il existe d'autres mécanismes connus pour expliquer leur impact favorable sur la prolifération, la migration et la survie des cellules cancéreuses ¹⁹⁸. Tout d'abord, en diminuant les stress cellulaires et deuxièmement, en amenant des substrats pour la production d'ATP via la beta-oxydation. Au-delà d'apporter de l'énergie à la cellule, cela permet la production de NADPH,

un donneur d'ion hydrogène, utilisable pour l'homéostasie rédox et la réduction de la formation de ROS ¹⁹⁹.

Une autre utilité des LD dans les cancers est la séquestration de précurseurs de molécules impliquées dans la signalisation et qui pourraient impacter la réponse tumorale ²⁰⁰. Il a, par exemple, été constaté que la synthèse de la prostaglandine E2 (suppresseur d'immunité antitumorale) se fait dans les LD ²⁰¹.

Dans la lignée de cancer rénal ccRCC, on observe une accumulation impressionnante de LD au point de leur donner un phénotype « clair/transparent ». Cette lignée est également associée à une activation constitutive de HIF2alpha suite à une mutation inactivant le gène Von Hippel-Lindau ²⁰². L'expression exclusive de PLIN2 fait également partie de ses caractéristiques, de manière à être essentielle à l'accumulation de LD et, avec cette dernière, requis pour la progression tumorale dépendante de HIF2 ²⁰³.

Les protéines et enzymes partenaires des gouttelettes lipidiques et leur impact sur leur dynamique

En somme, les lipides sont stockés dans les gouttelettes lipidiques lors des périodes de surplus en nutriments tandis qu'ils sont mobilisés pendant les périodes de privation ou utilisés pour la formation de phospholipides pendant les phases de prolifération avec une forte demande en composants membranaires. Les gouttelettes lipidiques servent également de tampon pendant différents stress cellulaires en stockant des lipides potentiellement toxiques et protègent ainsi contre la lipotoxicité et le stress oxydatif. Physiquement parlant, les gouttelettes interagissent avec d'autres membranes cellulaires, la plus fréquente étant une interaction avec le RE qui fournit les LD en lipides mais on remarque aussi des contacts avec les peroxisomes, les mitochondries et les lysosomes ²⁰⁴.

La maturation des gouttelettes lipidiques peut se faire par fusion de plusieurs LD, par transfert de TAG venant des ponts membranaires avec le RE ou encore par la synthèse de TAG directement à sa surface membranaire. Cette synthèse au niveau des LD est rendue possible par la relocalisation de protéines du RE sur la surface des LD ¹⁵⁸.

Parmi les LD, certaines restent attachées au RE tandis que d'autres s'en défont totalement. Ce détachement est cependant réversible mais nécessite l'intervention du complexe coatomère COPI²⁰⁵. Il est recruté à la surface des LD par la petite GTPase ARF1 et son GEF et déclenche la formation de minuscules LD à partir de la LD existante. Ce ratio surface sur volume particulièrement élevé des nano-gouttelettes prend tous les phospholipides de la gouttelette mère^{184,205}. Cela augmente la tension de surface qui facilite la fusion avec le RE. Lors de cette fusion, des protéines telles que DGAT2 et GPAT4 sont capables de diffuser du RE vers les LD²⁰⁶.

De manière générale, le protéome des LD consiste en 100 à 150 protéines, la plupart sont des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides et des protéines de la famille des périlipines (PLIN)²⁰⁷. On trouve également des protéines impliquées dans le trafficking membranaire et la dégradation de protéines. Une grande question qui réside toujours autour de ce protéome est comment ces protéines se retrouvent-elles sur les LD ? En effet, il n'y a pas de séquence type connue pour servir de signal ciblant les LD²⁰⁸.

Les protéines associées aux LD peuvent cependant être réparties en 2 classes principales : celles qui sont associées aux membranes de manière stables, provenant du RE et celles recrutées directement à partir du cytoplasme²⁰⁹.

Protéines de classe I

Elles comprennent des protéines aux fonctions diverses avec des enzymes de biosynthèse des lipides (ACSL3, GPAT4, DGAT) comme des enzymes de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine (AUP1, UBX)²¹⁰. Typiquement, les protéines de classe 1 s'associent aux membranes par des « épingles à cheveux » hydrophobes qui s'insèrent à mi-chemin de la membrane avec les 2 extrémités à la face cytosolique. Cette structure leur permettrait de se localiser aussi bien dans une double membrane comme dans le RE que dans la membrane simple des LD²⁰⁹. Il semblerait que pour certaines de ces protéines, des résidus chargés positivement sont nécessaires à leur localisation sur les LD. L'insertion de ces membranes se ferait initialement dans le RE puis passeraient dans les LD par des ponts membranaires¹⁵⁸.

Protéines de classe II

Ce sont les protéines recrutées directement à partir du cytoplasme, généralement par des hélices amphipatiques alpha. Cela permet à la face hydrophobe de l'hélice de s'associer à des zones défectueuses dans l'assemblage de phospholipides des membranes des LD ²⁰⁹. Ces zones défectueuses sont dues à la monocouche de phospholipides dont la tension de surface est souvent plus forte ainsi qu'à l'impact des lipides neutres qui interfèrent ⁹⁸. Les périlipines font partie de cette classe et se lient aux LD par des répétitions de 11 acides aminés qui sont désordonnés dans le cytosol mais qui peuvent se replier en une hélice amphipatique à la surface des LD ¹⁰⁶. Un cas particulier des périlipines est PLIN4 qui n'a pas les mêmes résidus hydrophobes, ce qui crée une distribution des charges asymétriques qui favorise des interactions interhélices. Cela permet à la PLIN4 de couvrir des portions membranaires des LD où il manque des phospholipides car PLIN4 peut se lier directement aux lipides internes ²¹¹.

Les sites de contact membranaire des LD

Les gouttelettes lipidiques peuvent interagir, de manière dépendante de l'accès aux nutriments, avec 6 autres organelles. Ces interactions se font par des sites de contact membranaires qui permettent de faciliter les échanges de lipides, métabolites et ions mais aussi de réguler la division d'organelles.

Les contacts entre les gouttelettes lipidiques et le réticulum endoplasmique.

Même si les LD peuvent se détacher complètement du RE, il semblerait que 85% restent en contact avec le RE. Elles auraient soit encore un partage de membrane soit leurs membranes sont complètement séparées tout en gardant des sites de fixation. Parmi les composants de ces contacts ER-LD, on retrouve DGAT2 qui s'associe à FATP1, RAB18 avec le complexe NAG-RINT1-ZW10 ainsi que sNAREs et Ice2 ²¹²⁻²¹⁴.

Les contacts entre l'enveloppe nucléaire et les LD

Les LD nucléaires restent associées à la membrane nucléaire interne par le biais de seipines. Ces LD auraient pour but de fournir des lipides à l'expansion de l'enveloppe nucléaire et pourrait servir de plateforme de régulation de l'expression des gènes en servant de support

aux facteurs de transcription ²¹⁵. On y retrouve notamment PLIN5 qui fonctionne dans le cadre d'un complexe régulateur de la transcription qui contrôle des gènes mitochondriaux ²¹⁶.

Les contacts entre les LD

Les gouttelettes lipidiques peuvent fusionner grâce à la famille de protéines CIDE. Ces protéines se localisent sur les LD par une hélice amphipatique carboxy-terminale et forment des dimères qui se diffusent sur la membrane jusqu'à trouver une autre LD CIDE-positive ²¹⁷. Ils peuvent ainsi former un oligomère trans-organelles. Ces oligomères formeraient un pore ou un canal qui permet le transfert spécifique de TAG de la plus petite LD vers la plus grosse, suivant la pression interne et la tension de surface ²¹⁷. La fusion par CIDE est régulée par des interactions avec PLIN1 qui influencerait l'oligomérisation mais aussi par la liaison de RAB8a-GDP qui active la fusion des LD par CIDE ²¹⁸. L'acétylation de CIDE en Lys56 par p300/CBP est également un facteur de régulation, sa désacétylation étant opérée par l'HDAC6 d'une manière dépendante des acides gras ²¹⁹.

Au-delà des CIDE, on trouve les homodimères AUP1 ubiquitine-dépendants qui ont également un rôle dans l'ancrage des LD entre elles ²²⁰.

Les contacts entre les mitochondries et les LD

Les interactions entre les mitochondries et les LD semblent avoir un impact différent selon le contexte. Le plus connu serait qu'en cas de privation en nutriments, on observerait une augmentation des interactions entre ces deux organelles ²²¹. Cela permettrait de fournir des acides gras par la lipolyse et la lipophagie de manière à ce qu'ils soient utilisables par les mitochondries pour la production d'énergie par la beta-oxydation et le cycle de l'acide citrique ^{187,222}. La proximité spatiale assurerait une minimisation des acides gras libres dans le cytosol qui pourraient causer de la cytotoxicité ou une signalisation aberrante ²²³. Par contre, dans les adipocytes bruns, on observe plutôt une diminution de la beta-oxydation lorsque les organelles sont à proximité. Il y aurait également une augmentation de la synthèse d'ATP qui pourrait servir à la synthèse de TAG. Ainsi, les mitochondries pourraient participer à l'expansion des LD ²²⁴.

Les contacts entre les peroxysomes et les LD

Les peroxysomes sont le lieu de beta-oxydation des acides gras à très longue chaîne et des acides gras branchés. Leurs interactions ne sont pas bien connues au niveau moléculaire mais la membrane des LD fusionne avec la couche de phospholipides externe du peroxysome, permettant aux enzymes peroxysomales d'accéder à son contenu ¹⁰⁹.

Les contacts entre les lysosomes et les LD

Ces contacts peuvent être soit prolongés soit de très courte durée. Ces derniers pourraient avoir pour but la dégradation des périlipines 2 et 3 par l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) ¹¹². Ces protéines voient leur motif pentapeptide reconnu par HSC70 et délivrées vers la surface lysosomale puis sont transloquées dans son lumen par LAMP2A. Ce phénomène survient dans les cas où les nutriments se font rares ¹⁰⁹.

Les fonctions des LD

Les gouttelettes lipidiques protègent contre le stress du RE

Le stress du RE est un terme générique qui peut se référer à 3 phénomènes de déséquilibre : problème dans la capacité de « repliage » des protéines, de prise de calcium ou de composition lipidiques ²²⁵. Les cellules présentent des mécanismes pour mesurer ce stress et initier une réponse adaptative, l'UPR, pour restaurer l'homéostasie du RE. Lorsqu'il y a une accumulation de protéines n'ayant pas une conformation correcte, il y a 3 activations possibles de IRE1, PERK et/ou ATF6 pour pallier au problème ²²⁶. Leurs activations déclenchent des cascades de signalisation qui coordonnent un ralentissement de la traduction des protéines et une surexpression des gènes impliqués dans le « repliage », dans la dégradation protéique et dans la biosynthèse des lipides. Des perturbations de la synthèse de lipides ou une surcharge des LD peut conduire à une activation de l'UPR ²²⁷. En absence de LD, la composition en phospholipides du RE est altérée et présente une augmentation de la quantité de PI qui aide à compenser l'accumulation inappropriée d'acides gras mais cela réduit la biogenèse d'autophagosomes ¹¹⁰.

Dans les adipocytes, la cascade de signalisation noradrénergique stimule la lipolyse et provoque la libération de nombreux acides gras et la formation de petites LD dont la production peut être empêchée par des inhibiteurs d'acyl-CoA synthétases et de DGAT1 ²²⁸.

Les problèmes de stockage des acides gras, lorsqu'il devient aberrant, peuvent perturber la composition lipidique du RE et ainsi déclencher la réponse UPR, tout comme ils pourraient influencer le repliement correct des protéines et le stockage du calcium ²⁰⁰. Les inducteurs d'UPR et les problèmes de dégradation de protéines dans le RE ont pour effet d'augmenter la quantité de LD ¹⁷⁶. Ainsi, les LD pourraient aider à assurer une composition lipidique du RE normale mais pourraient aussi séquestrer quelques protéines dysfonctionnelles provenant du RE de manière à ce qu'elles puissent être nettoyées par microlipophagie ²⁰¹.

Les gouttelettes lipidiques protègent contre l'endommagement des mitochondries pendant l'autophagie

Une pénurie de nutriments de longue durée augmente l'autophagie, ce qui déclenche la libération d'acides aminés et de lipides à partir de la destruction de protéines et d'organelles organisée par le complexe régulateur mTOR 1 (mTORC1) ²⁰². Une partie des lipides provenant de l'autophagie est directement estérifiée pour former des TAG stockables dans de nouvelles LD ²⁰³. Ces gouttelettes sont spécifiques de DGAT1, potentiellement à cause d'une spécificité de substrat, du rôle dans l'initiation et l'expansion de LD, de la localisation ou de mécanismes de régulation post-traductionnelle ²⁰⁴.

Les LD peuvent servir de tampon pour éviter des dommages lipotoxiques aux mitochondries ²⁰³. En effet, l'inhibition de leur biogenèse dans des cas de privation montre des perturbations du potentiel membranaire des mitochondries associées à une diminution de la respiration mitochondriale et un taux de mort cellulaire plus élevé ²⁰⁴. En fait, il y a un flux trop élevé d'acides gras convertis en acylcarnitine à la surface membranaire externe des mitochondries qui sert à l'incorporation d'acides gras dans la mitochondrie en vue de leur oxydation. L'excès d'acylcarnitine pourrait perméabiliser la membrane mitochondriale et perturber l'intégrité des liposomes ¹⁵⁰.

Liens entre la biogenèse des gouttelettes lipidiques et des peroxysomes

Les peroxysomes, comme les mitochondries, sont des sites de beta-oxydation des acides gras mais ceux-ci sont également essentiels pour la détoxification du peroxyde d'hydrogène. Les peroxysomes sont aussi des sites de synthèse d'acides aminés, plasmalogènes et de certains précurseurs du cholestérol ²⁰⁵. Comme les LD, les peroxysomes, lorsqu'ils sont générés de

novo, proviennent du RE mais eux, présentent une membrane en bicouche. Ils peuvent également être générés par division de peroxysomes pré-existants. Les peroxysomes matures reçoivent des lipides et des protéines provenant du RE de manière à prendre de la masse avant leur division ²⁰⁶.

Le modèle de génération de peroxysomes de novo se présente par la formation de vésicules pré-peroxysomales (PPV) à partir d'un organelle-mère, généralement, le RE mais aussi par les mitochondries. Différents PPV, d'origines différentes aussi, peuvent fusionner pour former un peroxysome fonctionnel. Ces PPV présentent souvent des protéines PEX qui favorisent la maturation et la fusion de ces PPV ²⁰⁷.

La formation des LD est particulièrement étudiée dans le contexte des levures où elles sont plus faciles à étudier. Il a pu être constaté que les peroxysomes et les LD y interagissent par des extensions membranaires enrichies en enzymes de beta-oxydation. Ces extensions comprendraient les protéines M1 spastine des LD qui fixeraient les ABCD1 peroxysomales ²⁰⁸.

Des similarités de sites de démarrage des LD et des peroxysomes ont pu être identifiées. En effet, les deux organelles démarrent souvent leur biogenèse dans des domaines membranaires du RE riches en PEX30, connu chez les eucaryotes sous la forme de MCTP2. Cependant, MCTP2 présente une association dynamique avec les peroxysomes sans vraiment s'y localiser ¹⁴⁶. Ces domaines pourraient agir en modulant le trafic des lipides et leur signalisation. Il a également pu être montré que les seipines, bien connues dans la biogenèse des LD, affectent la formation des peroxysomes puisque leur délétion conduit à une diminution du taux de formation de nouveaux peroxysomes. Les protéines PEX servent également à la localisation correcte de UBXD8, une protéine des LD ²⁰⁹.

Compartimentalisation spatiale de la synthèse des LD

Les LD sont régulés dynamiquement en réponse à diverses conditions physiologiques et leur composition, taille et nombre dépend à la fois du type cellulaire, de la disponibilité en nutriments et de l'état métabolique ⁹⁸. Concernant la localisation de leur formation, elle peut dépendre de la localisation d'enzymes impliquées dans la synthèse des lipides, qui vont

éventuellement migrer sur les LD, des protéines de structure favorisant l'assemblage et de la teneur en certains phospholipides membranaires (par ex. l'acide phosphatidique permet d'accommoder la membrane aux perturbations nécessaires à la formation des LD)²¹⁰. Pendant leur maturation, les LD restent fortement en contact avec le RE qui leur fournit des lipides neutres. Par après, et selon les conditions physiologiques, les LD peuvent entrer en contact avec divers organelles pour coordonner leur dégradation¹⁷⁶. Une cascade de réactions enzymatiques dans le RE est responsable de la synthèse des lipides qui se déposent dans la bicouche membranaire sous la forme de chaînes d'acyles mobiles dans cet environnement hydrophobe¹²⁹.

Dans le cœur des LD, on retrouve principalement des TAG et des esters de stérols (SE) mais on peut également rencontrer des esters de retinyls, du squalène, des éthers de lipides et des acylcéramides qui peuvent s'accumuler selon les conditions. Plus de 25 enzymes différentes sont requises pour la synthèse des lipides neutres et elles peuvent se localiser dans différents compartiments cellulaires et dans le cytoplasme⁹⁸.

La synthèse de TAG de novo est catalysée par 4 enzymes : GPAT, AGPAT, PAP et DGAT avec souvent plusieurs isoformes qui pourraient jouer un rôle fonctionnel dans la régulation de cette production de TAG²¹¹. La synthèse de TAG se passe normalement dans le RE mais peut être relocalisée directement dans les LD sous certaines conditions avec un flux d'acides gras conséquent²¹².

Chez les mammifères, on trouve 2 enzymes DGAT (1 et 2) qui ont des structures, des localisations sub-cellulaires et des substrats différents. Ils peuvent cependant se compenser mutuellement. DGAT1 est exclusif au RE et estérifie principalement des acides gras exogènes²¹³. Son rôle est notamment lié à la détoxification de lipides en excès pour protéger le RE des effets lipotoxiques. DGAT2 est par contre, l'enzyme majeure de la synthèse d'acides gras de novo et peut se localiser sur le RE comme sur les LD. Cette localisation possible sur les LD lui permet de synthétiser des TAG directement à leur surface pour assurer leur expansion²¹⁴.

Le ratio TAG/SE dans les LD dépend du type cellulaire, au même titre que des conditions environnementales. Par exemple, les adipocytes favorisent les TAG tandis que les macrophages présentent plus de LD riches en esters de stérols (SE). Ces types de LD ont des

sites de formations différents. Les LD riches en SE sont plus souvent formées dans la partie corticale ou périphérique du RE tandis que celles riches en TAG sont plutôt au niveau nucléaire du RE où les pools de DAG sont plus importants ¹²⁹. Les enzymes responsables de la formation de SE ont pu être observées à la fois au niveau du RE et des LD. Cela pourrait indiquer à la fois une production et une régulation au niveau des 2 sites avec potentiellement une restriction de l'accès à des partenaires et intermédiaires métaboliques ²¹⁵.

À de faibles concentrations, les TAG sont positionnés dans les membranes de phospholipides de manière à ce que leur squelette de glycérol soit face à l'interface membranaire aqueuse. La solubilité de TAG est réduite en présence de cholestérols et son dépôt dans les LD en formation pourrait en dépendre. Au-delà d'une concentration de 5 à 10 mol%, on observe un phénomène de dé-mixage qui minimise la tension de surface et les coûts énergétiques dus à 2 phases qui ne se mélangent pas ²¹⁶. La composition phospholipidique des membranes est un déterminant essentiel des propriétés biophysiques de la membrane. Lorsque la tension de surface est élevée, la formation de LD est favorisée ¹²⁹. Les lipides avec une courbure négative stabilisent la connexion entre le RE et la LD tandis que des lipides à courbure positive comme les PI vont la diminuer pour favoriser le détachement de la LD hors du RE. Ainsi, la composition de la membrane en certains points détermine au moins partiellement la formation de LD et permet une asymétrie de manière à diriger la formation de LD vers le cytoplasme ¹⁴⁹. Le RE présente des zones membranaires plates et d'autre en tubules recourbés qui sont maintenus par différentes protéines (réticulons, atlastines) et leur mutation impacte l'architecture du RE ainsi que la formation de LD en termes de taille et de morphologie ²¹⁷.

Les protéines FIT constituent une famille de protéines conservées qui facilitent le bourgeonnement des LD. Chez les mammifères, on retrouve FIT1 et FIT2 et leur déplétion cause une accumulation de lipides et des croissances de LD ratées. FIT2 peut lier les TAG et DAG avec DAG qui favorise une courbure membranaire négative ¹⁴². On suppose que FIT2 pourrait réguler la concentration locale de DAG et ainsi réguler la formation de LD. Cependant, les protéines FIT pourraient également présenter une fonction phosphatase/phosphotransférase puisqu'elles présentent une séquence protéique similaire à leur site actif ¹⁷⁵.

Une autre famille importante lorsque l'on parle de la formation des LD est la famille des seipines. La seipine est une protéine intégrale membranaire du RE avec sa partie principale dans le lumen et les extrémités du côté du cytoplasme ¹⁴¹. Sa localisation dans le RE n'est pas uniforme mais plutôt concentrée en certains points formant les contacts RE-LD. Elles sont aussi recrutées sur les LD en formation et peuvent être observées au stade de lentille ²¹⁸. En l'absence de seipine, les contacts LD-RE sont plus hétérogènes en termes de taille et de forme. On observe des perturbations du trafic de protéines vers les LD avec moins de lipases capables de se localiser sur les LD et aussi moins d'apports de lipides ¹⁴⁵. Les seipines jouent visiblement un rôle favorable dans l'adipogenèse en influençant la voie de signalisation PPARgamma. L'absence de seipine augmente l'activité de la GPAT et ainsi le taux d'acide phosphatidique qui, en excès, inhibe la voie PPAR ¹⁴⁷. Les seipines pourraient également agir sur d'autres aspects tournant autour de l'adipogenèse, comme l'homéostasie du calcium, le remodelage du cytosquelette d'actine et la prévention de l'inflammation ¹⁴⁷.

La localisation des LD n'est pas anodine. Elle est notamment modulée par ses interactions avec les divers organelles pour promouvoir les échanges de lipides et les interactions métaboliques, permettant ainsi de répondre à différents stress ⁹⁸.

En cas de lipotoxicité, les cellules peuvent exprimer des ligases d'acyl-CoA et acides gras qui peuvent estérifier les acides gras et promouvoir leur incorporation dans les membranes ou en lipides neutres. Par exemple, l'inhibition de DGAT peut accentuer l'accumulation d'acides gras dans la bicouche phospholipidique du RE et perturber son fonctionnement, augmenter l'apparition de conformation aberrante de protéines et l'activation de l'UPR ¹⁵⁵.

Nom	Fonction	Rôle dans le cancer
PLIN1	Régulation du stockage et de la libération des lipides dans les adipocytes.	Effet dépendant du tissu. Favorise la progression tumorale des tissus emmagasinant les acides gras et défavorable à l'évasion tumorale dans les

		tissus utilisant les acides gras ²¹⁹ .
PLIN2	Stabilisation des LD et régulation du métabolisme des lipides.	Associé positivement à la progression tumorale ²²⁰ .
PLIN3	Transport des lipides et interaction avec les membranes.	Augmente la résistance à la radiothérapie et l'efficacité du docetaxel ²²¹ .
PLIN4	Améliore la stabilité membranaire des LD.	Associé à la résistance à la chimiothérapie ²²² .
PLIN5	Protéine de contact entre les LD et les mitochondries.	Indicateur de pronostic défavorable ²²⁰ .
DGAT1	Conversion de DAG en TAG lors de la formation des LD à partir du RE.	Protège contre le stress oxydatif en incorporant les acides gras excédents en TAG ²²³ .
Seipine	Biogenèse des LD et régulation de leur taille ²²⁴ .	/
LDAF1	Biogenèse des LD et régulation de leur taille ²²⁴ .	/
FIT2	Régulation de la composition des LD lors de leur formation et de leur croissance ²²⁵ .	/
CIDE	Régulation de la taille des LD et de l'apoptose.	Surexpression dans certains cancers ²²⁶ .
GPAT4	Synthèse des TAG et formation des LD.	Favorise la prolifération cellulaire ¹⁵¹ .
ERTOLD	Ciblage des protéines du RE vers les LD ¹⁵¹ .	/

SNAP23	Régulation de la fusion des LD et interaction avec les membranes cellulaires ¹⁹³ .	/
AUP1	Régulation de la formation des LD et dégradation des protéines de mauvaise conformation ¹⁵⁰ .	
UBX	Régulation de la dégradation des protéines et des LD ¹⁷¹ .	
DGAT2	Conversion de DAG en TAG lors de la formation et l'expansion des LD.	Inhibition réduit l'invasion tumorale ²²³ .
RAB18	Régulation de la dynamique des LD et interaction avec le RE ¹⁸⁵ .	
Ice2	Régulation de la formation des LD ¹⁸³ .	
RAB8a-GDP	Régulation de la dynamique des LD ¹⁸⁹ .	
AGPAT	Synthèse de phospholipides et formation des LD ²¹⁴ .	Surexpression dans certains cancers.
ATGL	Hydrolyse des TAG et mobilisation des lipides ²²⁷ .	
CGI-58	Activation d'ATGL et régulation de la lipolyse ²²⁷ .	

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des protéines clés associées aux LD et impliquées dans les mécanismes de leur genèse, de leur dégradation et de leur localisation.

Chapitre 6 : L'acétylation

L'acétyl-CoA synthétase (ACS) voit son expression augmentée en conditions hypoxiques. Cela pourrait modifier la disponibilité des pools d'acétyl-CoA cytosolique et mitochondrial, influençant ainsi le profil d'acétylation de certaines protéines comme la glutamate déshydrogénase (GDH) et la superoxyde dismutase (SOD) ²⁸.

L'acétylation d'histones consiste en un processus dynamique et réversible de transfert d'un groupe acétyl. L'acétylation d'histones spécifiques permet une relaxation de la chromatine. Au niveau protéique, de nombreuses protéines peuvent être régulées par acétylation, on y trouve notamment HIF, Myc, KRAS, p53, pRb et PTEN ⁵⁹.

L'acétylation des protéines non-histones constitue une portion majeure de l'acétylome dans les cellules de mammifères. Parmi les phénomènes associés à l'acétylation, on retrouve des processus cellulaires importants tels que la transcription des gènes, les systèmes de réparation de l'ADN, la division cellulaire, la transduction de signal, le repliement des protéines, l'autophagie et le métabolisme ²²⁸. Les protéines impactées voient leur stabilité, activité enzymatique, localisation et interactions modulées par l'acétylation. Un avantage clé des modifications post-traductionnelles est la dynamique de régulation qui est beaucoup plus rapide et moins énergivore qu'une régulation au niveau de l'expression des protéines. Cela permet également de créer des isoformes avec des fonctions variables, rendant le protéome encore plus diversifié ²²⁹.

Historiquement, l'acétylation a été découverte par Vincent Allfrey en 1964. D'abord sur les histones puis sur les protéines de haute mobilité HMG qui lient la chromatine et la tubuline ²³⁰. Dans les années 90, l'acétylation de p53 a aussi pu être répertoriée et des acétyltransférases et déacétylases ont pu être identifiées avec leur bromodomaine servant à lire les lysines acétylées. Il existe cependant d'autres acétylations qui ne sont pas forcément localisées sur des résidus lysine ²³¹. Depuis 2006, de nombreux sites d'acétylation ont pu être identifiés grâce à une combinaison de spectrométrie de masse à haute résolution et à des enrichissements en peptides acétylés par affinité immunitaire ²³².

Ces dernières années, l'utilisation de modèles KO et d'inhibiteurs de CBP et p300 a permis d'étudier les différents sites d'acétylation associés à ces deux enzymes et leur vitesse de « turnover ». À elles deux, ces enzymes sont responsables de l'acétylation d'environ un tiers de l'acétyle nucléaire avec une cinétique de déacétylation rapide, témoignant d'un équilibre fin entre leur activité et celle des déacétylases ²³³.

Régulation de l'acétylation

L'acétylation des lysines consiste en le transfert d'un groupe acétyle d'un acétyl-CoA sur la chaîne ε-aminée du résidu lysine. Cela peut se produire de manière enzymatique, avec une lysine acétyl-transférase (KAT) ou non. Cette réaction est hautement réversible, avec ou sans l'aide d'une lysine déacétylase (KDAC) ²³⁴.

L'acétyl-CoA est un métabolite essentiel avec diverses fonctions comme la génération d'énergie dans les mitochondries et la synthèse de lipides dans le cytoplasme. Il est cependant imperméable à la membrane ²³⁵. Cela implique qu'il en existe deux sources indépendantes, une dans la mitochondrie et l'autre dans le cytoplasme. Dans la mitochondrie, il est généré par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC), par la beta-oxydation des acides gras ou le métabolisme des acides aminés ²³⁶. Dans le cytoplasme, et parfois le noyau, l'acétyl-CoA est généré par ACLY et l'ACSS2 ou encore par le PDC nucléaire. La membrane du noyau n'empêche pas l'acétyl-CoA de circuler grâce à ses pores nucléaires. L'acétylation dépend directement de la concentration d'acétyl-CoA et de sa localisation ²³⁷. En effet, dans le noyau, ACLY, ACSS2 et PDC régulent l'acétylation d'histone et la transcription des gènes ²³⁸. Par ailleurs, la délétion des acétyl-CoA carboxylases (ACC1 et ACC2), enzymes qui convertissent l'acétyl-CoA en malonyl-CoA résulte en une augmentation de l'acétylation des protéines, sans doute due à une inhibition de la lipogenèse et une accumulation plus élevée en acétyl-CoA ²³⁹.

Les lysines acétyltransférases (KAT)

Il existe 13 lysines acétyltransférases (KAT) canoniques classées en 3 familles (GCN5, p300 et MYST). Les KAT restantes sont très variables. On y retrouve l'alpha-tubuline N-acétyltransférase 1 (TAT1), les homologues d'établissement de cohésion 1 et 2 (ESCO1/2) et l'histone acétyltransférase 1 (HAT1). Elles sont toutes, à l'exception de TAT1, localisées

majoritairement dans le noyau. La spécificité de substrat des KAT serait défini par leur localisation, leurs interactions et l'accessibilité du résidu lysine de leur substrat. Cela induit une certaine redondance ^{240–243}.

La plupart des acétylations se produisent dans le noyau et concernent majoritairement des protéines impliquées dans la régulation de la transcription. Parmi les sites d'acétylation identifiés, environ deux tiers seraient catalysés par CBP et/ou p300. En somme, jusqu'à 90% des protéines sont acétylées par 5 KAT (CBP, p300, GCN5, PCAF et TIP60) ²²⁹.

Enzyme	Fonction	Cibles
Histone acétyltransférase (HAT)	Acétylation des histones, régulation de la transcription génétique	Histones H3, H4
Choline acétyltransférase (ChAT)	Synthèse de l'acétylcholine, un neurotransmetteur	Choline
Sérotonine N-acétyltransférase	Conversion de la sérotonine en mélatonine	Sérotonine
Chloramphénicol acétyltransférase	Inactivation de l'antibiotique chloramphénicol	Chloramphénicol
NatA acétyltransférase	Acétylation des protéines à l'extrémité N-terminale	Protéines N-terminales, Sup35p1, L-serine, L-alanine, L-thréonine, glycine 1
NatB acétyltransférase	Acétylation des peptides commençant par Met-Asp/Glu/Asn/Gln	Peptides N-terminales, actine, tropomyosine, tubuline
Lysine acétyltransférases (KAT)	Acétylation des résidus lysine sur les histones et autres protéines	Histones et autres protéines

KAT2A (GCN5)	Acétylation des histones H3 et H4, régulation de la transcription	Histones H3, H4, p53, E2F1
KAT2B (PCAF)	Acétylation des histones H3 et H4, régulation de la transcription	Histones H3, H4, p53, NF-κB
KAT3A (CBP)	Acétylation des histones H2B, H3, H4, régulation de la transcription	Histones H2B, H3, H4, p53, NF-κB
KAT3B (p300)	Acétylation des histones H2B, H3, H4, régulation de la transcription	Histones H2B, H3, H4, p53, NF-κB
KAT5 (TIP60)	Acétylation des histones H2A, H4, régulation de la réparation de l'ADN	Histones H2A, H4, ATM
KAT6A (MOZ)	Acétylation des histones H3, H4, régulation de la transcription	Histones H3, H4, RUNX2
KAT6B (MORF)	Acétylation des histones H3, H4, régulation de la transcription	Histones H3, H4, RUNX2
KAT7 (HBO1)	Acétylation des histones H4, régulation de la transcription	Histones H4, ORC1
KAT8 (MOF)	Acétylation des histones H4, régulation de la transcription	Histones H4, MSL1

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principales acétyltransférases (histones et non-histones) et de leurs fonctions respectives.

Les lysines déacétylases (KDAC)

Il en existe 18 chez l'humain réparties en 2 catégories : les HDAC dépendantes du zinc et les sirtuines dépendantes de NAD⁺. Les HDAC ont un domaine déacétylase fortement conservé et peuvent être divisées en quatre classes (I,IIa, IIb,IV) : les classes I et IV sont nucléaires, IIb est cytoplasmique et la classe IIa est initialement nucléaire mais peut être exportée dans le cytoplasme ^{244,245}.

Les sirtuines, aussi appelées HDAC de classe III présentent des localisations plus variées : SIRT1 et SIRT6 dans le noyau, SIRT7 dans le nucléole, SIRT2 dans le cytoplasme et SIRT3, SIRT4 et SIRT5 dans les mitochondries. Il est intéressant de noter que SIRT6 agit également comme acylase pour les acides gras à longues chaînes. SIRT1 est responsable de la désacétylation de plus de 40% des sites d'acétylation ²²⁹.

Enzyme	Fonction	Cibles
Histone désacétylase (HDAC)	Désacétylation des histones, régulation de la transcription génétique	Histones H3, H4
Sirtuines (SIRT)	Désacétylation des histones et des protéines non-histones, régulation métabolique	Histones H3, H4, protéines non-histones
HDAC1	Désacétylation des histones, régulation de la transcription génétique	Histones H3, H4
HDAC2	Désacétylation des histones, régulation de la transcription génétique	Histones H3, H4
HDAC3	Désacétylation des histones, régulation de la transcription génétique	Histones H3, H4
HDAC6	Désacétylation des protéines non-histones, régulation de la stabilité des microtubules	Tubuline, HSP90, cortactine
Lysine désacétylases (KDAC)	Désacétylation des résidus lysine sur les histones et autres protéines	Histones et autres protéines
SIRT1	Désacétylation des histones H3, H4, régulation de la transcription et du métabolisme	Histones H3, H4, p53, FOXO, NF-κB
SIRT2	Désacétylation des histones H4, régulation du cycle cellulaire	Histones H4, α-tubuline, p53

SIRT3	Désacétylation des protéines mitochondriales, régulation du métabolisme énergétique	Protéines mitochondriales , MnSOD, IDH2
SIRT6	Désacétylation des histones H3, régulation de la réparation de l'ADN	Histones H3 , HIF1 α , TNF

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principales lysines déacétylases, incluant les HDAC et les sirtuines, ainsi que leurs fonctions et cibles.

Les rôles cellulaires de l'acétylation

La transcription des gènes

La plupart des KAT sont donc nucléaires, comme la majorité des protéines capables de reconnaître les lysines acétylées via un bromodomaine, et agissent comme des co-activateurs de transcription. Par exemple, l'acétylation de p53 régule sa capacité à se lier à l'ADN, sa stabilité et ses interactions protéiques, contribuant ainsi à l'activation des gènes de réponse au stress cellulaire ²⁴⁶.

Le cycle cellulaire

La tête ATPase SMC3, composant clé du complexe cohésine, est acétylé en deux résidus sensibles à l'ADN (Lys105 et Lys106). Après interaction avec l'ADN, cette acétylation referme l'anneau de cohésine, assurant ainsi une cohésion stable avec la chromatine. Elle est réversible et annulée par la désacétylation effectuée par HDAC8 ²⁴⁷. Parmi les régulateurs du cycle cellulaire impactés par l'acétylation, on retrouve également BUBR1, les kinases Aurora A et B, ainsi que CDK1, CDK2 et PLK4 ²⁴⁸⁻²⁵⁰.

La réparation des dommages à l'ADN

TIP60 acétyle et active H2AFX, un régulateur clé de la réparation des cassures double brin de l'ADN, permettant ainsi la réponse aux dommages. L'inactivation de TIP60 sensibilise les cellules aux radiations ²⁵¹. L'acétylation joue également un rôle dans le choix de la voie de réparation des cassures double brin entre, la voie NHEJ et la voie HDR, en régulant le recrutement de la protéine 53BP1 au niveau des sites problématiques ²⁵². Par ailleurs, la phosphorylation d'ACLY par ATM induit par les dommages à l'ADN provoque une

augmentation de la production d'acétyl-CoA nucléaire favorisant l'acétylation des histones et la localisation de 53BP1 sur la chromatine impactée ²⁵³.

L'acétylation joue également un rôle dans les systèmes de réparation par excision de base (BER) et par excision de nucléotide (NER). L'acétylation de l'endonucléase apurinique/apyrimidique 1 (APE1) induite par les dommages à l'ADN inhibe son interaction avec XRCC1 et réduit son activité. La fonction d'APE1 nécessite sa désacétylation par SIRT1 pour être restaurée. Lors des dommages induits par les UV, l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) est acétylé, ce qui facilite son retrait de la chromatine après la réparation par NER ²⁵⁴.

La signalisation cellulaire

PTEN, un régulateur de PIP3, est acétylé par PCAF dans son domaine catalytique, ce qui inhibe son activité. Cependant, son acétylation par CBP dans son domaine carboxy-terminal va promouvoir son interaction avec des protéines contenant PDZ et renforcer son activité phosphatase ²⁵⁵. PIP3 est également régulé par l'acétylation d'AKT et de PDK1 par PCAF et p300, ce qui bloque leur activation. À l'inverse, la désacétylation par SIRT1 favorise leur liaison à PIP3 et augmente leur activité kinase ²⁵⁶. L'acétylation de RICTOR, un compagnon de mTORC2, par p300 accroît la phosphorylation d'AKT. Dans la même idée, l'inhibition des sirtuines augmente l'acétylation de RICTOR laquelle est accentuée par l'apport de glucose ou d'acétate ²⁵⁷.

Le repliement des protéines

Les protéines de réponse au choc thermique (HSP), chaperonnes majeures chez les eucaryotes, sont également ciblées par l'acétylation. On peut y compter HSP10, HSP70, HSP90 et HSPA5 ²⁵⁸.

L'organisation du cytosquelette

Pour rappel, les microtubules sont formés par la polymérisation d'alpha et beta tubulines. L'alpha-tubuline est acétylée à la Lys40 par TAT1 et désacétylée par HDAC6. L'acétylation des microtubules augmente leur résilience face au stress mécanique ²⁵⁹.

L'agrégation de protéines

L'accumulation de protéines sous la forme d'agrégats peut être associée à divers troubles, notamment neurologiques. Certaines protéines présentent une plus forte propension à s'agréger lorsqu'elles sont acétylées. C'est notamment le cas de l'Huntingtin, de Tau, de la superoxyde dismutase 1 et de TDP43 ²⁶⁰.

Le processing et la stabilité des ARN

L'acétylation régule de nombreuses étapes du *processing* des ARN, notamment l'épissage et la polyadénylation ainsi que la dégradation des ARN polyadénylés. Il a pu être montré que CBP et p300 favorisent la dégradation des ARN par l'acétylation de CNOT7, composant du complexe CCR4-NOT ²⁶¹.

L'autophagie

Selon la cible de l'acétylation, son effet sur l'autophagie peut différer. En condition de privation en nutriments, l'activation de la GSK3 phosphoryle et active TIP60. TIP60 peut ensuite acétyler et stimuler ULK1, une protéine essentielle à l'initiation de l'autophagie ²⁶². À l'inverse, dans des conditions riches en nutriments, mTORC1 phosphoryle p300, retirant son auto-inhibition, ce qui supprime l'autophagie et favorise la lipogenèse ²⁶³. P300 acétyle également certains facteurs clés de l'autophagie tels que ATG5, ATG7 et LC3.

SIRT1 interagit directement avec ATG5, ATG7 et LC3 et les désacétyle, cela est nécessaire au fonctionnement de l'autophagie. HDAC6 est, chez les mammifères, la seule désacétylase contenant un domaine de liaison à l'ubiquitine. Cela lui permet de compenser des problèmes éventuels dans le système de dégradation par le protéasome. HDAC6 facilite le transport de protéines agrégées et des mitochondries endommagées le long des microtubules vers les autophagosomes. Elle favorise également la fusion des autophagosomes avec les lysosomes par la désacétylation de la cortactine qui contribue à l'organisation du réseau de l'actine F ^{172,264}.

Autres fonctions de régulation

On compte de nombreux processus régulés par l'acétylation des protéines non-histone. Parmi ceux-ci, on peut trouver la réplication de l'ADN (MCM10), l'apoptose (p53), le stockage et la dégradation des lipides (CAVIN1, CIDEA), la fission et la fusion des mitochondries (MFN1, OPA1), la synthèse des protéines (eIF2A), le transport d'ions (AMPA), la régulation redox (PRX1) ainsi que des implications dans le métabolisme cellulaire ²⁶⁵.

