



HAL
open science

Rôle de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives et son implication dans les effets anticancéreux de dérivés de la troglitazone

Marine Geoffroy

► **To cite this version:**

Marine Geoffroy. Rôle de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives et son implication dans les effets anticancéreux de dérivés de la troglitazone. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0056 . tel-01838631

HAL Id: tel-01838631

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01838631>

Submitted on 2 Sep 2019

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Marine GEOFFROY**

**Rôle de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires
triple-négatives et son implication dans les effets anticancéreux de
dérivés de la troglitazone**

Le 23 avril 2018

Membres du jury :

Rapporteurs : Madame Sandra CITI

Professeur, Université de Genève,
Département de Biologie Cellulaire
Citi Laboratory, Genève

Monsieur Mustapha CHERKAOUI MALKI

Professeur, Université de Bourgogne,
EA 7270 Bio-PeroxiL, Dijon

Examineurs : Madame Catherine-Laure TOMASETTO

Directrice de recherche,

UMR 7104 IGBMC, Illkirch

Monsieur Bernard NAMOUR

PU-PH, Hôpitaux de Brabois,

UMR 954 INSERM, Nancy

Madame Isabelle GRILLIER-VUISSOZ

Docteur, Université de Lorraine,

UMR 7039 CRAN CNRS, Nancy

Directrice de thèse

Madame Sandra KUNTZ

Docteur, Université de Lorraine,

UMR 7039 CRAN CNRS, Nancy

Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

« On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire. »

Marie Curie

C'est parfaitement ce que j'ai ressenti tout au long de cette thèse. Tellement de chose à faire encore, à découvrir et à explorer ! Une deuxième thèse ? Non ! Malheureusement, ceci est la fin d'un long chapitre de ma vie qui a été ponctué de passion, de joie, de pleurs et de beaucoup de doutes. C'est comme ce film qu'on a adoré, ces acteurs qu'on affectionne particulièrement et que l'on n'a pas envie de quitter en vain. Vous êtes les acteurs qui ont construit mon histoire et je tiens à tous vous remercier pour ces années enrichissantes.

Je tiens tout d'abord à remercier les personnes qui ont accepté de juger ce travail de thèse, Madame le Professeur **Sandra Citi** et Monsieur le Professeur **Mustapha Cherkaoui Malki**. J'exprime également ma gratitude à Madame le Docteur **Catherine-Laure Tomasetto** et à Monsieur le Professeur **Bernard Namour** pour vos conseils constructifs qui m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse. Merci à tous pour le temps que vous consacrez à ce manuscrit.

Je remercie **Didier Wolf** de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire depuis mon stage de Master 2.

Je remercie également **Philippe Becuwe** de m'avoir accueillie au sein de l'axe STICMO durant mon master et ma thèse.

Merci à vous, **Stéphane Flament**, pour vos conseils très précieux lors de mes présentations et votre grande aide pour la rédaction des articles scientifiques.

Je pense particulièrement à **Isabelle Grillier-Vuissoz** et à **Sandra Kuntz**, mes directrices de thèses qui m'ont soutenue pendant ces quatre années et qui m'ont transmis leur passion de la recherche. Je vous remercie de votre présence et de votre grande disponibilité. Merci pour tous vos conseils scientifiques et professionnels. Vous avez su me mettre en confiance et tirer

le meilleur de moi-même en me poussant toujours de l'avant. Je vous remercie pour toute la confiance que vous m'avez accordée. J'ai parfois été tiraillée entre vous deux quand l'une disait « blanc » alors que l'autre disait « noir », d'où votre surnom « le vieux couple ». Je souhaite à tout le monde d'avoir des directrices de thèse aussi humaines que vous.

La team « Claudette » ne serait pas au complet sans toi, **Alexandra Kleinclauss**, la meilleure technicienne du monde. Je te remercie de ta patience et de ta gentillesse extrême à mon arrivée et durant toutes ces années. Plus qu'un bureau de partagé, un projet de recherche mais aussi des rires et des conversations. Tu as toujours été à l'écoute et de bons conseils tant au niveau personnel que pour l'aspect technique. Merci vraiment pour tout Alexandra. Tu me manqueras c'est plus que certain !

Ma reconnaissance va également aux Docteurs **Sabine Mazerbourg**, **Amand Chesnel**, **Hélène Dumond**, **Stéphanie Grandemange** et **Nadège Touche** pour leurs remarques et conseils avisés lors de la pause-café et lors de mes présentations.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, secrétaire, personnel technique et étudiants pour votre sympathie et vos encouragements: **Catherine**, **Audrey**, **Claire**, **Charlène**, **Guillaume**, **Florian**, **Alexis**, **Marie**, **Elia**, **Maëlle**, **Vanessa** et à **Marine 2** alias « **Marinette** » qui je l'espère va poursuivre le projet. Toutes mes pensées vont vers toi **Martine...**

Je voudrais particulièrement te remercier, **Audrey**. Toi qui m'a accueillie dans ton bureau, qui a toujours été à l'écoute et qui a toujours su trouver les bons mots pour apaiser mon stress et mes moments de doutes.

J'exprime également mes remerciements aux personnes qui ont collaboré à ma thèse :

Au Professeur **Muriel Barberi-Heyob**, pour vos conseils, votre gentillesse, et votre accueil au sein de votre équipe.

Au Docteur **Michel Boisbrun** pour nos discussions constructives et votre grande disponibilité.

Au Professeur **Thierry Bastogne** et au Docteur **Levy Batista** pour le temps et les conseils que vous m'avez prodigués.

❖❖ **Mille mercis** ❖❖

A toute ma famille et plus particulièrement à mes parents et mes frères qui m'ont soutenue pendant toutes ces années de dur labeur. Merci d'avoir cru en moi quand moi-même je n'y croyais plus.

A tous mes amis pour votre présence et votre folie, et plus particulièrement à toi Sophie !

A ma belle-famille pour votre soutien si précieux.

A mon compagnon, pour ton amour, ta patience, ta gentillesse et pour tous !

AVANT-PROPOS

Un défi majeur en cancérologie est le traitement des tumeurs mammaires dites **triple-négatives** (ER-, PR-, HER2-). Elles sont le plus souvent résistantes aux traitements conventionnels et présentent un haut risque de récurrence. De plus, l'absence de cibles thérapeutiques ne permet pas le développement de thérapie spécifique pour ces dernières. 78% de ces tumeurs expriment faiblement la **claudine 1** et sont de très mauvais pronostic. Cette protéine des jonctions serrées est impliquée dans l'adhérence des cellules entre elles et pourrait jouer un rôle suppresseur de tumeur dans les cancers mammaires (revue Zhou *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, le laboratoire s'intéresse aux dérivés de la **troglitazone** (TGZ) qui montrent des effets anticancéreux prometteurs sur les tumeurs mammaires. Au sein du laboratoire, nous avons développé de nombreux dérivés de TGZ en collaboration avec une équipe de chimiste de l'UMR 7565 CNRS UL (Dr. Michel Boisbrun, équipe MoBAT). Ces composés, dont la **$\Delta 2$ -TGZ et l'AB186**, ont montré une activité antiproliférative accrue sur les cellules cancéreuses mammaires et une toxicité moindre sur des hépatocytes en culture primaire comparé au composé parent, la TGZ (Salamone *et al.*, 2012 ; Bordessa *et al.*, 2014). Le laboratoire a mis en évidence que la $\Delta 2$ -TGZ induit un **stress du réticulum endoplasmique** et une entrée en **apoptose** des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Colin-Cassin *et al.*, 2015). Dans le but de comprendre le mécanisme d'action de la $\Delta 2$ -TGZ, une analyse par puce à ADN réalisée sur des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 a révélé que le gène le plus exprimé après 12 heures de traitement est celui de la **claudine 1**.