Les mécanismes fonctionnels de l'acétylation

La régulation des enzymes

Régulation de l'activité catalytique des enzymes par acétylation

L'acétylation inactive l'activité enzymatique de l'acétyl-CoA synthétase 1 (ACSS1) et ACSS2 qui se localisent dans le cytoplasme et dans la mitochondrie, respectivement. Leur désacétylation par les SIRT1 et SIRT3 restaure leur fonction catalytique ²⁶⁶. Pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), son acétylation par KAT9 inhibe la formation de dimères actifs de cette enzyme, engendrant ainsi une perte de son activité enzymatique. Au contraire, sa désacétylation par la SIRT2 restaure la fonction de G6PD et protège les cellules contre les dommages oxydatifs ²⁶⁷. De manière générale, dans les mitochondries, l'acétylation inhibe les enzymes mitochondriales et les sirtuines les désacétylent pour restaurer leur fonction ²⁶⁷. On retrouve aussi cet effet sur des enzymes kinases de régulation du cycle cellulaire tels que CDK1, CDK2 et CDK5. Par contre, l'autoacétylation augmente l'activité de plusieurs lysines acétyltransférases comme p300, PCAF et MOF ²⁶⁸.

Altération de la spécificité enzyme-substrat

L'acétylation peut altérer la spécificité de MDM2, la faisant passer de son auto-ubiquitinylation à l'ubiquitinylation de p53. L'acétylation de MDM2 sur les lysines 182 et 185 par p300 permet sa liaison à la déubiquitinylation USP7. Cela dirige l'activité de MDM2 vers p53, augmentant ainsi la stabilité de MDM2. En cas de stress génotoxique, la SIRT1 désacétyle MDM2 pour promouvoir son auto-ubiquitination et sa dégradation. Cela réduit l'ubiquitination de p53, augmente sa stabilité et favorise l'apoptose ²⁶⁹.

La régulation de la dégradation des protéines

L'acétylation rentre en compétition avec l'ubiquitination et la dégradation dépendante du protéasome car ils peuvent se partager les mêmes résidus lysines. Cela est notamment le cas avec SMAD7. Cependant, l'acétylation peut également favoriser la dégradation protéique. Par exemple, DNMT1 devient plus sensible à l'ubiquitination par UHRF1 après son acétylation ²⁷⁰.

Une dégradation indépendante du protéasome est observée pendant l'acétylation de la pyruvate kinase PKM, qui devient une cible de la dégradation par l'autophagie médiée par les chaperonnes. On observe un mécanisme similaire pour la lactate déshydrogénase A (LDHA) dont l'acétylation sur sa lysine 5 inhibe son activité et favorise sa reconnaissance par la protéine chaperonne HSPA8 pour sa dégradation par le lysosome ²⁶⁴.

Les interactions entre protéines

Favorisation des interactions

Les interactions protéiques dépendantes de l'acétylation sont principalement étudiées dans le cadre des protéines contenant des bromodomaines. On décompte 61 bromodomaines répartis sur 46 protéines, majoritairement nucléaires. Parmi celles-ci figure la famille protéique extraterminale à bromodomaine (BET). Ces protéines interagissent avec les queues d'histones acétylés et régulent l'expression des gènes. L'interaction médiée par le bromodomaine est caractérisée par une faible affinité et une promiscuité vis-à-vis du ligand. Leur affinité pourrait cependant augmenter grâce à un fonctionnement en tandem et des liaisons coopératives. Elles peuvent également agir en combinaison avec d'autres domaines reconnaissant des modifications post-traductionnelles ²⁷¹. Par exemple, la phosphorylation de CREB favorise son interaction avec le domaine KIX de CBP tandis que son acétylation favorise son interaction avec le bromodomaine de CBP ²⁷². Cela résulte en une liaison dépendante de modification réciproque qui augmente le recrutement de CBP au niveau des promoteurs de gènes.

L'inhibition d'interactions protéiques

L'inhibiteur du facteur NF- κ B ($I\kappa B\alpha$) séquestre la sous-unité p65 dans le cytoplasme, inhibant ainsi son activité transcriptionnelle. L'acétylation de p65 perturbe son interaction avec $I\kappa B\alpha$ tandis que sa désacétylation par HDAC3 favorise son export nucléaire et sa dégradation.

L'acétylation de résidus dans le domaine C-terminal de p53 empêche son interaction avec plusieurs partenaires protéiques possédant un domaine acide tels que SET ou DAXX ²⁷³.

Régulation de la liaison à l'ADN

Le facteur de transcription de réponse au choc thermique, HSF1, est un régulateur de gènes impliqués dans le repliement des protéines. Son acétylation inhibe sa liaison à HSP70 tandis que sa désacétylation par SIRT1 restaure sa capacité à lier l'ADN. L'acétylation de p53 dans son domaine C-terminal augmente son interaction avec l'ADN et son acétylation par TIP60 dans son domaine de liaison à l'ADN accroît son recrutement au niveau des promoteurs de gènes pro-apoptotiques ²⁵¹.

Régulation de la localisation sous-cellulaire

Augmentation de la localisation cytoplasmique

L'acétylation de p300 de la protéine kinase associée à la phase S 2 (SKP2) au niveau de son signal de localisation nucléaire favorise sa rétention cytoplasmique et inhibe sa dégradation. La déplétion de SIRT3 augmente la rétention de SKP2 dans le cytoplasme, où elle peut augmenter la migration cellulaire par ubiquitination et dégradation de l'E-cadhérine. L'acétylation de SOX2 favorise son association à la machinerie d'export nucléaire, provoquant sa relocalisation dans le cytoplasme et ainsi sa dégradation par la voie du protéasome ²⁷⁴.

Augmentation de la localisation nucléaire

CBP catalyse l'acétylation du signal de localisation nucléaire de HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4), favorisant ainsi sa rétention nucléaire. La version non acétylée d'HNF4 est exportée dans le cytoplasme par la voie de l'exportine 1 ²⁷⁵.

Sécrétion extracellulaire

La protéine HMGB1 est une protéine de liaison à l'ADN. Toutefois, dans les macrophages et monocytes activés, elle est sécrétée afin d'induire une réponse inflammatoire. Ce processus est régulé par l'acétylation de HMGB1 qui le relocalise vers le cytosol et permet sa concentration dans les lysosomes sécrétoires, provoquant son excrétion extracellulaire ²⁷⁶.

Localisation membranaire

La désacétylase SIRT1 régule l'acétylation et localisation membranaire de la sous-unité alpha du canal sodique cardiaque voltage-dépendant ²⁷⁷.

La translocation mitochondriale

Dans des conditions riches en glucose, l'acétylation de p66Shc favorise sa phosphorylation, provoquant sa translocation vers la mitochondrie. Cela a pour effet d'augmenter la production de ROS par la génération de peroxyde d'hydrogène ²⁷⁸.

Les interactions avec d'autres modifications post-traductionnelles

Les résidus lysines peuvent être le lieu de plusieurs modifications post traductionnelles différentes. Outre l'acétylation, ils peuvent subir des acylations, des méthylations, ou encore de l'ubiquitination. Une compétition peut donc s'établir entre toutes ces modifications possibles, assurant ainsi une régulation fine des protéines. Un excellent exemple de ce phénomène est celui de p53. Son acétylation sur des résidus lysines dans le domaine C-terminal rentre en compétition avec l'ubiquitination catalysée par MDM2, influençant ainsi sa dégradation et réciproquement ²⁷⁹. L'acétylation de p53 peut être augmentée par sa méthylation par SETD7 qui favorise le recrutement de TIP60. Indépendamment, SETD7 régule négativement SIRT1 laquelle désacétyle p53 ²⁵¹. La phosphorylation de la sous-unité p65 de NF-κB favorise son acétylation par p300 et augmente son activité transcriptionnelle. Lorsqu'elle n'est pas acétylée, la lysine 310 est chargée positivement et interagit avec la méthyltransférase SETD7 ²²⁹.

Chapitre 7 : NPM1

La nucléophosmine (NPM1) est une phosphoprotéine ubiquiste abondante principalement localisée dans le nucléole, participant à son maintien. Elle est caractérisée par sa capacité à se déplacer entre le nucléole, le noyau et le cytoplasme. Elle est également connue sous les noms de B23 ou de numitrine ²⁸⁰.

C'est une protéine connue sous 3 isoformes issues de l'épissage alternatif avec l'isoforme 1.1 comme la plus courante et étudiée. Le second variant ne contient pas l'exon 8 et le troisième est très faiblement exprimé avec 35 acides aminés manquant du côté C-terminal. On retrouve ce variant dans le nucléoplasme mais pas dans le nucléole ²⁸¹.

La structure de NPM1

NPM1 provient d'un gène à 12 exons qui font entre 58 et 358 paires de bases, situé sur le chromosome 5q35. Son ablation induit une mort pendant la gestation suite à des défauts d'hémopoïèse et de formation du cerveau ²⁸¹.

La structure de NPM1 se compose de 3 régions distinctes (Figure 11a) :

- La région N-terminale est responsable du rôle de chaperonne de NPM1 et est également un site d'interaction clé de NPM1. Cette région contient 2 séquences signal d'export nucléaire et se compose de 8 brins beta anti-parallèles formant un tonneau beta avec un repliement appelé « jelly-roll ». Ce domaine est requis pour l'oligomérisation de NPM1 ;
- Une zone centrale dépourvue de structure particulière (IDR) mais présentant une séquence signal de localisation nucléaire. Cette région contient des résidus acides glutamates et aspartates qui sont importants pour le rôle de chaperonne d'histone de NPM1. Cela leur permet de servir de site de liaison à des protéines basiques telles que les histones et les protéines ribosomales ;
- La région C-terminale (CTD) responsable des interactions avec les acides nucléiques et comportant un signal de localisation nucléolaire. C'est cette région qui est mutée dans les cas de leucémies amyéloïdes (AML). Sa structure consiste en un faisceau de 3

hélices stabilisé par des résidus aromatiques qui reconnaît de préférence les acides nucléiques simple brin ^{280–282}.

NPM1 est une protéine capable de former un homopentamère en couronne qui peut interagir avec un second pentamère pour former un décamère (Figure 11b). Cet assemblage pentamérique est stabilisé par le biais de nombreuses interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes. Ce mécanisme est typique des chaperonnes. Cet état oligomérique peut être déstabilisé par la phosphorylation de sérines et de thréonines. Les monomères en eux-mêmes ont une stabilité assez faible ²⁸³.

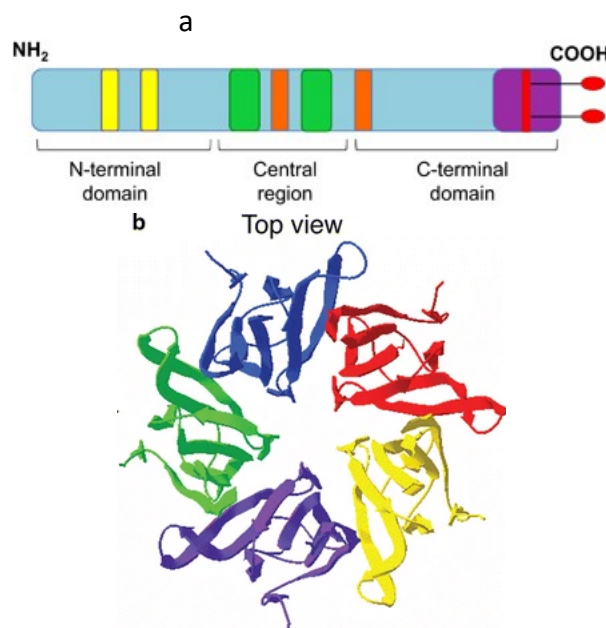


Figure 11 : Structure de NPM1 (a) et représentation du pentamère (b) formé par NPM1 ²⁸¹.

NPM1 est capable d'interagir avec l'ADN comme avec l'ARN par une région de 70 résidus comprenant le CTD et le segment basique de l'IDR. Cette région a cependant une faible affinité pour les molécules simple brin, cela favorise donc les interactions avec les ARN ribosomaux. Cela permet également à NPM1 d'avoir une activité ribonucléase sur l'ARN ribosomique 28S pour lequel le CTD et l'IDR ont une affinité particulièrement forte ²⁸⁴. Parmi les interactions de NPM1 avec les ARN, on peut remarquer une quadruple interaction entre NPM1, des ARNsno, la fibrillarine et l'enzyme de méthylation de l'ARN ribosomal en 2'-O. NPM1 peut aussi interagir avec les ARN non codants, intergéniques, de transfert et messagers ²⁸².

L'acétylation des différents résidus lysines de NPM1 joue un rôle essentiel pour NPM1. En effet, la structure de G-quadruplex du CTD en est dépendante et il a pu être noté que l'acétylation des lysines K250 et K257 ou K229 et K230 est capable de déplacer NPM1 hors du nucléole ²⁸².

Les rôles de NPM1

La nucléophosmine est une protéine aux rôles multiples (Figure 12). Parmi les plus connus, on retrouve :

- La maturation et l'export des ribosomes
- La régulation de la duplication du centrosome
- La progression du cycle cellulaire
- L'assemblage des histones
- La réponse au stress
- La réplication de l'ADN
- La réparation de l'ADN
- La recombinaison de l'ADN
- La transcription
- L'embryogenèse
- L'organisation du nucléole

Cette pléthore de rôles se justifie par un nombre important d'interactions dont NPM1 est capable. On note des interactions entre NPM1 et des protéines dénaturées, des histones, des protéines ribosomales, des particules virales, des suppresseurs de tumeurs, ... ^{280-282,284}

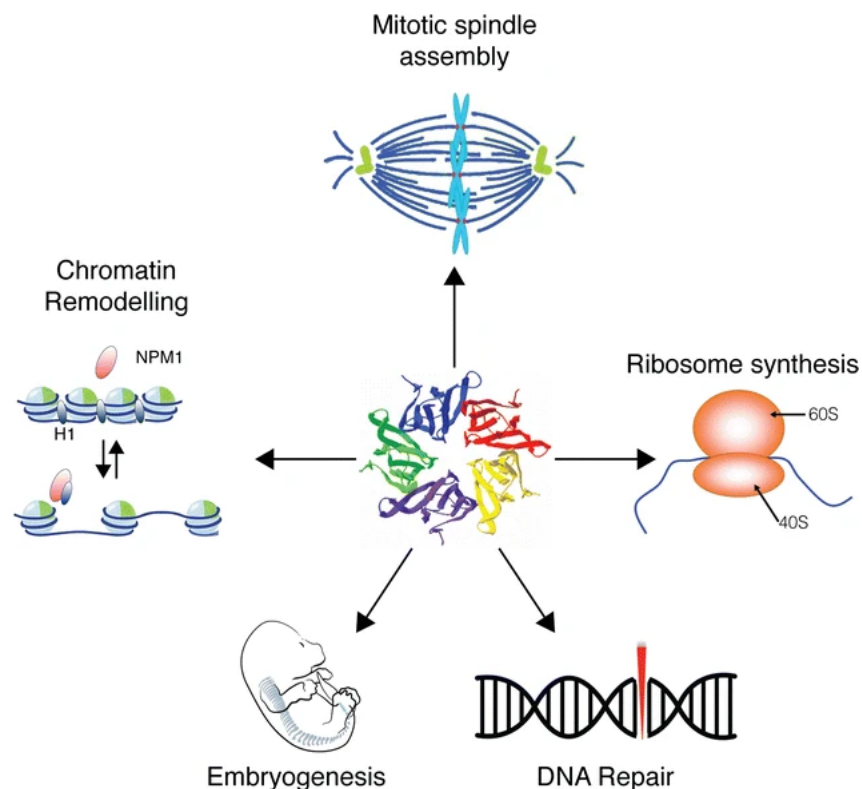


Figure 12 : Représentation des fonctions principales de NPM1 ²⁸¹.

NPM1 dans l'axe de signalisation p14ARF-HDM2-p53

NPM1 possède une fonction de suppresseur de tumeur car il est le principal interactant de p14ARF, protéine faiblement exprimée, afin de la séquestrer dans la partie granulaire du nucléole (Figure 13). Cela a pour effet de protéger p14ARF de la dégradation. Lorsque p14ARF est délété, par exemple par la destruction de l'intégrité nucléolaire, NPM1 est relocalisé vers le nucléoplasme et provoque une forte augmentation de la biogenèse des ribosomes, de la synthèse des protéines et de la taille du nucléole. Ainsi, NPM1 stabilise p53 en permettant l'inhibition de MDM2 par p14ARF, induisant l'arrêt de la croissance cellulaire ²⁸⁵. Lors de l'activation d'oncogènes, on observe une augmentation de p14ARF avec une séquestration nucléolaire de MDM2 qui l'empêche de réguler négativement p53 et NPM1, provoquant l'arrêt du cycle cellulaire ³⁸. Lorsque NPM1 est surexprimé, il interagit avec c-Myc et contrôle l'hyperprolifération ainsi que les activités de transformation induites par c-Myc en assurant la localisation nucléolaire de cet interactant. De plus, le promoteur du gène de NPM1 est une des cibles de c-Myc ²⁸⁷.

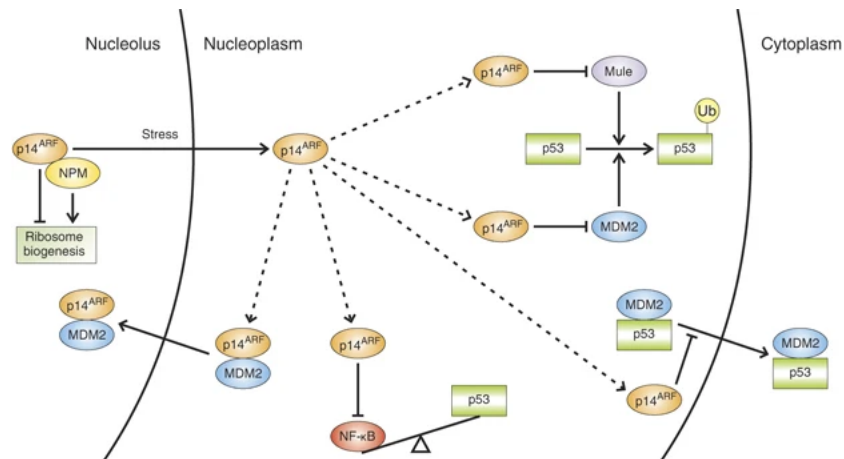


Figure 13 : Représentation de la voie P14ARF-MDM2-p53 ²⁸⁸.

NPM1 contribue aux propriétés physiques du nucléole

Le nucléole est le site de biogenèse des ribosomes, connus pour être d'importants senseurs de stress. Cet organelle non membranaire est composé de 3 sous-structures : le centre fibrillaire, le composant fibrillaire (lieu de transcription) et le composant granulaire où l'on retrouve NPM1 pour l'assemblage des ribosomes ²⁸².

L'abondance de NPM1 au sein du nucléole lui confère des propriétés proches des liquides favorisant une séparation de phases pour former des condensats biomoléculaires. L'assemblage de ces condensats est permis par la région polyampholytique de NPM1, une région désordonnée ^{283,284}.

La progression du cycle cellulaire

Lors de la mitose, NPM1 est phosphorylé par CDC2 de manière à déclencher la rupture du nucléole. En phase G2, CKII augmente l'affinité de NPM1 pour les composants nucléaires et favorise son activité de chaperonne. CDKI va promouvoir la liaison de NPM1 au nucléole et aux compartiments sous-nucléaires ²⁸⁰⁻²⁸².

En termes de niveaux d'expression, on observe une augmentation de celle-ci dans les cellules en prolifération par rapport aux cellules « restantes ».

La maturation et l'export des ribosomes

L'effet de NPM1 sur les ribosomes est médié par les mouvements de NPM1 entre les différents compartiments cellulaires, son activité RNase, ses liaisons avec les acides nucléiques, le processing des molécules pré-ARN et son activité de chaperonne. NPM1 évite l'agrégation des protéines pendant l'assemblage des ribosomes et facilite le transport de leurs sous-unités dans le cytoplasme ²⁸⁹.

La régulation de la duplication du centrosome

À nouveau, cette fonction dépend de la capacité de NPM1 à se déplacer entre les différents compartiments. Lorsque les cellules sont en phase G1, NPM1 est associé au centrosome. À la fin de cette phase, NPM1 est phosphorylé au niveau de sa thréonine 199 par CDK2/cycline E, ce qui le dissocie du centrosome. Pendant les phases S et G2, NPM1 se situe dans le nucléole pour intervenir sur la biogenèse des ribosomes. Une fois la membrane nucléaire brisée, NPM1 retourne auprès du centrosome pour empêcher une nouvelle duplication ²⁹⁰.

La réparation de l'ADN

Cette fonction permet à NPM1 de participer au maintien de la stabilité génomique. NPM1 présente un contrôle sur l'APE pour réguler le système de réparation par « *base excision repair* » ²⁸¹.

L'assemblage des histones

La structure de NPM1 lui permet de mimer les charges présentes sur l'ADN et l'ARN de manière à assurer des liaisons aux histones H1, H3, H4, H2A et H2B ²⁸².

NPM1 dans le cancer

Dans le cadre des cancers, NPM1 est principalement connu pour sa mutation dans certains cas d'AML (leucémie myéloïde aigue). Cependant, NPM1 est également surexprimé dans de nombreuses tumeurs solides et cette surexpression est corrélée à l'index mitotique et à la formation de métastases. Cela peut provenir de l'augmentation de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique ^{291,292}.

On retrouve NPM1 surexprimé dans les cancers de la prostate, du foie, de la thyroïde, du colon, de l'estomac, du pancréas ainsi que dans les gliomes, glioblastomes et les astrocytomes²⁸².

NPM1 est un suppresseur de tumeurs. Lors de l'activation oncogène, NPM1 stimule la réparation de l'ADN et réduit la réponse par apoptose/sénescence. On observe ainsi une plus forte réponse aux dommages de l'ADN²⁹³.

Une des mutations les plus fréquentes de NPM1 est celle où le signal (NoLS) de localisation nucléolaire est remplacée par un signal d'export nucléaire (NES). Cela représente environ 30% des cas de leucémies amyloïdes aiguës (AML). Il semblerait cependant que la mutation de NPM1 peut se faire en coopération avec des mutations de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) ou de la méthylcytosine dioxygénase (TET). Elle serait mutuellement exclusive avec les mutations de p53²⁸².

NPM1 muté interagit avec p14ARF et l'ubiquitine ligase Fbw7gamma ciblant c-Myc. Cela induit leur translocation vers le cytosol et cause leur dégradation par le protéasome. Cela entrave une voie de suppresseur de tumeur et stabilise l'oncogène c-Myc. La version mutée cytoplasmique de NPM1 lie et inhibe les caspases 6 et 8, HAUSP et induit la polyubiquitination de PTEN²⁹⁴.

L'effet de NPM1 sur les cancers est relatif. Il a un effet suppresseur de tumeur mais peut devenir oncogène lorsqu'il est surexprimé puisqu'il favorise la croissance cellulaire en accélérant la machinerie ribosomale et en inhibant la mort cellulaire programmée. Par contre, quand NPM1 est sous-exprimé, cela facilite la leucémogénèse et augmente l'instabilité génomique^{291,292,295}.

L'acétylation de NPM1

L'acétylation de certains sites de NPM1 est connue pour être catalysée par p300 ainsi que pour affecter sa localisation cellulaire et son effet oncogène ou non. NPM1 acétylé tend à se localiser dans le nucléoplasme pour s'associer à l'ARN polymérase II transcriptionnellement

active. À l'inverse, la désacétylation de NPM1 par la sirtuine 1 diminue son potentiel d'activation de la transcription ²⁹².

Au-delà de l'effet sur la transcription, l'acétylation de NPM1 par p300 augmente son activité de chaperonne d'histone en améliorant sa capacité d'interaction avec les histones, elles aussi, acétylées ²⁹².

Parmi les résidus acétylés de NPM1 détectés par l'équipe du Pr. Kundu, on retrouve les lysines K212, 215, 229, 230, 257, 267 et 292. Ils ont pu observer que NPM1 acétylé colocalise avec la RNAPII pour augmenter la transcription. Leur théorie serait que NPM1 acétylé faciliterait le désassemblage des nucléosomes acétylés au niveau de promoteurs actifs ²⁹².

Objectifs de thèse

Le rôle du métabolisme lipidique dans la résistance aux traitements anticancéreux est de plus en plus reconnu. Les lipides ne servent pas seulement de source d'énergie pour les cellules tumorales, mais participent également à des mécanismes d'adaptation métabolique favorisant leur survie face aux stress thérapeutiques ²⁹⁶. Des études ont montré que la désaturation des lipides et la modification de l'équilibre entre PUFA et MUFA peuvent contribuer à la résistance au stress oxydatif induit par les traitements ²⁹⁷. Dans ce contexte, certaines protéines du métabolisme lipidique, telles que SCD1, PLIN2 et FABP4, sont surexprimées dans des conditions d'hypoxie-réoxygénation et pourraient protéger les cellules tumorales de la ferroptose en modulant la composition lipidique des membranes. De plus, un enrichissement en gouttelettes lipidiques a été observé dans le cancer du sein métastatique hormonosensible ²⁹⁸. Ainsi, les adaptations du métabolisme lipidique induites par l'hypoxie pourraient contribuer à la plasticité métabolique des cellules tumorales et à leur résistance aux traitements. Dans ce contexte, l'hypothèse de cette thèse est que les adaptations du métabolisme lipidique induites par l'hypoxie, notamment via des protéines telles que SCD1 et PLIN2, contribuent à la plasticité métabolique des cellules tumorales et à leur capacité à résister aux traitements.

Nous avons donc commencé par observer l'expression de ces deux protéines dans des conditions de normoxie et d'hypoxie par Western Blot afin de révéler une régulation de leur expression via l'hypoxie. PLIN2 étant une protéine associée aux gouttelettes lipides, nous avons effectué son marquage par immunofluorescence pour confirmer son niveau d'expression.

Étude de l'importance de PLIN2 dans la formation des gouttelettes lipidiques en hypoxie et dans la progression tumorale

Pour évaluer l'effet de l'hypoxie sur la formation des gouttelettes lipidiques, nous avons utilisé un marquage Bodipy, révélant les lipides neutres par fluorescence, pour observer l'effet de l'hypoxie sur la quantité de gouttelettes lipidiques retrouvées dans les cellules soumises à ce stress. Suite à ces résultats, des cellules déplétées pour PLIN2 ont été générées par CRISPR-cas9 afin d'étudier leur agressivité par des mesures de prolifération et de migration in vitro

puis leur croissance in vivo. Ces cellules ont également été observée avec un marquage Bodipy pour définir le rôle de PLIN2 dans leur formation dans un contexte hypoxique. Étant donné le rôle de PLIN2 dans le stockage des lipides, nous avons investigué l'impact de son expression sur l'oxydation des acides gras par l'utilisation du Seahorse et sur le métabolisme des lipides en observant l'expression de protéines impliquées dans ce phénomène par Western Blot.

Étude du rôle de SCD dans la survie et la progression tumorale au-delà de sa fonction de désaturase

SCD1 voit son niveau d'expression altéré positivement en condition d'hypoxie malgré la nécessité de la présence d'oxygène pour son activité de désaturase. Afin de comprendre l'utilité de son augmentation en hypoxie, nous avons cherché quelles autres protéines liées au métabolisme du lipide étaient exprimées différemment en fonction de l'expression de SCD1. La technique de Western Blot a permis de démontrer un impact de l'expression de SCD1 sur l'acétyl-CoA carboxylase, ce qui nous a conduit à vouloir évaluer les niveaux d'acétyl-CoA dans les cellules cancéreuses en fonction de l'expression de SCD1. Suite à cette information, nous avons effectué, avec l'aide d'une plateforme de protéomique, une analyse de l'acétylome de ces cellules.

Étude de l'impact du métabolisme des lipides sur l'acétylation des protéines et ses conséquences

L'acétylation représentant une méthode rapide et éphémère de régulation des protéines, nous avons cherché lesquelles de ses cibles étaient impactées différemment en fonction de l'expression de PLIN2 ou de SCD1 par une analyse de l'acétylome. Ainsi, nous avons pu sélectionner une protéine candidate, NPM1, qui voyait son niveau d'acétylation particulièrement affecté avec ces conditions. Pour la suite du projet, il a été question de comprendre comment NPM1 voyait son acétylation si modifiée en fonction de l'expression de SCD1. Pour cela, il a d'abord été nécessaire de confirmer les résultats de l'analyse de l'acétylome par co-immunoprécipitation des protéines acétylées avant que ces dernières ne soient révélées par Western Blot. Il a également été question de déterminer les interactions probables entre NPM1, SCD1 et d'éventuelles protéines impliquées dans les mécanismes d'acétylation et désacétylation. Pour cela, la technique de co-immunoprécipitation révélée par Western Blot et la technique gPCA « Gaussia protein–fragment complementation assay »

pour confirmer l'interaction entre les deux protéines ont pu être utilisées. Nous avons par ailleurs investigué les conséquences liées au niveau d'acétylation de NPM1 sur sa stabilité ainsi que sur la sensibilité des cellules face à des traitements influençant l'acétylation des protéines.

Ce travail explorera le potentiel thérapeutique d'un axe moléculaire impliquant SCD1, NPM1 et HDAC2. Des stratégies combinant l'inhibition du métabolisme lipidique et des HDAC seront évaluées *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de cancer du sein et de cancer colorectal. Les résultats permettront de déterminer si le ciblage simultané des mécanismes métaboliques et épigénétiques peut limiter la progression tumorale et révéleront un nouveau lien fonctionnel entre métabolisme lipidique, régulation de l'acétylation des protéines et résistance tumorale.

Résultats

Notre étude s'est concentrée sur le rôle des protéines PLIN2 et SCD1 dans le métabolisme des lipides et l'acétylation des protéines dans les cellules cancéreuses sous hypoxie. Nous avons utilisé des lignées cellulaires PLIN2-KO et SCD1-KO pour observer les effets de la déplétion de ces protéines. Les résultats montrent que l'absence de PLIN2 ou de SCD1 réduit significativement l'accumulation des gouttelettes lipidiques, la migration et la prolifération des cellules *in vitro*, ainsi que la croissance tumorale *in vivo*.

L'analyse par Western Blot a confirmé l'augmentation de l'expression de PLIN2 et SCD1 sous hypoxie, avec une expression de SCD1 restant élevée après réoxygénation. L'analyse de l'acétylome a révélé des effets opposés de PLIN2 et SCD1 sur l'acétylation des protéines non-histones. PLIN2 favorise l'acétylation, tandis que SCD1 favorise la désacétylation. Parmi les protéines affectées, nous avons identifié NPM1. L'acétylation de NPM1 influence sa stabilité et sa localisation cellulaire, avec NPM1 acétylé principalement nucléaire et NPM1 désacétylé cytoplasmique. Nous avons exploré le mécanisme par lequel SCD1 influence l'acétylation de NPM1. La co-immunoprécipitation de NPM1 et SCD1, ainsi que des *assays* de ligation de proximité, ont montré une interaction entre ces deux protéines. SCD1 pourrait agir de manière directe pour promouvoir la désacétylation de NPM1, potentiellement via une association avec l'HDAC2. Cette hypothèse est soutenue par des co-immunoprécipitations et une forte corrélation de SCD1 avec NPM1 et l'HDAC2. Pour exploiter nos résultats dans une optique thérapeutique, nous avons testé *in vitro* un cocktail d'inhibiteurs de désacétylases sur des cellules déplétées pour SCD1, montrant des résultats encourageants. En utilisant le vorinostat, un inhibiteur des désacétylases déjà impliqué dans des essais cliniques, nous avons démontré *in vivo* que la combinaison entre le vorinostat et l'inhibition de SCD1 présente une efficacité supérieure à celle des deux éléments séparés.

En conclusion, nos résultats montrent que l'hypoxie influence le métabolisme des lipides par l'augmentation de l'expression de SCD1 et PLIN2, qui régulent l'accumulation des gouttelettes lipidiques et l'acétylation des protéines. Ces découvertes ouvrent la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le métabolisme des lipides dans les cellules cancéreuses.

Publication

Stearoyl-CoA Desaturase-1 drives tumor growth by interacting with Histone deacetylase-2 and deacetylating Nucleophosmin-1

Authors: Coline Wery¹, Laetitia Montero-Ruiz^{1,2}, Eric Bonneil⁴, Mohammad Farran¹, Robin Jehay¹, Quentin Herrera Garfia¹, Gregory Fettweis³, Silvia Blacher², Charles Pottier¹, Gael Cobraiville⁵, Yasmine Boumahd⁶, Olivier Peulen⁶, Agnès Noël², Franck Dequiedt³, Marianne Fillet⁵ and Nor Eddine Sounni¹ *

Affiliations:

¹ *Cancer Metabolism and Tumor Microenvironment Lab, GIGA-Cancer, GIGA Institute, University of Liège, Liège, Belgium.*

² *Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA Institute, University of Liège, Liège, Belgium*

³ *Laboratory of Gene Expression and Cancer, GIGA Institute, University of Liège, 4000 Liège, Belgium*

⁴ *Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montréal, Montréal, Canada*

⁵ *Laboratory for the Analysis of Medicines, CIRM Institute, University of Liège, Liège, Belgium*

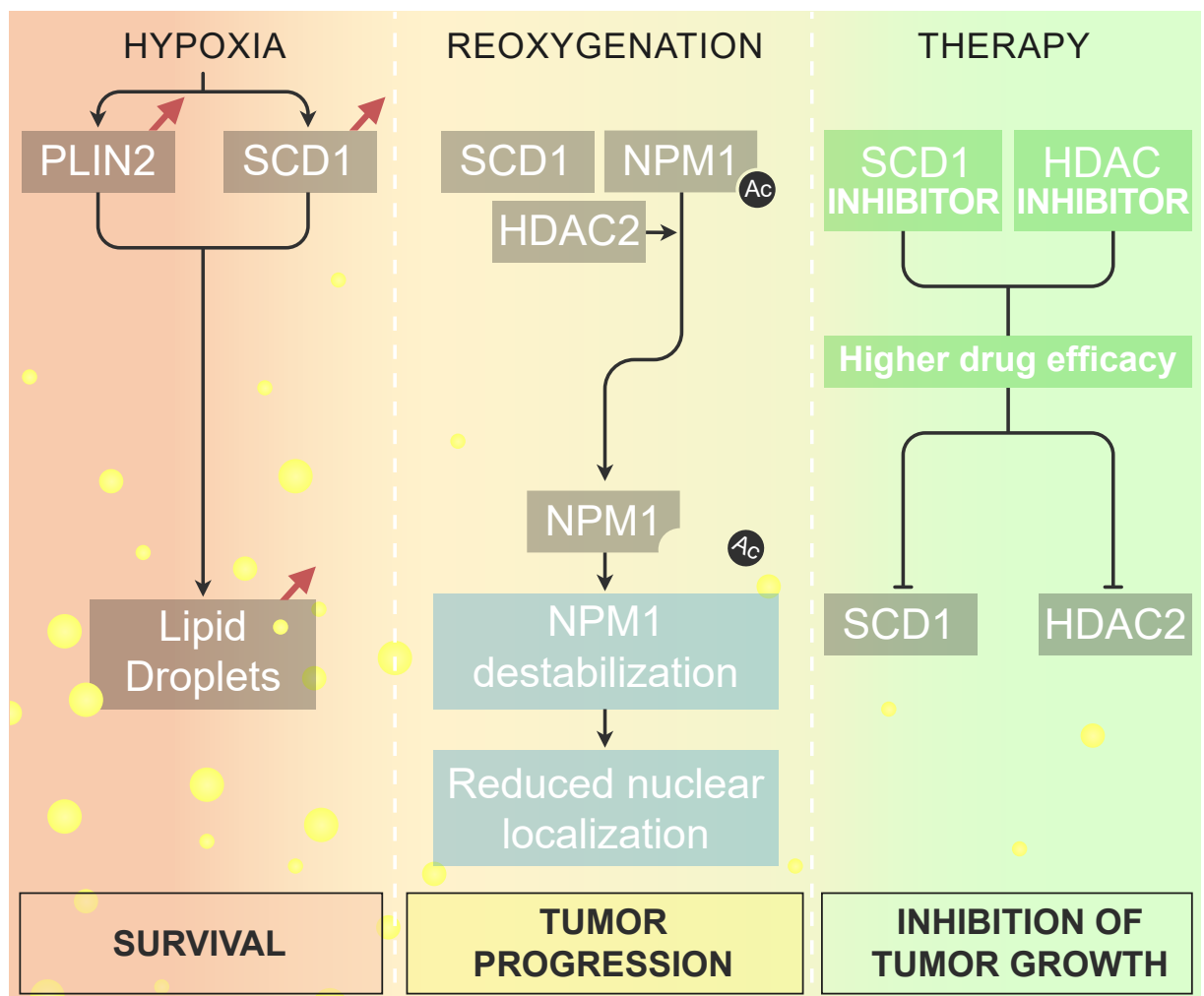
⁶ *Metastasis Research Laboratory, GIGA-Cancer, GIGA Institute, University of Liège, Liège, Belgium*

Running title: *SCD1 as a dual regulator of cancer survival and sensitivity to therapy*

Keywords: SCD1; NPM1; cancer progression; acetylome

*Corresponding author. Email: nesounni@uliege.be

Graphical Abstract



- Hypoxia induces SCD1 and PLIN2 expression and lipid droplet accumulation to promote tumor cell survival.
- Upon reoxygenation, SCD1 drives proliferation through interaction with NPM1 and HDAC2.
- SCD1 controls NPM1 deacetylation, stability, and subcellular localization.
- Genetic or pharmacological inhibition of SCD1 sensitizes tumors to HDAC inhibitors.
- Dual SCD1–HDAC inhibition increases lipid peroxidation and suppresses tumor growth

Abstract

Adaptation of lipid metabolism in cancer cells, driven by changes in the tumor microenvironment, presents significant challenges for effective cancer therapy. Here, we demonstrate that hypoxia upregulates the key desaturase, stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), and the lipid droplet (LD) protein PLIN2, thereby promoting lipid metabolic adaptation in cancer cells, which in turn enhances cell proliferation, migration and tumor growth. We found that SCD1 and PLIN2 are both essential and interdependent for LD formation. PLIN2 supports cell survival under hypoxic and metabolic stress, while SCD1 sustains cancer cell proliferation upon reoxygenation. Additionally, we found that SCD1 expression in cancer cells significantly impacts non-histone protein deacetylation, whereas PLIN2 expression enhances protein acetylation. Among these proteins, Nucleophosmin (NPM1)—a tumor suppressor and regulator of p53—was found to be destabilized through SCD1-dependent deacetylation. Additionally, SCD1 interacts with NPM1, influences its cellular localization and recruits histone deacetylase-2 (HDAC2) to the complex. Notably, we observed that knockdown of SCD1 in vitro or its pharmacological inhibition in vivo enhances cancer cell sensitivity to HDAC inhibitors. Our findings underscore the role of SCD1 in reshaping the cellular acetylome and suggests that targeting SCD1 could sensitize cancer cells to HDAC inhibitors, offering a promising therapeutic strategy.

Introduction

The dynamic metabolic plasticity of cancer and stromal cells poses a significant barrier to effective cancer therapy (Fendt *et al*, 2020; Stine *et al*, 2022; Holohan *et al*, 2013; Bosc *et al*, 2017). Treatments targeting proliferating tumor or stromal cells often encounter drug resistance. Understanding the mechanisms underlying metabolic plasticity in tumors and changes in the microenvironment is essential for improving drug efficacy and response. One notable adaptation is hypoxia-induced metabolic switching within tumors (Bristow & Hill, 2008; Wheaton & Chandel, 2011; Midha *et al*, 2023), where cells shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, a process known as the Pasteur effect (Marchiq & Pouyssegur, 2016). While glycolysis regulation by hypoxia has been extensively studied (Zhang *et al*, 2019; Colegio *et al*, 2014; Kim *et al*, 2006; Denko, 2008), the role of hypoxia in the control of fatty acid metabolism in cancer progression and therapy response has received relatively less attention (Carracedo *et al*, 2013; Santos & Schulze, 2012).

Lipids, particularly fatty acids (FAs), are crucial building blocks for cellular membrane structure and signaling (Cao, 2019; Jones & Infante, 2015; Martin-Perez *et al*, 2022). While central for energy storage and cellular function, FAs can become toxic if not properly utilized or stored in lipid droplets (LDs), potentially triggering cell death (Cheng *et al*, 2020; Cruz *et al*, 2020). For example, prolonged exposure of cancer cells to palmitic acid can induce apoptosis in an ER stress dependent pathway (Zhao *et al*, 2022). The alteration of FA metabolism is a hallmark of cancer progression and metastasis. Elevated FA levels whether originating from dietary sources or changes within the tumor microenvironment are associated with poor clinical outcomes in various cancers (Pascual *et al*, 2017; Schug *et al*, 2015; Vogel *et al*, 2024). Recently, LDs have garnered interest due to their regulation during cellular and environmental stress (Zadoorian *et al*, 2023; Cheng *et al*, 2020; Luis *et al*, 2021; Curtarello *et al*, 2019). As essential organelles, LDs play a central role in lipid and energy homeostasis, buffering cells

against toxic lipid accumulation, and preventing lipotoxicity and oxidative stress (Magtanong *et al*, 2019; Bailey *et al*, 2015). We previously observed that LDs increase under therapy-induced hypoxia, helping in cancer cell protection towards oxidative stress and ferroptosis (Luis *et al*, 2021; Wang *et al*, 2022).

Cancer cell proliferation requires a supply of saturated fatty acids (SFAs) and monounsaturated fatty acids (MUFAs) for energy storage, signaling, and membrane biogenesis (Martin-Perez *et al*, 2022; Lim *et al*, 2021; Carracedo *et al*, 2013). This demand is met by key enzymes involved in de novo FA synthesis, including fatty acid synthase (FASN), ATP citrate lyase (ACLY), and stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), all of which are elevated in proliferating cancer cells and are considered potential drug targets (Lim *et al*, 2021; Theodoropoulos *et al*, 2016; Zaytseva *et al*, 2012). SCD1, in particular, is crucial for proliferation across various cancer types (Vivas-García *et al*, 2020; Zhao *et al*, 2022; Angelucci *et al*, 2018; Igal, 2010), and its expression is associated with ferroptosis resistance and tumor recurrence (Luis *et al*, 2021; Vriens *et al*, 2019). However, the mechanisms by which SCD1 influences cancer cell phenotypic plasticity remain poorly understood.

In this study, we show that SCD1 and the LD-associated protein PLIN2 are upregulated by hypoxia in cancer cells. Knockdown of PLIN2 or SCD1 resulted in decreased LDs in hypoxic cells, reduced cell migration and proliferation *in vitro*, and inhibited tumor growth *in vivo*. Post-translational modification (PTM) analysis of acetylated proteins in cells depleted of SCD1 and PLIN2 revealed distinct patterns of non-histone protein acetylation and deacetylation. Specifically, PLIN2 increased non-histone protein acetylation, while SCD1 decreased it. We found that SCD1 deacetylates NPM1, a tumor suppressor protein (Sportoletti *et al*, 2008; Grisendi *et al*, 2006; Mitrea *et al*, 2014; Mano, 2012), and consequently reduces its stability. Co-immunoprecipitation (CoIP) and protein-complementation assays using the gaussian

luciferase (gPCA) demonstrated interactions between SCD1, NPM1 and HDAC2 in molecular complexes. Interestingly, knockdown of SCD1 or its pharmacological inhibition enhances cancer cell sensitivity to HDAC inhibitors (HADCi) in vitro and in vivo.

Material and methods

Cell lines and chemicals

Human triple negative breast cancer cells (MDA-MB231 and HS578T) and human colorectal cancer cells (HT29 and HCT116) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA). The murine colon adenocarcinoma (MC38) cell line is from Sigma-Aldrich (Merck, USA) and the murine triple negative breast cancer (E0771) cell line is from CH3 BioSystems (Amherst, New York, USA). CRISPR-cas9 stable cell lines for human breast cancer (MDA-MB231 and HS578T) and human colorectal cancer (HT29 and HCT116) were purchased from Genecopoeia (Maryland, USA). Cell lines were tested by MycoALert Kit 139 (Lonza) to ensure that they were Mycoplasma-free before in vitro and in vivo experiments. MDA-MB231, HS578T, HCT116 and MC38 cells were grown in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) and HT29 and E0771 cells were cultured in RPMI basal medium. Culture medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). All cell culture reagents and medium are from ThermoFisher (Waltham, USA). Cycloheximid (#C4859) and mitomycin (#M4289) are from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The potent and orally bioavailable SCD1 inhibitor, A939572, was purchased from Abcam (#Ab142089, Abcam, Cambridge UK) for in vitro study and from TargetMol for in vivo study (#T4534, TargetMol, Boston, USA). Lipid droplet detection agent, Bodipy 493/503 (#HY-W090090) and the Deacetylase Inhibitor Cocktail (#HY-K0030) were purchased from (MediChemExpress, Monmouth Junction, USA). Vorinostat

(#V-8477) was purchased from LC Laboratories (Woburn, USA). Santacruzamate A (CAY10683; MedChemExpress) and SGC-CBP30 (Sigma-Aldrich, Merck) were used as HDAC2 and EP300 inhibitors, respectively.

Mouse models and drugs administration

All animal procedures were performed in accordance with the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) guidelines within the accredited institutional animal facility at Liège University, Belgium, under approved animal protocols #1990 and #1991. In vivo tumor growth studies were conducted on MDA-MB231 and HT29 xenografts grown in immunodeficient nude or RAG2^{-/-} mice (6–8 weeks old) (Envigo). Mice were injected subcutaneously (s.c.) with 1×10^6 cells of either SCD-KO MDA-MB231 or HT29, along with their respective wild-type control cells (n=6). Mouse health was monitored daily, and caliper measurements of tumor size commenced once tumors became palpable. Syngeneic mouse tumor MC38 or E0771 cells were grown into 6- to 8-week-old female C57BL/6 mice (Janvier). Mice were injected s.c. with 1×10^5 cells for MC38 or 0.5×10^6 cells for E0771, and once tumor volumes reached 50–75 mm³, mice were randomized into four treatment groups. In the SCD1 inhibitor (SCD1i) group, mice were treated via gavage with SCD1i dissolved in vehicle-1 (2.5% DMSO, 0.5% methylcellulose, 0.25% Tween 80 in H₂O) at 40 mg/kg/day, five days per week. In the vorinostat group, mice received intraperitoneal (i.p.) injections of vorinostat at 100 mg/kg/day, dissolved in vehicle-2 (2.5% DMSO, 30% PEG300, 0.25% Tween 80 in H₂O). In the combination group, mice were treated with SCD1i by gavage and vorinostat by *i.p.* injection. Control mice received vehicle-1 for SCD1i and vehicle-2 for vorinostat. Tumor sizes were measured twice weekly as previously described (Luis *et al*, 2021), and body weights were recorded twice weekly. For the pharmacological studies, 6 mice per group (n=6) were used for MC38 and E0771 tumor and 5 mice per group (n=5) were for the HT29 and HT29-

SCDKO tumor grown in RAG1-/- mice (Animal facility, CHU de Liège). Data were analyzed using Excel for the calculation of tumor volumes, and GraphPad Prism was used for statistical analyses. Please refer to the Statistical Analysis section for details.

PLIN2 and SCD1 depletion

Generation of PLIN2 and SCD1 knockout (PLIN2-KO and SCD-KO) cells was performed by CRISPR-CAS9 technology. MDA-MB231 (#SL515) and HT29 (#SL523) cell lines stably expressing CRISPR-Cas9 nuclease were obtained after transgene transduction and selection by hygromycin at 500 mg/ml for MDA-MB231 and 1mg/ml for HT29 cells (GeneCopoeia, Maryland, USA). CRISPR-cas9 expressing MDA-MB-231 and HT29 cells were transduced with a pool of either 3 PLIN2 or SCD1 sgRNA as recommended by GeneCopoeia. Parental HS578T and HCT116 knockout cells, either targeting SCD1 or PLIN2, were generated using the same procedures described for HT29 and MDA-MB-231 cells. Clones were isolated using a colony-formation assay, and the resulting knockout cells were validated by Western blot analysis for SCD1 or PLIN2 expression. For SCD1 depletion by shRNA, MDA-MB231 cells depleted from SCD1 by shRNA (SCD1-KD) and their control (CTRL) containing non-targeted shRNA were generated as described previously (Luis *et al*, 2021).

Cell proliferation

Cell proliferation was assessed using CYQUANT assay according to the manufacturer's protocol. For cell proliferation assessment by IncuCyte®, HT29 (1×10^4) and MDA-MB231 (1×10^4) cells were plated in 96 well-plates with DMEM 10% FBS. Data of proliferating profiles were collected and processed from IncuCyte® (Sartorius, Göttingen, Germany). For hypoxia measurements, pictures were taken right at the beginning of the experiments and after

24 hours of hypoxic incubation. For treatments, cells were incubated either with DMSO (2%), with vorinostat (#V-8477, LC Laboratories, Woburn, USA), santacruzamate A (# CAY10683, MedChemExpress, New Jersey, USA) or Deacetylase Inhibitor Cocktail (# HY-K0030, MediChemExpress, Monmouth Junction, USA).

Cell migration

For cell migration assessment by IncuCyte®, HT29 ($4,5 \times 10^3$) and MDA-MB231 ($4,5 \times 10^3$) cells were plated in 96 well-plates with DMEM 10 % FBS supplemented with mitomycin. Once cells are attached on the plate, a scratch is performed with the WoundMaker according to the manufacturer's protocol. Data of proliferating profiles were collected and processed from IncuCyte® (Sartorius, Göttingen, Germany). For hypoxia measurements, pictures were taken right at the beginning of the experiments and after 24 hours of hypoxic incubation.

Western blot analysis

Cell lysates were prepared as previously described in (Luis *et al*, 2021). Total protein extracts (50 µg) were separated under reducing conditions on 5–15% polyacrylamide gels (depending on the molecular weight) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (NEN, Boston, MA, USA). Membranes were saturated for 2 h with casein (1%, w/v) in PBS-Tween-20 (0.1%, v/v). Antigenic bands were detected by exposing the membranes to human primary antibodies targeting the following proteins: PLIN2 (#ab78920, Abcam), SCD1 (#ab19862, #ab236868, Abcam), NPM1(ab15440, Abcam), Acetylated-Lysines (#9814, Cell Signaling), Histone Deacetylase Antibody Sampler Kit (9928, Cell Signaling), EP300 (#MA1-16608), SIRT1 (#9475), SIRT3 (#PA5-28402), SIRT7 (#D3K51), P21 (#ab109199), Lactate Dehydrogenase (#ab101562), CD44 (#ab157107, Abcam), Filamin A (#ab11074), PSMA7 (#5688-M01, Abnova), FASN (#3180S), Phospho-ACC1 (#3661, Cell Signaling), ACC1

(#3662, Cell Signaling), CPT1 (#ab53532). After washes, membranes were incubated with a secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2000, Dako Cytomation) or sheep anti-mouse antibody (1:1000, Dako Cytomation). Immunocomplexes were visualized by chemiluminescence reaction on a luminescent image analyzer (Amersham ImageQuant800). For loading control, membranes were stripped and re-incubated with Hsc70 [#B-6, sc-7298] antibody (Santa Cruz, CA, USA), or GAPDH [#MAB37A] and actin [#A2066] antibody (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA).

Coimmunoprecipitation assay

Cell lysates were lysed in lysis buffer (Cell Signaling Technology) containing Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete, Roche), Phosphatase Inhibitor Cocktail (PhosSTOP, Roche) and a Deacetylase Inhibitor Cocktail (#HY-K0030, MedChemExpress). The protein was immunoprecipitated from lysates (1 mg) using the respective antibody (1 µg) and 50 µL of 50% slurry protein G coupled to Dynabeads (Invitrogen). The precipitate was subjected to Western blotting using a rabbit monoclonal anti-NPM1 antibody (#ab15440, abcam), anti-SCD1 (#ab19862, abcam), and anti-HDAC kit (#9928, Cell Signaling). The antibodies are revealed with an HRP-conjugated secondary antibody.

Immunofluorescent detection of Perilipin-2

Detection of PLIN2 in cancer cells in vitro was performed on coverslips of Control or KO PLIN2 MDA-MB231 and HT29 cells incubated or not in hypoxic conditions (1% O₂) for 24 hours. Coverslips were washed with PBS, fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min at RT, washed with PBS and incubated with 5% BSA for 30 min at RT. Cells were incubated with anti-PLIN2 antibody (#ab78920, Abcam) at 1/100 in 1% BSA/PBS overnight at 4°C. After washing, cells were incubated with donkey anti rabbit/Alexa

Fluor 555 (#A31572, Invitrogen) at 1/200 for 1h at RT, and slides were mounted with DAPI Fluoromount G (#0100–20, Southern Biothec) and analyzed by fluorescent microscopy (Olympus, Zeiss HR LSM 880).

Immunofluorescent detection of NPM1

Detection of NPM1 in cancer cells in vitro was performed on coverslips of Control and KO SCD1 MDA-MB231 and HT29 cells. Coverslips were washed with PBS, fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min at RT, washed with PBS, and incubated with 5% BSA for 30 min at RT. Cells were incubated with anti-NPM1 antibody (#MABE938, Sigma-Aldrich) at 1/100 in 1% BSA/PBS overnight at 4°C. After washing, cells were incubated with donkey anti rabbit/Alexa Fluor 555 (#A31572, Invitrogen) at 1/200 for 1h at RT, and slides were mounted with DAPI Fluoromount G (0100–20, Southern Biothec) and analyzed by fluorescent microscopy (Olympus, Zeiss HR LSM 880).

Immunofluorescent detection of Lipid Droplets

Detection of lipid droplets in cancer cells in vitro was performed on coverslips of Control and KO PLIN2 MDA-MB231 and HT29 cells. Coverslips were washed with PBS, fixed with 4% PFA and stained with Bodipy 493/503 for 20 min at RT then washed with PBS. Slides were mounted with DAPI Fluoromount G (#0100–20, Souther Biothec) and analyzed by fluorescent microscopy (Olympus, Zeiss HR LSM 880).

Proximity Ligation assay

Proximity ligation assay in cancer cell in vitro was performed following the protocol previously described in Pacchiana et al. 2014 (Pacchiana *et al*, 2014) on HT29 and MDA-MB231 cells. Coverslips were washed with PBS, fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.25% Triton

X-100 for 10 min at RT, washed with PBS and incubated with Duolink Blocking solution for 30 min at 37°C. Cells were incubated with anti-NPM1 antibody (ab15440, abcam) and anti-SCD1 (ab19862, abcam) at 1/100 in antibody overnight at 4°C. After washing, cells were incubated with Secondary antibodies (Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS DUO92002, Anti-Mouse MINUS, DUO92004, Sigma-Aldrich) coupled with oligonucleotides at 1/40 for 2h at 37°C. After washing, cells were incubated in Duolink ligation solution (1/40 enzyme, 1/5 buffer) (Duolink In Situ Detection Reagents Red, DU92008, Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C, washed, and incubated in Duolink amplification solution (1/80 enzyme, 1/5 buffer) for 90 min at 37°C. Slides were mounted with DAPI Fluoromount G (0100–20, Southern Biothec) and analyzed by fluorescent microscopy (Olympus, Zeiss HR LSM 880).

Measurement of oxygen consumption and extracellular acidification rates

Oxygen consumption rate (OCR) was measured using the Extracellular consumption assay from Abcam (#ab197243) as instructed by the fabricant. Fatty acid Oxidation rate (FAO) was measured using the Fatty Acid Oxidation Assay from Abcam (#ab217602) as instructed by the manufacturer. Kinetic profiles of oxygen consumption rates (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were obtained using a Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent) according to the manufacturer's protocol. Cells were seeded in normal growth medium 40 h before measurement at a density of $17,5 \times 10^3$ cells per well for MDA-MB231 cells and 2×10^4 per well for HT29 cells. Cells were first incubated in normal conditions overnight then 24h in a hypoxic incubator with 1% of oxygen. One hour before the assay, cells were incubated in unbuffered serum-free DMEM (Basal DMEM, Agilent) pH 7.4, supplemented with 10 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate and 2 mM glutamine at 37°C in a non-CO2 incubator. Measurements of OCR and ECAR were performed before and after sequential injection of inhibitors. The glucose pathway is inhibited by UK5099 (2µM) targeting

the mitochondrial pyruvate carrier. The glutamine pathway is inhibited by BPTES (3 μ M) targeting the glutaminase-1 and the fatty acid pathway is inhibited by etomoxir (4 μ M) targeting the carnitine palmitoyl-transferase-1A. The cell dependence to fatty acids is measured by the sequential inhibition induced by UK5099 and BPTES, followed by Etomoxir. The cell capacity to use fatty acids is measured by the sequential inhibition induced by Etomoxir, followed by UK5099 and BPTES. The flexibility is calculated as the subtraction of the dependence from the capacity. The data were normalized after cell counting with Hoechst staining.

RNA extraction and qRT-PCR analysis

RNA was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics Applied Science, Mannheim, Germany) or RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilde, Germany) for cells, according to manufacturer's recommendations. RNA quality check including concentration and purity was performed with Nanodrop One (Thermo Scientific). For the QRT-PCR on cells RNA, 1 μ g of RNA were used for reverse transcription with FastGene Scriptase II cDNA 5x ReadyMix, LS64, Nippon Genetics (*Düren, Germany, Europe*) and SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Then, 10 ng of cDNA were mixed with primers Forward + Reverse (20 μ mol/L) and Sybergreen (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 04913914001/ NipponGenetics). The mix was analyzed with the QuantStudio 3 (appliedBiosystems - Thermo Fisher Scientific). Relative HDAC mRNAs expression was calculated from Cq values reported to GAPDH mRNA and using the Δ Cq method. Primers used are listed in the Table-1

Target	Sequence
HDAC1	Fw: 5' ACC GGG CAA CGT TAC GAA T 3' Rv: 5' CTA TCA AAG GAC ACG CCA AGT G 3'
HDAC2	Fw: 5' TCA TTG GAA AAT TGA CAG CAT AGT 3' Rv: 5' CAT GGT GAT GGT GTT GAA GAA G 3'
HDAC3	Fw: 5' TTG AGT TCT GCT CGC GTT ACA 3' Rv: 5' CCC AGT TAA TGG CAA TAT CAC AGA T 3'
HDAC4	Fw: 5' AAT CTG AAC CAC TGC ATT TCC A 3'

	Rv: 5' GGT GGT TAT AGG AGG TCG ACA CT 3'
HDAC5	Fw: 5' TTG GAG ACG TGG AGT ACC TTA CAG 3' Rv: 5' GAC TAG GAC CAC ATC AGG TGA GAA C 3'
HDAC6	Fw: 5' TGG CTA TGG CAT GTT CAA CCA 3' Rv: 5' GTC GAA GGT GAA CTG TGT TCC T 3'
HDAC7	Fw: 5' CTG CAT TGG AGG AAT GAA GCT 3' Rv: 5' CTG GCA CAG CGG ATG TTT G 3'
HDAC8	Fw: 5' CAC CAT GGA GGA GCC GGA GGA A 3' Rv: 5' GAC CAC ATG CTT CAG ATT CCC TTT G 3'
SREBP1	Fw: 5' ACT TCT GGA GGC ATC GCA AGC A 3' Rv: 5' AGG TTC CAG AGG AGG CTA CAA G 3'
SREBP2	Fw: 5' CTC CAT TGA CTC TGA GCC AGG A 3' Rv: 5' GAA TCC GTG AGC GGT CTA CCA T 3'
SCD1	Fw: 5' GAA GGG GAG TAC GCT AGA CTT GT 3' Rv: 5' ACA TCA TCA GCA AGC CAG GT 3'
PGC1a	Fw: 5' CCA AAG GAT GCG CTC TCG TTCA 3' Rv: 5' CGG TGT CTG TAG TGG CTT GACT 3'
GAPDH	FW: 5' TGT GGG CAT CAA TGG ATT TGG 3' RV: 5' ACA CCA TGT ATT CCG GGT CAAT 3'

Table 1: Sequences of primers used for qRT-PCR analysis

Quantification of Acetyl-Coenzyme A by UHPLC–ESI-MS/MS

Chromatographic conditions: UHPLC was performed on a 1290 Infinity LC system coupled to a 6495 triple quadrupole mass spectrometer equipped with the iFunnel technology (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Chromatographic separation was performed on a reverse-phase Kinetex Phenyl-Hexyl column (1.7 μ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm ID) protected with a Security Guard Ultra Phenyl-Hexyl precolumn (both from Phenomenex, Torrance, CA, USA). Optimal chromatographic conditions were as follows: The column compartment was thermostated at 50 °C. The separation was carried out in gradient mode with aqueous mobile phase A (50 mM NH₄HCO₂ and 2.5 mM TEA at pH 5.6) and organic mobile phase B (ACN/IPA, 8/2 v/v) at 0.3 ml/min. The gradient started at 3% B for 0.25 min and ramped as follows: 0.25 - 4.25 min, 90% B; 4.25 - 5.25 min; 90% B; 5.25 - 5.35 min, 3% B. The autosampler was thermostated at 10 °C and kept in the dark. One microliter of the samples was injected in triplicate for each sample.

Mass spectrometric conditions: The electrospray source was operated in positive ionization mode (ESI+). The capillary and the nozzle voltage were set at 4000 V and 1100 V respectively. Nitrogen was used as dry gas and sheath gas heated at 210 °C with a flow rate of 15 l/min and 400 °C at 12 l/min, respectively. The nebulizer pressure was settled at 30 psi. The high pressure and low-pressure funnels were operated at 170 and 150 V, respectively. Fragmentation and collision energies were optimized for Acetyl-CoA. Unit mass resolution was set in both mass-resolving quadrupoles Q1 and Q3. Cell accelerator voltage was kept at 4 V. Analysis was conducted in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Two transitions (810.1/303.1 and 810.1/136.0) were followed for Acetyl-CoA as quantifier and qualifier transitions, respectively. Collision energies were set at 30 and 50 V for transition quantifier and qualifier respectively.

Calibration standards: Calibration standards were prepared with NH₄HCO₂ 2.5 mM pH 5.6 to obtain concentrations ranging from 0.01 µM to 5 µM.

Sample preparation: Acetyl-CoA was extracted on cell pellet with 300 µl of NH₄HCO₂ 2.5 mM pH 5.6/ACN/MeOH (1/1/1, v/v/v). Sonication was performed using a Q700 Sonicator (Qsonica, Newtown, CT, USA). Each pulse of 5 s was followed by a 5 s off pulse for a total 3 times of sonication (20% amplitude). Then samples were incubated at -20°C for 2h and centrifugation at 4 °C and 15000 x g for 20 min. The supernatants were vacuum dried for 2 h at 50 °C using a CentriVap Concentrator (LabConco, Kansas-City, MO, USA) and reconstituted in 100 µl of NH₄HCO₂ 2.5 mM pH 5.6/ACN (8/2, v/v). The reconstituted samples were then analyzed by UHPLC–MS/MS.

Data analysis: Results were obtained with MassHunter Data Acquisition and analyzed using the Quantitative Analysis Software (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

LC-MS based acetylomics

Acetylome analysis was performed by the center for advanced proteomics analyses Proteomic-IRIC Center of Montreal. Crude cell pellets of MDA-MB-231 shNT and shSCD1, CRISPR Control and CRISPR-cas9 KO PLIN2 were sent. The pellets were snap frozen in nitrogen. Cell pellets were resuspended in 5 volumes of 8 M urea 50 mM Tris-HCL pH 8.0, sonicated and centrifugated. Supernatants were quantified with Bradford assays. 5-10 mg of proteins were reduced with TCEP (1 mM), alkylated with chloroacetamide (20 mM) for 30 min at room temperature. 7 volumes of ammonium bicarbonate 50 mM were added to bring urea concentration to 1 M. Trypsin at 1:20 (enz/prot) was added and the samples were incubated overnight at 37°C. Peptide samples were acidified with TFA (1%). Samples were desalted on stage tips and dried down with a speed-vac. Samples were then resolubilized in 1X of IAP buffer (Cell Signaling). Samples were spinned at 13000 rpm for 3 min and cooled on ice. Wash the AC-Lysine agarose beads (Cell Signaling) 4 times with 1 ml of PBS. Add peptides to the Eppendorf tubes containing the Ac-Lys agarose beads. Samples were incubated for 2 hours at 4°C under constant rotation. Samples were spinned at 2000 g for 30 s, and supernatants were discarded. Beads were washed 2 times with cold IAP buffer (1 ml) and 3 times with cold 20 mM Tris-HCl pH 7.6. Peptides were eluted from the beads with 100 µl of 0.15% TFA and desalted on stage tips. Samples were resolubilized in 4% formic acid (FA). Peptides were loaded and separated on a home-made reversed-phase column (150-µm i.d. by 200 mm) with a 106-min gradient from 10 to 30% ACN-0.2% FA and a 600-nl/min flow rate on an Easy nLC-1000 connected to an Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Each full MS spectrum acquired at a resolution of 120,000 was followed by tandem-MS (MS-MS) spectra acquisition on the most abundant multiply charged precursor ions for a maximum of 3s. Tandem-MS experiments were performed using collision-induced dissociation (CID) at a collision energy of 30%. The data were processed using PEAKS X Pro (Bioinformatics

Solutions, Waterloo, ON) and a Uniprot human database (20366 entries). Mass tolerances on precursor and fragment ions were 10 ppm and 0.3 Da, respectively. The fixed modification was carbamidomethyl (C). Variable selected posttranslational modifications were oxidation (M), deamidation (NQ), phosphorylation (STY), and acetylation (N-ter). The data were visualized with Scaffold 4.0 (protein threshold, 99%, with at least 2 peptides identified and a false-discovery rate [FDR] of 1% for peptides).

Immunohistochemistry analysis on tumor sections

Paraffin-embedded tumor sections were processed for immunohistochemistry (IHC) as follows. Antigen retrieval was performed for 11 minutes at 126 °C in Target Retrieval Solution (Dako, S2031). Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating slides in 3% H₂O₂ in water for 20 minutes. Non-specific binding was blocked using animal-free blocking solution (20%; Cell Signaling, 15019L) for 20 minutes. For SCD1 and CAIX staining, slides were first incubated overnight at 4 °C with anti-CAIX antibody (Abcam, Ab15086; 1:1000), followed by rabbit/HRP and TSA-FITC detection. For SCD1 staining, slides were incubated overnight at 4 °C with anti-SCD1 antibody (Abcam, Ab19862; 1:100), followed by EnVision mouse/HRP and TSA-Cy5 amplification. For Ki67 and cleaved caspase-3 staining, the procedure followed our previously described protocol (Pottier *et al*, 2025). Briefly, slides were incubated with the primary antibody (Abcam, Ab833; 1:500 in Dako diluent, S2022) for 60 minutes at room temperature (RT), followed by a 30-minute incubation at RT with goat anti-rabbit ENVISION/HRP (Dako, K4003). Apoptotic tumor cells were detected using activated caspase-3 staining. After overnight incubation at 4 °C with anti-cleaved caspase-3 antibody (clone C14, 1:300; Cell Signaling, 9661L) diluted in enhancer buffer, slides were incubated for 30 minutes with EnVision/HRP goat anti-rabbit reagent and developed with DAB. All slides were scanned using the Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology (NDP) system. Quantification of Ki67

and cleaved caspase-3 IHC staining was performed in QuPath v3.2 (29203879) according to the official user documentation.

Gaussia Protein-Fragment Complementation Assay (gPCA)

To investigate the interaction between SCD1 and NPM1, open reading frames (ORFs) were obtained from the hORFeome 7.1 and 8.1 collections. ORFs were amplified by PCR and cloned into the pDONR223 entry vector via BP recombination using Gateway technology (Invitrogen). All clones were verified by sequencing. Entry clones were then recombined into destination vectors encoding the GLucN1 and GLucN2 fragments of *Gaussia princeps* luciferase using LR Clonase reaction. gPCA assays were carried out as previously described (Fettweis *et al*, 2025). Briefly, HEK293T cells were seeded in 24-well plates and transfected with the appropriate constructs. After 48 hours, cells were washed with PBS, and lysates were prepared following the manufacturer's instructions (Renilla Luciferase Kit, Promega). Luminescence was measured in triplicate using a TriStar 2 S LB 942 luminometer (Berthold). Experiments were performed with at least three independent biological replicates per construct. Normalized luminescence ratios (NLR) were calculated as:
$$\text{NLR} = \frac{\text{signal (Glu1A + Glu2B)}}{\text{signal (Glu1A + Glu2) + signal (Glu1 + Glu2B)}}$$
 where **A** and **B** represent the proteins of interest, **Glu1** and **Glu2** are the split luciferase fragments alone, and **Glu1A/Glu2B** are the fragments fused to proteins A and B, respectively. Interactions were evaluated using a one-tailed one-sample t-test against a value of 3.5, as described by (Cassonnet *et al*, 2011). Positive interactions were defined at $p < 0.05$.

Detection of Lipid Peroxidation by Flow Cytometry

HT29 and MDA-MB-231 cells were seeded in triplicates in 24-well plates for 24 h. The cells were then treated with DMSO, SCD1 inhibitor, A939572 (20 μ M), Vorinostat (0.75 μ M), or both inhibitors for 24 h. Subsequently, cells were incubated 1 μ M BODIPY™ 581/591 C11 (Invitrogen) at 37 °C for 30 min. After trypsinization, cells were washed with FACS buffer by centrifugation, and the fluorescence intensity of cells with BODIPY™ 581/591 C11 staining was measured by flow cytometry. The fold change of the median fluorescence intensity (MFI) over the control group (ctrl) was then calculated for each sample. All the flow cytometry

analyses were performed by the CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Sciences,) and then analyzed and images captured by FlowJo software (BD Biosciences).

Gene co-expression correlation analysis

Gene correlation and discovery with HIF1a, SCD, NPM1 and HDAC2 genes was analyzed by the *Correlation AnalyzeR* tool described in (Miller & Bishop, 2021). The interface used and database and are available as a web application at <https://gccri.bishop-lab.uthscsa.edu/correlation-analyzer/> and as a standalone R package at <https://github.com/Bishop-Laboratory/correlationAnalyzeR>.

Statistical analysis

Considering in vitro experimentation, differences between experimental groups were assessed using a Mann-Whitney test using Prism 7.0/8.0 software (GraphPad, San Diego, CA). For computerized image analysis, statistical analysis was performed using the statistic toolbox of Matlab (9.4) 9 (R2018b) software (Mathworks, Inc.). The results were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). A non-parametric Mann-Whitney significance test was used to compare the median values measured for the groups. Results were considered significant at $p < 0.05$. *In vivo* data were analyzed using GraphPad Prism 8. Pairwise comparisons between vehicle-treated and drug-treated cohorts were performed using a two-tailed Student's t-test. Longitudinal tumor-growth data were evaluated using a two-way repeated-measures ANOVA to account for within-subject measurements over time. Endpoint analyses involving all four treatment conditions were conducted using a one-way ANOVA.

Results

Hypoxia upregulates the expression of SCD1 and PLIN2 in cancer cells.

To explore the effect of hypoxia on the expression of lipid metabolism proteins, MDA-MB231 and HT29 cells were incubated under hypoxia for 24h and the expression of key proteins involved in lipid desaturation and storage was analyzed. SCD1 expression increased under hypoxic conditions, and slightly declined after reoxygenation, indicating a cell response to hypoxic stress (Fig. 1A and B). Similar results were observed in additional cell lines, including HS578T and HCT116, which also showed elevated SCD1 expression under hypoxia and a modest reduction after reoxygenation (Fig. 1C). Successful induction of hypoxia was confirmed by the increased expression of HIF1 α in all tested cell lines. No change in SCD1 mRNA levels was detected in MDA-MB-231, HT29, HS578T, or HCT116 cells incubated under hypoxia (Supplemental Fig. S1A). However, reoxygenation led to an increase in SCD1 transcript levels, with significant changes observed in HT29 and HCT116. Consistent with the mRNA profile of SCD1, the transcription factors SREBP1 and SREBP2 showed no significant changes in expression under hypoxia in any of the four cell lines (Supplemental Fig. S1B, C). Bioinformatic analysis of human tumor datasets (pan-cancer, breast, and intestinal cancers) revealed a positive correlation between HIF1 α and SCD1 expression (Supplemental Fig. S1D). While transcriptional regulation of SCD1 may play a role in human tumors, our in vitro data indicate that hypoxia primarily regulates SCD1 and HIF1 α at the protein level in all four tested cell lines (Fig. 1A–C), as well as in pooled analyses across these lines (Fig. 1D). A strong association between HIF1 α expression and lipid-metabolism pathways was consistently observed across human cancer datasets, and Gene Ontology (GO) pathway analysis of ARCHS4 RNA-sequencing data identified a lipid-droplet signature as significantly correlated with HIF1 α expression (Supplemental Fig. S1D). These findings prompted us to examine lipid-droplet abundance in our cell models.

Bodipy staining and immunofluorescence for PLIN2 confirmed an increase in LD formation under hypoxia (Fig. 1B and C Fig. 1E and F), highlighting LDs as a cellular adaptation to hypoxic stress. CRISPR-Cas9-mediated knockout (KO) experiments demonstrated that SCD1 and PLIN2 are required for LD formation under hypoxia, as KO cells did not form LDs under these conditions (Fig. 1G-I and Supplemental Fig. 1F). Hypoxic conditions increased PLIN2 expression in both cell lines. However, this increase was inhibited when cells were treated with an SCD1 inhibitor (SCDi) (Supplemental Fig. S2A). Similarly, SCD expression was reduced in PLIN2 KO cells under hypoxia (Supplemental Fig. S2B), suggesting an interdependence of SCD and PLIN2. This connection was further validated by the inhibition of PLIN2+ LDs when cancer cells were incubated under hypoxia and treated with SCDi (Supplemental Fig. S2C). Furthermore, SCD1 and PLIN2 were found to co-immunoprecipitate (Supplemental Fig. S2D) which was confirmed by the reverse IP (Supplemental Fig. S2E), suggesting an association of these two proteins that supports their functional connection during cellular adaptation to hypoxic stress.

Inhibition of PLIN2 or SCD1 reduces cancer cell proliferation in vitro and in vivo.

We investigated the impact of PLIN2 and SCD1 depletion in cancer cell migration, proliferation, and tumor growth under different oxygen conditions. Under normoxia, PLIN2 depletion slightly reduced HT29 cell migration, with no significant effect on MDA-MB231 cells (Fig. 2A). In contrast, the migration of both cell types depleted in PLIN2 or was notably inhibited in hypoxia (Fig. 2B). Cell proliferation was next monitored over a 24-hour period by using *Incucyte*. PLIN2 depletion under hypoxia resulted in a pronounced inhibition of cell proliferation in both cell lines, whereas under normoxia, a slight proliferation reduction was observed only in MDA-MB231 cells (Fig. 2C and D). SCD1 depletion under normoxia significantly inhibited proliferation in both cell lines (Fig. 2E). Given the required oxygen for its enzymatic activity, we did not test hypoxia conditions on SCD1 depleted cells in vitro. In

vivo, both PLIN2 and SCD1 depletion led to reduced tumor growth in HT29 and MDA-MB231 xenografts, supporting their pro-tumorigenic roles (Fig. 2F-H). Immunohistochemical analyses of tumor sections showed a reduction in Ki67-positive cells in PLIN2-depleted tumors for both cell lines, indicating decreased proliferation (Supplemental Fig. S3A). No significant change was observed in Ki67-positive cells for SCD1-depleted tumors (Supplemental Fig. S3B). Analysis of apoptotic markers (caspase-3) revealed an increase in apoptotic cells in PLIN2-depleted MDA-MB231 tumors, but not in HT29 tumors for either protein depletion. To visualize hypoxic regions within the tumors and assess SCD1 expression in the xenografts, we performed immunofluorescence staining for CAIX and SCD1 (Fig. 2I). SCD1 expression was consistently detected adjacent to CAIX-positive hypoxic areas, and this pattern was observed in all sections from both HT29 and MDA-MB-231 xenografts. In SCD1-knockout xenografts, SCD1 staining was markedly reduced within the tumor compartment, particularly in CAIX-positive hypoxic regions (Supplemental Fig. S3C), with the remaining signal likely attributable to mouse stromal cells. These observations further support a strong association between hypoxia and SCD1 expression, highlighting a potential pro-tumorigenic role for SCD1 in hypoxic and metabolically stressed tumor microenvironments

Inhibition of PLIN2 affects fatty acid oxidation in cancer cells.

Assuming that PLIN2 is essential for LD formation, we assessed fatty acid oxidation (FAO) dependency in PLIN2 depleted cancer cells. Western blot analysis showed that CPT1, the rate-limiting enzyme in FAO, was reduced in PLIN2-depleted cells under normoxia but was unaffected by hypoxic conditions (Fig. 3A, B). Cells were next incubated under hypoxia for 24h. FAO dependency and flexibility were evaluated by Mito Fuel Flex Test Kit. Cancer cells were sequentially incubated with pathway inhibitors etomoxir (CPT1), UK5099 (pyruvate) and BPTES (glutaminase) in the Seahorse XF Analyzer and oxygen consumption rate (OCR) and

extracellular acidification rate (ECAR) were determined. Both PLIN2-depleted HT29 and MDA-MB231 cells showed ability to compensate for FAO inhibition (etomoxir) by using alternative fuel sources and exhibited decreased dependency on FAO compared to controls (Fig. 3C-H). Moreover, PLIN2 depletion did not affect the metabolic flexibility of either cell line treated with etomoxir or with inhibitors of pyruvate or glutamine inhibitors. Treatment with etomoxir and UK5099/BPTES inhibitors led to an increase in ECAR in both cell lines (Fig. 3I-L). This data may reflect an enhanced glucose consumption as a compensatory response, reflecting metabolic flexibility in response to blocked FAO and glutamine utilization.

Inhibition of PLIN2 or SCD1 affects lipid synthesis and the acetylome of cancer cells.

We investigated the impact of PLIN2 and SCD1 depletion on de novo FA synthesis and protein post-translational modifications in cancer cells. Western blot analysis of FASN, ACC, and pACC showed no significant changes in FASN levels (Supplemental Fig. S4A-D), but reduced ACC and pACC levels in PLIN2- and SCD1-depleted MDA-MB231 cells, suggesting a decrease in FA synthesis (Fig. 4A-D). However, no striking effect was seen on acetyl CoA-pool in MDA-MB231 and HT29 cells depleted for SCD1 or PLIN2, while a slight fold change increase was noticed in SCD-KO MDA-MB231 cells (Fig. 4E). We then applied posttranslational acetylome scan analysis by proteomics in SCD1 or PLIN2 KO cells and their control cells. Proteomic analysis showed an increase in acetylation of non-histone proteins in SCD1-depleted MDA-MB231 cells, including NPM1, SMC3, GAPDH, and VIM (Fig. 3F and Supplemental Fig. S5A). Pathway analysis indicated that SCD1 depletion mainly affected protein metabolism and cytokine signaling pathways (Fig. 4G). In contrast, PLIN2 depletion was linked to decreased acetylation of non-histone proteins (Fig. 4H and Supplemental Fig. S5B), affecting pathways related to epigenetic regulation, chromatin modifications, cell cycle, RNA metabolism, and SUMOylation (Fig. 4I and Supplemental Fig. S5C). Notably, among the

most prominently modified proteins, NPM1 exhibited significant deacetylation (100-fold) upon SCD1 depletion (Supplemental Fig. S5A), highlighting its role in cell cycle and stress response.

SCD interacts with NPM1 and increases its stabilization.

The link between SCD1 and NPM1 deacetylation of NPM1 was confirmed by immunoprecipitation (IP) with acetyl-lysine antibodies (AcK) followed by western blot analysis for NPM1. Increased level of acetylated NPM1 was detected in SCD1-depleted cells (SCD1-KD) compared to controls (Fig. 5A). Additionally, analysis of total NPM1 levels in cell lysates (Fig. 5B) revealed that NPM1 was more abundant in SCD1-KD cells than in control cells, suggesting that acetylation may reduce NPM1 stability. To address this issue, MDA-MB-231 control and SCD-KO cells (Fig. 5C), as well as HT29 control and SCD-KO cells, were treated with cycloheximide, a protein synthesis inhibitor (Supplementary Fig. S6A). After 96 h, NPM1 expression was significantly reduced in control cells, whereas NPM1 levels remained stable in SCD1-depleted cells following cycloheximide treatment. Furthermore, immunoprecipitation of SCD1 with NPM1 (Supplemental Fig. S6B) confirmed their association in molecular complexes across multiple cell lines, which was further corroborated by reciprocal IP in MDA-MB231, HT29, HS578T and HCT116 cells (Supplemental Fig. S6C). To further validate the interaction between SCD1 and NPM1, we performed Gaussia protein–fragment complementation assays (gPCA) (Fig. 5D). The normalized luminescence ratio (NLR) for the SCD1–NPM1 pair was 8, demonstrating a close physical interaction between the two proteins in HEK293T cells. Interaction between SCD1 and NPM1 was further validated by a proximity ligation assay (PLA), indicating that SCD1 and NPM1 were co-localized in the cytoplasm of MDA-MB231 and HT29 cells (Fig. 5E). Moreover, immunofluorescence (IF) staining of NPM1 showed an increased nuclear localization of highly acetylated NPM1 in SCD-KO cells when compared to wild type (WT) control cells. Conversely, in PLIN2-KO cells,

deacetylated NPM1 was less abundant in the nucleus compared to control cells. These results suggest that SCD1 influences NPM1 cellular localization (Fig. 5F). Overall, our findings demonstrate that the stability and localization of the chaperone protein NPM1 are regulated by SCD1-dependent deacetylation. In addition, a high correlation score of 0.534 between SCD and NPM1 genes ($P = 0.007435$) was particularly evident across multiple cancer types, including breast cancers (Fig. 5G-I). As a control of the correlation analyses for instance, no correlation was found between SCD and VEGF-A genes in human cancers (Supplemental Fig. S6D). Moreover, SCD1 and NPM1 genes expression revealed several similar common target genes and pathways (Fig. 4J and Supplemental Fig. S6E-G), suggesting a functional interaction of SCD1 and NPM1 in human cancers.