A partir de cette piste intéressante, je suis partie de l'hypothèse que **la claudine 1 pourrait jouer un rôle crucial dans les effets anticancéreux de nos composés**. Pour cela, j'ai travaillé sur trois lignées cancéreuses mammaires qui expriment peu la claudine 1 : les cellules MCF-7 de sous-type « luminal A » et les cellules MDA-MB-231 et Hs578T de sous-type « triple-négatif ».

La première partie de ma thèse a consisté à **déterminer l'implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules « triple-négatives » « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T**. Ce travail a donné lieu à une publication acceptée (Geoffroy *et al.*, 2017).

La deuxième partie de ma thèse a porté sur l'étude **des mécanismes d'action de la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 à des temps précoces dans les cellules « claudin 1-low » MCF-7, MDA-MB-231 et Hs578T**. Nous avons déterminé si la claudine 1 pouvait être impliquée dans les modifications précoces induites par la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186, avant l'induction de l'apoptose qui est un mécanisme plus tardif. La préparation d'une publication est en cours sur l'ensemble de ce travail.

La troisième partie de ma thèse a consisté à **évaluer si la claudine 1 sensibilise les cellules « triple-négatives » « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T aux agents de chimiothérapie**. Des données de la littérature suggèrent que la claudine 1 pourrait être un marqueur prédictif de sensibilité à différents agents de chimiothérapie (Zhou *et al.*, 2015).

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
AVANT-PROPOS	4
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS	16
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	20
<u>CHAPITRE 1: Le cancer du sein</u>	21
I. La glande mammaire	22
1. Anatomie de la glande mammaire	22
2. Hiérarchie et organisation cellulaire de la glande mammaire	22
a. Le compartiment épithélial	22
b. Le compartiment mésenchymateux	23
II. Le cancer du sein	23
1. Incidence, mortalité et facteurs de risque	24
2. Origine de la cancérogenèse	25
a. Origine moléculaire	25
b. Origine cellulaire	26
➤ Le modèle stochastique ou d'évolution clonale	26
➤ Le modèle hiérarchique ou des cellules souches cancéreuses.....	26
3. Mécanisme de développement tumoral	27
4. Mécanisme de formation de métastases.....	27
a. Les métastases : détournement d'un processus physiologique	28
b. Transition épithélio-mésenchymateuse.....	29
III. Hétérogénéité des cancers du sein	30
1. Classification clinique et histologique	30
a. Classification histologique standard	30
➤ Carcinomes non infiltrants (<i>in situ</i>)	30
➤ Carcinomes infiltrants (invasifs).....	30
b. Classification par stade	31
c. Classification par grade	31
2. Classification moléculaire.....	32
a. Tumeurs « luminal A et B ».....	32
➤ « Luminal A »	32
➤ « Luminal B »	32
b. Tumeurs « HER2-enriched »	33
c. Tumeurs triple-négatives	33
➤ Classification de Perou et ses collaborateurs (2000)	33
➤ Classification de Ahn et ses collaborateurs (2016).....	34
IV. Mise en place d'une stratégie thérapeutique	35
1. Les traitements à visée locale	35
a. La chirurgie.....	35
b. La radiothérapie	35
2. Les traitements à visée systémique : la chimiothérapie	36
a. Interaction directe avec l'ADN.....	36
➤ Les agents alkylants de l'ADN	36

➤ Les anthracyclines	36
b. Inhibition de la synthèse de l'ADN : les anti-métabolites	37
c. Interaction directe avec des protéines : les anti-tubulines.....	37
3. Les traitements ciblés.....	37
a. Hormonothérapie	37
➤ Non médicamenteuse.....	38
➤ Médicamenteuse	38
b. Thérapie ciblant le récepteur HER2.....	39
c. Thérapie ciblant le récepteur VEGF	39
d. Thérapie ciblant m-TOR.....	39
e. Thérapie ciblant CDK.....	40
f. Essais cliniques.....	40

CHAPITRE 2: La claudine 1, une protéine des jonctions serrées : importance dans le cancer du sein **42**

I. Les jonctions serrées	43
1. Structure des jonctions serrées.....	43
2. Fonctions des jonctions serrées.....	43
a. Adhérence cellulaire	44
b. Perméabilité paracellulaire : « gate function »	44
c. Barrière de diffusion : « fence function »	44
d. Régulation transcriptionnelle.....	45
3. Principaux constituants des jonctions serrées	45
a. Les protéines transmembranaires.....	45
➤ La famille des claudines	45
➤ La famille des TAMPs : les protéines à domaine MARVEL.....	48
➤ La superfamille des immunoglobulines (Ig-like CAMs)	50
b. Les protéines de la plaque cytoplasmique	50
➤ Les protéines adaptatrices	50
➤ Les protéines de signalisation	51
➤ Fonctions des protéines de la plaque cytoplasmique.....	52
c. Les protéines du cytosquelette.....	52
➤ Les microfilaments d'actine	53
➤ Les filaments intermédiaires	54
➤ Les microtubules	54
4. Assemblage et formation des jonctions serrées	55
II. Jonctions serrées et cytosquelette : acteurs de la déformation cellulaire nécessaire à la migration.....	56
1. Les jonctions serrées et le cytosquelette	56
a. Le cytosquelette d'actine et les jonctions serrées	56
b. Le cytosquelette de microtubules et les jonctions serrées	57
2. La migration à l'échelle de la cellule.....	57
a. Les différentes étapes de la migration cellulaire	57
b. Les structures d'adhérence d'une cellule en migration	58
c. Les différentes structures morphologiques d'une cellule en migration.....	59
III. La protéine claudine 1 : une protéine clé dans les jonctions serrées	60
1. Découverte de la claudine 1.....	60
2. Organisation structurale du gène et de la protéine claudine 1	60
a. Structure du gène de la claudine 1	60
b. Structure de la protéine claudine 1	61
3. Régulation de l'expression du gène et de la localisation de la protéine claudine 1	61
a. Régulation transcriptionnelle de la claudine 1	62
b. Régulation post-transcriptionnelle de la claudine 1	64

c.	Régulation post-traductionnelle de la claudine 1	64
4.	Rôles physiologiques et pathologiques de la claudine 1	65
IV.	Implication de la claudine 1 dans le cancer.....	66
1.	La claudine 1 dans les cancers	66
2.	La claudine 1 dans le cancer du sein.....	67
a.	Les tumeurs claudin 1-low	68
b.	Les tumeurs claudin 1-high	68
c.	Rôle de la claudine 1 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	68

CHAPITRE 3: Les TZDs : une nouvelle piste thérapeutique **71**

I.	Découvertes et commercialisation.....	72
II.	Les TZDs : des ligands de PPARγ.....	72
1.	Le récepteur PPAR γ	72
2.	Activité antidiabétique des TZDs médiée par PPAR γ	73
3.	Activité anti-tumorale des TZDs médiée par PPAR γ	74
4.	Découverte des effets PPAR γ -indépendants.....	75
III.	Effets des TZDs sur l'apoptose.....	77
1.	Les différentes étapes de l'apoptose	77
a.	Les caspases : effecteurs de l'apoptose	77
b.	Voie extrinsèque.....	78
c.	Voie intrinsèque	79
2.	Effets des TZDs sur la voie apoptotique.....	80
IV.	Effets des TZDs sur la migration	81
V.	Vers l'amélioration du composé TGZ	83
➤	<i>ARTICLE 1 : Reprofiling of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment?</i>	