SCD1 interacts with HDAC-2.

To determine whether SCD1-associated NPM1 acetylation involves deacetylases, we examined SIRT1, SIRT3, and SIRT7, but found no expression differences between control and SCD1-KO cells (Supplemental Figure 7A–C). The acetyltransferase EP300 levels were also unchanged (Supplemental Figure 7D), and inhibition of EP300 reduced NPM1 acetylation in both control and SCD1-KO cells (Supplemental Figure 7E), suggesting that SCD1 regulates NPM1 acetylation via a deacetylase other than EP300. To determine if the SCD1 associated deacetylation could rely on the recruitment of histone deacetylases (HDACs), we first analyzed the mRNA expression of HDAC family members (HDAC1-9) by qRT-PCR (Supplemental Fig. S7F and G). No significant differences were observed in HDAC mRNA, except a downregulation of HDAC2 and HDAC4 in PLIN2- and SCD-depleted HT29 cells (Supplemental Fig. S7F). However, HDAC2 and HDAC4 were not affected in PLIN2 and SCD1 depleted MDA-MB231 cells (Supplemental Fig. S7G). Western blot analysis (Fig. 6A) showed no differences in protein levels for HDAC1, HDAC3, and HDAC4, while HDAC6 was

not expressed in MDA-MB231 and HT29 cells. A slight increase in HDAC2 levels was observed in SCD1 knockout (KO) cells (MDA-MB231 and HT29), suggesting a potential compensatory mechanism in response to SCD1 depletion. Furthermore, immunoprecipitation of SCD1 revealed that HDAC2 was present in SCD1 containing complexes in HT29 and MDA-MB231 cells (Fig. 6B), which was further validated by reverse IP in these cells (Fig. 6C). In contrast, other HDACs (HDAC3, HDAC4 and HDAC6) were either not detected or in SCD1 immunoprecipitates in MDA-MB231 and HT29 cells (Supplemental Fig. S8A). Interestingly, SCD1 and HDAC2 genes showed a high correlation score (0.496) across various cancer types ($P = 0.00105$) including breast cancers (correlation score = 0.506 ; $P = 0.006018$) (Fig. 6D-F and Supplemental Fig. S8B). Additionally, pathway analysis highlighted common target genes and pathways associated with SCD1 and HDAC2 genes in various human cancer types including breast cancers (Fig. 6G and Supplemental Fig. S8C-E). Together these data highlight a functional role for SCD1 and HDAC2 in posttranslational protein modifications in cancer.

Inhibition of SCD1 sensitizes cancer cells to histone deacetylase inhibitors.

We hypothesized that SCD1 depletion could enhance cancer cell sensitivity to histone deacetylase (HDAC) inhibitors. To test this, we evaluated the effect of a pan-HDAC inhibitor cocktail on the proliferation of SCD1 KO and wild-type cells over 96 hours using the Incucyte system (Fig. 7A-B). All parental cells showed sensitivity to the HDAC inhibitor cocktail. Notably, depletion of SCD1 in HT29 and MDA-MB231 cells resulted in delayed tumor cell proliferation over 96 hours, with these cells exhibiting significantly higher sensitivity to the HDAC inhibitor cocktail ($P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively) (Fig. 7A). The combination of SCD1 depletion and HDAC inhibitors cocktail was more effective at 96 hours when compared to control and single agent treatment (Fig. 7B). Similar results were observed in vitro with vorinostat, an FDA-approved HDAC inhibitor (Fig 7C-D). Specifically, SCD1-depleted

HT29 ($P < 0.0001$) and cells MDA-MB231 ($P < 0.001$) exhibited greater inhibition of proliferation by vorinostat compared to their parental counterparts (Fig. 7C). The combination of SCD1 depletion and vorinostat was more effective at 96 hours when compared to control and single agent treatment (Fig. 7D).

To investigate the *in vivo* efficacy of this combination therapy, we utilized the MC38 syngeneic colorectal mouse model. Tumor-bearing mice were treated with vehicle, SCD1 inhibitor (SCD1i), vorinostat, or the combination of both agents (Fig. 7C–E). The incidence of measurable tumors at day 7 and day 17 post-injection was markedly reduced in the combination group (Fig. 7C), with only 4 tumors out of 12 injections compared with ~~to~~ 10/12 in the vehicle group at day 17, 11/12 in the vorinostat group, and 10/12 in the SCD1i group. Tumor volume in the MC38 model was significantly reduced by single-agent treatments and even more profoundly by the combined treatment of SCD1i and vorinostat (Fig. 7D). Consistently, only the combination therapy significantly reduced tumor weight compared to vehicle-treated tumors (Fig. 7E). Importantly, the combination treatment did not induce significant weight loss, indicating a tolerable safety profile (Supplemental Fig. S9A). Given the high immunogenicity and occasional spontaneous regression of MC38 tumors, we sought to validate the combination in a second, less immunogenic syngeneic E0771 model of triple-negative breast cancer in C57BL/6 mice (Fig. 7H). Both SCD1i and vorinostat alone significantly reduced tumor growth; however, the combination produced a markedly stronger antitumor effect, demonstrating enhanced efficacy in an additional immunocompetent context. As observed in the MC38 model, neither SCD1 inhibition nor vorinostat alone or in combination affected mouse body weight or induced signs of toxicity (Supplemental Fig. S9B). To explore whether this combination strategy is effective in human tumor xenografts, we used HT29 control and SCD1-knockout (SCD1-KO) cells implanted into immunodeficient RAG1^{-/-} mice. Once tumors reached ~75 mm³, mice were treated with vehicle or vorinostat. Control HT29 xenografts showed a modest

but significant response to vorinostat beginning at day 14. Strikingly, SCD1-KO xenografts were highly sensitive to vorinostat in vivo, exhibiting far stronger suppression than predicted from in vitro data, culminating in near-complete inhibition of tumor growth (Fig. 7I). As shown in representative images (Fig. 7J), tumor size and tumor weight were markedly reduced in the SCD1-KO + vorinostat group compared with vehicle or either single treatment. Similar to the syngeneic models, vorinostat treatment did not affect mouse body weight (Supplemental Fig. S9B).

Finally, because both vorinostat and SCD1 inhibition can induce metabolic stress, we assessed lipid peroxidation following treatment in vitro (Supplemental Fig. S9 D and E). As expected, SCD1 inhibition increased lipid peroxidation, as detected by C11-BODIPY fluorescence in FACS analysis. Notably, vorinostat treatment also resulted in a measurable increase in lipid peroxides, indicating that HDAC inhibition contributes to oxidative lipid damage. To determine whether specific inhibition of HDAC2 could reproduce the effects observed with vorinostat and whether this response would be further enhanced in the absence of SCD1 (Supplemental Fig. 9F and G), we treated multiple cancer cell lines (MDA-MB-231, HT29, and HS578T) with santacruzamate A (HDAC2i). HDAC2 inhibition significantly reduced cancer cell proliferation and did so more effectively in SCD1-depleted cells compared with control cells. These results validate HDAC2 and SCD1 as cooperative therapeutic targets and support the concept that dual interference with HDAC2 activity and lipid desaturation produces a stronger antiproliferative effect.

Collectively, these data indicate that SCD1 inhibition markedly enhances tumor sensitivity to HDAC inhibitors across multiple in vivo models, supporting a compelling therapeutic strategy for suppressing tumor growth.

Discussion

In recent years, the impact of lipid metabolism on cancer progression and response to therapy has gained significant consideration (Iwamoto *et al*, 2018; Germain *et al*, 2020; Martin-Perez *et al*, 2022; Sounni *et al*, 2014; Bacci *et al*, 2021; Viswanathan *et al*, 2017). Our study provides evidence linking tumor hypoxia to altered lipid metabolism in cancer cells, with downstream effects on proteins involved in cancer progression. Specifically, we observed that hypoxia induces the expression of Stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and Perilipin 2 (PLIN2), which collectively promote lipid droplet (LD) accumulation in cancer cells. Our findings reveal a reciprocal regulatory relationship between these proteins, with PLIN2 supporting cancer cell survival under hypoxic conditions, while SCD1 primarily influences cell proliferation and migration under normoxic and reoxygenation conditions. This interplay suggests that cancer cells may regulate lipid desaturation and storage in response to hypoxic stress to prevent lipid peroxidation and support cell survival.

The role of SCD1 in cancer involves balancing saturated and monounsaturated fatty acids (SFA/MUFA), which can help cells manage oxidative stress and avoid ferroptosis (Magtanong *et al*, 2019; Zhao *et al*, 2022). We previously demonstrated that SCD1 protects against reactive oxygen species (ROS) and ferroptosis by enriching cell membranes with MUFAs and reducing polyunsaturated fatty acids (PUFAs), a process that becomes critical during cancer cells transition from hypoxia to reoxygenation (Luis *et al*, 2021). This study expands on those findings by showing that SCD1 regulates the acetylation state of non-histone proteins, potentially impacting cancer cell adaptation to stress and by influencing a broad spectrum of cellular pathways. Interestingly, our data reveal that PLIN2 or SCD1 depletion leads to opposing effects on non-histone protein acetylation. We found that the acetyl-CoA was increased significantly in cancer cells after depletion of SCD1 and partly in PLIN2 depleted cells. Accordingly, reduced expression of the acetyl CoA carboxylase-1 (ACC-1) in SCD1-KO

and in PLIN2-KO cells supports an overall reduction of lipogenesis *de novo* and therefore the increase in the acetyl-CoA pool in KO cells. However, proteomics analyses of acetylated proteins did not perfectly correlate with the increase in acetyl-CoA level towards more acetylation in the whole proteome of SCD1-KO or PLIN2-KO cells. In contrast, many proteins were found either acetylated or deacetylated in the presence of PLIN2 or SCD1. The general scheme of the acetylome analysis revealed PLIN2 to promote acetylation of specific proteins, while SCD1 is associated with their deacetylation, implying a reversible regulatory mechanism that may help cancer cells in adapting to stress conditions. Among the proteins affected by SCD1-dependent deacetylation is Nucleophosmin (NPM1), a multifunctional chaperone protein, which can function as a tumor suppressor (Karhemo *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2007; Sportoletti *et al*, 2008), and which is commonly mutated, rearranged and deleted in several cancer types (Grisendi *et al*, 2006; Sportoletti *et al*, 2008; Nishikawa *et al*, 2009; Karhemo *et al*, 2011; Shlush *et al*, 2014; Mano, 2012; Li *et al*, 2020). We found that SCD1 contributes to NPM1 deacetylation, impacting its stabilization and its subcellular localization in the cytoplasm or in the nucleus, which may facilitate its role in cancer cell cycle regulation and cancer progression (Ånensen *et al*, 2012; Nishikawa *et al*, 2009; Leal *et al*, 2014). This regulatory pathway encompassing SCD1 and NPM1 is further underscored by the strong correlation of their target genes in human cancers, highlighting a potential signaling axis associated with cancer malignancy. Future research should explore the broader implications of SCD1 in protein acetylation and investigate other potential synergies between lipid metabolism modulators and epigenetic therapies in different cancers. Notably, we provide evidence that SCD1 can potentially recruit HDAC2 in a molecular complex containing NPM1, thereby facilitating its deacetylation. In addition, SCD1 gene expression profile correlated perfectly with NPM1 or HDAC2 genes in human cancers, suggesting that the SCD/HDAC2/NPM1 complex could have significant effects on gene regulation. The observed correlations likely reflect multiple layers

of regulation, encompassing both genetic and non-genetic mechanisms, including transcriptional and post-translational control. This mechanistic insight offers novel perspectives on the role of SCD1 in cancer-related transcriptional regulation and protein modification.

Given the mixed success and challenges of HDAC inhibitors in clinical cancer therapy (McClure *et al*, 2018; Duncan *et al*, 2023; Bondarev *et al*, 2021; Biersack *et al*, 2022), we suggest that combining HDAC inhibitors with SCD1 inhibitors may improve efficacy. Our *in vitro* experiments demonstrated that combined inhibition of SCD1 and HDAC significantly reduced cancer cell proliferation compared to single-drug treatments. This combination therapy was also effective *in vivo*, as shown in the aggressive colorectal cancer mouse model MC38, where SCD inhibition enhanced the tumor-suppressive effects of the HDAC inhibitor vorinostat (Blumenschein Jr. *et al*, 2008). Because MC38 tumors are highly immunogenic, a fraction of implants can undergo spontaneous regression in immunocompetent hosts, potentially complicating interpretation of therapeutic responses. To ensure that the enhanced antitumor effect of the combination was not model-specific or confounded by MC38 immunogenicity, we next evaluated the combination in a second, less immunogenic syngeneic model. We further extended our analysis to human colorectal cancer xenografts using HT29 cells and corresponding HT29 SCD1-knockout (SCD1-KO) derivatives. These results indicate that SCD1 loss dramatically potentiates HDAC inhibition *in vivo* even in immunodeficient mice, confirming that the interaction is tumor cell–intrinsic and not dependent on host immunity. The magnitude of response in SCD1-KO xenografts exceeded that observed *in vitro*, suggesting that SCD1 depletion may influence additional tumor microenvironmental factors such as metabolic stress, membrane composition, or nutrient availability, which could amplify HDAC inhibitor efficacy *in vivo*. In addition to the *in vivo* results, our *in vitro* analyses provide insight into the metabolic basis of this cooperative interaction. Both vorinostat and SCD1 inhibition increased lipid peroxidation, consistent with enhanced metabolic stress and impaired management of

reactive lipid species. Vorinostat alone elevates lipid peroxide levels, indicating that HDAC inhibition directly disrupts redox–lipid homeostasis, consistent with its known ability to increase ROS and oxidative stress (Jenke *et al*, 2024). Moreover, selective inhibition of HDAC2 with santacruzamate A recapitulated the antiproliferative effects of vorinostat and exerted an even stronger impact in SCD1-depleted cells across multiple cancer cell lines. Together, these data highlight SCD1 and HDAC2 as cooperative vulnerabilities whose simultaneous targeting amplifies metabolic and epigenetic stress, resulting in enhanced tumor suppression. The convergence of these pathways likely underlies the strong synergy observed across distinct tumor models. The present work brings a new model mechanism of SCD role in cancer progression and hints for the potential of SCD1 inhibitors in combination with HDAC inhibitors for the treatment of human cancers.

In conclusion, our study indicates that SCD1 and PLIN2 are critical for cancer cell adaptation to hypoxia, influencing lipid metabolism, protein acetylation, and tumor progression. Therapeutically, we highlighted the potential of targeting SCD1 in combination with HDAC inhibitors to improve antitumor responses, presenting a promising approach for cancer treatment. Future studies extending these findings to human tumor samples will help further substantiate their translational and clinical relevance.

References

- Ånensen N, Hjelle SM, Van Belle W, Haaland I, Silden E, Bourdon JC, Hovland R, Taskén K, Knappskog S, Lønning PE, *et al* (2012) Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 31
- Angelucci C, D'Alessio A, Iacopino F, Proietti G, Di Leone A, Masetti R & Sica G (2018) Pivotal role of human stearoyl-CoA desaturases (SCD1 and 5) in breast cancer

- progression: oleic acid-based effect of SCD1 on cell migration and a novel pro-cell survival role for SCD5. *Oncotarget* 9: 24364–24380
- Bacci M, Lorito N, Smiriglia A & Morandi A (2021) Fat and Furious: Lipid Metabolism in Antitumoral Therapy Response and Resistance. *Trends in Cancer* 7
doi:10.1016/j.trecan.2020.10.004
- Bailey AP, Koster G, Guillermier C, Hirst EMA, MacRae JI, Lechene CP, Postle AD & Gould AP (2015) Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* 163
- Biersack B, Nitzsche B & Höpfner M (2022) HDAC inhibitors with potential to overcome drug resistance in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Drug Resist* 5
doi:10.20517/cdr.2021.105
- Blumenschein Jr. GR, Kies MS, Papadimitrakopoulou VA, Lu C, Kumar AJ, Ricker JL, Chiao JH, Chen C & Frankel SR (2008) Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Invest New Drugs* 26: 81–87
- Bondarev AD, Attwood MM, Jonsson J, Chubarev VN, Tarasov V V. & Schiöth HB (2021) Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging indications and novel molecules. *Br J Clin Pharmacol* 87 doi:10.1111/bcp.14889
- Bosc C, Selak MA & Sarry JE (2017) Resistance Is Futile: Targeting Mitochondrial Energetics and Metabolism to Overcome Drug Resistance in Cancer Treatment. *Cell Metab* 26 doi:10.1016/j.cmet.2017.10.013
- Bristow RG & Hill RP (2008) Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer* 8 doi:10.1038/nrc2344
- Cao Y (2019) Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance. *J Clin Invest* 129:

- Carracedo A, Cantley LC & Pandolfi PP (2013) Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 13: 227–232
- Cassonnet P, Rolloy C, Neveu G, Vidalain PO, Chantier T, Pellet J, Jones L, Muller M, Demeret C, Gaud G, Vuillier F, Lotteau V, Tangy F, Favre M, & Jacob Y. (2011). Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. In *Nature Methods* (Vol. 8, Number 12). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1773>
- Cheng X, Geng F, Pan M, Wu X, Zhong Y, Wang C, Tian Z, Cheng C, Zhang R, Puduvalli V, *et al* (2020) Targeting DGAT1 Ameliorates Glioblastoma by Increasing Fat Catabolism and Oxidative Stress. *Cell Metab* 32
- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, *et al* (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513
- Cruz ALS, Barreto E de A, Fazolini NPB, Viola JPB & Bozza PT (2020) Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis* 11
doi:10.1038/s41419-020-2297-3
- Curtarello M, Tognon M, Venturoli C, Silic-Benussi M, Grassi A, Verza M, Minuzzo S, Pinazza M, Brillo V, Tosi G, *et al* (2019) Rewiring of Lipid Metabolism and Storage in Ovarian Cancer Cells after Anti-VEGF Therapy. *Cells* 8
- Denko NC (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8 doi:10.1038/nrc2468
- Duncan HF, Kobayashi Y, Kearney M & Shimizu E (2023) Epigenetic therapeutics in dental pulp treatment: Hopes, challenges and concerns for the development of next-generation biomaterials. *Bioact Mater* 27

- Fendt SM, Frezza C & Erez A (2020) Targeting metabolic plasticity and flexibility dynamics for cancer therapy. *Cancer Discov* 10 doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0844 [PREPRINT]
- Fettweis G, Wagh K, Stavreva DA, Jiménez-Panizo A, Kim S, Lion M, Alegre-Martí A, Rinaldi L, Johnson TA, Gilson E, Krishnamurthy M, Wang L, Ball DA, Karpova, T. S., Upadhyaya A, Vertommen D, Recio JF, Estébanez-Perpiñá E, Dequiedt F, & Hager G L (2025). Transcription factors form a ternary complex with NIPBL/MAU2 to localize cohesin at enhancers. *Nucleic Acids Research*, 53(9). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf415>
- Germain N, Dhayer M, Boileau M, Fovez Q, Kluza J & Marchetti P (2020) Lipid metabolism and resistance to anticancer treatment. *Biology (Basel)* 9 doi:10.3390/biology9120474
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B & Pandolfi PP (2006) Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6 doi:10.1038/nrc1885
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB & Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13: 714–726
- Igal RA (2010) Stearoyl-coa desaturase-1: A novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* 31 doi:10.1093/carcin/bgq131
- Iwamoto H, Abe M, Yang Y, Cui D, Seki T, Nakamura M, Hosaka K, Lim S, Wu J, He X, *et al* (2018) Cancer Lipid Metabolism Confers Antiangiogenic Drug Resistance. *Cell Metab* 28: 104-117 e5
- Jenke R, Oliinyk D, Zenz T, Körfer J, Schäker-Hübner L, Hansen F K, Lordick F, Meier-Rosar F, Aigner A, & Büch T (2024). HDAC inhibitors activate lipid peroxidation and ferroptosis in gastric cancer. *Biochemical Pharmacology*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116257>
- Jones SF & Infante JR (2015) Molecular Pathways: Fatty Acid Synthase. *Clin Cancer Res* 21:

- Karhemo PR, Rivinoja A, Lundin J, Hyvönen M, Chernenko A, Lammi J, Sihto H, Lundin M, Heikkil P, Joensuu H, *et al* (2011) An extensive tumor array analysis supports tumor suppressive role for nucleophosmin in breast cancer. *Am J Pathol* 179
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL & Dang C V (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3: 177–185
- Leal MF, Mazzotti TKF, Calcagno DQ, Cirilo PDR, Martinez MC, Demachki S, Assumpção PP, Chammas R, Burbano RR & Smith MC (2014) Deregulated expression of Nucleophosmin 1 in gastric cancer and its clinicopathological implications. *BMC Gastroenterol* 14
- Li F, Ng WL, Luster TA, Hu H, Sviderskiy VO, Dowling CM, Hollinshead KER, Zouitine P, Zhang H, Huang Q, *et al* (2020) Epigenetic CRISPR screens identify Npm1 as a therapeutic vulnerability in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 80
- Lim SA, Wei J, Nguyen TLM, Shi H, Su W, Palacios G, Dhungana Y, Chapman NM, Long L, Saravia J, *et al* (2021) Lipid signalling enforces functional specialization of Treg cells in tumours. *Nature* 591
- Luis G, Godfroid A, Nishiumi S, Cimino J, Blacher S, Maquoi E, Wery C, Collignon A, Longuespée R, Montero-Ruiz L, *et al* (2021) Tumor resistance to ferroptosis driven by Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) in cancer cells and Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP4) in tumor microenvironment promote tumor recurrence. *Redox Biol* 43: 102006
- Magtanong L, Ko PJ, To M, Cao JY, Forcina GC, Tarangelo A, Ward CC, Cho K, Patti GJ, Nomura DK, *et al* (2019) Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. *Cell Chem Biol* 26: 420-432.e9

- Mano H (2012) ALKoma: A cancer subtype with a shared target. *Cancer Discov* 2
doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0009 [PREPRINT]
- Marchiq I & Pouyssegur J (2016) Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J Mol Med* 94 doi:10.1007/s00109-015-1307-x
- Martin-Perez M, Urdiroz-Urricelqui U, Bigas C & Benitah SA (2022) The role of lipids in cancer progression and metastasis. *Cell Metab* 34 doi:10.1016/j.cmet.2022.09.023
- McClure JJ, Li X & Chou CJ (2018) Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. In *Advances in Cancer Research*
- Midha AD, Zhou Y, Queliconi BB, Barrios AM, Haribowo AG, Chew BTL, Fong COY, Blecha JE, VanBrocklin H, Seo Y, *et al* (2023) Organ-specific fuel rewiring in acute and chronic hypoxia redistributes glucose and fatty acid metabolism. *Cell Metab* 35
- Miller HE & Bishop AJR (2021) Correlation AnalyzeR: functional predictions from gene co-expression correlations. *BMC Bioinformatics* 22
- Mitrea DM, Grace CR, Buljan M, Yun MK, Pytel NJ, Satumba J, Nourse A, Park CG, Babu MM, White SW, *et al* (2014) Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111
- Nishikawa H, Wu W, Koike A, Kojima R, Gomi H, Fukuda M & Ohta T (2009) BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res* 69
- Pacchiana R, Abbate M, Armato U, Dal Prà I & Chiarini A (2014) Combining immunofluorescence with in situ proximity ligation assay: a novel imaging approach to monitor protein–protein interactions in relation to subcellular localization. *Histochem Cell Biol* 142
- Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martin M, Castellanos A, Attolini CS, Berenguer A,

- Prats N, Toll A, Hueto JA, *et al* (2017) Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* 541: 41–45
- Pottier C, Montero-Ruiz L, Jehay R, Wery C, Baiwir D, Mazzucchelli G, Bekisz S, Thissen R, Josse C, Rorive A, Gofflot S, Dahmani A, Morisset L, Collignon J, Delvenne P, Marangoni E, Noël A., Jerusalem G., & Sounni N E (2025). Targeting ferroptosis resistance resensitizes metastatic HR⁺ HER2⁻ breast cancer cells to palbociclib-hormone therapy. *Cancer Communications*, 45(4), 460–464.
<https://doi.org/10.1002/cac2.12646>
- Santos CR & Schulze A (2012) Lipid metabolism in cancer. *FEBS J* 279: 2610–2623
- Schug ZT, Peck B, Jones DT, Zhang Q, Grosskurth S, Alam IS, Goodwin LM, Smethurst E, Mason S, Blyth K, *et al* (2015) Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell* 27: 57–71
- Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, *et al* (2014) Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 506
- Sounni NE, Cimino J, Blacher S, Primac I, Truong A, Mazzucchelli G, Paye A, Calligaris D, Debois D, De Tullio P, *et al* (2014) Blocking lipid synthesis overcomes tumor regrowth and metastasis after antiangiogenic therapy withdrawal. *Cell Metab* 20
- Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, Teruya-Feldstein J & Pandolfi PP (2008) Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood* 111
- Stine ZE, Schug ZT, Salvino JM & Dang C V. (2022) Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nat Rev Drug Discov* 21 doi:10.1038/s41573-021-00339-6
- Theodoropoulos PC, Gonzales SS, Winterton SE, Rodriguez-Navas C, McKnight JS, Morlock

- LK, Hanson JM, Cross B, Owen AE, Duan Y, *et al* (2016) Discovery of tumor-specific irreversible inhibitors of stearoyl CoA desaturase. *Nat Chem Biol* 12
- Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, Gill S, Eichhoff OM, Seashore-Ludlow B, Kaffenberger SD, Eaton JK, Shimada K, Aguirre AJ, *et al* (2017) Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 547: 453–457
- Vivas-García Y, Falletta P, Liebing J, Louphrasitthiphol P, Feng Y, Chauhan J, Scott DA, Glodde N, Chocarro-Calvo A, Bonham S, *et al* (2020) Lineage-Restricted Regulation of SCD and Fatty Acid Saturation by MITF Controls Melanoma Phenotypic Plasticity. *Mol Cell* 77
- Vogel FCE, Chaves-Filho AB & Schulze A (2024) Lipids as mediators of cancer progression and metastasis. *Nat Cancer* 5 doi:10.1038/s43018-023-00702-z [PREPRINT]
- Vriens K, Christen S, Parik S, Broekaert D, Yoshinaga K, Talebi A, Dehairs J, Escalona-Noguero C, Schmieder R, Cornfield T, *et al* (2019) Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature* 566: 403–406
- Wang MH, Ye Y, Zhang M, Zhou BR, Wang JN, Song YN & Xia W (2022) Exosome-mediated delivery of SCD-1 siRNA promoted the death of anaplastic thyroid carcinoma cells via regulating ROS level. *Clin Transl Oncol* 24
- Wheaton WW & Chandel NS (2011) Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol - Cell Physiol* 300 doi:10.1152/ajpcell.00485.2010 [PREPRINT]
- Zadoorian A, Du X & Yang H (2023) Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 19 doi:10.1038/s41574-023-00845-0 [PREPRINT]
- Zaytseva YY, Rychahou PG, Gulhati P, Elliott VA, Mustain WC, O'Connor K, Morris AJ, Sunkara M, Weiss HL, Lee EY, *et al* (2012) Inhibition of fatty acid synthase attenuates

CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* 72: 1504–1517

Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, Liu W, Kim S, Lee S, Perez-Neut M, *et al* (2019) Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* 574

Zhang Q, Wang HY, Liu X & Wasik MA (2007) STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nat Med* 13

Zhao G, Tan Y, Cardenas H, Vayngart D, Wang Y, Huang H, Keathley R, Wei JJ, Ferreira CR, Orsulic S, *et al* (2022) Ovarian cancer cell fate regulation by the dynamics between saturated and unsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119

Acknowledgements:

This research was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (NFSR-FNRS) the Belgian Foundation against Cancer and Leon Fredericq Foundation, Liège, Belgium. The authors thank the Cell Imaging Core Facility of de GIGA for *incucyte*® and fluorescence microscopy experiments, Isabelle Dasoul, Emilie Feyereisen, Erika Konradowski and Nathalie Lefin for their technical support.

Authors contribution

Conception and design: NES and CW

Development of methodology: CW, LM, EB, MF, RB, GC, YB, OP, MF, GF, FD and NES

Acquisition of data: CW, LMR, DB, GM, RT, CHG, CJ, SG, YB, AD, LM and GF

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics): CW, LM, EB, MF, RB, CP, GC, MF, OP and NES

Writing, review, and/or revision of the manuscript: NES, OP, AN and CW

Study supervision: NES

Competing interests

All Authors declare no competing interest

Materials & Correspondence. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the corresponding author, Dr. Nor Eddine Sounni.

Figures and Figure legends

Figure 1

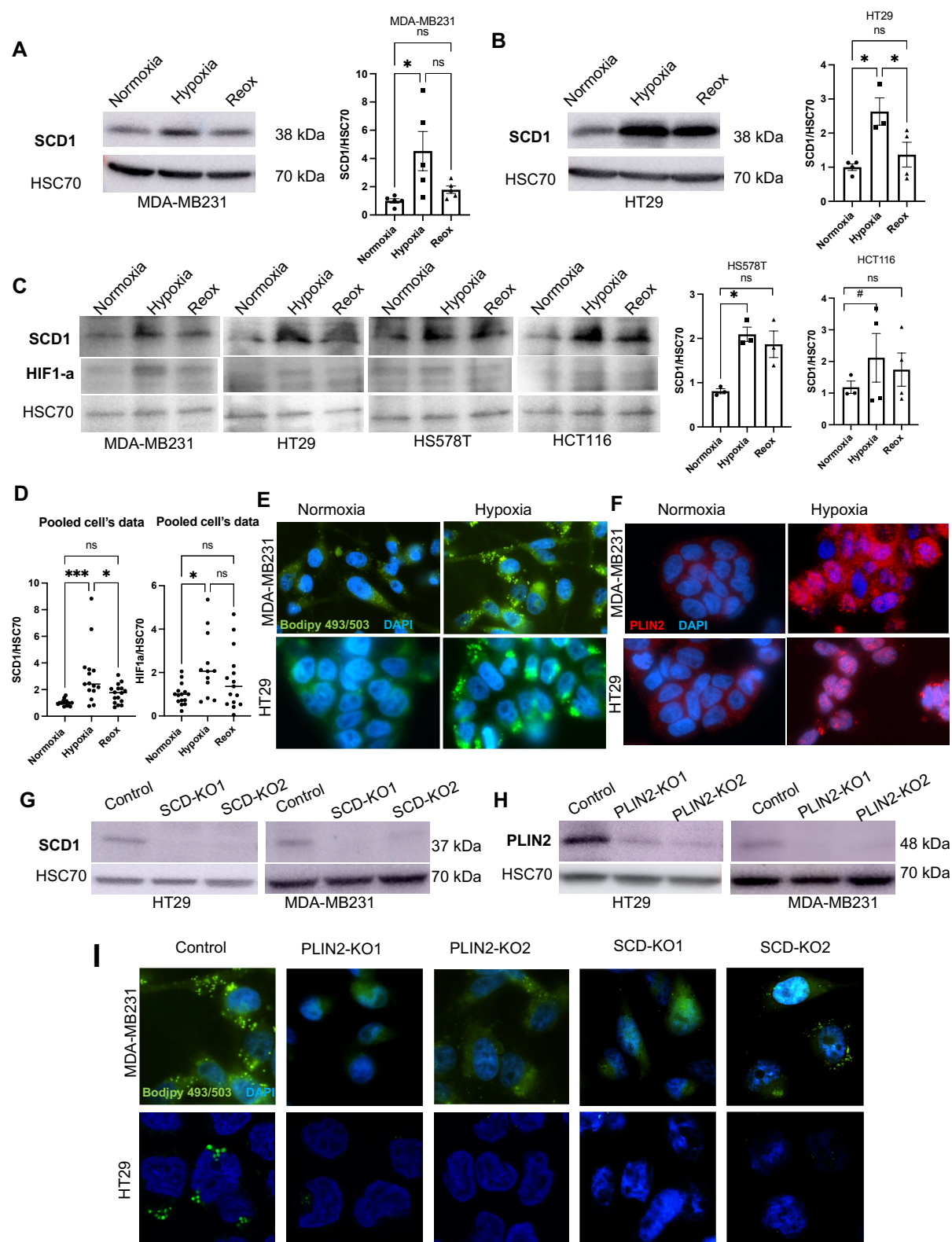


Figure 1: Hypoxia regulates the expression of proteins involved in lipid desaturation and storage in cancer cells. (A-B) Western blot analysis of SCD1 expression in MDA-MB231 in (A) and HT29 cancer cells in (B) incubated under normoxia, hypoxia condition and after reoxygenation. Graphs are densitometry quantification of western blot analysis. HSC70 serves as a loading control. (C) Western blot analysis of SCD1 and HIF1a expression in multiple cell lines cells incubated under normoxia, hypoxia condition and after reoxygenation. Graphs are densitometry quantification of western blot analysis. HSC70 serves as a loading control. (D) Western blot analysis of SCD expression on control and SCD1 knockout (SCD1-KO) cells. (E) Detection of lipid droplets (LDs) after Bodipy 493/503 staining on MDA-MB231 and HT29 cancer cells incubated in normoxic or hypoxic conditions. (F) Detection of lipid droplets by immunofluorescence staining of PLIN2 on MDA-MB231 and HT29 cancer cells incubated under normoxia or hypoxia conditions. (G) Western blot analysis of SCD expression on control and SCD1 knockout (SCD1-KO) cells. (H) Western blot analysis of PLIN2 expression on control and PLIN2 knockout (PLIN2-KO) cells. HSC70 serves as a loading control. (I) Detection of lipid droplets after Bodipy 493/503 staining on control, PLIN2-KO and SCD1-KO cells. Both the western blot and immunofluorescence (IF) experiments were repeated three independent times (n=3). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

Figure 2

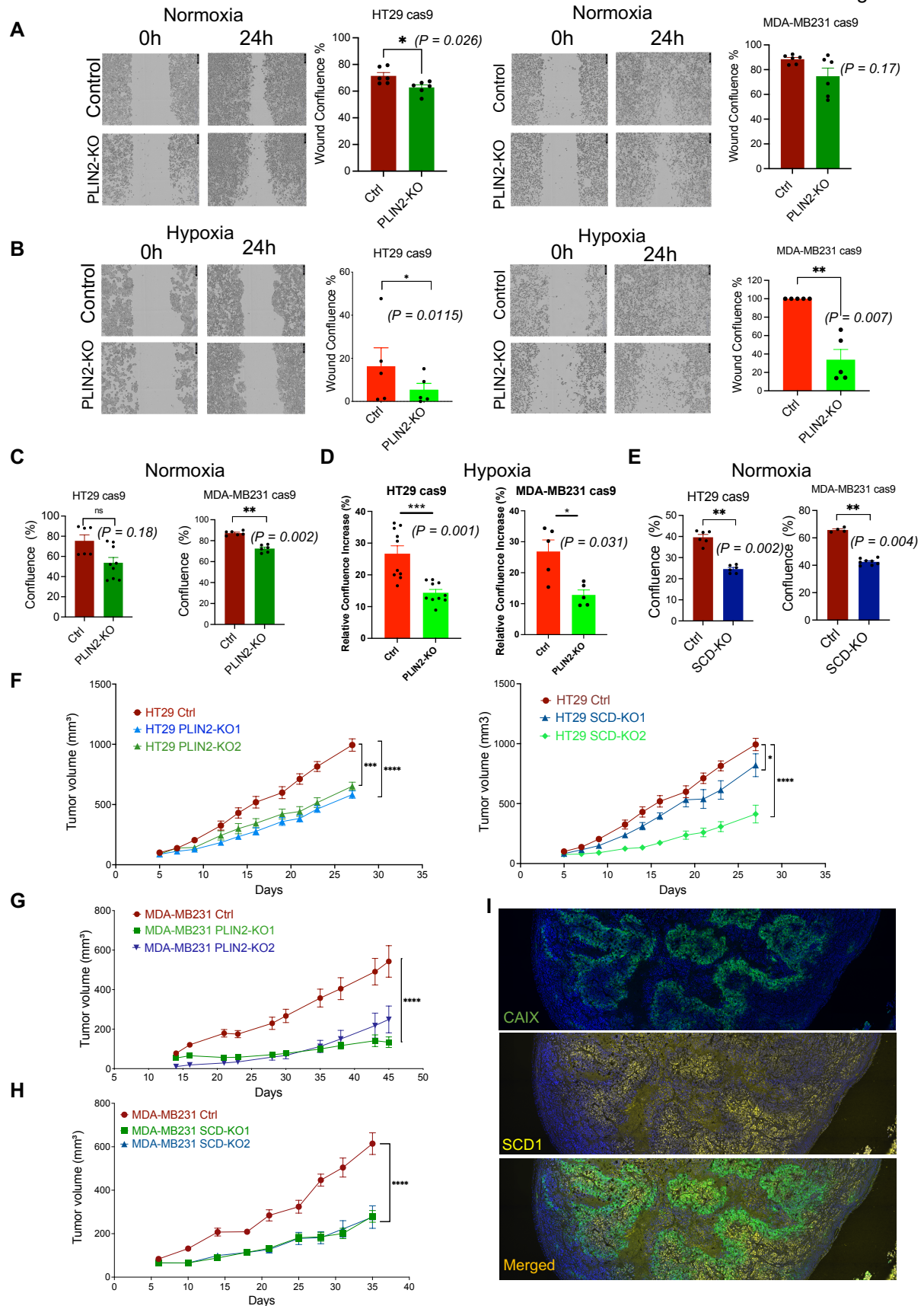


Figure 2: PLIN2 and SCD1 inhibitions reduce cancer cell proliferation in vitro and in vivo. (A) Migration assessment of HT29 (left) and MDA-MB231 (right) control cells and PLIN2-KO cancer cells incubated under normoxia conditions for 24 hours. (B) Migration assessment of HT29 (left) and MDA-MB231 (right) control and PLIN2-KO cancer cells in hypoxic conditions for 24 hours. (C) Proliferation assessment of HT29 (left) and MDA-MB231 (right) control and PLIN2-KO cancer cells incubated under normoxia conditions for 24 hours. (D) Proliferation assessment of HT29 (left) and MDA-MB231 (right) control and PLIN2-KO cancer cells incubated under normoxia conditions for 24 hours. (E) Proliferation assessment of HT29 (left) and MDA-MB231 (right) control and SCD-KO cells incubated under normoxia conditions. (F) Tumor growth of HT29 Control (Ctrl), PLIN2-KO cells (PLIN2-KO1 and PLIN2-KO2) (left graph), and SCD-KO cells (SCD-KO1 and SCD-KO2) (right graph) injected in RAG2^{-/-} mice (n=6), the HT29 control graphs on the left and on the right are identical. (G-H) Tumor growth of MDA-MB231 Control (Ctrl), PLIN2-KO cells (PLIN2-KO1 and PLIN2-KO2) in (G), and SCD-KO cells (SCD-KO1 and SCD-KO2) in (H), injected in nude mice (n=6). (I) Immunofluorescent staining of CAIX (green) and SCD1 (yellow) in MDA-MB-231 control tumors, showing the whole section and adjacent localization of CAIX and SCD1. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Figure 3

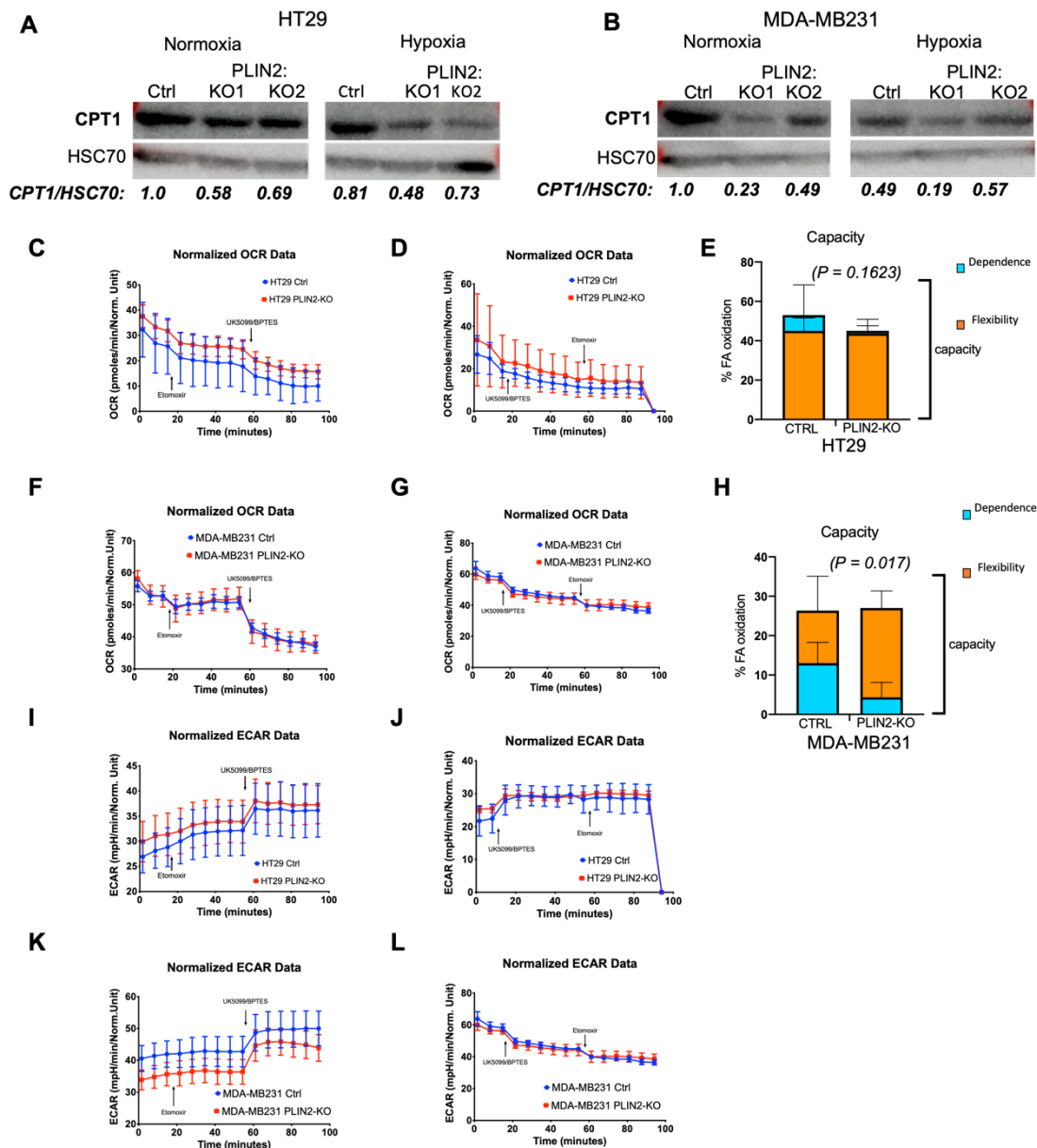


Figure 3: Decreased dependency on fatty acid oxidation (FAO) in PLIN2-depleted cells.