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL..... **87**

MATERIELS ET METHODES..... **89**

I.	Culture cellulaire.....	90
1.	Lignées cellulaires	90
2.	Entretien des cellules	91
3.	Traitement des cellules	91
a.	Traitement avec des TZDs	91
b.	Traitement avec des agents de chimiothérapie.....	92
c.	Traitement avec un agent déméthylant : la 5-azacytidine	92
4.	Transfection transitoire	92
a.	Transfection de plasmides.....	92
b.	Transfection d'ARN interférents.....	92
5.	Etablissement de lignées stables	93
a.	Détermination des conditions de sélections	93
b.	Transfection	93
c.	Sélection	93
d.	Isolement de clones.....	94
6.	Culture tridimensionnelle	94
a.	Préparation de la plaque.....	94
b.	Ensemencement des cellules.....	94
c.	Récupération des sphères.....	95
II.	Analyse des transcrits	95
1.	Extraction d'ARN	95
2.	Transcription inverse	96

3. PCR quantitative.....	96
III. Analyse protéique.....	96
1. Extraction protéique.....	96
2. Western blot.....	97
3. Immunofluorescence.....	98
4. Fractionnement sub-cellulaire.....	98
IV. Analyse de la réponse apoptotique.....	99
1. Par luminescence.....	99
2. Par immunofluorescence.....	99
3. Par cytométrie en flux.....	100
V. Analyse des propriétés migratrices.....	100
1. Par le test de la blessure.....	100
2. En chambre de Boyden.....	101
VI. Analyse du cytosquelette d'actine.....	101
VII. Analyse de l'agrégation cellulaire.....	102
VIII. Analyse de la réponse cytotoxique des composés TZDs en temps réel.....	102
1. Principe.....	102
2. Protocole.....	103
IX. Analyses statistiques.....	103

RESULTATS104

I. Implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives « claudin 1-low »105

1. $\Delta 2$ -TGZ induit l'expression de la claudine 1 et l'apoptose des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T.....105
2. La surexpression de la claudine 1 entraîne l'apoptose des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T.....106
3. La claudine 1 est impliquée dans l'apoptose des cellules MDA-MB-231 induite par la $\Delta 2$ -TGZ.....106
 - **ARTICLE 2** : *Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in "claudin 1-low" triple negative breast cancer cells: involvement of claudin 1*

II. Effets précoces des dérivés TGZ sur les cellules cancéreuses mammaires « claudin 1-low » : implication de la claudine 1 dans la migration cellulaire.....108

1. La $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 induisent des modifications très précoces de l'impédance et de la morphologie des cellules MCF-7 et MDA-MB-231108
2. La $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 induisent l'expression de la claudine 1 au niveau membranaire dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231110
3. La $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 inhibent les capacités migratoires des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.....111
4. La surexpression transitoire de la claudine 1 inhibe les capacités migratoires des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.....112
5. Le niveau d'expression de la claudine 1 est corrélé à l'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231112
6. La surexpression de la claudine 1 conduit à un changement de morphologie associé à une perte des fibres de stress des cellules MDA-MB-231113
7. La surexpression de la claudine 1 conduit à l'augmentation de l'adhésion intercellulaire des cellules MDA-MB-231113
 - **ARTICLE 3** : *Troglitazone derivatives induce early modifications of the cytoskeleton and inhibition of migration in « claudin 1-low » breast cancer cells : a key of role claudin 1 in cell migration*

8. Résultats complémentaires sur les transfectants stables MDA-MB-231	115
III. La claudine 1, un marqueur prédictif de sensibilité aux agents de chimiothérapie ?	117
1. Effet de différents agents de chimiothérapie sur l'expression de la claudine 1 et de marqueurs apoptotiques dans les lignées cancéreuses mammaires.....	117
2. La claudine 1 induite par la 5-azacytidine sensibilise-t-elle les cellules triple-négatives au 5-FU ?	118
3. Effet du 5-FU sur les lignées stables MDA-MB-231 sur la voie apoptotique	119
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	120
I. Quel est le mécanisme d'action des dérivés TGZ, la $\Delta 2$-TGZ et l'AB186, sur les cellules cancéreuses mammaires ?	121
II. Quel est le rôle de la claudine 1 dans la migration des cellules cancéreuses triple- négatives « claudin 1-low » ?	126
III. La claudine 1 permet-t-elle de sensibiliser les cellules cancéreuses triple-négatives « claudin 1-low » à divers agents de chimiothérapie	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	130
ANNEXES	148

LISTE DES FIGURES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Le cancer du sein

Figure 1 : Anatomie et organisation cellulaire de la glande mammaire.

Figure 2 : Schéma hypothétique de la hiérarchie des lignages épithéliaux mammaires.

Figure 3 : Taux standardisé monde (sur 100 000 personnes) de l'incidence et de la mortalité par cancers chez homme et femme confondus.

Figure 4 : Evolution du taux d'incidence et du taux de mortalité du cancer du sein chez la femme en France sur la période 1980-2012.

Figure 5 : L'hétérogénéité intra-tumorale : deux théories.

Figure 6 : Etapes du développement tumoral.

Figure 7 : Processus de la formation de métastases.

Figure 8 : Mécanisme de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

Figure 9 : Facteurs de transcription impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

Figure 10 : Classification clinique et histologique des tumeurs mammaires.

Figure 11 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires et leur origine cellulaire.

Figure 12 : Principaux sites métastatiques des tumeurs triple-négatives et risque de récurrence distante comparé aux tumeurs non triple-négatives.

CHAPITRE 2 : La claudine 1, une protéine des jonctions serrées : rôle clé dans le cancer du sein

Figure 13 : Localisation et architecture des jonctions serrées.

Figure 14 : Fonctions de barrière des jonctions serrées.

Figure 15 : Composition des jonctions serrées.

Figure 16 : Structure d'une claudine.

Figure 17 : Classification de la famille des claudines.

Figure 18 : Expression et localisation des claudines durant le développement mammaire chez la souris.

Figure 19 : Structure des TAMPs.

Figure 20 : Structure des protéines JAM.

Figure 21 : Structure des protéines adaptatrices à domaines PDZ.

Figure 22 : Interactions entre les protéines transmembranaires, les protéines de la plaque cytoplasmique et le cytosquelette.

Figure 23 : Structure et caractéristiques des trois constituants du cytosquelette : les microfilaments d'actine (A), les filaments intermédiaires (B) et les microtubules (C).

Figure 24 : Les microfilaments d'actine et de myosine.

Figure 25 : Représentation schématique de l'assemblage des filaments intermédiaires.

Figure 26 : Modèle d'assemblage des microtubules et leurs moteurs moléculaires.

Figure 27 : Modèle d'assemblage des jonctions serrées associé à la formation des jonctions adhérentes.

Figure 28 : Interaction du cytosquelette d'actine et des jonctions serrées.

Figure 29 : Interaction du réseau de microtubules aux jonctions serrées.

Figure 30 : Les différentes étapes de la migration cellulaire.

Figure 31 : Structure des contacts focaux.

Figure 32 : Organisation de l'actine cellulaire dans une cellule mésenchymateuse.

Figure 33 : Structure du gène de la claudine 1 chez l'humain.

Figure 34 : Structure de la protéine claudine 1 chez l'humain.

Figure 35 : Modifications post-traductionnelles de la claudine 1.

Figure 36 : Localisation de la claudine 1 dans les tissus mammaires sain et cancéreux.

Figure 37 : Courbe de survie Kaplan-Meier de la survie sans récurrence (RFS : Recurrence Free Survival) et survie globale (OS : Overall Survival) basée sur la localisation membranaire de la claudine 1.

CHAPITRE 3 : Les thiazolidinediones : une nouvelle piste thérapeutique

Figure 38 : Structure des thiazolidinediones les plus connues.

Figure 39 : Effets antidiabétiques et anticancéreux des TZDs médiés par le récepteur PPAR γ .

Figure 40 : Structure des dérivés $\Delta 2$ et de leur composé parent.

Figure 41 : Modifications morphologiques d'une cellule en apoptose.

Figure 42 : Les différentes caspases apoptotiques.

Figure 43 : Voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

Figure 44 : Structure des protéines de la famille Bcl-2.

Figure 45 : PTEN et ses cibles impliquées dans la migration et la survie cellulaire.

Figure 46 : Morphologie des cellules cancéreuses en réponse à la TGZ.

Figure 47 : Métabolisme de la troglitazone.

Figure 48 : Structure et activité antiproliférative de la troglitazone et de ses dérivés.

MATERIELS ET METHODES

Figure 49 : Caractérisation des lignées mammaires en fonction de leur statut ER α , PR, HER2 et claudine 1.

Figure 50 : Carte du vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo.

Figure 51 : Validation de l'anticorps dirigé contre la claudine 1 utilisés en Western Blot : C5838-02C USBiological.

Figure 52 : Validation de l'anticorps dirigé contre la claudine 1 utilisés en immunofluorescence : CB1046 Calbiochem.

Figure 53 : Principe du système xCELLigence.

RESULTATS

I. Implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives « claudin 1-low »

Figure 54 : Effet de la $\Delta 2$ -TGZ sur l'expression de la claudine 1 et l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.

Figure 55 : Effet de la surexpression de la claudine 1 sur l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.

Figure 56 : Implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.

Figure 57 : La surexpression de la claudine 1 potentialise l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ des cellules MDA-MB-231.

Figures incluses dans **Article 2** accepté dans *Breast Cancer Research and Treatment: Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in “claudin-1-low” triple-negative breast cancer cells: involvement of claudin-1*

Supplementary data.1 Changes in expression level of genes related to cell adhesion and associated with cancer progression in $\Delta 2$ -TGZ-treated MCF-7 cells after microarray analysis

Fig. 1 $\Delta 2$ -TGZ induces claudin 1 expression and apoptosis in TNBC cells.

Fig. 2 Claudin 1 localization in response to $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 and Hs578T cells.

Fig. 3 Overexpression of claudin 1 induces apoptosis in TNBC cells.

Fig. 4 TUNEL positive cells in MDA-MB-231 and Hs578T cells overexpressing claudin 1.

Fig. 5 Claudin 1 knockdown prevents $\Delta 2$ -TGZ pro-apoptotic effect in MDA-MB-231 cells.

Supplementary data.2 Claudin 1 and occludin co-localization in response to $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 and Hs578T cells.

Supplementary data.3 Increase apoptosis in MDA-MB-231 cells overexpressing claudin 1 with $\Delta 2$ -TGZ.

II. Effets précoces des dérivés TGZ sur les cellules cancéreuses mammaires « claudin 1-low » : implication de la claudine 1 dans la migration cellulaire

Figure 58 : Effet de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur l'expression de la claudine 1 et le clivage de PARP.

Figure 59 : Effets précoces de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur l'impédance des cellules MCF-7 et MDA-MB-231.

Figure 60 : Effets précoces de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur la morphologie des cellules MCF-7 et MDA-MB-231.

Figure 61 : Effet de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur l'expression et la localisation de la claudine 1 des cellules MCF-7 et MDA-MB-231.

Figure 62 : Effet des dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ, de l'AB186 et de la surexpression de la claudine 1 sur la migration cellulaire des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.

Figure 63 : Expression de la claudine 1 sur la migration des cellules MDA-MB-231.

Figure 64 : Effet de la surexpression de la claudine 1 sur la morphologie et le cytosquelette d'actine des cellules MDA-MB-231.

Figure 65 : Effet différentiel du niveau d'expression de la claudine 1 sur l'adhérence intercellulaire des cellules MDA-MB-231.

Figures incluses dans **Article 3** en preparation pour *Breast Cancer Research*: Troglitazone derivatives induce early modifications of the cytoskeleton and inhibition of migration in « claudin 1-low » breast cancer cells: a key of role claudin 1 in cell migration

Fig 1. Kinetics of TGZ derivatives effects on MDA-MB-231 and MCF-7 cells according to real-time impedance analysis.

Fig 2. TGZ derivatives alter MCF-7 morphology.

Fig 3. TGZ derivatives alter MDA-MB-231 morphology.

Fig 4. TGZ derivatives increase claudin 1 protein and transcript level in MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

Supplementary data.1. TGZ derivatives induce morphological change and increase claudin 1 protein level in Hs578T cells.

Fig 5. TGZ derivatives alter migration proprieties of MDA-MB-231 and Hs578T cells.

Fig 6. Claudin 1 overexpression inhibits MDA-MB-231 and Hs578T cells migration.

Fig.7 Claudin 1 level is correlated to inhibition of migration in MDA-MB-231 cells.

Fig 8. Claudin 1 brings morphological changes through the disappearance of stress fibers in MDA-MB-231.

Fig 9. Claudin 1 overexpression creates neo-formation of junctions of MDA-MB-231 cells.

Supplementary data.2. Claudin 1 overexpression induces tight and adherent junction proteins in MDA-MB-231 cells.

Résultats complémentaires sur les transfectants stables MDA-MB-231

Figure 66 : Caractérisation du niveau d'expression de la claudine 1, de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux sur les tranfectants stables MDA-MB-231 surexprimant la claudine 1.

III. La claudine 1, un marqueur prédictif de sensibilité aux agents de chimiothérapie ?

Figure 67 : Expression de la claudine 1 et de deux marqueurs pro-apoptotiques en réponse à différents agents de chimiothérapie dans les cellules MDA-MB-231.

Figure 68 : Expression de la claudine 1 et de deux marqueurs pro-apoptotiques en réponse à différents agents de chimiothérapie dans les cellules Hs578T.

Figure 69 : Effet de la ré-expression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 (A) et Hs578T (B).

Figure 70 : Effet de la ré-expression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Figure 71 : Interaction entre le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et les microtubules.

Figure 72 : Voies de signalisation activées par le récepteur GPCR couplé aux protéines G de classe $G\alpha_q$.

LISTE DES TABLEAUX

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Le cancer du sein

Tableau 1 : Gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers mammaires à prédispositions génétiques.

Tableau 2 : Liste des gènes les plus fréquemment mutés à l'origine des cancers du sein.

Tableau 3 : Classification des tumeurs triple-négatives.

Tableau 4 : Liste des principales combinaisons d'agents de chimiothérapie utilisées pour le traitement des cancers du sein.

Tableau 5 : Liste des thérapies ciblées disposant d'une AMM pour le traitement des cancers du sein en France.