(A, B) Western blot of CPT1 on control and PLIN2-KO HT29 cells (A) and MDA-MB231 cells (B) incubated under normoxia and hypoxia conditions for 24 hours. HSC70 serves as a loading control and densitometry of CPT1 was normalized to it. Control and PLIN2 KO HT29 and MDA-MB231 cells were preincubated under hypoxia for 24h and their metabolic activities were assessed in (C-L). (C, D) Normalized OCR data from dependence (C) or capacity (D) measurements in control and PLIN2-KO HT29 cells. (E) Fatty acid oxidation percentage

representing capacity (Dependence + Flexibility), dependence (Blue) and flexibility (Orange) in control and PLIN2 KO HT29 cells. (F, G) Normalized OCR data from dependence (F) or capacity (G) measurements in control and PLIN2-KO MDA-MB231 cells. (H) Fatty acid oxidation percentage representing capacity (Dependence + Flexibility), dependence (Blue) and flexibility (Orange), in MDA-MB231 cells. (I, J) Normalized ECAR data from dependence (I) and capacity (J) measurements on HT29 in control and PLIN2-KO HT29 cells. (K, L) Normalized ECAR data from dependence (K) and capacity (L) measurements in control and PLIN2-KO MDA-MB231 cells. WB analyses were conducted in two independent repeats (n=2), while OCR and ECAR measurements were obtained from a single experiment performed in technical triplicates.

Figure 4

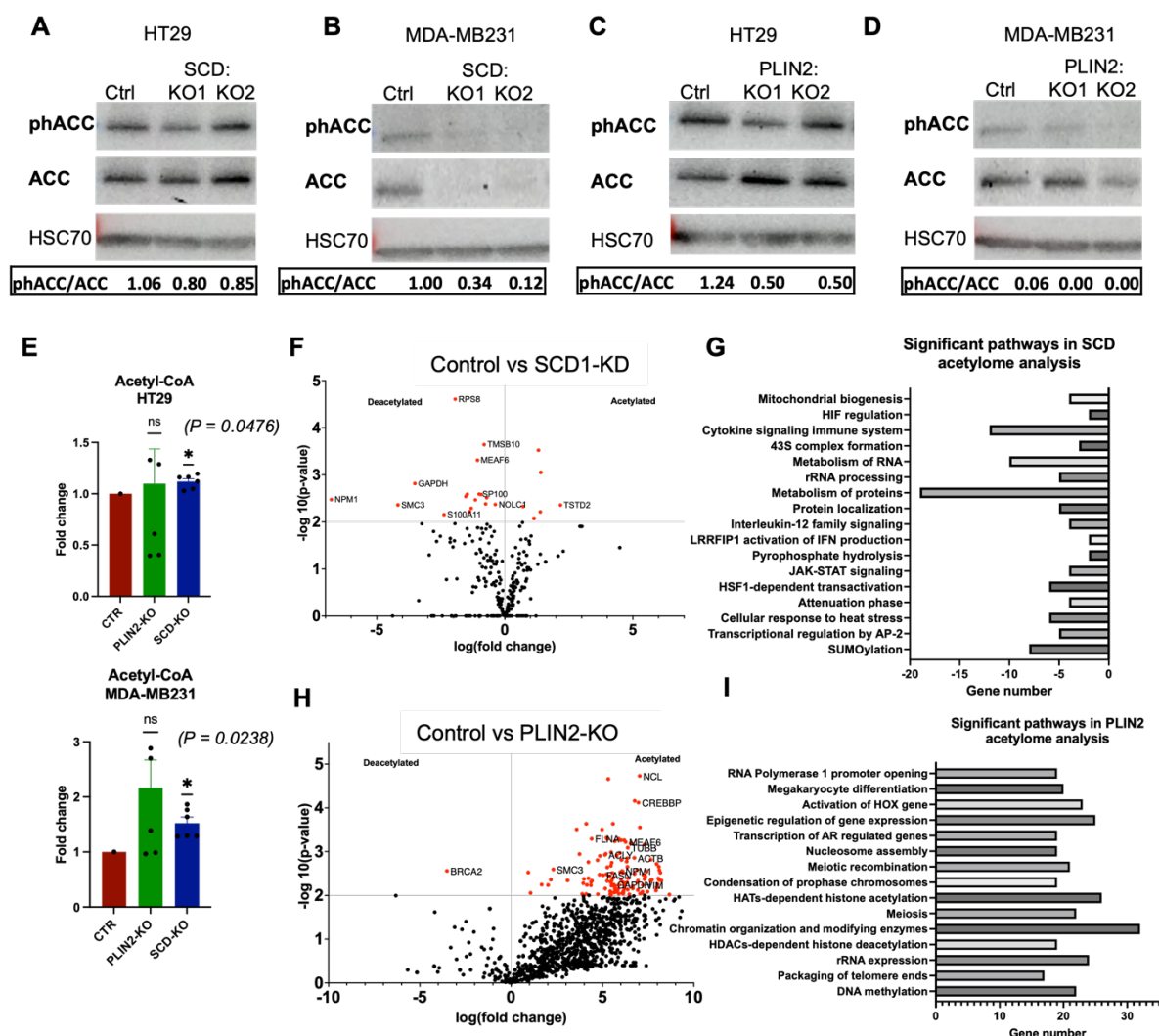


Figure 4: Inhibition of PLIN2 or SCD1 affects lipid synthesis in cancer cells. (A) Western blot analysis of phACC and ACC expression in HT29 control and SCD-KO cells. HSC70 serves as a loading control. (B) Western blot analysis of phACC and ACC in control and SCD1-KO MDA-MB231 cells. (C) Western blot analysis of phACC and ACC in HT29 control and PLIN2-KO cells. (D) Western blot analysis of phACC and ACC in control and PLIN2-KO MDA-MB231 cells. HSC70 was used as a loading control, and densitometry of phACC/total ACC ratios were normalized to it. (E) Mass spectrometry quantification of acetyl-CoA pool, presented as fold changes over control cells, in SCD-KO and PLIN2-KO HT29 and MDA-MB231 cells. (F) Volcano plot of the proteins in acetylome scan analysis of control vs SCD-

depleted MDA-MB231 (SCD1-KD) cells and according to the average ratio of three technical replicates and p values. (G) Graphical representation of pathways involving proteins differentially deacetylated by SCD1. (H) Volcano plot of the proteins in acetylome scan analysis of control vs PLIN2-depleted MDA-MB231 cells and according to the average ratio of three technical replicates and P -values. (I) Graphical representation of pathways involving proteins differentially acetylated by PLIN2. Each experiment was repeated twice ($n=2$), except for the acetylome analysis, which was performed once in biological triplicate.

Figure 5

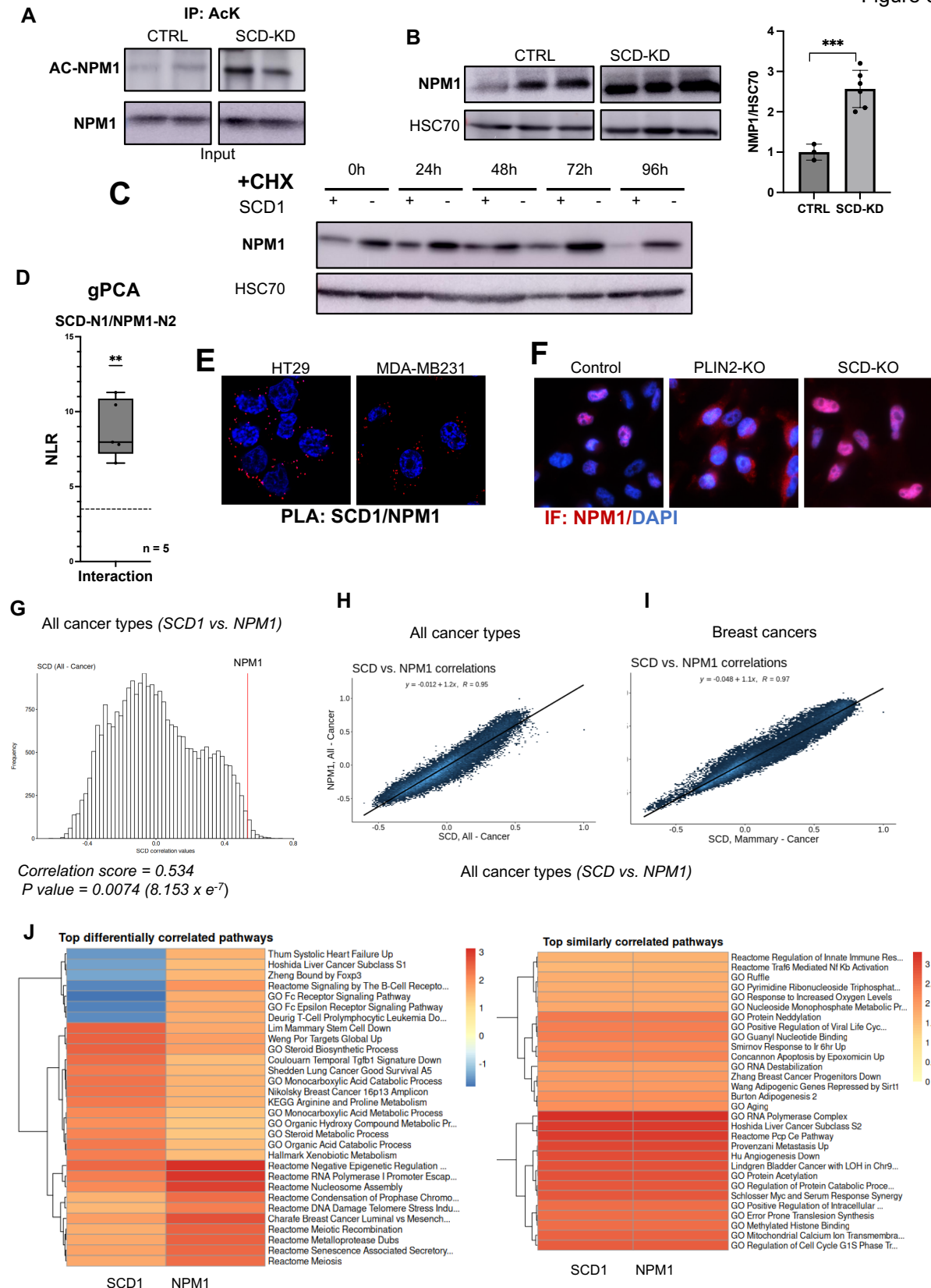


Figure 5: SCD interacts with NPM1 and increases its stabilization. (A) Co-immunoprecipitation of acetylated-lysines and detection of NPM1 by western blot in control and SCD1-depleted cells. (B) Western blot analysis of NPM1 in cell lysates of control and SCD1-depleted cells. (C) Stability assay for NPM1 by western blot at different time points after treatment with cycloheximide (100 μ M) of control and SCD1-depleted cells. HSC70 serves as a loading control. (D) Interaction between SCD1 and NPM1 was assessed using Gaussia protein-fragment complementation assays (gPCA). The normalized luminescence ratio (NLR) for the SCD1–NPM1 interaction is shown. Experiments were performed with $n = 5$ independent biological replicates. P-value corresponds to $P < 0.01$. (E) Images of a Proximity Ligation Assay on HT29 and MDA-MB231 cells. Red dots represent proximity between NPM1 and SCD1. (F) Immunofluorescent staining of NPM1 in control, PLIN2-KO and SCD-KO MDA-MB231 cells. NPM1 is shown in red, and DAPI (blue) marks the nucleus. (G) Correlation analysis of SCD gene expression with other genes revealed a correlation score of 0.534 with NPM1 in all cancer types ($P = 0.007435$). (H, I) Scatter plot showing the relationship between genome-wide co-expression correlations for SCD and NPM1 in all cancer types (H) and in breast cancers (I). Displayed R value determined by Pearson correlation. (J) Top differentially (left) and similarly (right) correlated pathways between SCD and NPM1 target genes in all cancer types. All experiments, except where indicated, were reproduced at least twice. Correlation analysis used ARCHS4 v8 (Feb 2020) with 238,522 human samples (Illumina HiSeq/NextSeq), each linked to GEO entries with tissue annotations and metadata.

Figure 6

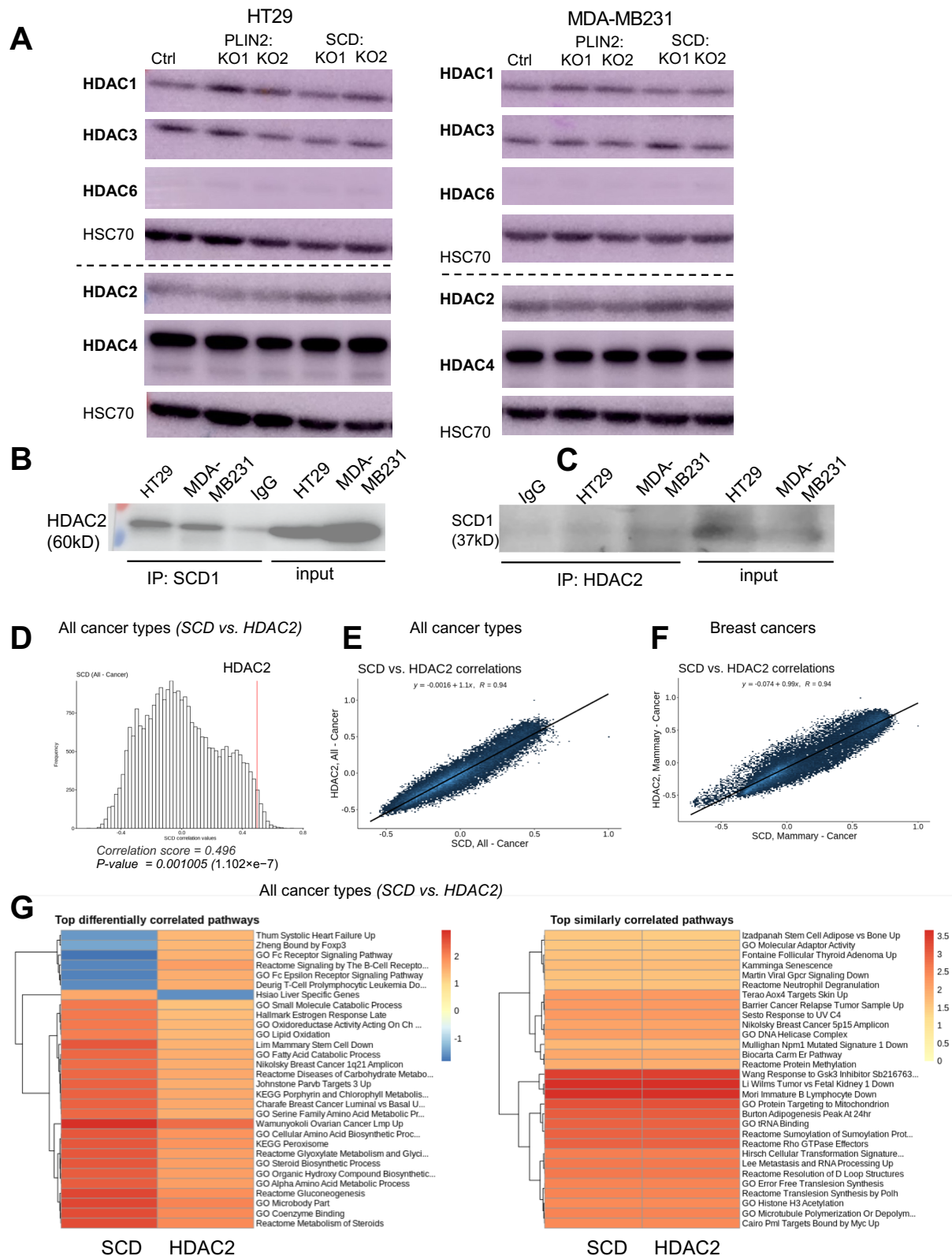


Figure 6: SCD1 interacts with HDAC2. (A) Western blot analysis of HDAC1, -2, -3, -4 and -6 proteins in control, PLIN2-KO and SCD1-KO HT29 and MDA-MB231 cells. HSC70 serves as a loading control. (B) Immunoprecipitation of SCD1 and detection of HDAC2 by western blot analysis in HT29 and MDA-MB231 cells. (C) Revers IP after immunoprecipitation of HDAC2 and detection of SCD1 by western blot analysis in HT29 and MDA-MB231 cells. (D) Correlation analysis of SCD gene expression with other genes revealed a correlation score of 0.496 with HDAC2 in all cancers ($P = 0.001005$). (E, F) Scatter plot showing the relationship between genome-wide co-expression correlations for SCD and HDAC2 in all human cancer tissues (E), and in breast cancers (F). Displayed R value determined by Pearson correlation. (G) Top differentially (left) and similarly (right) correlated pathways between SCD and HDAC2 target genes in all cancer types. All experiments were reproduced at least three times ($n=3$), and correlation analysis used ARCHS4 v8 (Feb 2020), as shown in Figure 5.

Figure 7

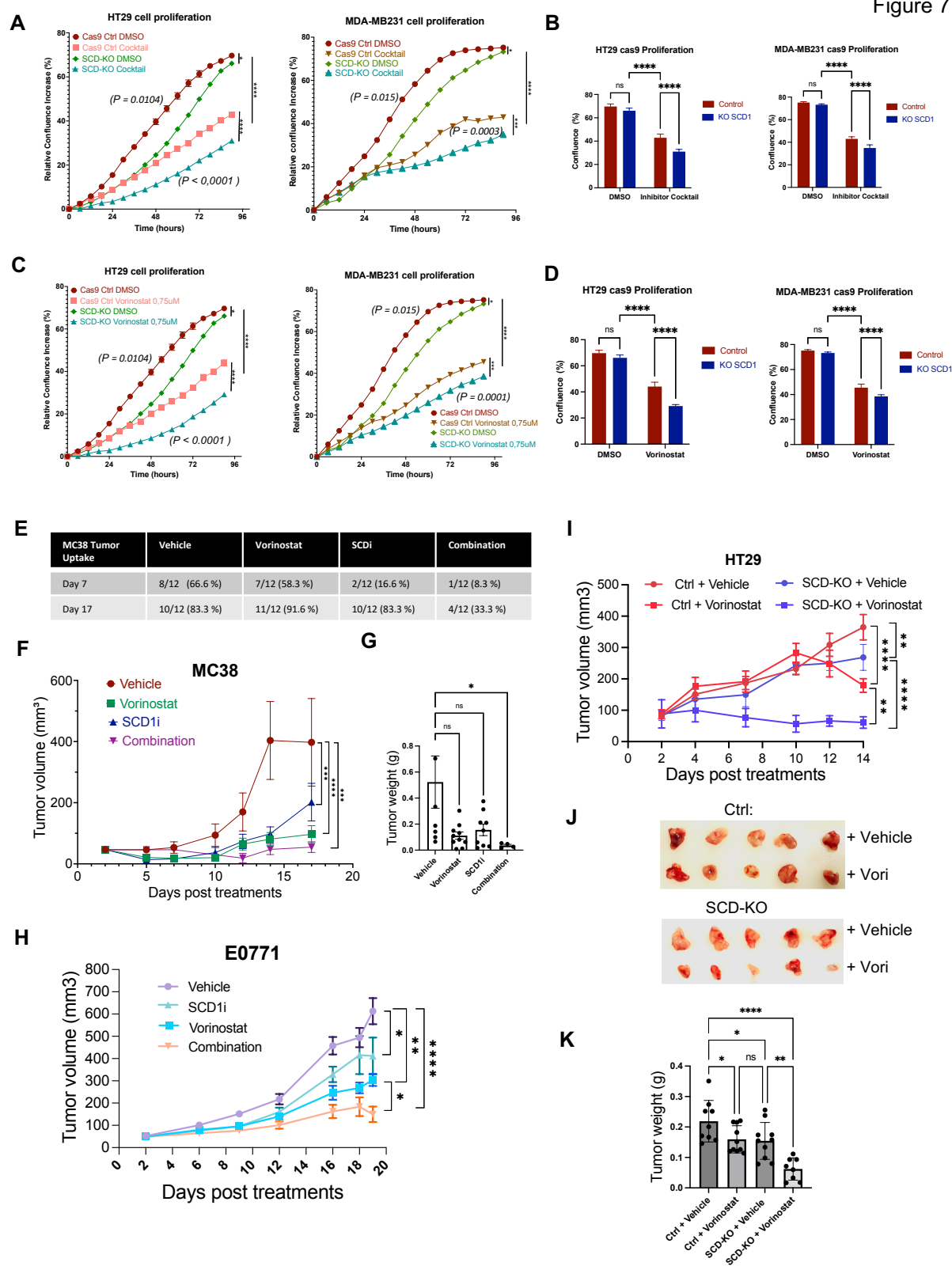


Figure 7: SCD-KO cells show sensitivity to acetylation inhibitors. (A) Proliferation assay with *incucyte*® at indicated time points of control, SCD-KO HT29 and MDA-MB231 cells treated with DMSO (Ctrl) or with a Deacetylase Inhibitor Cocktail. (B) Cell proliferation assessment at 96 hours of cells treated in A. (C) Proliferation of cells treated with DMSO (Ctrl) or with Vorinostat (0,75 μ M). (D) Cell proliferation assessment at 96 hours of cells treated in C. (E) Tumor uptake table of mouse colorectal tumors MC38 at day 7 and at day 17 post-injection in C57/Bl6 mice with different treatments. (F) Tumor growth of MC38 tumors in C57/Bl6 mice and treated with either vehicle, vorinostat and SCD Inhibitor (SCDi) as single agents or after the combination of both vorinostat and SCDi. (G) Tumor weight of MC38 tumors. (H) Tumor growth of E0771 tumors in C57BL/6 mice treated with vehicle, vorinostat, or SCD inhibitor (SCDi) alone, or with the combination of vorinostat and SCDi. (I) Tumor growth of HT29 control (Ctrl) or PLIN2-KO (PLIN2-KO1) cells treated with vehicle or vorinostat. HT29 tumors were injected into RAG1-/- mice (n=5). (J) Representative images of tumors from the experiment shown in (I). (K) Tumor weight of HT29 control and PLIN2-KO cells treated with vehicle or vorinostat, corresponding to (I). *ns*: $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

Supplementary data file

Stearoyl-CoA desaturase-1 drives tumor growth by interacting with histone deacetylase-2 and deacetylating nucleophosmin-1

Authors: Coline Wery¹, Laetitia Montero-Ruiz^{1,2}, Eric Bonneil⁴, Mohammad Farran¹, Robin Jehay¹, Quentin Herrera Garfia¹, Gregory Fettweis³, Silvia Blacher², Charles Pottier¹, Gael Cobraiville⁵, Yasmine Boumahd⁶, Olivier Peulen⁶, Agnès Noël², Franck Dequiedt³, Marianne Fillet⁵ and Nor Eddine Sounni¹ *

Affiliations:

¹ Cancer Metabolism and Tumor Microenvironment Lab, GIGA-Cancer, GIGA Institute, University of Liège, Liège, Belgium.

² Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA Institute, University of Liège, Liège, Belgium

³ Laboratory of Gene Expression and Cancer, GIGA Institute, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

⁴ Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montréal, Montréal, Canada

⁵ Laboratory for the Analysis of Medicines, CIRM Institute, University of Liège, Liège, Belgium

⁶ Metastasis Research Laboratory, GIGA-Cancer, GIGA Institute, University of Liège, Liège, Belgium

Running title: *SCD1 as a dual regulator of cancer survival and sensitivity to therapy*

Keywords: SCD1; NPM1; cancer progression; acetylome

*Corresponding author. Email: nesounni@uliege.be

Supplementary Figures S1-9

Supplementary Figures and Supplementary Figure legends

Figure S1

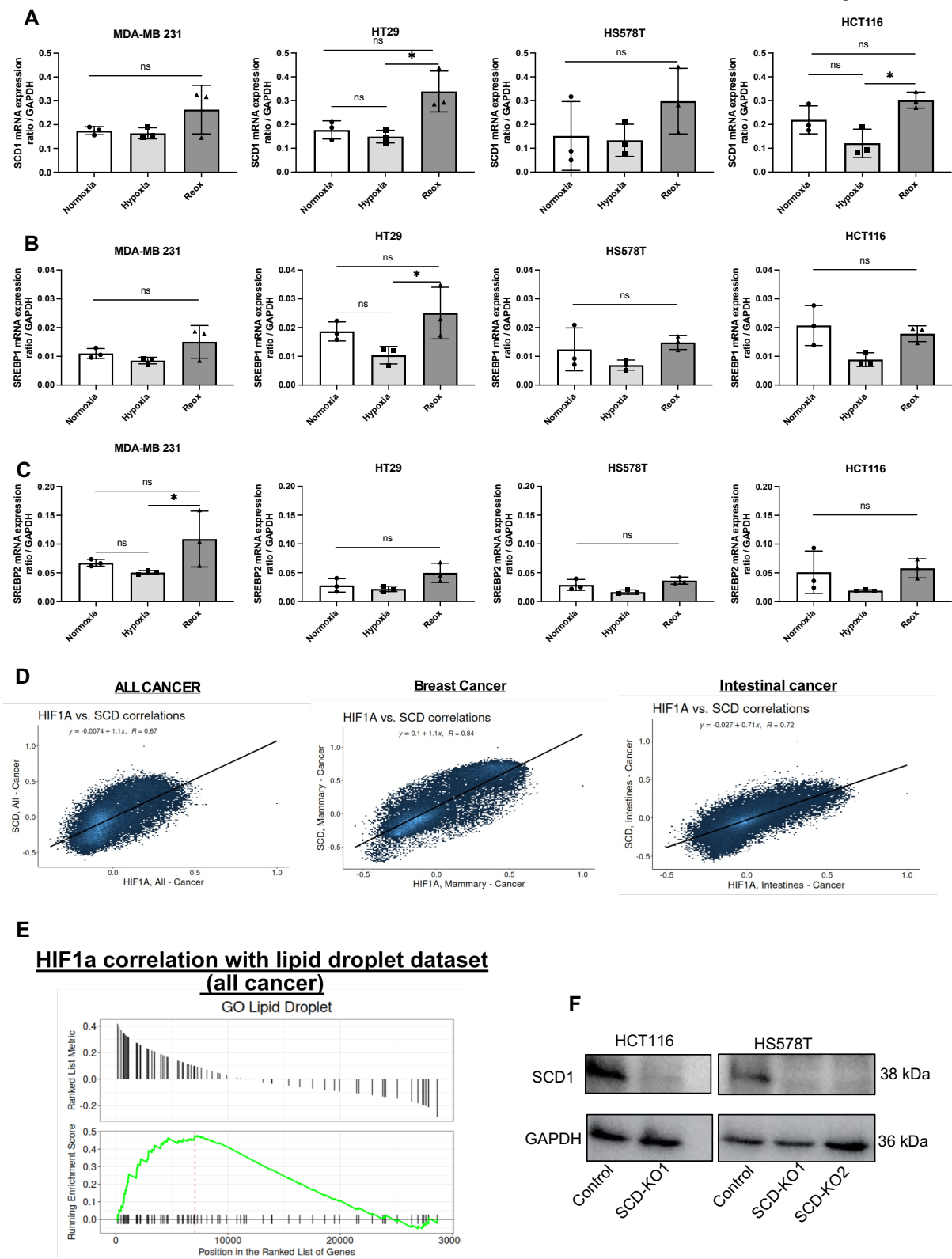


Figure S1: SCD1 expression is regulated by hypoxia and correlates with HIF1 α in human cancers. (A–C) qRT-PCR analysis of SCD1 (A), SREBP1 (B), and DERBP2 (C) in MDA-MB-231, HT29, HS578T, and HCT116 cells incubated under normoxic or hypoxic conditions or after 24 h reoxygenation (n=3). Expression was normalized to GAPDH. (D) Scatter plots showing genome-wide co-expression of HIF1 α and SCD1 across all cancers (left), breast cancers (middle), and intestinal cancers (right). (E) Gene Ontology (GO) analysis of ARCHS4 RNA-seq data identifies a lipid droplet signature significantly correlated with HIF1 α . Genes were ranked by correlation with HIF1 α using CorrelationAnalyzer, which calculated normalized enrichment scores (NES) and q-values. R values represent Pearson correlations. ARCHS4 v8 (Feb 2020) includes 238,522 human samples (Illumina HiSeq/NextSeq) linked to GEO entries with tissue annotations. (F) Western blot analysis of SCD expression in control and in SCD-KO HCT116 and HS578T cells. HSC70 served as a loading control. * $P < 0.05$

Figure S2

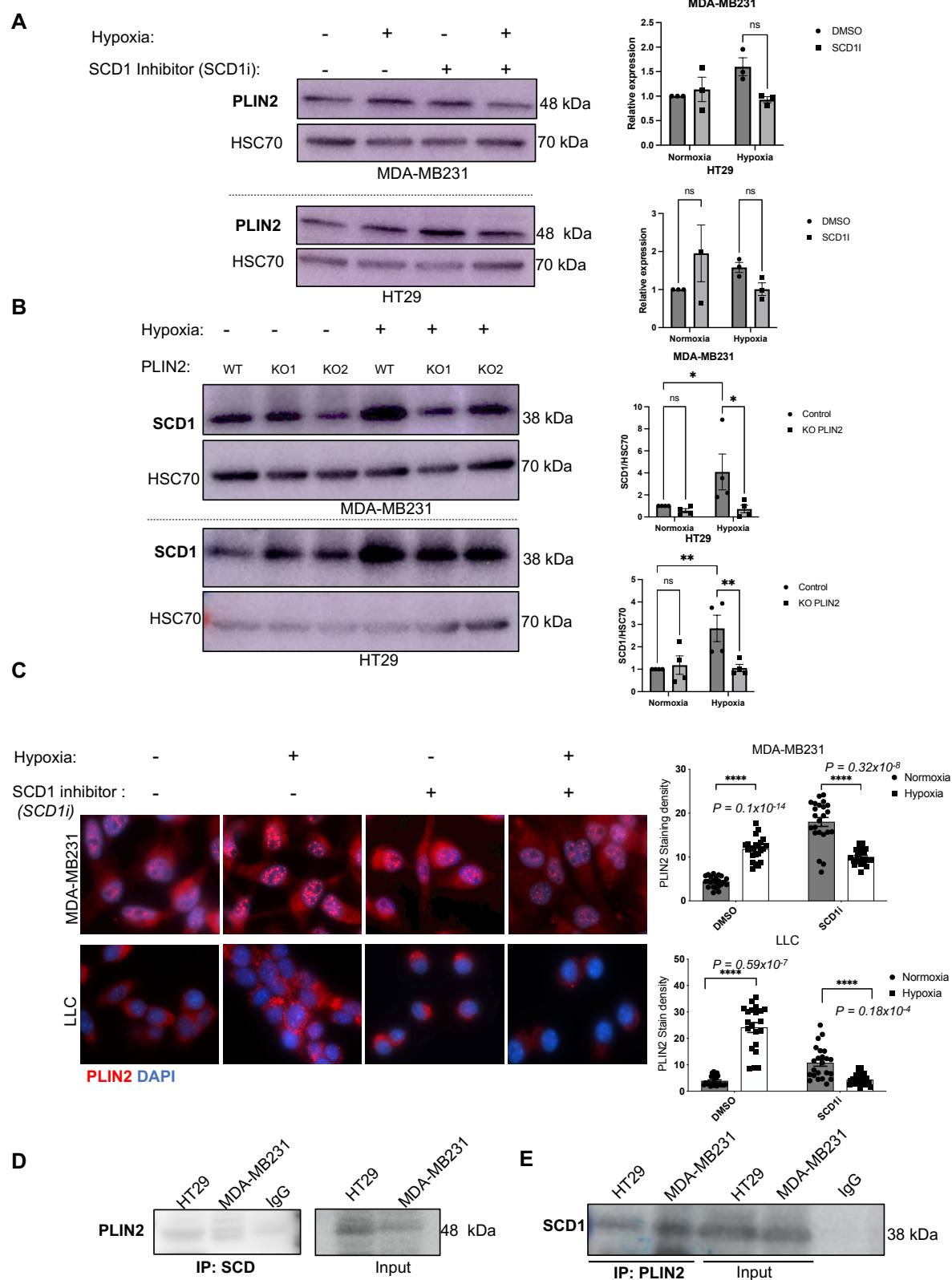


Figure S2: SCD and PLIN2 are mutually influenced and regulate LD formation in cancer cells. (A) Western blot of PLIN2 in MDA-MB231 and HT29 cells incubated under normoxic or hypoxic conditions and treated with DMSO (-) or SCD1 inhibitor (SCDi; 20 μ M) for 24 h. HSC70 served as a loading control and the graphs show the results of the densitometry quantification of the Western blot results. (B) Western blot of SCD1 on PLIN2 depleted from MDA-MB231 and HT29 Knockout (KO) cells incubated under normoxia or hypoxia conditions and quantifications. HSC70 served as a loading control. (C) PLIN2 staining on MDA-MB231 and LLC cells incubated either under normoxia or hypoxia conditions, with or without an SCD1 pharmaceutical inhibitor (SCDi; 20 μ M) and quantifications. (D) Detection of PLIN2 by Western blot analysis after immunoprecipitation of SCD1 in HT29 and MDA-MB231 cells lysates. (E) Reciprocal immunoprecipitation showing the detection of SCD1 by Western blot following immunoprecipitation of PLIN2 in HT29 and MDA-MB-231 cell lysates. Experiments were independently repeated three times (n=3). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure S3

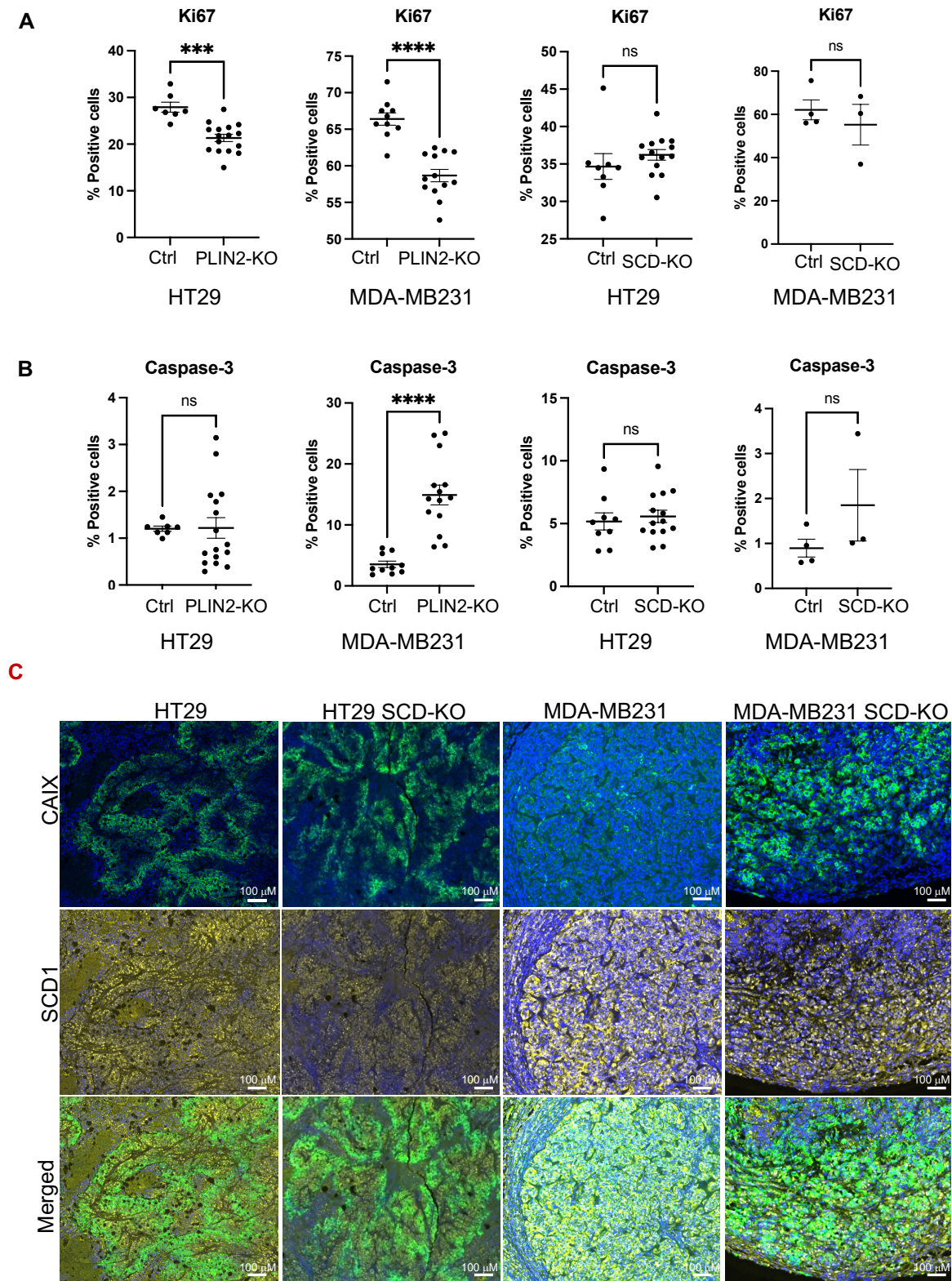


Figure S3: Depletion of PLIN2 decreases cell proliferation and increases apoptosis in

vivo. (A, B) Immunohistochemistry analysis of Ki67 in (A) and caspase-3 in (B) in tumor sections of HT29 and MDA-MB-231 xenografts depleted from PLIN2 or SCD1 and quantification of Ki67 or caspase-3 positive cells in whole tumor sections. (C)

Immunofluorescent staining of CAIX (green), SCD1 (yellow), and DAPI (blue) in HT29 and MDA-MB-231 control tumors, as well as in SCD-KO tumors, showing the whole section and the adjacent localization of CAIX and SCD1. Scale bars = 100 mm. *ns*: $P > 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

Figure S4

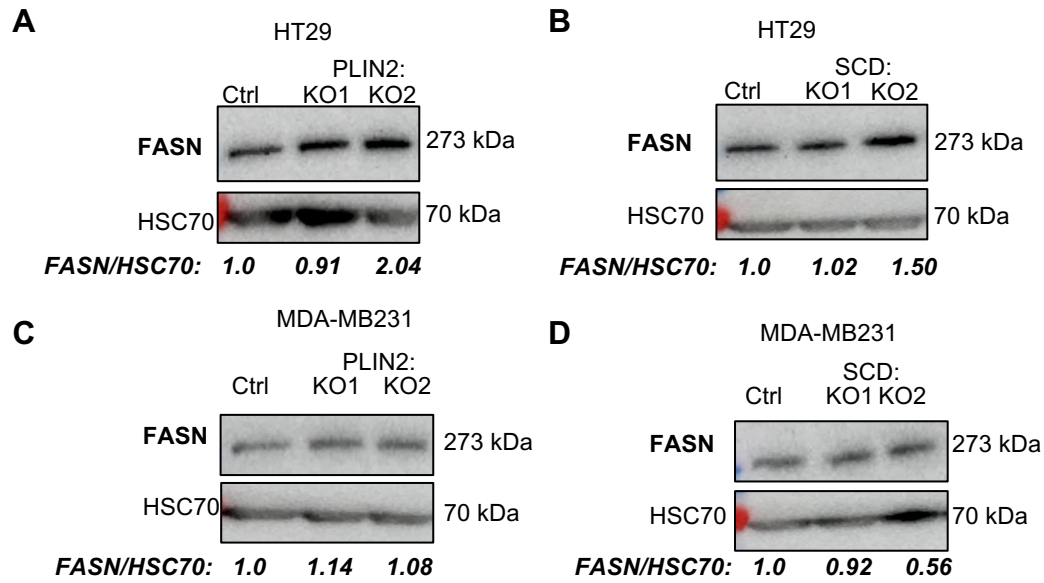
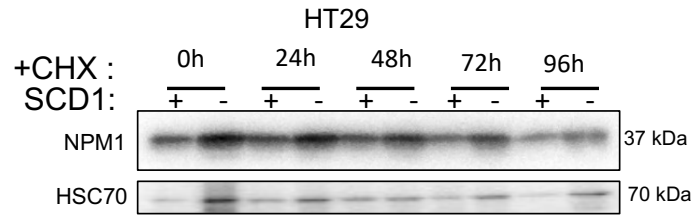


Figure S4: Inhibition of PLIN2 or SCD1 affects lipid synthesis in cancer cells. (A, B) Western blot analysis of FASN expression in control vs PLIN2-KO (A) and in control vs. SCD-KO HT29 cells (B). (C, D) Western blot of FASN expression in control vs. PLIN2-KO (C) and in control vs. SCD-KO MDA-MB 231 cells (D). HSC70 served as a loading control. FASN ratios were normalized to control (n = 2).