CHAPITRE 2 : La claudine 1, une protéine des jonctions serrées : rôle clé dans le cancer du sein

Tableau 6 : Liste des facteurs de croissance et cytokines qui régulent l'expression de la claudine 1.

Tableau 7 : Liste des facteurs de transcription qui régulent l'expression de la claudine 1.

Tableau 8 : Liste des microARN et des protéines liant l'ARN impliqués dans la régulation de l'expression de la claudine 1.

Tableau 9 : Répartition des tumeurs « claudin 1-low » et « claudin 1-high » au sein des différents sous-types moléculaires.

Tableau 10 : Répartition des différents sous-types moléculaires au sein des tumeurs « claudin 1-low » et « claudin 1-high ».

MATERIELS ET METHODES

Tableau 11 : Condition de traitement des lignées cellulaires avec différentes molécules.

Tableau 12 : Séquences des ARN interférents spécifiques de la claudine 1.

Tableau 13 : Liste des couples d'amorces utilisés pour la PCR quantitative.

Tableau 14 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot et en immunofluorescence (IF).

RESULTATS

II. Effets précoces des dérivés TGZ sur les cellules cancéreuses mammaires « claudin 1-low » : implication de la claudine 1 dans la migration cellulaire

Tableaux inclus dans **Article 3** en preparation pour *Breast Cancer Research*: Troglitazone derivatives induce early modifications of the cytoskeleton and inhibition of migration in « claudin 1-low » breast cancer cells: a key of role claudin 1 in cell migration

Table 1. Sequence of primers and length of PCR products for genes used for quantitative PCR.

Table 2. Maximal difference of cell index between control condition and treated condition, $\Delta 2$ -TGZ/Control and AB186/Control, was determined for three independent experiments. The mean of maximal difference of CI for each treatment was determined in MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

LISTE DES ABREVIATIONS

1-9

5-aza : 5-azacytidine
5-FU : 5-FluoroUracile

A

α -SMA : alpha Smooth Muscle Actin
Å : Ångström
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADP : Adénosine DiPhosphate
AF-6 : afadine 6
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMPK : AMP-activated Protein Kinase
APAF-1 : Apoptosis Protease Activating Factor-1
ARE : AU-rich element
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine TriPhosphate

B

Bad : Bcl-2 associated death protein
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax : Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2-like protein
Bcl-Xl : B-cell lymphoma-extra large
BH : Bcl-2 Homology
bHLH : basic Helix-Loop-Helix
Bid : BH3-interacting domain death agonist
BRCA1 et 2 : Breast Cancer 1 et 2

C

CAR : Coxsackie and Adenovirus Receptor
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain
CCND1 : Cyclin D1
CD : Cluster of Differentiation
CD1 : Cycline D1
CDH1 : Cadherin-1
Cdk : cyclin-dependent kinase
CDS : Coding DNA Sequence
Cdx-2 : Caudal Homeobox-2
CGZ : ciglitazone
CI : Cell Index
CICR : Ca²⁺ Induced Ca²⁺ Release
CLMP : CAR-like membrane protein
CSC : Cellule Souche Cancéreuse
CSMa : Cellules Souches Mammaires

D

DAG : DiAcylGycérols
DD : Death Domain
DEC1 : Differentiated Embryo-Chondrocyte expressed gene 1
DED : Death Effector Domain
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : diméthylsulfoxyde

dNTP : désoxynucléoside triphosphate
DTT : dithiotréitol

E

EC₅₀ : Effective Concentration 50
ECL : ExtraCellular Loop
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EHS : Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma
ER : Endoplasmic Reticulum
ER : Estrogen Receptor
ERBB2 : Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 = HER2
ESAM : Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule

F

FADD : Fas-Associated Death Domain
FAK : Focal Adhesion Kinase
FDA : Food and Drug Administration
FI : Filament Intermédiaire
FSH : Follicle-Stimulating Hormone

G

GLUT4 : GLUcose Transporter 4
GPCR : G Protein Coupled Receptor
GPR40 : G Protein Coupled Receptor 40
GTP : Guanosine TriPhosphate
GUK : GUanylate Kinase homology

H

HER2 : Human epidermal growth factor receptor-2
HES1 : Hairy and Enhancer of Split-1
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HuR : Human antigen R

I

IFN : Interferon
IL : Interleukine
INCa : Institut National du Cancer
IP₃ : Inositol-3-Phosphate
IP3R : Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor

J

JAM : Junctional Adhesion Molecule

K

kDa : kiloDalton
KO : Knock Out

L

LAR : Luminal Androgen Receptor
LH : Luteinizing Hormone
LMA : Leucémie Myéloïde Aiguë

M

MAGI : MAGuk Inverted
MAGUK : Membrane-Associated Guanylate Kinase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MARVEL : MAL : myelin and lymphocyte protein, and related protein for vesicle trafficking and membrane link
MCF : Michigan Cancer Foundation
MDA-MB : Medical Doctor Anderson-Metastatic Breast

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MLCK : Myosin Light-Chain Kinase
mM : milliMolaire
MMP : Matrix MetalloProtease
MT1-MMP : Membrane Type-MMP
MTOC : MicroTubule Organizing Center
m-TOR : mammalian Target Of Rapamycin
MUPP1 : MUlti-PDZ domain Protein
MYC : Myc proto-oncogene protein

N

NISCH : Neonatal Ichthyosis Sclerosing and Cholangitis syndrome
NF- κ B : Nuclear Localization-kappa B
nM : nanoMolaire
NR3C1 : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member

O

OGT : O-linked β -N-acetylGlucosamine Transferase
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frame
OS : Overall Survival

P

PAN : Planar Apical Network
PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PATJ : Pals 1-Associated Tight Junction protein
PD-1 : Programmed Death-1
PD-L1 : Programmed Death Ligand-1
PDZ : PSD95 (Post Synaptic Density Protein 95), Dlg1 (Drosophila disc large tumor suppressor 1), ZO-1 (Zonula Occludens-1)
Pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCNA : Proliferative Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFS : Progression Free Survival
PGZ : pioglitazone
PI3K : PhosphoInositol-3-Kinase
PIK3CA : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
PIP₂ : Phosphatidyl Inositol bis-Phosphate
PKA/B/C : Protein Kinase A/B/C
PMP-22/EMP/MP20 : Peripheral Myelin protein 22/ Epithelial Membrane Protein/ Muscle-specific Protein 20
PP1 : Protein Phosphatase 1
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PP2B : Protein Phosphatase 2B
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE : Peroxisome Proliferator Response Element
PR : Progesterone Receptor
PSA : Prostate-Specific Antigen
PtdIns (3,4,5)P₃ : Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PTEN : Phosphatase and TENSin homolog
PTP : Permeability Transition Pore

R

RB : RetinoBlastoma
RE: Reticulum Endoplasmique
RFS : Recurrence Free Survival

RGZ : Rosiglitazone
RNAse : Ribonucléase
RON : Récepteur d'Origine Nantais
ROS : Reactive Oxygen Species
RPLPO : human acidic ribosomal phosphoprotein
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RXR : Retinoid X Receptor

S

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Sec : seconde
SEMP1 : Senescence-associated Epithelial Membrane Protein 1
SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
SH3 : SRC Homology 3
siRNA : small interfering RNA
SP-1 : Specificity Protein 1
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TAMPs : Tight Junction-Associated MARVEL Proteins
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF : Transforming Growth Factor
TGZ : troglitazone
TMPRSS4 : TransMembrane PRotease, Serine 2
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TNM : Tumor Node Metastasis
TNT : Tris-HCl, NaCl, Tween
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSS : Transcription Start site
TZD : thiazolidinedione