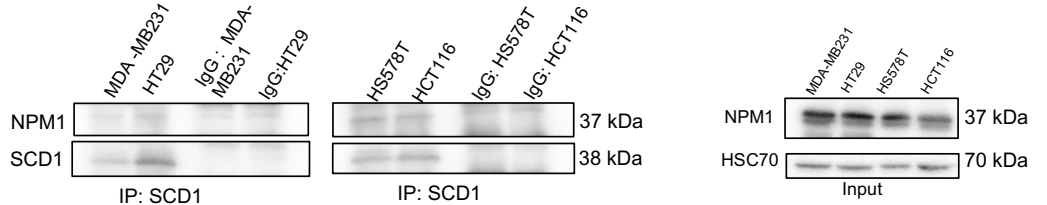
142

Figure S6

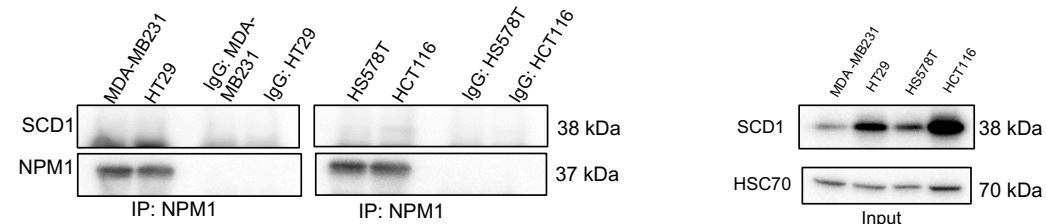
A



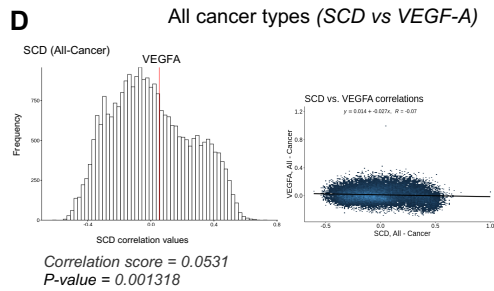
B



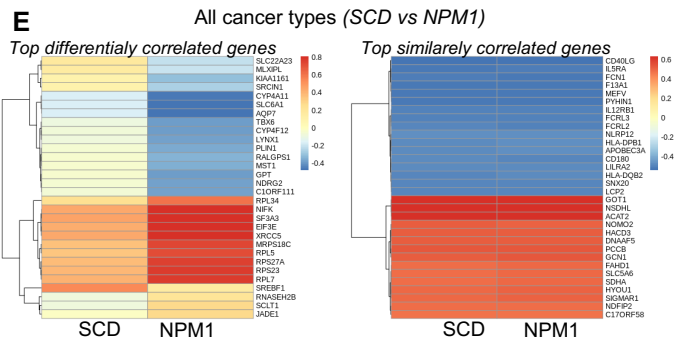
C



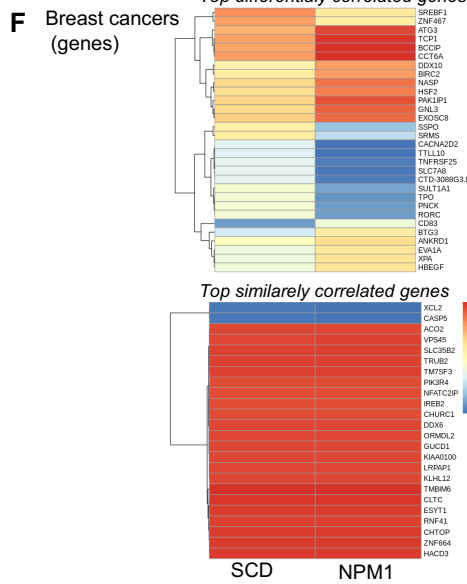
D



E



F



G

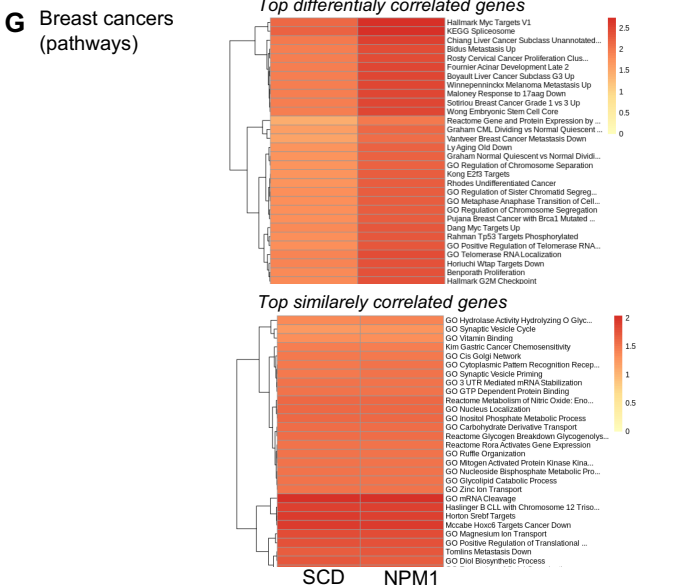


Figure S6: SCD interacts with NPM1 and increases its stabilization.

(A) Stability assay for NPM1 by Western blot at different time points after treatment with cycloheximide (100 μ M) in HT29 control and SCD-KO cells. (B) Immunoprecipitation of SCD1 and detection of NPM1 by Western blot analysis in MDA-MB231, HS578T, HCT116 and HT29 cells. Inputs are shown on the right. (C) Revers IP, after immunoprecipitation of NPM1 and detection of SCD1 by Western blot analysis. Inputs are shown on the right. HSC70 served as a loading control. (D) Correlation analysis of *SCD* gene expression with *VEGFA* gene (left graph) and Scatter plot (right graph) illustrating no correlation with these two genes in all type of cancers, *correlation score of 0,0531* and *P-value = 0,001318*. (E) Top differentially (left) and similarly (right) correlated target genes between SCD and NPM1 in all cancer types. (F, G) Top differentially (left) and similarly (right) correlated target genes (F) and pathways (G) between SCD and NPM1 in breast cancers. Displayed R value determined by Pearson correlation.

Figure S7

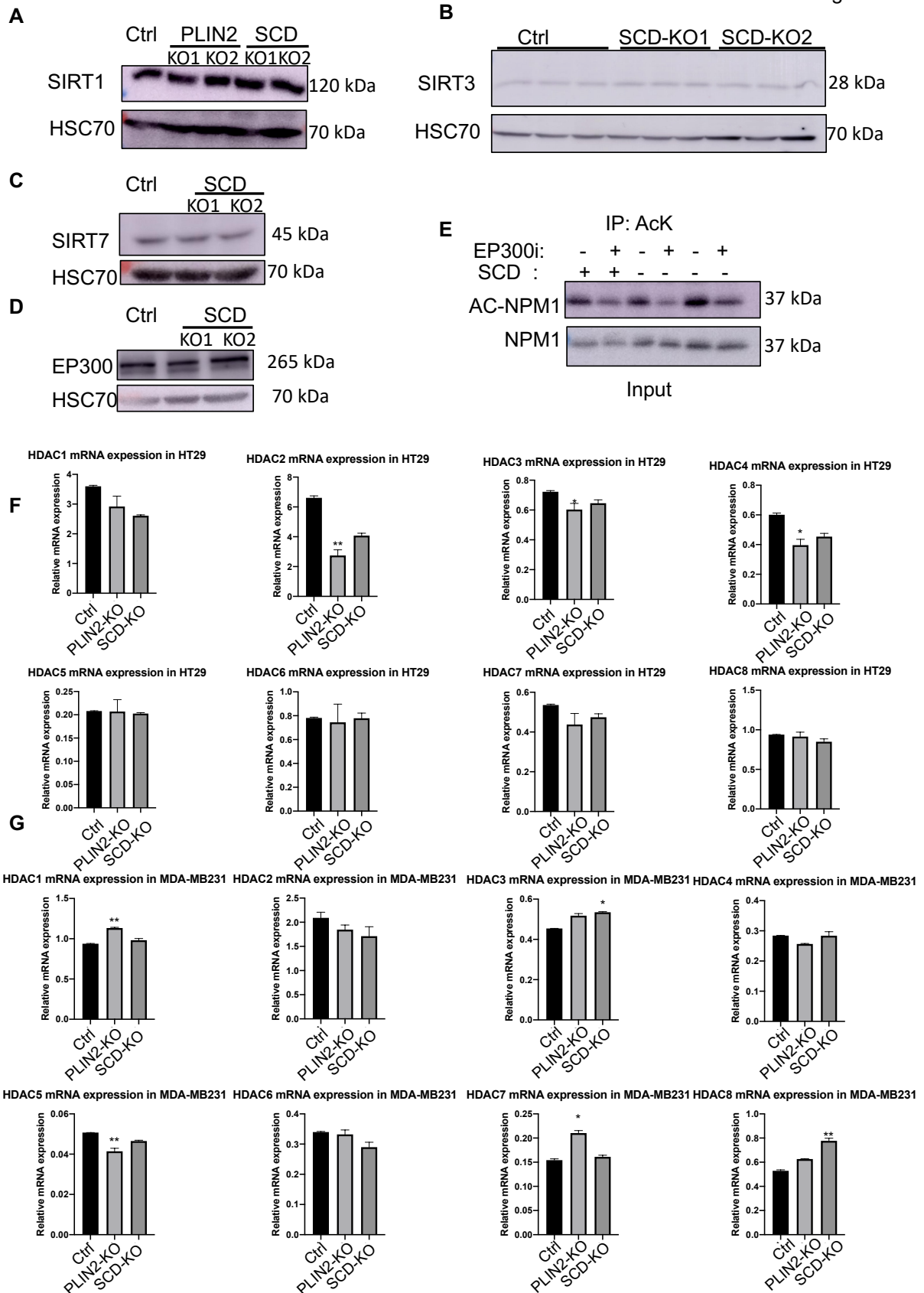


Figure S7: Effects of SCD1 and PLIN2 depletion on the expression of HDACs. (A–D) Western blot analysis of the deacetylases SIRT1 (A), SIRT3 (B), and SIRT7 (C), and the acetyltransferase EP300 (D) in MDA-MB-231 cells. HSC70 served as a loading control. (E) Assessment of NPM1 acetylation by immunoprecipitation with an acetyl-lysine antibody (Ac-K), followed by western blotting for NPM1 in control (Ctrl) and SCD-KO cells treated with DMSO or the EP300 inhibitor (EP300i; 50 μ M) for 24h. (F-G) qRT-PCR analysis of several mRNAs of HDACs in control, PLIN2-KO or SCD-KO HT29 cancer cells (F), and in control, PLIN2-KO or SCD1-KO MDA-MB231 cells (G).

Figure S8

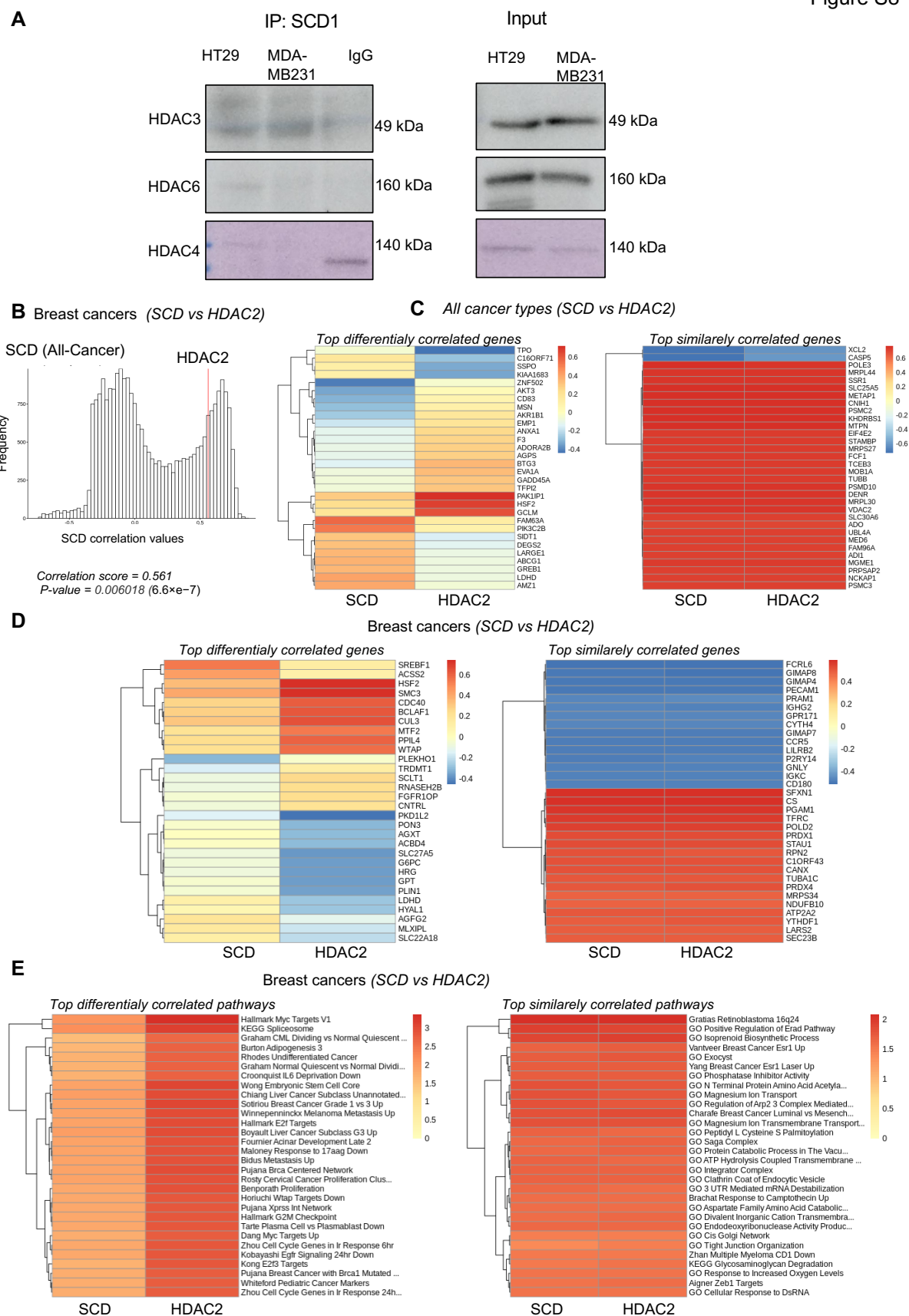


Figure S8: SCD1 and HDAC2 gene expression correlated in human cancer. (A) Co-immunoprecipitation of SCD1 and western blot analysis of HDAC3, HDAC4 and HDAC6 in HT29 and MDA-MB231 cells. Inputs are shown on the right. (B) Correlation score of *SCD* and *HDAC2* genes in breast cancers, correlation score of *0.561* and *P-value = 0.006*. (C) Top differentially (left) and similarly (right) correlated target genes between SCD and HDAC2 in all cancer types. (D, E) Top differentially (left) and similarly (right) correlated target genes (E) and pathways (E) between *SCD* and *HDAC2* genes in breast cancers. Displayed R value determined by Pearson correlation.

Figure S9

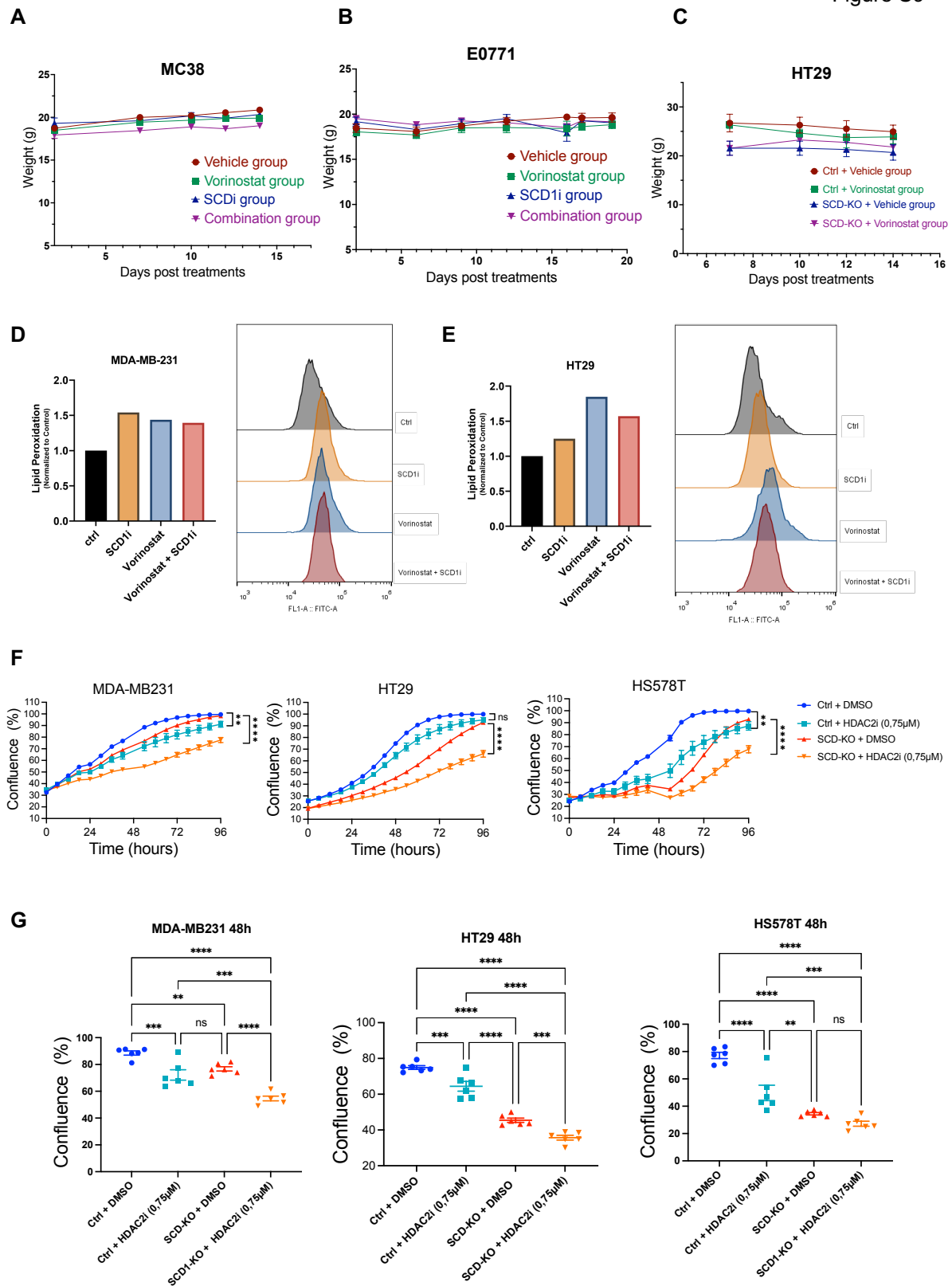


Figure S9: SCD-KO cells and tumors show sensitivity to acetylation inhibitors. (A) Weight of C57BL/6 mice bearing MC38 tumors treated with vehicle, vorinostat, an SCD inhibitor (SCDi), or a combination of vorinostat and SCDi. **(B)** Weight of C57BL/6 mice bearing E0771 tumors treated with vehicle, vorinostat, SCDi, or the combination of vorinostat and SCDi. **(C)** Weight of RAG1^{-/-} mice bearing HT29 control or SCD-KO tumors treated with vehicle or vorinostat. **(D–E)** Lipid peroxide detection using BODIPY[™] 581/591 C11 by FACS in **(D)** MDA-MB-231 cells or **(E)** HT29 cells treated with DMSO, SCD1 inhibitor (SCDi; 20 μ M), vorinostat (0.75 μ M), or both inhibitors for 24 h. Fold change of mean fluorescence intensity (MFI) relative to the control group (Ctrl) was calculated for each condition; shift counts are shown on the right. **(F)** Proliferation assay with the *Incucyte*[®] at the indicated time points for MDA-MB-231, HT29, and HS578T control (Ctrl) cells and their corresponding SCD-KO cells treated with DMSO or the HDAC2 inhibitor santacruzamate A (0.75 μ M). **(G)** Cell proliferation at 48 h of the cell lines described in panel (F). The FACS experiments were independently reproduced twice, and the *Incucyte* assays were reproduced three times.

Discussion et perspectives

Depuis quelques années, la recherche contre le cancer s'est de plus en plus intéressée au métabolisme, notamment celui des lipides et à son impact quant au développement de résistances aux traitements ²⁹⁹. En effet, les lipides sont particulièrement importants pour l'homéostasie cellulaire et la prolifération. Pour les cellules cancéreuses, une utilisation optimisée du métabolisme des lipides offre de nombreux avantages allant de la protection face à divers stress et traitements à la croissance tumorale en passant par un apport conséquent d'énergie et la régulation de nombreuses voies de signalisation ³⁰⁰. Au-delà des altérations du métabolisme, le microenvironnement joue un rôle clé avec des conditions physico-chimiques, telles que l'acidose ou l'hypoxie, pouvant impacter non seulement les cellules cancéreuses mais aussi les cellules associées à la tumeur ³⁰¹.

Régulation des gouttelettes lipidiques (LDs) par le stress hypoxique

Les gouttelettes lipidiques apparaissent souvent comme des organelles inertes mais ces dernières constituent en réalité un mécanisme essentiel du métabolisme des lipides. Les lipides sont connus pour représenter une arme à double tranchant. Ils représentent des éléments essentiels à l'apport énergétique, au maintien d'une structure membranaire appropriée ainsi qu'à l'efficacité de nombreuses voies de signalisation. Cependant, leurs proportions et leur localisation peuvent les rendre délétères pour diverses fonctions cellulaires ³⁰². La lipotoxicité et le stress oxydatif sont deux conséquences bien connues d'une accumulation inappropriée de lipides pouvant conduire à la mort cellulaire. C'est donc à ce niveau que les gouttelettes lipidiques prennent toute leur importance par leur fonction de stockage et de régulation du relargage des lipides ¹⁴⁸. Les LD sont donc un outil de contrôle essentiel pour protéger les lipides de réactions à risque pour la cellule et pour assurer leur distribution adéquate. Il a déjà été observé qu'une augmentation des LD sous hypoxie naturelle ou induite par la thérapie peut favoriser la survie des cellules cancéreuses face au stress oxydatif et à la ferroptose ³⁰³.

Notre travail s'est donc inscrit dans une recherche de la compréhension du métabolisme des lipides dans les cellules cancéreuses en hypoxie et de moyens de pouvoir l'exploiter afin de

combattre le cancer. Des travaux précédents menés au laboratoire ont révélé deux protéines d'intérêts, toutes les deux impactées par l'hypoxie. La périlipine 2 (PLIN2), protéine ubiquiste associée aux gouttelettes lipidiques et SCD1, une enzyme responsable de la première étape d'insaturation des acides gras ²⁹⁷. PLIN2 est une protéine impliquée dans l'accumulation des gouttelettes lipidiques et a pour rôle majeur de moduler l'accès d'enzymes lipolytiques aux lipides contenus dans les LD. SCD1 est quant à elle connue pour son rôle de désaturase oxygène-dépendante permettant de moduler l'équilibre entre les acides gras mono-insaturés et poly-insaturés. Cette fonction est essentielle dans la synthèse des acides, sa régulation et la protection contre la ferroptose. Ces deux protéines sont toutes les deux connues dans de nombreux cancers en ayant des pronostics majoritairement défavorables pour les patients en favorisant la rechute tumorale après traitement ³⁰³.

Dans cette étude, nous avons d'abord confirmé l'impact de l'hypoxie sur l'expression de PLIN2 et de SCD1 par Western Blot. Nous avons pu montrer une augmentation de leur expression en hypoxie et pour SCD1, nous avons constaté que son expression tend à rester légèrement élevée après réoxygénation dans plusieurs lignées cellulaires. Cette confirmation ayant été établie par la mise en évidence d'HIF1-alpha, nous avons choisi d'étudier leur impact sur la formation des gouttelettes lipidiques. De plus, nous avons validé cette association in vivo, dans des tumeurs issues de xénogreffes de MDA-MB231 et de HT29, par la mise en évidence de SCD1 exprimée dans les zones hypoxiques marquées par le CA9 (protéines induites par l'hypoxie). Pour valider le rôle des protéines cibles (SCD1 et PLIN2), nous avons logiquement utilisé une approche de délétion génétique par la technique de CRISPR-cas9 dans les HT29, les MDA-MB231 et nous avons étendu notre étude aux cellules HCT116 et HS578T.

Interaction entre PLIN2 et SCD1 et rôle dans la formation des LDs

Nous avons pu observer que la déplétion de PLIN2 ou de SCD1, dans les cellules MDA-MB231 et HT29, diminue fortement l'accumulation de LD, réduit la migration et la prolifération des cellules in vitro et réduit également la croissance tumorale in vivo. PLIN2 et SCD1 sont toutes les deux impliquées dans le métabolisme des lipides au sens large mais leurs rôles respectifs ne semblaient pas forcément sous-entendre des conséquences communes. Nous avons donc investigué la relation entre ces deux protéines. Pour cela, nous avons effectué des Western

Blots pour observer l'expression de l'une en absence de l'autre. L'expression de PLIN2 et l'accumulation de gouttelettes lipidiques sont donc réduites dans les cellules SCD1-KO ou traitées par un inhibiteur de SCD1. De même que SCD1 voit son expression diminuée dans les cellules PLIN2-KO en comparaison aux cellules contrôles. Une co-immunoprécipitation de SCD1 a par ailleurs révélé PLIN2 par Western Blot, suggérant une potentielle interaction entre les deux protéines. Ces résultats suggèrent que le métabolisme des lipides cache encore de nombreuses subtilités qu'il sera nécessaire d'explorer pour pouvoir en exploiter les pleins pouvoirs. Dans un premier temps, il serait utile d'utiliser d'autres techniques telles que le test PLA « proximity ligation assay » pour éventuellement confirmer une interaction entre PLIN2 et SCD1. Dans ce cas, il serait par la suite nécessaire d'étudier la localisation de cette interaction qui pourrait survenir dans des points de contacts entre les gouttelettes lipidiques et le réticulum endoplasmique et d'en étudier les causes et conséquences ³⁰⁴. On pourrait émettre l'hypothèse que SCD1 effectue son activité enzymatique au niveau d'une interface RE-LD de manière à directement incorporer le résultat de sa réaction dans les LD et réguler de cette manière les rapports MUFA/SFA environnants. Il conviendrait également de vérifier l'impact que l'hypoxie pourrait avoir sur cette interaction et ses mécanismes en gardant l'esprit ouvert face à d'autres fonctions possibles de SCD1. Concernant l'interdépendance des expressions de PLIN2 et de SCD1, elle paraît malgré tout logique. En effet, une disponibilité de stockage des lipides conséquente s'avère peu utile dans des conditions où la synthèse des lipides est limitée et deviendrait un gaspillage considérable d'énergie ³⁰⁵ alors que les cellules se retrouvent déjà dans des conditions de stress important. À l'inverse, une synthèse importante de lipides sans lieu de stockage disponible représente un risque non négligeable pour la cellule qui se retrouve à la merci de phénomènes de lipotoxicité et de ferroptose. Ainsi, il semble cohérent que les deux mécanismes présentent un lien réciproque assurant la survie cellulaire.

Le stockage des lipides représentant un élément clé du métabolisme des lipides, il ne serait pas surprenant de retrouver des liens entre l'expression de PLIN2 et de différentes enzymes impliquées dans la synthèse ou l'oxydation des lipides ⁹⁵. Dans cette optique, nous avons révélé l'expression de FASN, ACC (phosphorylé ou non) et de CPT1 dans nos cellules déplétées en PLIN2. Nos résultats suspectent une potentielle influence de PLIN2 sur la déphosphorylation d'ACC avec un effet d'inactivation et sur l'expression de CPT1 en hypoxie

tandis que l'expression de FASN ne semble pas particulièrement modifiée ²¹². Ces résultats nous ont poussé à investiguer l'effet de l'expression de PLIN2 associé à l'hypoxie sur l'oxydation des acides gras. Grâce à un test effectué au Seahorse et communiquant des informations sur la capacité, la flexibilité et la dépendance de la mitochondrie à un substrat donné, nous avons constaté que la déplétion de PLIN2 dans les cellules cancéreuses traitées 24 heures en hypoxie diminue la dépendance de la mitochondrie à l'oxydation des acides gras mais permet à sa flexibilité de rester élevée et de garder une capacité similaire aux cellules contrôles. Ce résultat sous-entend que la mitochondrie présente une capacité à s'adapter aux conséquences d'une altération du stockage des lipides ¹⁹³. L'absence de gouttelettes lipidiques peut représenter deux risques principaux pour la mitochondrie : des acides gras supplémentaires à éliminer pour éviter qu'ils ne partent dans des voies résultant en la mort cellulaire et un manque d'apport stable en acides gras. Nos résultats montrent surtout une adaptation mitochondriale sur ce deuxième point. Elle reste capable d'oxyder les lipides mais en dépend moins pour son fonctionnement.

En s'attardant un peu plus sur l'effet de l'expression de PLIN2 sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase, la question se pose de savoir si son inactivité en absence de PLIN2 présente des conséquences au niveau du pool d'acétyl-CoA dans la cellule. Nous avons donc mesuré la quantité d'acétyl-CoA contenu dans les cellules contrôles et PLIN2-KO. Ces résultats montrent une tendance vers une augmentation du pool dans les cellules PLIN2-KO mais elle n'est pas significative et nous ne pouvons donc pas conclure d'effet de PLIN2 sur la quantité d'acétyl-CoA intracellulaire. Cette tendance pourrait cependant avoir du sens puisque l'inactivation de l'ACC limiterait la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA et serait cohérente avec une diminution de la production d'acides gras dans les cellules présentant un nombre réduit de gouttelettes lipidiques ³⁰⁶. Il serait donc utile d'accorder de l'attention à cet aspect lors de travaux ultérieurs afin de mieux comprendre les implications d'une délétion de PLIN2 sur le métabolisme des lipides. En effet, plusieurs études montrent que PLIN2 ne se limite pas à stabiliser les gouttelettes lipidiques : elle participe à leur interaction avec les mitochondries et à la redistribution des organelles, créant un microenvironnement métabolique favorable à la survie tumorale. Cette organisation spatiale des lipides pourrait moduler la concentration locale d'acétyl-CoA dans le cytosol et le noyau, influençant la synthèse lipidique et les modifications épigénétiques qui activent des gènes oncogéniques ^{94,307}.

Rôle de PLIN2 dans l'acétylation des protéines non histones

Au-delà du pool d'acétyl-CoA, nous avons également investigué le niveau d'acétylation des protéines dans nos cellules par une analyse de l'acétylome de nos cellules contrôles et celles présentant une déplétion de PLIN2. Ce test démontre un impact considérable de PLIN2 sur l'acétylation des protéines non-histones. On observe une désacétylation massive dans les cellules n'exprimant pas PLIN2 comparé aux cellules contrôles, suggérant ainsi un rôle de PLIN2 dans l'acétylation des protéines non-histones. Ce résultat soulève une question concernant l'activité de l'ACC et le pool d'acétyl-CoA dans les cellules PLIN2-KO. En effet, une délétion de PLIN2 a pour effet d'inactiver l'ACC qui ne convertit donc plus l'acétyl-CoA en malonyl-CoA et augmentant potentiellement et légèrement le pool d'acétyl-CoA. Pourtant, aucune association entre le pool d'acétyl-CoA et l'acétylation des protéines n'a été observée dans les cellules KO pour PLIN2. Il serait par conséquent intéressant de trouver où part tout cet acétyl-CoA en mesurant notamment sa quantité dans différents compartiments cellulaires ainsi que dans le milieu extracellulaire ³⁰⁸. Une autre technique qui fournirait d'autant plus d'informations serait d'utiliser de l'acétyl-CoA marqué ³⁰⁹ pour pouvoir suivre son parcours et mieux comprendre son utilisation par rapport à l'expression de PLIN2. Il est important de rappeler que ces expériences ont été effectuées dans des conditions normoxiques et que les reproduire en conditions hypoxiques pourrait communiquer de nombreuses informations intéressantes dans la compréhension du métabolisme des lipides dans les cellules cancéreuses survivant à cette condition de stress. Il conviendrait également de pouvoir s'attarder sur les nombreuses cibles acétylées en présence de PLIN2 et d'investiguer le lien qui pourrait se faire entre l'expression de PLIN2 et l'acétylation des protéines. PLIN2 module l'acétylation de plus de 300 protéines impliquées dans de multiples voies cellulaires, notamment celles liées à la prolifération cellulaire, à la réponse aux stress, au métabolisme des ARN et à la régulation de l'expression génique, incluant la méthylation de l'ADN, la protection des télomères, l'organisation de la chromatine, l'assemblage du nucléosome, la régulation épigénétique ou encore le fonctionnement de la RNA polymérase I. Ce lien pourrait indiquer un niveau supplémentaire d'action du métabolisme des lipides et des gouttelettes lipidiques pouvant servir ou desservir les cellules tumorales. Il faudrait pour cela comparer ces résultats avec des cellules saines pour reconnaître les cibles spécifiques d'un contexte cancéreux et les étudier

plus profondément. Nous pourrions ainsi trouver de nouvelles cibles à étudier pour combattre le cancer de manière spécifique et en limitant les effets secondaires. En observant les protéines plus fortement acétylées dans les cellules contrôles, on retrouve déjà quelques protéines bien connues comme **NPM1**, la tubuline, la filamine A, GAPDH, FASN, la vimentine. Dans l'autre sens, nous trouvons tout de même des protéines plus fortement acétylées en absence de PLIN2 bien qu'elles soient drastiquement moins nombreuses. On remarque notamment CD44 et BRCA2 comme des cibles intéressantes. Cette partie de nos résultats ouvre la porte à de nombreuses investigations visant à explorer l'impact de PLIN2 sur l'acétylation de ces cibles et à déterminer leur site d'acétylation, ce qui pourrait être déjà connu ou non. En effet, l'acétylation, en plus d'être transitoire et rapidement modifiable peut présenter des effets très variables selon la protéine touchée et son site précis d'acétylation²²⁹. Un tel travail pourrait ouvrir la voie à l'étude de nombreuses subtilités encore méconnues. En termes de mécanisme, le lien entre PLIN2 et l'acétylation est encore méconnu et son investigation paraît essentielle pour pouvoir éventuellement agir de manière à impacter de nombreuses protéines pro- ou anti-tumorales à des fins thérapeutiques.

Rôle de SCD1 dans la désacétylation des protéines non histones

De la même manière que pour PLIN2, l'effet de la déplétion de SCD1 sur l'activité de l'ACC a été vérifié par Western blot mais n'a pas montré d'effet particulier au-delà d'une réduction de l'expression de l'ACC. La mesure du pool d'acétyl-CoA montre une augmentation significative bien que faible de celui-ci, d'une façon relativement similaire à PLIN2. À nouveau, il serait pertinent d'investiguer les mouvements d'acétyl-CoA dans ces cellules cancéreuses modifiées. En effet, SCD1, en catalysant la conversion des acides gras saturés en MUFA, influence directement la consommation d'acétyl-CoA pour la lipogenèse et la fluidité membranaire³¹⁰. L'inhibition de SCD1 active AMPK et inhibe ACC, réduisant la conversion d'acétyl-CoA en malonyl-CoA et perturbant la synthèse lipidique³¹¹. Cette modulation impacte non seulement la quantité globale d'acétyl-CoA mais aussi sa distribution entre le cytosol et les mitochondries, avec des conséquences potentielles sur les voies épigénétiques dépendantes de l'acétylation³¹⁰. Par ailleurs, la balance MUFA/PUFA joue un rôle critique : un excès de MUFA favorise la prolifération et la résistance au stress oxydatif, tandis qu'une augmentation des PUFA peut induire la ferroptose et modifier le flux d'acétyl-CoA³¹².

Cependant, nous avons constaté dans une analyse de l'acétylome des cellules SCD1-KO que l'effet de SCD1 sur l'acétylation est radicalement différent de PLIN2 puisqu'il est son inverse. Ce résultat indique un effet plutôt de désacétylation de la part de SCD1 avec une majorité de protéines non-histones acétylées dans les cellules déplétées en SCD1 et quelques protéines désacétylées dans ces mêmes conditions. Parmi les protéines notables repérées dans cette analyse de l'acétylome, nous retrouvons certaines protéines également trouvées dans l'analyse de l'acétylome des cellules déplétées pour PLIN2. Par exemple, la filamine A, GAPDH, NPM1 et la vimentine. Il faudrait donc évaluer les sites d'acétylation de ces protéines pour déterminer s'ils sont communs ou distincts et évaluer l'effet de l'acétylation sur ces cibles ²⁷⁵. Cela pourrait éventuellement indiquer des voies de régulation encore méconnues et reliant ces deux protéines entre elles. Ce travail serait tout autant profitable sur les autres protéines trouvées dans l'acétylome de SCD1 qu'elles soient désacétylées ou acétylées en présence de SCD1. Dans les voies impactées par l'effet de SCD1 sur l'acétylation, on retrouve notamment la biogenèse des mitochondries, la régulation d'HIF, la signalisation immunitaire, la réponse au stress, le métabolisme des ARN et des protéines. La mise en contexte de ces voies avec l'expression de SCD1 et en connaissant l'effet de l'acétylation sur les cibles trouvées dans l'acétylome permettrait à nouveau d'ouvrir des pistes pour de nouveaux traitements plus spécifiques contre divers cancers. Il convient encore une fois de comparer ces résultats avec des cellules saines pour distinguer les cibles thérapeutiques éventuelles et de refaire ces tests dans des conditions hypoxiques.

Régulation de la stabilité de NPM1 par SCD1

À la suite de ces résultats, nous avons focalisé notre travail sur une protéine que l'on a retrouvée fortement désacétylée par SCD1, la nucléophosmine NPM1. Elle présente un *fold change* de plus de 100 et est déjà connue dans certains cancers comme la leucémie ²⁹². Il est également intéressant de noter qu'on la retrouve aussi dans l'analyse de l'acétylome des cellules PLIN2-KO mais avec un effet inverse sur son acétylation. Cette protéine NPM1 ouvre à elle seule une porte vers de nombreuses possibilités de conséquences car elle est multifonctionnelle et le site d'acétylation retrouvé dans l'analyse de l'acétylome des cellules SCD1-KO n'a pas encore été spécifiquement étudié. Nous avons dans un premier temps confirmé l'augmentation de l'acétylation de NPM1 dans les cellules SCD1-KO en co-

immunoprécipitant toutes les protéines acétylées et en révélant NPM1 par Western Blot. Ensuite, nous avons simplement évalué par Western Blot son niveau d'expression dans les cellules contrôles et déplétées pour SCD1. Cela a révélé une augmentation de la quantité de protéine NPM1 présente dans les cellules KO. Afin de distinguer s'il s'agissait d'une augmentation de l'expression de NPM1 ou de sa stabilisation, nous avons effectué un test avec le cycloheximide bloquant la synthèse des protéines. Cela nous a permis de constater que l'acétylation de NPM1 sur sa lysine 267 joue un rôle stabilisateur puisqu'on la retrouve toujours présente après 96 heures de traitement. Un autre aspect non négligeable de NPM1 est sa capacité à se déplacer entre le noyau et le cytoplasme, connu pour affecter ses différentes fonctions ²⁹². Il a par ailleurs été montré que dans certaines leucémies, NPM1 présente une mutation qui le rend exclusivement cytoplasmique et l'empêche ainsi d'exercer pleinement ses différentes fonctions. Par marquage de NPM1 dans la région de sa lysine 267 dans des cellules contrôles, PLIN2-KO et SCD1-KO, nous avons pu constater un impact considérable de l'acétylation sur sa localisation cellulaire. NPM1 présente une localisation variée dans les cellules contrôles, parfois nucléaire, parfois cytoplasmique. Étant donné que NPM1 joue un rôle clé dans le cycle cellulaire qui est dépendant de sa localisation, il n'est pas surprenant de la retrouver dans différents compartiments dans différentes cellules qui peuvent être à des étapes différentes du cycle cellulaire ²⁸⁶. Dans les cellules PLIN2-KO, la localisation de NPM1 devient majoritairement cytoplasmique tandis qu'elle est fortement nucléaire dans les cellules SCD1-KO. Ces changements de localisation dans des cellules présentant des modifications agissant de manière contraire sur le niveau d'acétylation de NPM1 suggèrent une régulation de la localisation de NPM1 dépendante de son niveau d'acétylation. Nous pourrions donc avancer que NPM1 acétylé se retrouve dans le noyau et sa version désacétylée dans le cytoplasme. Cette différence de localisation dépendante de l'acétylation peut certainement jouer un rôle majeur dans le fonctionnement de NPM1 et ainsi agir sur divers événements régulés par NPM1 ³³⁸. Par exemple, l'acétylation de NPM1 la conduisant dans le noyau pourrait affecter ses rôles dans la réparation de l'ADN, la séquestration de p14ARF, le chaperonnage d'histones ou encore la duplication du centrosome. Sa désacétylation la localisant dans le cytoplasme pourrait agir sur la biogenèse des ribosomes, la régulation de p53 et la réponse aux stress ²⁸⁶. Il conviendrait de pouvoir étudier plus précisément la ou les fonction(s) de NPM1 impactée(s) par l'acétylation de ce site

pour potentiellement définir des méthodes capables de moduler le fonctionnement de NPM1 en notre faveur.