U

UTR : Untranslated Transcribed Region

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Z

Zeb : Zinc-finger E-box-binding
ZMYND8 : Zinc Finger MYND (Myeloid, Nery and DEAF-1)-type containing 8
ZO : Zonula Occludens
ZONAB : ZO1-associated nucleic acid binding protein

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1: Le cancer du sein

I.	La glande mammaire	22
1.	Anatomie de la glande mammaire.....	22
2.	Hiérarchie et organisation cellulaire de la glande mammaire	22
II.	Le cancer du sein	23
1.	Incidence, mortalité et facteurs de risque	24
2.	Origine de la cancérogenèse.....	25
3.	Mécanisme de développement tumoral.....	27
4.	Mécanisme de formation de métastases	27
III.	Hétérogénéité des cancers du sein.....	30
1.	Classification clinique et histologique	30
a.	Classification histologique standard.....	30
b.	Classification par stade.....	31
c.	Classification par grade	31
2.	Classification moléculaire	32
IV.	Mise en place d'une stratégie thérapeutique	35
1.	Les traitements à visée locale	35
a.	La chirurgie	35
b.	La radiothérapie.....	35
2.	Les traitements à visée systémique : la chimiothérapie	36
3.	Les traitements ciblés	37
a.	Hormonothérapie.....	37
b.	Thérapie ciblant le récepteur HER2	39
c.	Thérapie ciblant le récepteur VEGF.....	39
d.	Thérapie ciblant m-TOR	39
e.	Thérapie ciblant CDK	40
f.	Essais cliniques	40

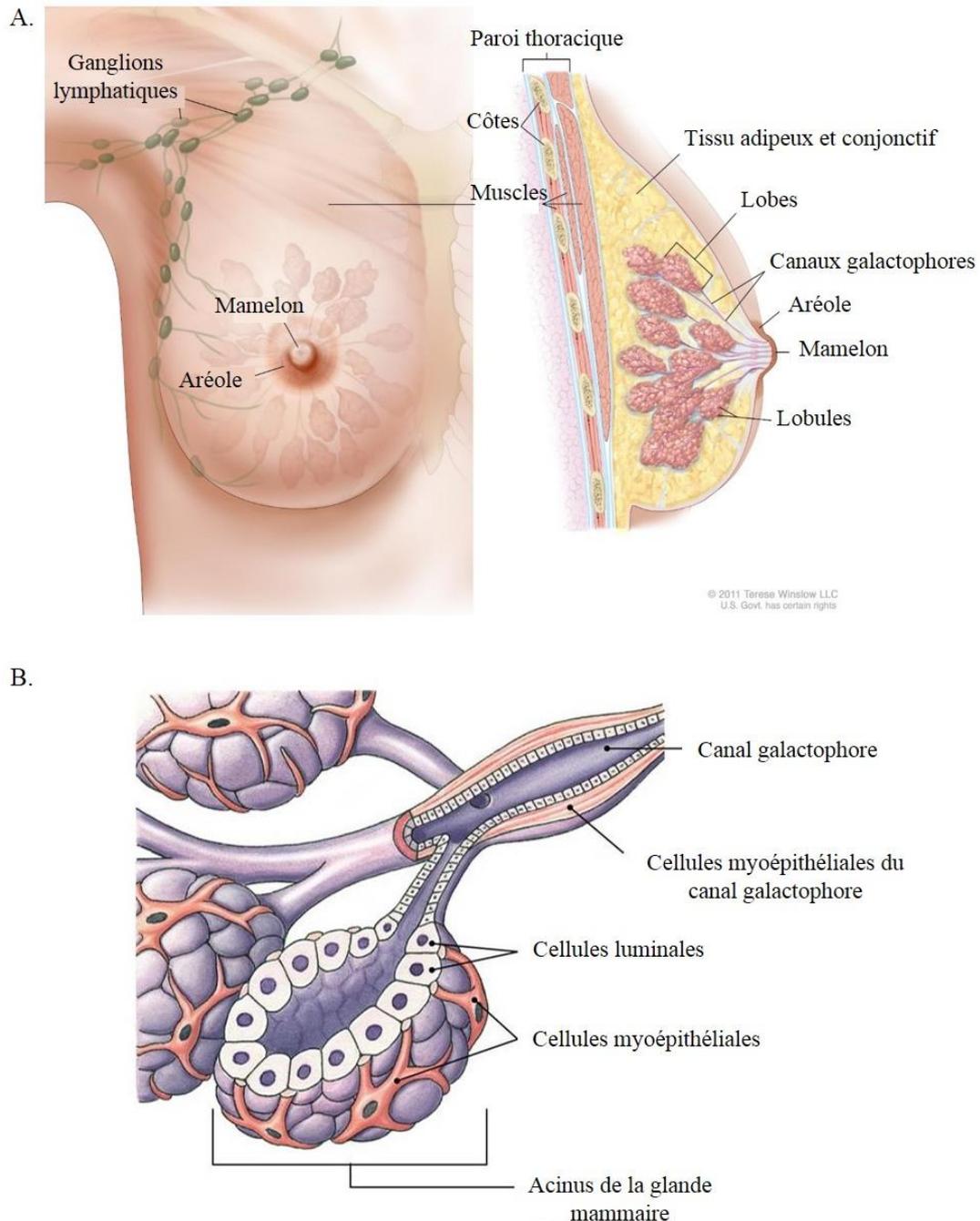


Figure 1 : Anatomie et organisation cellulaire de la glande mammaire. (A) Le sein repose sur les muscles pectoraux de la paroi thoracique. La glande mammaire est une structure en grappe composée d'acini regroupés en lobules, eux-mêmes regroupés en lobes. Les sécrétions des acini sont récupérées par un réseau de canaux s'associant pour former un canal galactophore principal et convergent vers le mamelon. Le sein est aussi composé de tissus adipeux et conjonctif qui entourent et séparent les lobes. Chaque glande mammaire est drainée par un réseau de ganglions lymphatiques. (B) Le compartiment épithélial mammaire est composé de deux types cellulaires différenciés : une couche de cellules luminales qui bordent la lumière des acini et des canaux ainsi qu'une assise de cellules myoépithéliales positionnées entre les cellules luminales et la membrane basale (d'après Associate Degree Nursing Physiology Review et National Cancer Institute 2017).

I. La glande mammaire

1. Anatomie de la glande mammaire

Le sein est une glande exocrine dont la principale fonction est la production de lait afin d'alimenter le nouveau-né. Chez la femme, les glandes mammaires reposent sur les muscles pectoraux et sont recouvertes de peau avec en son centre une papille mammaire appelée **mamelon** (Figure 1A). Ce dernier est entouré d'une zone pigmentée contenant de nombreuses glandes sudoripares et sébacées : l'**aréole**. D'un point de vue interne, chaque glande mammaire est une structure en grappe composée d'acini agencés en **lobules**, eux-mêmes groupés en **lobes** (15-25 lobes chez la femme). Les sécrétions des acini sont récupérées par des canaux ramifiés (canaux galactophores ou lactifères), permettant l'acheminement du lait vers l'extérieur au niveau du mamelon. Le sein est aussi composé de tissus adipeux et conjonctif, qui entourent et séparent les lobes. Ces tissus assurent un rôle de protection et donnent la forme et le volume à ce dernier. La glande mammaire est également richement vascularisée. Un réseau lymphatique (vaisseaux et ganglions) entoure la région mammaire et assure un rôle de protection immunitaire.

Le sein se développe tout au long de la vie de la femme sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance.

2. Hiérarchie et organisation cellulaire de la glande mammaire

Le tissu mammaire est organisé de manière hiérarchique. Sa caractérisation constitue une base importante pour la compréhension de l'origine et de l'hétérogénéité des cancers du sein, tant au niveau histologique que moléculaire. La glande mammaire est composée de deux compartiments cellulaires: **épithélial** et **mésenchymateux**.

a. Le compartiment épithélial

L'épithélium mammaire est composé de deux types cellulaires différenciés : les **cellules luminales** et les **cellules myoépithéliales** (Figure 1B). La couche de cellules luminales borde la lumière des acini et des canaux. Au niveau de l'acinus, elles permettent la production et la sécrétion de lait lors de la lactation. Les cellules myoépithéliales sont en contact direct avec les cellules luminales et possèdent une fonction contractile permettant l'acheminement du lait vers l'extérieur. Ces deux types de cellules différenciées ont une origine commune et

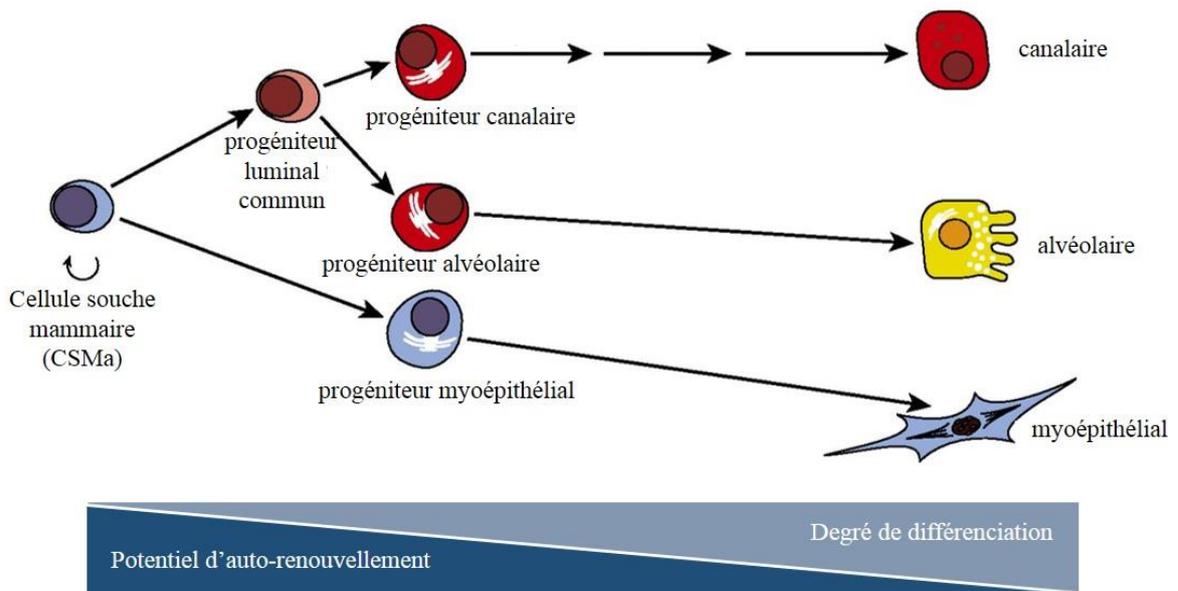


Figure 2: Schéma hypothétique de la hiérarchie des lignages épithéliaux mammaires. Les différents lignages mammaires proviennent d'une origine commune, les cellules souches mammaires (CSMa). Elles ont un fort potentiel d'auto-renouvellement afin de maintenir leur pool et sont à l'origine des progéniteurs luminal commun et myoépithélial. Le progéniteur luminal commun peut se différencier en progéniteur canalaire ou alvéolaire, qui se différencie à leur tour en cellule luminaire canalaire ou alvéolaire. Le progéniteur myoépithélial se différencie quant à lui en cellule myoépithéliale (d'après revue Visvader *et al.*, 2014).

proviennent d'une petite population de cellules que l'on appelle les **cellules souches mammaires (CSMa)** (Figure 2). Ces cellules sont en faible nombre et sont localisées au niveau de niches environnementales basales en état de quiescence, dans l'attente de signaux systémiques ou locaux. Les CSMa sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement afin de maintenir leur pool. Pendant la division, la cellule souche donne soit deux cellules filles identiques gardant les propriétés de la cellule souche mère (division symétrique), soit une cellule identique à la cellule souche mère et une cellule, le progéniteur, engagée dans une voie de différenciation (division asymétrique) (Smith *et al.*, 2005). Après différenciation et divisions successives, les progéniteurs précoces donnent naissance aux progéniteurs luminaux et myoépithéliaux, qui à leur tour donneront les cellules différenciées composant le myoépithélium et les épithelia luminaux canaux et alvéolaires (Figure 2).

Les CSMa sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent produire toutes les lignées de la glande mammaire (épithélial et myoépithélial). En effet, cette petite population de cellules souches isolées à partir de différents marqueurs chez la souris, permet la régénération à long-terme *in vivo* d'une glande mammaire entière et fonctionnelle (Shackleton *et al.*, 2006 ; Stingl *et al.*, 2006). Récemment, une petite population de cellules pluripotentes a été identifiée dans une glande mammaire saine humaine avec une capacité de se différencier en différents lignages cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Ces cellules expriment les marqueurs de pluripotence NANOG, OCT3/4 et SOX2 (Hassiotou *et al.*, 2012).

b. Le compartiment mésenchymateux

Le compartiment mésenchymateux ou stroma mammaire est séparé du compartiment épithélial par une membrane basale. Celui-ci est constitué d'adipocytes en grand nombre, de fibroblastes, de cellules immunitaires, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de fibres nerveuses ainsi que des constituants de la matrice extracellulaire (MEC). Tous ces constituants composent le microenvironnement de la glande mammaire et vont influencer son développement par des signaux systémiques et paracrines.

II. Le cancer du sein

Le mot latin « **cancer** » tire son origine du mot grec « **karkinos** » qui signifie « **crabe** ». Hippocrate (460-377 avant J-C) est le premier à comparer le cancer à un crabe par analogie à l'aspect des tumeurs du sein lorsqu'elles s'étendent à la peau. Il explique que la tumeur

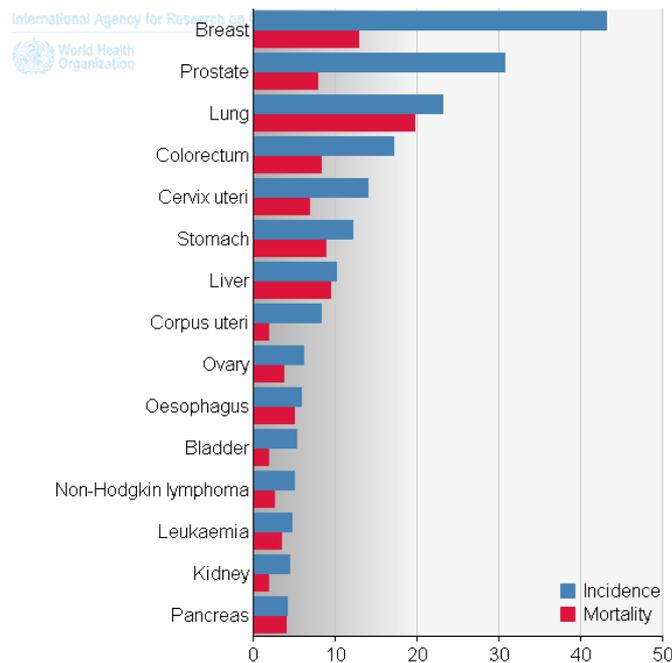


Figure 3 : Taux standardisé monde (sur 100 000 personnes) de l'incidence et de la mortalité par cancers chez homme et femme confondus. Les histogrammes bleus et les histogrammes rouges représentent respectivement l'incidence et la mortalité de chaque cancer. Le cancer du sein possède l'incidence la plus élevée et correspond au deuxième cancer le plus meurtrier derrière le cancer du poumon (d'après Globocan, 2012).