Nous avons cherché à comprendre le mécanisme par lequel SCD1 peut influencer l'état d'acétylation de NPM1 de manière aussi efficace. La co-immunoprécipitation de NPM1 suivie de la révélation de SCD1 et inversement a montré une possible interaction entre ces deux protéines. Bien que les IP inverses n'aient pas toujours été convaincantes, en raison de problèmes liés aux anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation, nous avons testé une autre approche directe utilisant la technique gPCA. Cette méthode nous a permis de consolider nos données et de confirmer que NPM1 est un partenaire solide de SCD1. Nous avons aussi effectué une expérience de PLA « proximity ligation assay » et évalué la corrélation reliant SCD1 et NPM1 dans les cancers qui ont corroboré ce résultat. Ainsi, SCD1 pourrait agir de manière relativement directe pour promouvoir la désacétylation de NPM1. Ces expériences seraient utiles à réitérer avec d'autres protéines détectées dans l'analyse de l'acétylomes comme « désacétylées » par SCD1. La probabilité d'une fonction désacétylase per se de SCD1 étant faible, nous avons dans un premier temps investigué la possibilité d'une association SCD1-désacétylase par co-immunoprécipitations de SCD1 et révélations des différentes HDAC connues ³¹⁴. Ce travail a soulevé une potentielle interaction entre SCD1 et l'HDAC2 qui est soutenue par la co-immunoprécipitation inverse ainsi que par une corrélation forte entre SCD1 et HDAC2. Ce résultat est en faveur de notre hypothèse et pourrait suggérer la formation d'un complexe SCD1-HDAC2-cible. Il est nécessaire de pousser les tests plus loin avant d'attester un tel complexe fonctionnel mais nous pouvons émettre l'hypothèse d'un mécanisme par lequel SCD1 pourrait faciliter le rôle de l'HDAC2 et la guider vers ses différentes cibles. Bien que ces données n'excluent pas l'implication d'autres HDAC, elles soutiennent un lien fonctionnel entre HDAC2 et le phénotype induit par la perte de SCD1. Parmi les désacétylases analysées par Western Blot et immunoprécipitation, HDAC2 était la seule co-immunoprécipitée avec SCD1 de manière reproductible, suggérant une association préférentielle. L'analyse de SIRT1 et SIRT3 n'a révélé aucune différence d'expression entre cellules contrôle et SCD1-KO. De même, l'expression d'EP300, une acétyltransférase de NPM1, n'était pas modifiée par la déplétion de SCD1. L'inhibition d'EP300 a réduit l'acétylation de NPM1 dans les cellules contrôle et SCD1-KO, indiquant que l'augmentation observée dans les cellules SCD1-KO ne s'explique pas uniquement par l'activité des acétyltransférases.

Nos données indiquent que SCD1 régule principalement NPM1 au niveau post-traductionnel, en favorisant sa désacétylation et sa dégradation, ce qui pourrait altérer sa fonction de suppresseur de tumeur. Ce mécanisme a été observé dans des lignées cellulaires cancéreuses *in vitro*. Dans les tumeurs humaines, une corrélation entre l'expression de SCD1 et de NPM1 a été observée dans plusieurs types de cancers, suggérant l'existence de mécanismes de régulation supplémentaires, génétiques et non génétiques.

Nous avons également examiné le rôle potentiel de l'hypoxie, capable de stabiliser SCD1 et HIF1 α . Bien que leurs niveaux protéiques augmentent, l'hypoxie n'a pas modifié leur expression transcriptionnelle dans les lignées cellulaires étudiées. Ces résultats suggèrent que la régulation post-traductionnelle observée *in vitro* pourrait ne représenter qu'un aspect d'un réseau de régulation plus complexe dans les tumeurs. Ce nouveau rôle de SCD1 a le potentiel d'ouvrir de nombreuses opportunités de découvertes et d'éventuellement donner une explication à l'augmentation de son expression en conditions hypoxiques malgré l'inutilité de sa fonction de désaturase en absence d'oxygène. Cela nécessite cependant des études beaucoup plus poussées avant de pouvoir arriver à ce type de conclusion. Il est notamment nécessaire de refaire ce travail en hypoxie pour évaluer si cette explication tient la route.

L'inhibition de SCD1 augmente la sensibilité des tumeurs aux inhibiteurs des HDAC

Afin d'exploiter nos résultats dans une optique thérapeutique, nous avons testé *in vitro* un cocktail d'inhibiteurs des désacétylases sur des cellules déplétées pour SCD1 qui a montré des résultats encourageants. Ce cocktail n'étant pas réaliste à transférer *in vivo*, nous avons refait l'expérience avec un inhibiteur bien connu des désacétylases et déjà impliqué dans des essais cliniques, le vorinostat³¹⁵. Enfin, l'inhibiteur pan-HDAC vorinostat a renforcé l'inhibition de la croissance des cellules déplétées en SCD1, un effet partiellement reproduit par l'inhibiteur sélectif de HDAC2 santacruzamate-A. Ensemble, ces résultats soutiennent HDAC2 comme médiateur principal de la régulation dépendante de SCD1 de l'acétylation de NPM1, sans exclure la contribution d'autres HDAC. L'expérience a ensuite été effectuée *in vivo* et démontré que la combinaison entre le vorinostat et l'inhibition de SCD1 présentaient une efficacité plus importante que les deux éléments séparés. En plus de MC38, un modèle

syngénique de cancer colorectal, nous avons testé un second modèle syngénique, E0771 (TNBC murin), et avons observé une activité antitumorale cohérente de la combinaison entre l'inhibition de SCD1 et le vorinostat. Ces données *in vivo* supplémentaires soutiennent la généralisabilité de l'effet de la combinaison entre différents types tumoraux et répondent à la question du choix des modèles. Nous avons également étendu nos analyses dans les tumeurs humaines en évaluant la délétion génétique de SCD1 dans la lignée cellulaire de cancer colorectal HT29, ce qui a révélé une suppression marquée de la croissance tumorale *in vivo* après déplétion de SCD1, renforçant ainsi la pertinence du ciblage de SCD1 dans le cancer colorectal. Concernant l'utilisation du vorinostat, nous reconnaissons qu'il s'agit d'un inhibiteur pan-HDAC et qu'il ne permet donc pas d'isoler spécifiquement les effets de HDAC2 *in vivo*. Néanmoins, aux Etats-Unis, le vorinostat est un médicament approuvé en clinique et largement utilisé, et sa combinaison avec l'inhibition pharmacologique ou la déplétion génétique de SCD1 constitue un cadre cliniquement pertinent pour évaluer une vulnérabilité thérapeutique, en particulier dans les tumeurs intrinsèquement résistantes à l'inhibition des HDAC. Il est important de noter que la spécificité de HDAC2 a été abordée *in vitro* à l'aide de l'inhibiteur sélectif de HDAC2 santacruzamate-A, qui a montré une inhibition marquée de la croissance spécifiquement dans les cellules déplétées en SCD1, dans plusieurs lignées cellulaires. Nous n'avons pas testé santacruzamate-A *in vivo* en raison de l'absence de données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques établies, ce qui limite actuellement son applicabilité translationnelle. Nous convenons que la validation de la synergie SCD1–HDAC2 dans des modèles tumoraux HDAC2-KO renforcerait davantage la spécificité mécanistique et constitue une perspective importante pour de futures études. Ces résultats suggèrent une piste thérapeutique à envisager plus profondément et potentiellement avec un inhibiteur spécifique de l'HDAC2 afin de limiter les effets indésirables. À nouveau, il serait intéressant d'investiguer cette partie dans des conditions hypoxiques pour la partie *in vitro* et d'adapter le modèle *in vivo* avec des inhibiteurs d'angiogenèse pour accentuer le stress hypoxique dans les tumeurs. La combinaison pourrait également être testée dans des conditions de réoxygénation.

En résumé, nos résultats montrent que l'hypoxie influence le métabolisme des lipides par l'augmentation de l'expression de SCD1 et PLIN2 qui se présentent comme des facteurs clés de l'accumulation des gouttelettes lipidiques et une régulation réciproque reliant ces deux

protéines. Au-delà de leur effet sur le métabolisme des lipides, notre travail a démontré un nouvel aspect impacté par SCD1 et PLIN2 qui correspond à l'acétylation des protéines. Ces résultats ouvrent la porte à de nombreuses questions concernant les cibles, les mécanismes, les conséquences et les portées thérapeutiques de ce nouvel axe de régulation modulé par des acteurs du métabolisme des lipides.

Nos travaux ouvrent de nombreuses pistes pour mieux comprendre le métabolisme lipidique dans les cellules cancéreuses et son impact sur la survie tumorale. La relation entre PLIN2 et SCD1, ainsi que leur rôle dans la formation des gouttelettes lipidiques et la régulation de l'acétylation des protéines, mérite d'être explorée plus en profondeur. Il serait notamment intéressant de confirmer leur interaction directe, de localiser précisément cette association au sein de la cellule et d'évaluer l'influence de l'hypoxie sur ces mécanismes.

Le lien entre PLIN2, SCD1 et la régulation de NPM1 et d'autres protéines non-histones ouvre également de nouvelles perspectives thérapeutiques. Comprendre comment l'acétylation et la désacétylation modulent ces cibles pourrait révéler des vulnérabilités spécifiques aux cellules tumorales et guider le développement de traitements combinant inhibition de SCD1 et HDAC. La validation de ces approches dans différents modèles tumoraux, en particulier sous hypoxie, permettra de mieux traduire nos découvertes vers la clinique.

Enfin, nos résultats suggèrent que le métabolisme des lipides ne se limite pas à fournir de l'énergie ou des composants membranaires : il pourrait agir comme un régulateur clé des modifications post-traductionnelles et de la signalisation cellulaire. Explorer cette dimension métabolique-épigénétique pourrait révéler de nouvelles cibles et stratégies pour lutter contre le cancer de manière plus précise et efficace.

Conclusion

Notre étude met en lumière le rôle central du métabolisme lipidique dans la survie et la progression des cellules cancéreuses sous hypoxie. Nous avons identifié PLIN2 et SCD1 comme des acteurs clés de l'accumulation des gouttelettes lipidiques, régulant non seulement le stockage des lipides mais aussi l'acétylation des protéines non-histones, avec des effets marqués sur des cibles telles que NPM1. Ces mécanismes révèlent un lien inédit entre métabolisme et régulation post-traductionnelle, contribuant à la prolifération et à la résistance des cellules tumorales.

Sur le plan thérapeutique, nos travaux suggèrent que l'inhibition de SCD1, en combinaison avec des inhibiteurs de HDAC comme le vorinostat, peut représenter une stratégie prometteuse pour sensibiliser les tumeurs à ces traitements et limiter leur progression. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles approches ciblées, exploitant les vulnérabilités métaboliques et épigénétiques des cancers, et offrent un cadre solide pour des recherches futures visant à développer des thérapies plus efficaces et spécifiques.

En résumé, nos résultats montrent que l'hypoxie influence le métabolisme des lipides par l'augmentation de l'expression de SCD1 et PLIN2, qui se présentent comme des facteurs clés de l'accumulation des gouttelettes lipidiques et une régulation réciproque reliant ces deux protéines. Au-delà de leur effet sur le métabolisme des lipides, notre travail a démontré un nouvel aspect impacté par SCD1 et PLIN2, correspondant à l'acétylation des protéines.

Notre étude a mis en lumière l'importance de deux protéines, PLIN2 et SCD1, dans la régulation des gouttelettes lipidiques sous hypoxie. PLIN2, associée aux gouttelettes lipidiques, modère la lipotoxicité et l'accès des enzymes lipolytiques aux lipides, tandis que SCD1, une désaturase dépendante de l'oxygène, joue un rôle crucial dans la synthèse et la régulation des acides gras monoinsaturés. L'expression accrue de ces protéines en hypoxie, observée dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein triple négatif et de cancer colorectal, s'est montrée au niveau protéique pour SCD1 et HIF1-alpha mais pas au niveau de l'ARNm. Nous avons ensuite exploré l'aspect fonctionnel de cette régulation de PLIN2 et SCD1 par l'hypoxie en générant des cellules KO pour ces deux protéines.

La délétion de PLIN2 ou de SCD1 diminue fortement l'accumulation de gouttelettes lipidiques, réduit la migration et la prolifération des cellules in vitro, et réduit également la croissance tumorale in vivo. De plus, une interdépendance entre PLIN2 et SCD1 dans la formation des LD a été révélée, suggérant une interaction potentielle entre ces deux protéines.

En s'attardant sur l'effet de l'expression de PLIN2 et de SCD1 sur l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), nous avons constaté que l'inactivation de l'ACC en absence de PLIN2 ou de SCD1 pourrait limiter la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, bien que cette tendance ne soit pas significative. De plus, l'analyse de l'acétylome a révélé des effets opposés de PLIN2 et SCD1 sur l'acétylation des protéines non-histones. PLIN2 semble favoriser l'acétylation, tandis que SCD1 favorise la désacétylation. Ces résultats soulèvent des questions sur l'utilisation de l'acétyl-CoA et son impact sur le métabolisme des lipides.

Nous avons cherché à comprendre le mécanisme par lequel SCD1 peut influencer l'état d'acétylation de NPM1 de manière aussi efficace. La co-immunoprécipitation de NPM1 suivie de la révélation de SCD1 et inversement, l'étude par gPCA ainsi que des expériences de PLA « proximity ligation assay », ont montré une interaction entre ces deux protéines. SCD1 pourrait agir de manière relativement directe pour promouvoir la désacétylation de NPM1, potentiellement via une association avec l'HDAC2. Cette hypothèse est soutenue par des co-immunoprécipitations et une forte corrélation entre SCD1 et HDAC2, suggérant la formation d'un complexe SCD1-HDAC2-cible.

Afin d'exploiter nos résultats dans une optique thérapeutique, nous avons testé in vitro un cocktail d'inhibiteurs des désacétylases sur des cellules déplétées pour SCD1, montrant des résultats encourageants. En utilisant le vorinostat, un inhibiteur des désacétylases déjà impliqué dans des essais cliniques, nous avons démontré in vivo que la combinaison entre le vorinostat et l'inhibition de SCD1 présente une efficacité supérieure à celle des deux éléments séparés. Ces résultats, confirmés avec un inhibiteur spécifique de l'HDAC2 (santacruzamate-A) sur plusieurs lignées, suggèrent une piste thérapeutique prometteuse, potentiellement avec un inhibiteur spécifique de l'HDAC2 pour limiter les effets indésirables.

De façon remarquable, la validation in vivo du modèle MC38 (colorectal murin), **E0771 (TNBC murin)** et HT29 colorectal humain ont permis d'observer **une activité antitumorale cohérente de la combinaison SCD1–vorinostat**, soutenant la généralisabilité de cet effet à différents types tumoraux.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques de ce nouvel axe de régulation modulé par des acteurs du métabolisme des lipides.

Bibliographie

1. Sinkala M. Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers. *Sci Rep.* 2023;13(1):12742. doi:10.1038/s41598-023-39608-2
2. Shin D, Cho KH. Critical transition and reversion of tumorigenesis. *Exp Mol Med.* 2023;55(4):692-705. doi:10.1038/s12276-023-00969-3
3. Zhang S, Xiao X, Yi Y, et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):149. doi:10.1038/s41392-024-01848-7
4. Cancer Today.
https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&types=0
5. Chaubal R, Gardi N, Joshi S, et al. Surgical Tumor Resection Deregulates Hallmarks of Cancer in Resected Tissue and the Surrounding Microenvironment. *Mol Cancer Res.* 2024;22(6):572-584. doi:10.1158/1541-7786.MCR-23-0265
6. Anand U, Dey A, Chandel AKS, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis.* 2023;10(4):1367-1401. doi:10.1016/j.gendis.2022.02.007
7. Chen HHW, Kuo MT. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget.* 2017;8(37):62742-62758. doi:10.18632/oncotarget.18409
8. Abraham J, Ocen J, Staffurth J. Hormonal therapy for cancer. *Medicine (Baltimore).* 2023;51(1):28-31. doi:10.1016/j.mpmed.2022.10.017
9. Immunothérapie des cancers · Inserm, La science pour la santé. Accessed March 31, 2025. <https://www.inserm.fr/dossier/immunotherapie-cancers/>
10. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE. Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers.* 2020;12(3):731. doi:10.3390/cancers12030731
11. Thérapies ciblées. Accessed March 31, 2025.
https://www.cancerologie.chuliege.be/jcms/c2_22039791/fr/therapies-ciblees
12. El-Sehrawy AAMA, Hsu CY, Alkhathami AG, et al. Metabolic reprogramming: The driving force behind cancer drug resistance. *Semin Oncol.* 2025;52(5):152392. doi:10.1016/j.seminoncol.2025.152392
13. Cevatemre B, Ulukaya E, Dere E, Dilege S, Acilan C. Pyruvate Dehydrogenase Contributes to Drug Resistance of Lung Cancer Cells Through Epithelial Mesenchymal Transition. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:738916. doi:10.3389/fcell.2021.738916
14. Abe K, Ikeda S, Nara M, Kitadate A, Tagawa H, Takahashi N. Hypoxia-induced oxidative stress promotes therapy resistance via upregulation of heme oxygenase-1 in multiple myeloma. *Cancer Med.* 2023;12(8):9709-9722. doi:10.1002/cam4.5679
15. Singh L, Nair L, Kumar D, et al. Hypoxia induced lactate acidosis modulates tumor microenvironment and lipid reprogramming to sustain the cancer cell survival. *Front Oncol.* 2023;13:1034205. doi:10.3389/fonc.2023.1034205
16. Jena AB, Samal RR, Bhol NK, Duttaroy AK. Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. *Biomed Pharmacother.* 2023;162:114606. doi:10.1016/j.biopha.2023.114606
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
18. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059

19. Campbell BB, Galati MA, Stone SC, et al. Mutations in the RAS/MAPK Pathway Drive Replication Repair-Deficient Hypermutated Tumors and Confer Sensitivity to MEK Inhibition. *Cancer Discov.* 2021;11(6):1454-1467. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1050
20. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* 2022;29(5):946-960. doi:10.1038/s41418-022-00988-z
21. Vaupel P, Mayer A, Höckel M. Tumor Hypoxia and Malignant Progression. In: *Methods in Enzymology*. Vol 381. Academic Press; 2004:335-354. doi:10.1016/S0076-6879(04)81023-1
22. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):437-447. doi:10.1038/nrc1367
23. Obeagu EI. Hypoxia-driven angiogenesis in breast cancer mechanisms and therapeutic targets: a narrative review. *Ann Med Surg.* 2025;87(7):4246-4254. doi:10.1097/MS9.0000000000003411
24. Dudley AC. Tumor Endothelial Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(3):a006536-a006536. doi:10.1101/cshperspect.a006536
25. Michiels C, Tellier C, Feron O. Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2016;1866(1):76-86. doi:10.1016/j.bbcan.2016.06.004
26. Cannito S, Giardino I, d'Apolito M, et al. The Multifaceted Role of Mitochondria in Angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2025;26(16):7960. doi:10.3390/ijms26167960
27. Gilkes DM, ed. *Hypoxia and Cancer Metastasis*. Vol 1136. Springer International Publishing; 2019. doi:10.1007/978-3-030-12734-3
28. Eales KL, Hollinshead KER, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis.* 2016;5(1):e190-e190. doi:10.1038/oncsis.2015.50
29. Xia Y, Duan S, Han C, Jing C, Xiao Z, Li C. Hypoxia-responsive nanomaterials for tumor imaging and therapy. *Front Oncol.* 2022;12:1089446. doi:10.3389/fonc.2022.1089446
30. Rani S, Roy S, Singh M, Kaithwas G. Regulation of Transactivation at C-TAD Domain of HIF-1 α by Factor-Inhibiting HIF-1 α (FIH-1): A Potential Target for Therapeutic Intervention in Cancer. Ciccarone F, ed. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022(1):2407223. doi:10.1155/2022/2407223
31. Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. The Oxygen Sensor Factor-Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor-1 Controls Expression of Distinct Genes through the Bifunctional Transcriptional Character of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Cancer Res.* 2006;66(7):3688-3698. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4564
32. Koivunen P, Hirsilä M, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic Properties of the Asparaginyl Hydroxylase (FIH) in the Oxygen Sensing Pathway Are Distinct from Those of Its Prolyl 4-Hydroxylases. *J Biol Chem.* 2004;279(11):9899-9904. doi:10.1074/jbc.M312254200
33. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood.* 2011;117(23):e207-e217. doi:10.1182/blood-2010-10-314427
34. Chen Z, Han F, Du Y, Shi H, Zhou W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):70. doi:10.1038/s41392-023-01332-8
35. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003;17(2):271-273. doi:10.1096/fj.02-0445fje
36. Wang M, Wang W, Wang J, Zhang J. MiR-182 promotes glucose metabolism by upregulating hypoxia-inducible factor 1 α in NSCLC cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(2):400-405. doi:10.1016/j.bbrc.2018.06.035

37. Hsu YL, Hung JY, Chang WA, et al. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017;36(34):4929-4942. doi:10.1038/onc.2017.105
38. Byun Y, Choi YC, Jeong Y, et al. MiR-200c downregulates HIF-1 α and inhibits migration of lung cancer cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24(1):28. doi:10.1186/s11658-019-0152-2
39. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):6140. doi:10.3390/ijms20246140
40. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604-4613. doi:10.1128/MCB.16.9.4604
41. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1117-1133. doi:10.1177/1947601911423654
42. Skuli N, Liu L, Runge A, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood*. 2009;114(2):469-477. doi:10.1182/blood-2008-12-193581
43. Hsu YL, Hung JY, Chang WA, et al. Hypoxic Lung-Cancer-Derived Extracellular Vesicle MicroRNA-103a Increases the Oncogenic Effects of Macrophages by Targeting PTEN. *Mol Ther*. 2018;26(2):568-581. doi:10.1016/j.ymthe.2017.11.016
44. Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. HIF-1-Independent Mechanisms Regulating Metabolic Adaptation in Hypoxic Cancer Cells. *Cells*. 2021;10(9):2371. doi:10.3390/cells10092371
45. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol*. 2021;599(1):23-37. doi:10.1113/JP280572
46. Kim J whan, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3(3):177-185. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002
47. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
48. Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1998;1401(3):242-264. doi:10.1016/S0167-4889(97)00150-X
49. Mor I, Cheung EC, Vousden KH. Control of Glycolysis through Regulation of PFK1: Old Friends and Recent Additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76(0):211-216. doi:10.1101/sqb.2011.76.010868
50. Mattevi A, Bolognesi M, Valentini G. The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Lett*. 1996;389(1):15-19. doi:10.1016/0014-5793(96)00462-0
51. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, et al. Transcription Factor HIF-1 Is a Necessary Mediator of the Pasteur Effect in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21(10):3436-3444. doi:10.1128/MCB.21.10.3436-3444.2001
52. Lynch EM, Hansen H, Salay L, et al. Structural basis for allosteric regulation of human phosphofructokinase-1. *Nat Commun*. 2024;15(1):7323. doi:10.1038/s41467-024-51808-6
53. Lodish, Berk, Matsudaira, et al. L'énergétique cellulaire. In: *Biologie Moléculaire de La Cellule*. 5th ed. De Boeck.

54. Cordani M, Rumio C, Bontempi G, Strippoli R, Marcucci F. Oxidative and Glycolytic Metabolism: Their Reciprocal Regulation and Dysregulation in Cancer. *Cells*. 2025;14(15):1177. doi:10.3390/cells14151177
55. Bartman CR, Weilandt DR, Shen Y, et al. Slow TCA flux and ATP production in primary solid tumours but not metastases. *Nature*. 2023;614(7947):349-357. doi:10.1038/s41586-022-05661-6
56. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(19):8788-8793. doi:10.1073/pnas.1003428107
57. Pistollato F, Rampazzo E, Persano L, et al. Interaction of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Notch Signaling Regulates Medulloblastoma Precursor Proliferation and Fate. *Stem Cells*. 2010;28(11):1918-1929. doi:10.1002/stem.518
58. Chinopoulos C. Complex I activity in hypoxia: implications for oncometabolism. *Biochem Soc Trans*. 2024;52(2):529-538. doi:10.1042/BST20230189
59. Grasso D, Zampieri LX, Capelôa T, Van de Velde JA, Sonveaux P. Mitochondria in cancer. *Cell Stress*. 2020;4(6):114-146. doi:10.15698/cst2020.06.221
60. Swenson ER. Does Aerobic Respiration Produce Carbon Dioxide or Hydrogen Ion and Bicarbonate? *Anesthesiology*. 2018;128(5):873-879. doi:10.1097/ALN.0000000000002125
61. Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev*. 2011;25(10):1041-1051. doi:10.1101/gad.1987211
62. Chen H, Yang Z, Sun Y, Yin S, Tang M, Zhang F. Targeting the Key Enzymes of Abnormal Fatty Acid β -oxidation as a Potential Strategy for Tumor Therapy. *Front Biosci-Landmark*. 2022;27(3):95. doi:10.31083/j.fbl2703095
63. Wakui M, Kawai K, Mizushima T, et al. Fatty Acid β -Oxidation-dependent and -independent Responses and Tumor Aggressiveness Acquired Under Mild Hypoxia. *Anticancer Res*. 2019;39(1):191-200. doi:10.21873/anticancer.13097
64. Ma J, Wang S, Zhang P, et al. Emerging roles for fatty acid oxidation in cancer. *Genes Dis*. 2025;12(4):101491. doi:10.1016/j.gendis.2024.101491
65. Teng Y, Xu L, Li W, Liu P, Tian L, Liu M. Targeting reactive oxygen species and fat acid oxidation for the modulation of tumor-associated macrophages: a narrative review. *Front Immunol*. 2023;14:1224443. doi:10.3389/fimmu.2023.1224443
66. Dong J, Li M, Peng R, Zhang Y, Qiao Z, Sun N. ACACA reduces lipid accumulation through dual regulation of lipid metabolism and mitochondrial function via AMPK- PPAR α -CPT1A axis. *J Transl Med*. 2024;22(1):196. doi:10.1186/s12967-024-04942-0
67. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5703. doi:10.3390/ijms22115703
68. Jalil AT, Al-Kazzaz HH, Hassan FA, et al. Metabolic Reprogramming of Anti-cancer T Cells: Targeting AMPK and PPAR to Optimize Cancer Immunotherapy. *Indian J Clin Biochem*. 2025;40(2):165-175. doi:10.1007/s12291-023-01166-9
69. Ma L, Chen C, Zhao C, et al. Targeting carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) induces ferroptosis and synergizes with immunotherapy in lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):64. doi:10.1038/s41392-024-01772-w
70. Mao S, Ling Q, Pan J, et al. Inhibition of CPT1a as a prognostic marker can synergistically enhance the antileukemic activity of ABT199. *J Transl Med*. 2021;19(1):181. doi:10.1186/s12967-021-02848-9

71. Zhelev Z, Sumiyoshi A, Aoki I, et al. Over-Reduced State of Mitochondria as a Trigger of “ β -Oxidation Shuttle” in Cancer Cells. *Cancers*. 2022;14(4):871. doi:10.3390/cancers14040871
72. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med*. 2020;52(9):1496-1516. doi:10.1038/s12276-020-00504-8
73. Le A, Lane AN, Hamaker M, et al. Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells. *Cell Metab*. 2012;15(1):110-121. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.009
74. Ameer F, Scandiuizzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63(7):895-902. doi:10.1016/j.metabol.2014.04.003
75. Li C, Zhang L, Qiu Z, Deng W, Wang W. Key Molecules of Fatty Acid Metabolism in Gastric Cancer. *Biomolecules*. 2022;12(5):706. doi:10.3390/biom12050706
76. Liu X, Lu J, Ni X, et al. FASN promotes lipid metabolism and progression in colorectal cancer via the SP1/PLA2G4B axis. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):122. doi:10.1038/s41420-025-02409-9
77. Tracz-Gaszewska Z, Sowka A, Dobrzyn P. Stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition impairs triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in colorectal cancer cells. *J Cell Physiol*. 2023;238(12):2888-2903. doi:10.1002/jcp.31137
78. Sen U, Coleman C, Gandhi N, et al. SCD1 Inhibition Blocks the AKT–NRF2–SLC7A11 Pathway to Induce Lipid Metabolism Remodeling and Ferroptosis Priming in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2025;85(13):2485-2503. doi:10.1158/0008-5472.CAN-24-2745
79. Khan F, ElSORI D, Verma M, et al. Unraveling the intricate relationship between lipid metabolism and oncogenic signaling pathways. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1399065. doi:10.3389/fcell.2024.1399065
80. Koizume S, Miyagi Y. Adaptation mechanisms in cancer: Lipid metabolism under hypoxia and nutrient deprivation as a target for novel therapeutic strategies (Review). *Mol Med Rep*. 2025;31(4):83. doi:10.3892/mmr.2025.13448
81. Liu R, Wang C, Tao Z, Hu G. Lipid Metabolism Reprogramming in Cancer: Insights into Tumor Cells and Immune Cells Within the Tumor Microenvironment. *Biomedicines*. 2025;13(8):1895. doi:10.3390/biomedicines13081895
82. Elewaut A, Estivill G, Bayerl F, et al. Cancer cells impair monocyte-mediated T cell stimulation to evade immunity. *Nature*. 2025;637(8046):716-725. doi:10.1038/s41586-024-08257-4
83. Chandrasekaran P, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Perilipins: A family of five fat-droplet storing proteins that play a significant role in fat homeostasis. *J Cell Biochem*. 2024;125(6):e30579. doi:10.1002/jcb.30579
84. Gianazza E, Papaiani GG, Brocca L, Banfi C, Mallia A. Omics Approaches to Study Perilipins and Their Significant Biological Role in Cardiometabolic Disorders. *Int J Mol Sci*. 2025;26(2):557. doi:10.3390/ijms26020557
85. Dias Araújo AR, Bello AA, Bigay J, et al. Surface tension–driven sorting of human perilipins on lipid droplets. *J Cell Biol*. 2024;223(12):e202403064. doi:10.1083/jcb.202403064
86. Grisetti E, Bello AA, Bieth E, et al. Molecular mechanisms of perilipin protein function in lipid droplet metabolism. *FEBS Lett*. 2024;598(10):1170-1198. doi:10.1002/1873-3468.14792
87. Ajjaji D, Ben M’barek K, Mimmack ML, et al. Dual binding motifs underpin the hierarchical association of perilipins1–3 with lipid droplets. Parton RG, ed. *Mol Biol Cell*. 2019;30(5):703-716. doi:10.1091/mbc.E18-08-0534

88. Desgrouas C, Thalheim T, Cerino M, Badens C, Bonello-Palot N. Perilipin 1: a systematic review on its functions on lipid metabolism and atherosclerosis in mice and humans. *Cardiovasc Res*. 2024;120(3):237-248. doi:10.1093/cvr/cvae005
89. Hsieh K, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 17):4067-4076. doi:10.1242/jcs.104943
90. Hsieh K, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol- or cholesteryl ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J Cell Sci*. Published online January 1, 2012;jcs.104943. doi:10.1242/jcs.104943
91. MacPherson REK, Vandenboom R, Roy BD, Peters SJ. Skeletal muscle PLIN3 and PLIN5 are serine phosphorylated at rest and following lipolysis during adrenergic or contractile stimulation. *Physiol Rep*. 2013;1(4). doi:10.1002/phy2.84
92. Pourteymour S, Lee S, Langleite TM, et al. Perilipin 4 in human skeletal muscle: localization and effect of physical activity. *Physiol Rep*. 2015;3(8):e12481. doi:10.14814/phy2.12481
93. Najt CP, Devarajan M, Mashek DG. Perilipins at a glance. *J Cell Sci*. 2022;135(5):jcs259501. doi:10.1242/jcs.259501
94. Wu Y, Chen K, Li L, et al. Plin2-mediated lipid droplet mobilization accelerates exit from pluripotency by lipidomic remodeling and histone acetylation. *Cell Death Differ*. 2022;29(11):2316-2331. doi:10.1038/s41418-022-01018-8
95. Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2751-2761. doi:10.1194/jlr.M700359-JLR200
96. Liao PC, Yang EJ, Borgman T, et al. Touch and Go: Membrane Contact Sites Between Lipid Droplets and Other Organelles. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:852021. doi:10.3389/fcell.2022.852021
97. Tsai TH, Chen E, Li L, et al. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy*. 2017;13(7):1130-1144. doi:10.1080/15548627.2017.1319544
98. Zhang Z, Yu Z, Liang D, et al. Roles of lipid droplets and related proteins in metabolic diseases. *Lipids Health Dis*. 2024;23(1):218. doi:10.1186/s12944-024-02212-y
99. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol*. 2015;17(6):759-770. doi:10.1038/ncb3166
100. Kaushik S, Cuervo AM. **AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA.** *Autophagy*. 2016;12(2):432-438. doi:10.1080/15548627.2015.1124226
101. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(10):1221-1232. doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.009
102. Wang H, Klein MG, Zou H, et al. Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(7):581-585. doi:10.1038/nsmb.3049
103. Petroff AB, Weir RL, Yates CR, Ng JD, Baudry J. Sequential Dynamics of Stearyl-CoA Desaturase-1(SCD1)/Ligand Binding and Unbinding Mechanism: A Computational Study. *Biomolecules*. 2021;11(10):1435. doi:10.3390/biom11101435

104. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(17):6409-6414. doi:10.1073/pnas.0401627101
105. Popeijus HE. SCD (Stearoyl-CoA Desaturase). In: Choi S, ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer International Publishing; 2018:4847-4853. doi:10.1007/978-3-319-67199-4_101551
106. Shetty VV, Shetty SS. Fatty Acid Desaturase: The Yin or Yang of Disease Pathology. *Mol Diagn Ther*. 2025;29(5):637-654. doi:10.1007/s40291-025-00796-4
107. Shanklin J, Cahoon EB. DESATURATION AND RELATED MODIFICATIONS OF FATTY ACIDS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1998;49(1):611-641. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.611
108. Pellman J, Goldstein A, Slabicki M. Human E3 ubiquitin ligases: accelerators and brakes for SARS-CoV-2 infection. *Biochem Soc Trans*. 2024;52(5):2009-2021. doi:10.1042/BST20230324
109. Scaglia N, Igal RA. Stearoyl-CoA Desaturase Is Involved in the Control of Proliferation, Anchorage-independent Growth, and Survival in Human Transformed Cells. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25339-25349. doi:10.1074/jbc.M501159200
110. Nashed M. ROLE OF STEAROYL-COA DESATURASE- 1 (SCD1) IN THE ACTIVATION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) IN LUNG CANCER CELLS.
111. Sampath H, Ntambi JM. Role of Stearoyl-CoA Desaturase-1 in Skin Integrity and Whole Body Energy Balance. *J Biol Chem*. 2014;289(5):2482-2488. doi:10.1074/jbc.R113.516716
112. Chen M, Wang H, Cui Q, Shi J, Hou Y. Dual function of activated PPAR γ by ligands on tumor growth and immunotherapy. *Med Oncol*. 2024;41(5):114. doi:10.1007/s12032-024-02363-z
113. Zhang J, Song F, Zhao X, et al. EGFR modulates monounsaturated fatty acid synthesis through phosphorylation of SCD1 in lung cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):127. doi:10.1186/s12943-017-0704-x
114. Zhang J, Song F, Zhao X, et al. EGFR modulates monounsaturated fatty acid synthesis through phosphorylation of SCD1 in lung cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):127. doi:10.1186/s12943-017-0704-x
115. Liu Q, Luo Q, Halim A, Song G. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Lett*. 2017;401:39-45. doi:10.1016/j.canlet.2017.05.002
116. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):763-777. doi:10.1038/nrc2222
117. Salita T, Rustam YH, Mouradov D, Sieber OM, Reid GE. Reprogrammed Lipid Metabolism and the Lipid-Associated Hallmarks of Colorectal Cancer. *Cancers*. 2022;14(15):3714. doi:10.3390/cancers14153714
118. Ascenzi F, De Vitis C, Maugeri-Saccà M, Napoli C, Ciliberto G, Mancini R. SCD1, autophagy and cancer: implications for therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):265. doi:10.1186/s13046-021-02067-6
119. Igal RA. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(9):1509-1515. doi:10.1093/carcin/bgq131
120. Iwai T, Kume S, Chin-Kanasaki M, et al. Stearoyl-CoA Desaturase-1 Protects Cells against Lipotoxicity-Mediated Apoptosis in Proximal Tubular Cells. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11):1868. doi:10.3390/ijms17111868

121. Kubota CS, Espenshade PJ. Targeting Stearoyl-CoA Desaturase in Solid Tumors. *Cancer Res.* 2022;82(9):1682-1688. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-4044
122. Thompson TE. Encyclopedia Britannica, lipid. In: 2023. <https://www.britannica.com/science/lipid>
123. Szlasa W, Zendran I, Zalesińska A, Tarek M, Kulbacka J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 2020;52(5):321-342. doi:10.1007/s10863-020-09846-4
124. Sharma R. The Role of Lipid Hormones in Metabolism Regulation, Reproductive Functions, Immune Responses and Cellular Differentiation.
125. Wang D, DuBois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(3):181-193. doi:10.1038/nrc2809
126. Hawkins PT, Stephens LR. Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P2 in Class I and II PI3K-regulated pathways. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(1):307-314. doi:10.1042/BST20150248
127. González-García A, Garrido A, Carrera AC. Targeting PTEN Regulation by Post Translational Modifications. *Cancers.* 2022;14(22):5613. doi:10.3390/cancers14225613
128. Henne WM, Reynolds E, Prinz WA. Lipid droplets: Open questions and conceptual advances around a unique organelle. *J Cell Biol.* 2025;224(10):e202406019. doi:10.1083/jcb.202406019
129. Mathiowetz AJ, Olzmann JA. Lipid droplets and cellular lipid flux. *Nat Cell Biol.* 2024;26(3):331-345. doi:10.1038/s41556-024-01364-4
130. Cui D, Yu X, Guan Q, et al. Cholesterol metabolism: molecular mechanisms, biological functions, diseases, and therapeutic targets. *Mol Biomed.* 2025;6(1):72. doi:10.1186/s43556-025-00321-3
131. Ho-Palma AC, Toro P, Rotondo F, et al. Insulin Controls Triacylglycerol Synthesis through Control of Glycerol Metabolism and Despite Increased Lipogenesis. *Nutrients.* 2019;11(3):513. doi:10.3390/nu11030513
132. Kaushik S, Cuervo AM. **AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA.** *Autophagy.* 2016;12(2):432-438. doi:10.1080/15548627.2015.1124226
133. Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, et al. Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *J Hepatol.* 2014;60(3):633-642. doi:10.1016/j.jhep.2013.11.007
134. Coleman RA. The “discovery” of lipid droplets: A brief history of organelles hidden in plain sight. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(9):158762. doi:10.1016/j.bbalip.2020.158762
135. Li S, Yuan H, Li L, Li Q, Lin P, Li K. Oxidative Stress and Reprogramming of Lipid Metabolism in Cancers. *Antioxidants.* 2025;14(2):201. doi:10.3390/antiox14020201
136. Bolarinwa T, Akomolafe OO, Sagay-Omonogor I. Addressing Lipid Droplet-Mediated Stress Responses in Cancer Cells. *Int J Multidiscip Res Growth Eval.* 2023;4(2):870-876. doi:10.54660/IJMRGE.2023.4.2.870-876
137. Petschnigg J, Wolinski H, Kolb D, et al. Good Fat, Essential Cellular Requirements for Triacylglycerol Synthesis to Maintain Membrane Homeostasis in Yeast. *J Biol Chem.* 2009;284(45):30981-30993. doi:10.1074/jbc.M109.024752
138. Thiam AR, Forêt L. The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2016;1861(8):715-722. doi:10.1016/j.bbalip.2016.04.018
139. Gomez-Navarro N, Miller EA. COP-coated vesicles. *Curr Biol.* 2016;26(2):R54-R57. doi:10.1016/j.cub.2015.12.017

140. Kazemisabet F, Bahrami A, Ghosh R, Różycki B, Bahrami AH. Molecular mechanisms and energetics of lipid droplet formation and directional budding. *Soft Matter*. 2024;20(4):909-922. doi:10.1039/D3SM01438J
141. Klug YA, Ferreira JV, Carvalho P. A unifying mechanism for seipin-mediated lipid droplet formation. *FEBS Lett*. 2024;598(10):1116-1126. doi:10.1002/1873-3468.14825
142. Graff J, Schneider R. FIT2 proteins and lipid droplet emergence, an interplay between phospholipid synthesis, surface tension, and membrane curvature. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1422032. doi:10.3389/fcell.2024.1422032
143. Molotkovsky RJ. Energy Barrier of a Monolayer Stalk Formation during Lipid Droplet Fusion. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol*. 2024;18(1):22-30. doi:10.1134/S199074782470003X
144. Wang S, Idrissi FZ, Hermansson M, Grippa A, Ejlsing CS, Carvalho P. Seipin and the membrane-shaping protein Pex30 cooperate in organelle budding from the endoplasmic reticulum. *Nat Commun*. 2018;9(1):2939. doi:10.1038/s41467-018-05278-2
145. Salo VT, Belevich I, Li S, et al. Seipin regulates ER –lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J*. 2016;35(24):2699-2716. doi:10.15252/embj.201695170
146. House M, Khadayat K, Trybala TN, et al. Phosphatidic acid drives spatiotemporal distribution of Pex30 at ER-LD contact sites. *J Cell Biol*. 2025;224(7):e202405162. doi:10.1083/jcb.202405162
147. Pagac M, Cooper DE, Qi Y, et al. SEIPIN Regulates Lipid Droplet Expansion and Adipocyte Development by Modulating the Activity of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase. *Cell Rep*. 2016;17(6):1546-1559. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.037
148. Zadoorian A, Du X, Yang H. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2023;19(8):443-459. doi:10.1038/s41574-023-00845-0
149. Walther TC, Chung J, Farese RV. Lipid Droplet Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2017;33(1):491-510. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060608
150. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):137-155. doi:10.1038/s41580-018-0085-z
151. Olarte MJ, Swanson MJ, Walther TC, Farese RV. The CYTOLD and ERTOLD pathways for lipid droplet–protein targeting. *Trends Biochem Sci*. 2022;47(1):39-51. doi:10.1016/j.tibs.2021.08.007
152. Fujimoto T. Nuclear lipid droplets – how are they different from their cytoplasmic siblings? *J Cell Sci*. 2022;135(5):jcs259253. doi:10.1242/jcs.259253
153. Sołtysik K, Ohsaki Y, Tatematsu T, et al. Nuclear lipid droplets form in the inner nuclear membrane in a seipin-independent manner. *J Cell Biol*. 2021;220(1):e202005026. doi:10.1083/jcb.202005026
154. Sołtysik K, Ohsaki Y, Tatematsu T, Cheng J, Fujimoto T. Nuclear lipid droplets derive from a lipoprotein precursor and regulate phosphatidylcholine synthesis. *Nat Commun*. 2019;10(1):473. doi:10.1038/s41467-019-08411-x
155. Henne M, Goodman JM, Hariri H. Spatial compartmentalization of lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865(1):158499. doi:10.1016/j.bbalip.2019.07.008
156. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular Trafficking and Secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1079-1086. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241471
157. Sołtysik K, Ohsaki Y, Fujimoto T. Duo in a Mystical Realm—Nuclear Lipid Droplets and the Inner Nuclear Membrane. *Contact*. 2019;2:2515256419896965. doi:10.1177/2515256419896965
158. Nguyen TB, Louie SM, Daniele JR, et al. DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. *Dev Cell*. 2017;42(1):9-21.e5. doi:10.1016/j.devcel.2017.06.003

159. Velázquez AP, Tatsuta T, Ghillebert R, Drescher I, Graef M. Lipid droplet-mediated ER homeostasis regulates autophagy and cell survival during starvation. *J Cell Biol.* 2016;212(6):621-631. doi:10.1083/jcb.201508102
160. Darling NJ, Cook SJ. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2014;1843(10):2150-2163. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.009
161. Herms A, Bosch M, Reddy BJN, et al. AMPK activation promotes lipid droplet dispersion on detyrosinated microtubules to increase mitochondrial fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015;6(1):7176. doi:10.1038/ncomms8176
162. Volmer R, Van Der Ploeg K, Ron D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(12):4628-4633. doi:10.1073/pnas.1217611110
163. Moldavski O, Amen T, Levin-Zaidman S, et al. Lipid Droplets Are Essential for Efficient Clearance of Cytosolic Inclusion Bodies. *Dev Cell.* 2015;33(5):603-610. doi:10.1016/j.devcel.2015.04.015
164. Cortini M, Ilieva E, Massari S, Bettini G, Avnet S, Baldini N. Uncovering the protective role of lipid droplet accumulation against acid-induced oxidative stress and cell death in osteosarcoma. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2025;1871(2):167576. doi:10.1016/j.bbadis.2024.167576
165. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(3):419-425. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086
166. Obaseki E, Adebayo D, Bandyopadhyay S, Hariri H. Lipid droplets and fatty acid-induced lipotoxicity: in a nutshell. *FEBS Lett.* 2024;598(10):1207-1214. doi:10.1002/1873-3468.14808
167. Lee J, Shin D, Roh JL. Lipid metabolism alterations and ferroptosis in cancer: Paving the way for solving cancer resistance. *Eur J Pharmacol.* 2023;941:175497. doi:10.1016/j.ejphar.2023.175497
168. Corbet C, Bastien E, Santiago De Jesus JP, et al. TGFβ2-induced formation of lipid droplets supports acidosis-driven EMT and the metastatic spreading of cancer cells. *Nat Commun.* 2020;11(1):454. doi:10.1038/s41467-019-14262-3
169. Kelly Osayi Otakhor, Elizabeth O. Soladoye. Lipid droplets in cancer: A review of their implications for tumor biology and treatment. *World J Adv Res Rev.* 2024;23(1):520-529. doi:10.30574/wjarr.2024.23.1.2037
170. Ying M, You D, Zhu X, Cai L, Zeng S, Hu X. Lactate and glutamine support NADPH generation in cancer cells under glucose deprived conditions. *Redox Biol.* 2021;46:102065. doi:10.1016/j.redox.2021.102065
171. Luo W, Wang H, Ren L, et al. Adding fuel to the fire: The lipid droplet and its associated proteins in cancer progression. *Int J Biol Sci.* 2022;18(16):6020-6034. doi:10.7150/ijbs.74902
172. Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, et al. Lipid Bodies Are Reservoirs of Cyclooxygenase-2 and Sites of Prostaglandin-E2 Synthesis in Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 2008;68(6):1732-1740. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1999
173. Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1):55-64. doi:10.1038/nrc3844
174. Qiu B, Ackerman D, Sanchez DJ, et al. HIF2α-Dependent Lipid Storage Promotes Endoplasmic Reticulum Homeostasis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Discov.* 2015;5(6):652-667. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1507
175. Becuwe M, Bond LM, Pinto AFM, et al. FIT2 is an acyl-coenzyme A diphosphatase crucial for endoplasmic reticulum homeostasis. *J Cell Biol.* 2020;219(10):e202006111. doi:10.1083/jcb.202006111

176. Kumar A, Yadav S, Choudhary V. The evolving landscape of ER-LD contact sites. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1483902. doi:10.3389/fcell.2024.1483902
177. Malis Y, Armoza-Eilat S, Nevo-Yassaf I, Dukhovny A, Sklan EH, Hirschberg K. Rab1b facilitates lipid droplet growth by ER-to-lipid droplet targeting of DGAT2. *Sci Adv.* 2024;10(22):eade7753. doi:10.1126/sciadv.ade7753
178. Chung J, Wu X, Lambert TJ, Lai ZW, Walther TC, Farese RV. LDAF1 and Seipin Form a Lipid Droplet Assembly Complex. *Dev Cell.* 2019;51(5):551-563.e7. doi:10.1016/j.devcel.2019.10.006
179. Kory N, Farese RV, Walther TC. Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol.* 2016;26(7):535-546. doi:10.1016/j.tcb.2016.02.007
180. Dhiman R, Caesar S, Thiam AR, Schrul B. Mechanisms of protein targeting to lipid droplets: A unified cell biological and biophysical perspective. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;108:4-13. doi:10.1016/j.semcdb.2020.03.004
181. Wilfling F, Wang H, Haas JT, et al. Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Dev Cell.* 2013;24(4):384-399. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.013
182. Čopič A, Antoine-Bally S, Giménez-Andrés M, et al. A giant amphipathic helix from a perilipin that is adapted for coating lipid droplets. *Nat Commun.* 2018;9(1):1332. doi:10.1038/s41467-018-03717-8
183. Markgraf DF, Klemm RW, Junker M, Hannibal-Bach HK, Ejsing CS, Rapoport TA. An ER Protein Functionally Couples Neutral Lipid Metabolism on Lipid Droplets to Membrane Lipid Synthesis in the ER. *Cell Rep.* 2014;6(1):44-55. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.046
184. Xu N, Zhang SO, Cole RA, et al. The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J Cell Biol.* 2012;198(5):895-911. doi:10.1083/jcb.201201139
185. Xu D, Li Y, Wu L, et al. Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J Cell Biol.* 2018;217(3):975-995. doi:10.1083/jcb.201704184
186. Romanauska A, Stankunas E, Schuldiner M, Köhler A. Seipin governs phosphatidic acid homeostasis at the inner nuclear membrane. *Nat Commun.* 2024;15(1):10486. doi:10.1038/s41467-024-54811-z
187. Gallardo-Montejano VI, Saxena G, Kusminski CM, et al. Nuclear Perilipin 5 integrates lipid droplet lipolysis with PGC-1 α /SIRT1-dependent transcriptional regulation of mitochondrial function. *Nat Commun.* 2016;7(1):12723. doi:10.1038/ncomms12723
188. Wu L, Zhou L, Chen C, et al. Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue. *Sci China Life Sci.* 2014;57(1):107-116. doi:10.1007/s11427-013-4585-y
189. Wu L, Xu D, Zhou L, et al. Rab8a-AS160-MSS4 Regulatory Circuit Controls Lipid Droplet Fusion and Growth. *Dev Cell.* 2014;30(4):378-393. doi:10.1016/j.devcel.2014.07.005
190. Qian H, Chen Y, Nian Z, et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEC regulates fat-induced lipid storage. *J Clin Invest.* 2017;127(4):1353-1369. doi:10.1172/JCI85963
191. Lohmann D, Spandl J, Stevanovic A, Schoene M, Philippou-Massier J, Thiele C. Monoubiquitination of Ancient Ubiquitous Protein 1 Promotes Lipid Droplet Clustering. Yang H, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e72453. doi:10.1371/journal.pone.0072453
192. Ye Z, Hu C, Wang J, et al. Burst of hopping trafficking correlated reversible dynamic interactions between lipid droplets and mitochondria under starvation. *Exploration.* 2023;3(5):20230002. doi:10.1002/EXP.20230002

193. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty Acid Trafficking in Starved Cells: Regulation by Lipid Droplet Lipolysis, Autophagy, and Mitochondrial Fusion Dynamics. *Dev Cell*. 2015;32(6):678-692. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.029
194. Smolková K, Gotvaldová K. Fatty Acid Trafficking Between Lipid Droplets and Mitochondria: An Emerging Perspective. *Int J Biol Sci*. 2025;21(5):1863-1873. doi:10.7150/ijbs.105361
195. Eckhardt M. Molecular Interactions at Lipid Droplet–Mitochondria Membrane Contact Sites in Mammalian Cells. *Lipidology*. 2025;2(3):16. doi:10.3390/lipidology2030016
196. Austin RC. The Unfolded Protein Response in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2279-2287. doi:10.1089/ars.2009.2686
197. Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):352. doi:10.1038/s41392-023-01570-w
198. Volmer R, Ron D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:67-73. doi:10.1016/j.ceb.2014.12.002
199. Chitraju C, Mejhert N, Haas JT, et al. Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis. *Cell Metab*. 2017;26(2):407-418.e3. doi:10.1016/j.cmet.2017.07.012
200. Han J, Kaufman RJ. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res*. 2016;57(8):1329-1338. doi:10.1194/jlr.R067595
201. Pon LA. Lipid droplet autophagy during energy mobilization lipid homeostasis and protein quality control. *Front Biosci*. 2018;23(8):1552-1563. doi:10.2741/4660
202. Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:655731. doi:10.3389/fcell.2021.655731
203. Nguyen TB, Olzmann JA. Lipid droplets and lipotoxicity during autophagy. *Autophagy*. 2017;13(11):2002-2003. doi:10.1080/15548627.2017.1359451
204. Jusović M, Starič P, Jarc Jovičić E, Petan T. The Combined Inhibition of Autophagy and Diacylglycerol Acyltransferase-Mediated Lipid Droplet Biogenesis Induces Cancer Cell Death during Acute Amino Acid Starvation. *Cancers*. 2023;15(19):4857. doi:10.3390/cancers15194857
205. Kumar R, Islinger M, Worthy H, Carmichael R, Schrader M. The peroxisome: an update on mysteries 3.0. *Histochem Cell Biol*. 2024;161(2):99-132. doi:10.1007/s00418-023-02259-5
206. Joshi AS, Cohen S. Lipid Droplet and Peroxisome Biogenesis: Do They Go Hand-in-Hand? *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:92. doi:10.3389/fcell.2019.00092
207. Sugiura A, Mattie S, Prudent J, McBride HM. Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature*. 2017;542(7640):251-254. doi:10.1038/nature21375
208. Papsdorf K, Miklas JW, Hosseini A, et al. Lipid droplets and peroxisomes are co-regulated to drive lifespan extension in response to mono-unsaturated fatty acids. *Nat Cell Biol*. 2023;25(5):672-684. doi:10.1038/s41556-023-01136-6
209. Joshi AS, Cohen S. Lipid Droplet and Peroxisome Biogenesis: Do They Go Hand-in-Hand? *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:92. doi:10.3389/fcell.2019.00092
210. Choudhary V, Schneider R. Lipid droplet biogenesis from specialized ER subdomains. *Microb Cell*. 2020;7(8):218-221. doi:10.15698/mic2020.08.727
211. Coleman R. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*. 2004;43(2):134-176. doi:10.1016/S0163-7827(03)00051-1
212. Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F, Schneider R. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*. 2011;124(14):2424-2437. doi:10.1242/jcs.076836

213. Bhatt-Wessel B, Jordan TW, Miller JH, Peng L. Role of DGAT enzymes in triacylglycerol metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 2018;655:1-11. doi:10.1016/j.abb.2018.08.001
214. Wilfling F, Wang H, Haas JT, et al. Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Dev Cell*. 2013;24(4):384-399. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.013
215. Renne MF, Hariri H. Lipid Droplet-Organelle Contact Sites as Hubs for Fatty Acid Metabolism, Trafficking, and Metabolic Channeling. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:726261. doi:10.3389/fcell.2021.726261
216. Santinho A, Salo VT, Chorlay A, et al. Membrane Curvature Catalyzes Lipid Droplet Assembly. *Curr Biol*. 2020;30(13):2481-2494.e6. doi:10.1016/j.cub.2020.04.066
217. Roberts MA, Segura-Roman A, Olzmann JA. Organelle Biogenesis: ER Shape Influences Lipid Droplet Nucleation. *Curr Biol*. 2020;30(13):R770-R773. doi:10.1016/j.cub.2020.05.027
218. Cartwright BR, Binns DD, Hilton CL, Han S, Gao Q, Goodman JM. Seipin performs dissectible functions in promoting lipid droplet biogenesis and regulating droplet morphology. Parton RG, ed. *Mol Biol Cell*. 2015;26(4):726-739. doi:10.1091/mbc.E14-08-1303
219. Bombarda-Rocha V, Silva D, Badr-Eddine A, Nogueira P, Gonçalves J, Fresco P. Challenges in Pharmacological Intervention in Perilipins (PLINs) to Modulate Lipid Droplet Dynamics in Obesity and Cancer. *Cancers*. 2023;15(15):4013. doi:10.3390/cancers15154013
220. Zhang X, Su L, Sun K. Expression status and prognostic value of the perilipin family of genes in breast cancer. Published online 2021.
221. Lamprou I, Tsolou A, Kakouratos C, et al. Suppressed PLIN3 frequently occurs in prostate cancer, promoting docetaxel resistance via intensified autophagy, an event reversed by chloroquine. *Med Oncol*. 2021;38(10):116. doi:10.1007/s12032-021-01566-y
222. Sirois I, Aguilar-Mahecha A, Lafleur J, et al. A Unique Morphological Phenotype in Chemoresistant Triple-Negative Breast Cancer Reveals Metabolic Reprogramming and PLIN4 Expression as a Molecular Vulnerability. *Mol Cancer Res*. 2019;17(12):2492-2507. doi:10.1158/1541-7786.MCR-19-0264
223. Deng B, Kong W, Shen X, et al. The role of DGAT1 and DGAT2 in regulating tumor cell growth and their potential clinical implications. *J Transl Med*. 2024;22(1):290. doi:10.1186/s12967-024-05084-z
224. Walther TC, Kim S, Arlt H, Voth GA, Farese RV. Structure and function of lipid droplet assembly complexes. *Curr Opin Struct Biol*. 2023;80:102606. doi:10.1016/j.sbi.2023.102606
225. Graff J, Schneider R. FIT2 proteins and lipid droplet emergence, an interplay between phospholipid synthesis, surface tension, and membrane curvature. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1422032. doi:10.3389/fcell.2024.1422032
226. Chen F, Yin Y, Chua BT, Li P. CIDE family proteins control lipid homeostasis and the development of metabolic diseases. *Traffic*. 2020;21(1):94-105. doi:10.1111/tra.12717
227. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*. 2006;3(5):309-319. doi:10.1016/j.cmet.2006.03.005
228. Gunes S, Hekim N, Ergun S, Alkan EN, Can C. Histone and Non-histone Reversible Acetylation in Development, Aging, and Disease. In: Halasa M, Wawruszak A, eds. *Histone and Non-Histone Reversible Acetylation in Development, Aging and Disease*. Springer Nature Switzerland; 2025:3-24. doi:10.1007/978-3-031-91459-1_1
229. Narita T, Weinert BT, Choudhary C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):156-174. doi:10.1038/s41580-018-0081-3

230. Tiepolo L, Fraccaro M, Lindsten J. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS* BY V. G. ALLFREY, R. FAULKNER, AND A. E. MIRSKY.
231. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
232. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science.* 2009;325(5942):834-840. doi:10.1126/science.1175371
233. Weinert BT, Narita T, Satpathy S, et al. Time-Resolved Analysis Reveals Rapid Dynamics and Broad Scope of the CBP/p300 Acetylome. *Cell.* 2018;174(1):231-244.e12. doi:10.1016/j.cell.2018.04.033
234. Li P, Ge J, Li H. Lysine acetyltransferases and lysine deacetylases as targets for cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(2):96-115. doi:10.1038/s41569-019-0235-9
235. Izzo LT, Trefely S, Demetriadou C, et al. Acetylcarnitine shuttling links mitochondrial metabolism to histone acetylation and lipogenesis. *Sci Adv.* 2023;9(18):eadf0115. doi:10.1126/sciadv.adf0115
236. Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska-Łata J, Gul-Hinc S, Ronowska A, Szutowicz A. Metabolic and Cellular Compartments of Acetyl-CoA in the Healthy and Diseased Brain. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17):10073. doi:10.3390/ijms231710073
237. Ewida H, Benson H, Tareq S, Ahmed MS. Molecular Targets and Small Molecules Modulating Acetyl Coenzyme A in Physiology and Diseases. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2025;8(1):36-46. doi:10.1021/acsptsci.4c00476
238. Sivanand S, Viney I, Wellen KE. Spatiotemporal Control of Acetyl-CoA Metabolism in Chromatin Regulation. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(1):61-74. doi:10.1016/j.tibs.2017.11.004
239. Chow JDY, Lawrence RT, Healy ME, et al. Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. *Mol Metab.* 2014;3(4):419-431. doi:10.1016/j.molmet.2014.02.004
240. Yang XJ, Razavi A. Lysine Acetyltransferase 6A and Its Paralog: From Biological Functions to Neurodevelopmental Disorders, Cancer and New Therapeutics. In: Glazzard J, ed. *Understanding Developmental Disorders*. IntechOpen; 2025. doi:10.5772/intechopen.1009241
241. Dent SYR. KAT tales: Functions of Gcn5 and PCAF lysine acetyltransferases in SAGA and ATAC. *J Biol Chem.* 2024;300(10):107744. doi:10.1016/j.jbc.2024.107744
242. Zhou MM, Cole PA. Targeting lysine acetylation readers and writers. *Nat Rev Drug Discov.* 2025;24(2):112-133. doi:10.1038/s41573-024-01080-6
243. Iuzzolino A, Pellegrini FR, Rotili D, Degrassi F, Trisciuglio D. The α -tubulin acetyltransferase ATAT1: structure, cellular functions, and its emerging role in human diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2024;81(1):193. doi:10.1007/s00018-024-05227-x
244. Curcio A, Rocca R, Alcaro S, Artese A. The Histone Deacetylase Family: Structural Features and Application of Combined Computational Methods. *Pharmaceuticals.* 2024;17(5):620. doi:10.3390/ph17050620
245. Brancolini C. Class IIa HDACs Are Important Signal Transducers with Unclear Enzymatic Activities. *Biomolecules.* 2025;15(8):1061. doi:10.3390/biom15081061
246. Reed S, Quelle D. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers.* 2014;7(1):30-69. doi:10.3390/cancers7010030
247. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature.* 2012;489(7415):313-317. doi:10.1038/nature11316

248. Sun M, Yang B, Xin G, et al. TIP60 acetylation of Bub1 regulates centromeric H2AT120 phosphorylation for faithful chromosome segregation. *Sci China Life Sci.* 2024;67(9):1957-1969. doi:10.1007/s11427-023-2604-8
249. Mishra N, Soni A, Kumari M, Singh G, Sharma SK, Singh SK. Targeting cell cycle regulators: A new paradigm in cancer therapeutics. *BIOCELL.* 2024;48(12):1639-1666. doi:10.32604/biocell.2024.056503
250. Miao Y, Zhang N, Li F, et al. Histone Acetyltransferase MOF-Mediated AURKB K215 Acetylation Drives Breast Cancer Cell Proliferation via c-MYC Stabilization. *Cells.* 2025;14(14):1100. doi:10.3390/cells14141100
251. Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Mol Cell.* 2006;24(6):827-839. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.021
252. Jacquet K, Fradet-Turcotte A, Avvakumov N, et al. The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation. *Mol Cell.* 2016;62(3):409-421. doi:10.1016/j.molcel.2016.03.031
253. Tsaridou S, Velimezi G, Willenbrock F, et al. 53BP1 -mediated recruitment of RASSF1A to ribosomal DNA breaks promotes local ATM signaling. *EMBO Rep.* 2022;23(8):e54483. doi:10.15252/embr.202154483
254. Li S, Shi B, Liu X, An HX. Acetylation and Deacetylation of DNA Repair Proteins in Cancers. *Front Oncol.* 2020;10:573502. doi:10.3389/fonc.2020.573502
255. Hopkins BD, Hodakoski C, Barrows D, Mense SM, Parsons RE. PTEN function: the long and the short of it. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(4):183-190. doi:10.1016/j.tibs.2014.02.006
256. Wang C, Ma X. The role of acetylation and deacetylation in cancer metabolism. *Clin Transl Med.* 2025;15(1):e70145. doi:10.1002/ctm2.70145
257. Ragupathi A, Kim C, Jacinto E. The mTORC2 signaling network: targets and cross-talks. *Biochem J.* 2024;481(2):45-91. doi:10.1042/BCJ20220325
258. Ahn B, Chen W, Shi W, Shrestha R, Hu F, Lin H. Deacetylation of HSC70 by SIRT2 promotes chaperone mediated autophagy. *Autophagy Rep.* 2025;4(1):2580781. doi:10.1080/27694127.2025.2580781
259. Su CC, Desikan V, Betsch K, Shim MS, Keller KE, Liton PB. Tubulin Acetylation Enhances Microtubule Stability in Trabecular Meshwork Cells Under Mechanical Stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2025;66(1):43. doi:10.1167/iovs.66.1.43
260. Kabir F, Atkinson R, Cook AL, Phipps AJ, King AE. The role of altered protein acetylation in neurodegenerative disease. *Front Aging Neurosci.* 2023;14:1025473. doi:10.3389/fnagi.2022.1025473
261. Pavanello L, Hall M, Winkler GS. Regulation of eukaryotic mRNA deadenylation and degradation by the Ccr4-Not complex. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1153624. doi:10.3389/fcell.2023.1153624
262. Lin SY, Li TY, Liu Q, et al. GSK3-TIP60-ULK1 Signaling Pathway Links Growth Factor Deprivation to Autophagy. *Science.* 2012;336(6080):477-481. doi:10.1126/science.1217032
263. Wan W, You Z, Xu Y, et al. mTORC1 Phosphorylates Acetyltransferase p300 to Regulate Autophagy and Lipogenesis. *Mol Cell.* 2017;68(2):323-335.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.09.020
264. Huang L, Guo H. Acetylation modification in the regulation of macroautophagy. *Adv Biotechnol.* 2024;2(2):19. doi:10.1007/s44307-024-00027-7
265. Geng Y, Luo H, Gao F. AIPred: comprehensive prediction and analysis of non-histone acetylation via protein language model and interpretable machine learning. *BMC Biol.* 2025;23(1):311. doi:10.1186/s12915-025-02418-1

266. El-Kurjieh A, Al-Arab R, Hachem QA, Ibrahim JN, Kobeissy PH. ACSS2 and metabolic diseases: from lipid metabolism to therapeutic target. *Lipids Health Dis.* 2025;24(1):74. doi:10.1186/s12944-025-02491-z
267. Wu F, Muskat NH, Dvilansky I, et al. Acetylation-dependent coupling between G6PD activity and apoptotic signaling. *Nat Commun.* 2023;14(1):6208. doi:10.1038/s41467-023-41895-2
268. Voit R, Seiler J, Grummt I. Cooperative Action of Cdk1/cyclin B and SIRT1 Is Required for Mitotic Repression of rRNA Synthesis. Ott M, ed. *PLOS Genet.* 2015;11(5):e1005246. doi:10.1371/journal.pgen.1005246
269. Nihira NT, Ogura K, Shimizu K, et al. Acetylation-dependent regulation of MDM2 E3 ligase activity dictates its oncogenic function. *Sci Signal.* 2017;10(466):eaai8026. doi:10.1126/scisignal.aai8026
270. Wang L, Yang X, Zhao K, et al. MOF-mediated acetylation of UHRF1 enhances UHRF1 E3 ligase activity to facilitate DNA methylation maintenance. *Cell Rep.* 2024;43(3):113908. doi:10.1016/j.celrep.2024.113908
271. Pan Z, Zhao Y, Wang X, et al. Targeting bromodomain-containing proteins: research advances of drug discovery. *Mol Biomed.* 2023;4(1):13. doi:10.1186/s43556-023-00127-1
272. Paz JC, Park S, Phillips N, et al. Combinatorial regulation of a signal-dependent activator by phosphorylation and acetylation. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(48):17116-17121. doi:10.1073/pnas.1420389111
273. Wang D, Kon N, Lasso G, et al. Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. *Nature.* 2016;538(7623):118-122. doi:10.1038/nature19759
274. Baltus GA, Kowalski MP, Zhai H, et al. Acetylation of Sox2 Induces its Nuclear Export in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 2009;27(9):2175-2184. doi:10.1002/stem.168
275. Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I. Acetylation Regulates Transcription Factor Activity at Multiple Levels. *Mol Cell.* 2000;5(4):745-751. doi:10.1016/S1097-2765(00)80253-1
276. Bonaldi T. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 2003;22(20):5551-5560. doi:10.1093/emboj/cdg516
277. Vikram A, Lewarchik CM, Yoon JY, et al. Sirtuin 1 regulates cardiac electrical activity by deacetylating the cardiac sodium channel. *Nat Med.* 2017;23(3):361-367. doi:10.1038/nm.4284
278. Prill M, Sardão VA, Sobczak M, Nowis D, Szymanski J, Wieckowski MR. p66Shc Protein—Oxidative Stress Sensor or Redox Enzyme: Its Potential Role in Mitochondrial Metabolism of Human Breast Cancer. *Cancers.* 2024;16(19):3324. doi:10.3390/cancers16193324
279. Xia Z, Kon N, Gu AP, Tavana O, Gu W. Deciphering the acetylation code of p53 in transcription regulation and tumor suppression. *Oncogene.* 2022;41(22):3039-3050. doi:10.1038/s41388-022-02331-9
280. Taha MS, Ahmadian MR. Nucleophosmin: A Nucleolar Phosphoprotein Orchestrating Cellular Stress Responses. *Cells.* 2024;13(15):1266. doi:10.3390/cells13151266
281. Box JK, Paquet N, Adams MN, et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol.* 2016;17(1):19. doi:10.1186/s12867-016-0073-9
282. Cela I, Di Matteo A, Federici L. Nucleophosmin in Its Interaction with Ligands. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):4885. doi:10.3390/ijms21144885
283. Okuwaki M, Ozawa SI, Ebine S, et al. The stability of NPM1 oligomers regulated by acidic disordered regions controls the quality of liquid droplets. *J Biochem (Tokyo).* 2023;174(5):461-476. doi:10.1093/jb/mvad061

284. Saluri M, Leppert A, Gese GV, et al. A “grappling hook” interaction connects self-assembly and chaperone activity of Nucleophosmin 1. Li B, ed. *PNAS Nexus*. 2023;2(2):pgac303. doi:10.1093/pnasnexus/pgac303
285. Maiguel DA, Jones L, Chakravarty D, Yang C, Carrier F. Nucleophosmin Sets a Threshold for p53 Response to UV Radiation. *Mol Cell Biol*. 2004;24(9):3703-3711. doi:10.1128/MCB.24.9.3703-3711.2004
286. Gibbs E, Perrone B, Hassan A, Kümmerle R, Kriwacki R. NPM1 exhibits structural and dynamic heterogeneity upon phase separation with the p14ARF tumor suppressor. *J Magn Reson*. 2020;310:106646. doi:10.1016/j.jmr.2019.106646
287. Chen T, Chen H, Xia M, et al. In-depth inference of transcriptional regulatory networks reveals NPM1 as a therapeutic ribosomal regulator in MYC-amplified medulloblastoma. *Npj Precis Oncol*. 2025;9(1):10. doi:10.1038/s41698-024-00792-7
288. Van Maerken T, Vandesompele J, Rihani A, De Paepe A, Speleman F. Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14ARF-MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ*. 2009;16(12):1563-1572. doi:10.1038/cdd.2009.138
289. Mitrea DM, Cika JA, Guy CS, et al. Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA. *eLife*. 2016;5:e13571. doi:10.7554/eLife.13571
290. Nagarajan L, ed. *Acute Myelogenous Leukemia: Genetics, Biology and Therapy*. Vol 145. Springer New York; 2010. doi:10.1007/978-0-387-69259-3
291. Uckelmann HJ, Haarer EL, Takeda R, et al. Mutant NPM1 Directly Regulates Oncogenic Transcription in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. 2023;13(3):746-765. doi:10.1158/2159-8290.CD-22-0366
292. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, Kundu TK. Acetylated NPM1 Localizes in the Nucleoplasm and Regulates Transcriptional Activation of Genes Implicated in Oral Cancer Manifestation. *Mol Cell Biol*. 2009;29(18):5115-5127. doi:10.1128/MCB.01969-08
293. Poletto M, Lirussi L, Wilson DM, Tell G. Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins. Matera AG, ed. *Mol Biol Cell*. 2014;25(10):1641-1652. doi:10.1091/mbc.e13-12-0717
294. Di Matteo A, Franceschini M, Chiarella S, Rocchio S, Travaglini-Allocatelli C, Federici L. Molecules that target nucleophosmin for cancer treatment: an update. *Oncotarget*. 2016;7(28):44821-44840. doi:10.18632/oncotarget.8599
295. Sekhar KR, Freeman ML. Nucleophosmin Plays a Role in Repairing DNA Damage and Is a Target for Cancer Treatment. *Cancer Res*. 2023;83(10):1573-1580. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-3631
296. Sounni NE, Cimino J, Blacher S, et al. Blocking Lipid Synthesis Overcomes Tumor Regrowth and Metastasis after Antiangiogenic Therapy Withdrawal. *Cell Metab*. 2014;20(2):280-294. doi:10.1016/j.cmet.2014.05.022
297. Luis G, Godfroid A, Nishiumi S, et al. Tumor resistance to ferroptosis driven by Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) in cancer cells and Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP4) in tumor microenvironment promote tumor recurrence. *Redox Biol*. 2021;43:102006. doi:10.1016/j.redox.2021.102006
298. Pottier C, Montero-Ruiz L, Jehay R, et al. Targeting ferroptosis resistance resensitizes metastatic HR⁺ HER2⁻ breast cancer cells to palbociclib-hormone therapy. *Cancer Commun*. 2025;45(4):460-464. doi:10.1002/cac2.12646
299. Finley LWS. What is cancer metabolism? *Cell*. 2023;186(8):1670-1688. doi:10.1016/j.cell.2023.01.038
300. Corbet C, Pinto A, Martherus R, Santiago de Jesus JP, Polet F, Feron O. Acidosis Drives the Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Cancer Cells through Changes in

- Mitochondrial and Histone Acetylation. *Cell Metab.* 2016;24(2):311-323. doi:10.1016/j.cmet.2016.07.003
301. Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J Mol Med.* 2016;94(2). doi:10.1007/s00109-015-1307-x
 302. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 2012;279(15):2610-2623. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x
 303. Luis G, Godfroid A, Nishiumi S, et al. Tumor resistance to ferroptosis driven by Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) in cancer cells and Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP4) in tumor microenvironment promote tumor recurrence. *Redox Biol.* 2021;43:102006. doi:10.1016/j.redox.2021.102006
 304. Parton RG, Bosch M, Steiner B, Pol A. Novel contact sites between lipid droplets, early endosomes, and the endoplasmic reticulum. *J Lipid Res.* 2020;61(11):1364. doi:10.1194/jlr.ILR120000876
 305. Schnorr SL, Berry D. Lipid synthesis at the trophic base as the source for energy management to build complex structures. *Curr Opin Biotechnol.* 2022;73:364-373. doi:10.1016/j.copbio.2021.09.014
 306. Bacci M, Lorito N, Smiriglia A, Morandi A. Fat and Furious: Lipid Metabolism in Antitumoral Therapy Response and Resistance. *Trends Cancer.* 2021;7(3). doi:10.1016/j.trecan.2020.10.004
 307. Ippolito L, Comito G, Parri M, et al. Lactate Rewires Lipid Metabolism and Sustains a Metabolic–Epigenetic Axis in Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2022;82(7):1267-1282. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-0914
 308. Shi L, Tu BP. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;33:125-131. doi:10.1016/j.ceb.2015.02.003
 309. Egger AS, Rauch E, Sharma S, et al. Linking metabolism and histone acetylation dynamics by integrated metabolic flux analysis of Acetyl-CoA and histone acetylation sites. *Mol Metab.* 2024;90:102032. doi:10.1016/j.molmet.2024.102032
 310. Guertin DA, Wellen KE. Acetyl-CoA metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2023;23(3):156-172. doi:10.1038/s41568-022-00543-5
 311. Scaglia N, Chisholm JW, Igal RA. Inhibition of StearoylCoA Desaturase-1 Inactivates Acetyl-CoA Carboxylase and Impairs Proliferation in Cancer Cells: Role of AMPK. Bonini M, ed. *PLoS ONE.* 2009;4(8):e6812. doi:10.1371/journal.pone.0006812
 312. Dierge E, Feron O. Dealing with saturated and unsaturated fatty acid metabolism for anticancer therapy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2019;22(6). https://journals.lww.com/clinicalnutrition/fulltext/2019/11000/dealing_with_saturated_and_unsaturated_fatty_acid.6.aspx
 313. Ånensen N, Hjelle SM, Van Belle W, et al. Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. *Oncogene.* 2012;31(12). doi:10.1038/onc.2011.348
 314. McClure JJ, Li X, Chou CJ. Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. In: *Advances in Cancer Research.* Vol 138. 2018. doi:10.1016/bs.acr.2018.02.006
 315. Blumenschein Jr. GR, Kies MS, Papadimitrakopoulou VA, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Invest New Drugs.* 2008;26(1):81-87. doi:10.1007/s10637-007-9075-2

Résumé

Les lipides sont essentiels pour l'homéostasie cellulaire et la résistance aux stress. Les gouttelettes lipidiques (LD) sont des organites essentiels dans ce métabolisme, servant de stockage pour prévenir la lipotoxicité et le stress oxydatif. Notre étude examine les rôles de PLIN2 et SCD1, deux protéines influencées par l'hypoxie, dans le métabolisme des lipides et l'acétylation des protéines dans les cellules cancéreuses.

En utilisant des lignées cellulaires PLIN2-KO et SCD1-KO, nous avons observé que la déplétion de ces protéines réduit significativement l'accumulation des LD, la migration et la prolifération in vitro ainsi que la croissance tumorale in vivo. L'augmentation de l'expression de PLIN2 et SCD1 sous hypoxie a été confirmée, avec une expression de SCD1 restant élevée après réoxygénation. Des investigations supplémentaires ont révélé une régulation réciproque entre PLIN2 et SCD1 et suggèrent une interaction potentielle. Notre analyse de l'acétylome a montré des effets opposés de PLIN2 et SCD1 sur l'acétylation des protéines non-histones. PLIN2 favorise l'acétylation tandis que SCD1 favorise la désacétylation, affectant notamment NPM1. L'acétylation de NPM1 influence sa stabilisation et sa localisation cellulaire. Nous avons cherché à comprendre le mécanisme par lequel SCD1 peut influencer l'état d'acétylation de ses cibles. SCD1 pourrait agir de manière relativement directe pour promouvoir la désacétylation de NPM1, potentiellement via une association avec l'HDAC2. Cette hypothèse est soutenue par des co-immunoprécipitations et une forte corrélation de SCD1 avec NPM1 et l'HDAC2, suggérant la formation d'un complexe SCD1-HDAC2-cible. L'utilisation du vorinostat, un inhibiteur de désacétylase, en combinaison avec l'inhibition de SCD1 résulte en une efficacité plus importante que les traitements séparés, suggérant ainsi une opportunité thérapeutique à investiguer.

En résumé, nos résultats montrent que l'hypoxie influence le métabolisme des lipides par l'augmentation de l'expression de SCD1 et PLIN2, qui se présentent comme des facteurs clés de l'accumulation des gouttelettes lipidiques. Notre travail a également démontré un nouvel aspect impacté par SCD1 et PLIN2, correspondant à l'acétylation des protéines. Ces résultats ouvrent la porte à de nombreuses questions concernant les cibles, les mécanismes, les conséquences et les portées thérapeutiques de ce nouvel axe de régulation modulé par des acteurs du métabolisme des lipides.

Abstract

Recent research has increasingly focused on the role of lipid metabolism in cancer, particularly its impact on treatment resistance. Lipids are crucial for cellular homeostasis and proliferation, offering cancer cells advantages such as protection from stress, energy supply, and regulation of signaling pathways. Lipid droplets (LDs) are essential organelles in lipid metabolism, serving as storage and regulatory units to prevent lipotoxicity and oxidative stress. Our study investigates the roles of PLIN2 and SCD1, two proteins influenced by hypoxia, in lipid metabolism and protein acetylation in cancer cells.

Using PLIN2-KO and SCD1-KO cell lines, we observed that depletion of PLIN2 or SCD1 significantly reduces LD accumulation, migration, and proliferation in vitro, and tumor growth in vivo. Western Blot analysis confirmed increased expression of PLIN2 and SCD1 under hypoxia, with SCD1 expression remaining elevated post-reoxygenation. Further investigation revealed a reciprocal regulation between PLIN2 and SCD1 and suggest a potential interaction. Our acetylome analysis demonstrated opposing effects of PLIN2 and SCD1 on protein acetylation. PLIN2 promotes acetylation, while SCD1 favors deacetylation, affecting non-histone proteins such as NPM1. Notably, NPM1 acetylation influences its stabilization and cellular localization. We explored the mechanism behind the influence of SCD1 on NPM1 acetylation, identifying a potential interaction between SCD1 and HDAC2. Co-immunoprecipitation and correlation studies suggest a functional SCD1-HDAC2 complex, potentially guiding HDAC2 to its targets. Therapeutically, combining vorinostat, an HDAC inhibitor, with SCD1 inhibition showed enhanced efficacy in vitro and in vivo, indicating a promising treatment strategy.

In summary, hypoxia modulates lipid metabolism through increased expression of PLIN2 and SCD1, which regulate LD accumulation and protein acetylation. These findings highlight a novel regulatory axis with significant therapeutic potential, warranting further investigation into the mechanisms and clinical applications of targeting lipid metabolism in cancer.