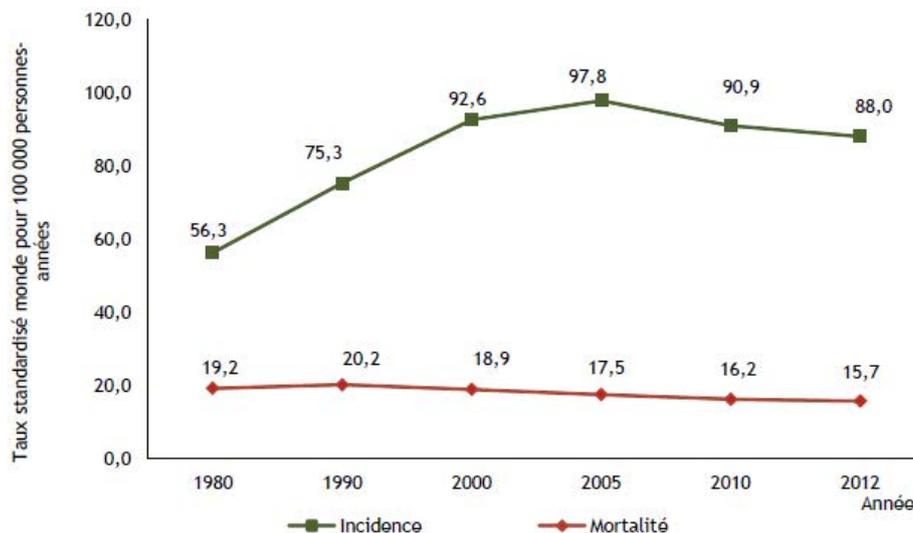


Figure 4 : Evolution du taux d'incidence et du taux de mortalité du cancer du sein chez la femme en France sur la période 1980-2012. L'incidence du cancer du sein a régulièrement augmenté au cours des trois dernières décennies, et commence à diminuer depuis 2005 (courbe verte). Au contraire, la mortalité est restée plutôt stable avec une diminution observée depuis 1995 (courbe rouge) (d'après l'Institut National du Cancer 2013).

présente une masse centrale arrondie et des prolongements en rayons ressemblant aux pattes de l'animal. Galien (130-200 après J-C) reprend cette comparaison et écrit un traité des tumeurs où il décrit avec précision le cancer du sein. Depuis l'Antiquité, le cancer du sein a servi de modèle pour mieux comprendre le cancer en général.

1. Incidence, mortalité et facteurs de risque

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué en 2012 tous sexes confondus (43,1/100 000) (Globocan, [Figure 3](#)). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 25% des cancers diagnostiqués chez la femme sont des cancers du sein. Il constitue la 2^{ème} cause de décès par cancer après celui du poumon (12,9/100 000). Ces estimations signifient que 1,67 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués pour cette maladie et 522 000 personnes en sont décédées dans le monde cette année-ci. L'incidence est plus élevée dans les pays développés et la mortalité concerne principalement les pays les moins développés, par manque de détection précoce et d'accès aux traitements.

En France, entre 1980 et 2000, le taux d'incidence standardisé a quasiment doublé avant de se stabiliser en 2005 puis de diminuer de 1,5% par an sur la période 2005-2012 (88/100 000 en 2012) (Institut National du Cancer, [Figure 4](#)). Cette diminution s'explique par le diagnostic plus précoce des tumeurs et coïncide avec la réduction massive de la prescription des traitements hormonaux de la ménopause. La mortalité est restée relativement stable jusqu'en 1995 malgré une forte augmentation de l'incidence sur la même période, puis a diminué significativement jusqu'en 2012 (15,7/100 000) ([Figure 4](#)). Deux principaux éléments ont contribué au meilleur taux de survie des patientes. D'une part, la pratique du dépistage organisé a permis d'établir des diagnostics plus précoces et de traiter les patientes avec une meilleure efficacité. D'autre part, les progrès dans la prise en charge thérapeutique, en particulier, les traitements adjuvants sont de plus en plus efficaces et destinés à un nombre plus important de patientes. En 2015, l'estimation de nouveaux cas est de 54 062 et de 11 913 personnes décédées (Institut National du Cancer).

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle qui comporte des facteurs de risque internes et externes. Le sexe et l'âge sont les deux principaux facteurs de risque puisque 99% des cas concernent les femmes et 2/3 des cancers se déclarent après 50 ans. En France, l'âge médian au diagnostic est de 63 ans et l'âge médian au décès est de 73 ans (Institut National du Cancer, 2015). La majorité des cancers du sein (90 à 95%) ont une **origine sporadique**, c'est-

Symbole du gène	Nom de la protéine (Uniprot)	Fonction principale
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	Réparation de l'ADN
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein	
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2	
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated : Serine/Thréonine Kinase	
TP53	cellular tumor antigen p53	Régulation du cycle cellulaire
CHEK2	Checkpoint kinase 2	
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog	
CDH1	Cadherin-1 ou E-cadherin	Adhérence intercellulaire
STK11	Serine/Threonine Kinase 11	Polarité cellulaire

Tableau 1 : Gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers mammaires à prédispositions génétiques. Le nom et la fonction principale de chaque gène sont indiqués (d'après American Cancer Society).

Symbole du gène	Nom de la protéine (Uniprot)	Fonctions principales
TP53	Cellular tumor antigen p53	Régulation du cycle cellulaire/ Suppresseur de tumeur
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog	
RB1	Retinoblastoma-associated protein	
MYC	Myc proto-oncogene protein	Régulation du cycle cellulaire/Oncogène
CCND1	Cyclin D1	
PIK3CA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	Contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire/Oncogène
ERBB2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 ou HER2 protein (Human epidermal growth factor receptor-2)	
chr8 :ZNF703/FGFR1 locus	Zinc finger protein 703/Fibroblast growth factor receptor 1	Contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire
GATA3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3	Différenciation des cellules épithéliales
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	Contrôle de voies de signalisation
CDH1	Cadherin-1	Adhérence intercellulaire
TTN	Titin	Structure des chromosomes

Tableau 2 : Liste des gènes les plus fréquemment mutés à l'origine des cancers du sein. Le nom et la fonction principale de chaque gène sont indiqués (d'après Nik-Zainal *et al.*, 2016 ; Ma *et al.*, 2017).

à-dire l'apparition de mutations somatiques acquises dues à de multiples facteurs environnementaux tel que l'alcool, le tabac, les perturbateurs endocriniens, les produits chimiques, les radiations ionisantes, les hormones exogènes et endogènes. Dans 5 à 10% des cas, les cancers du sein diagnostiqués sont à **prédispositions génétiques**. Ces cancers sont caractérisés par des mutations germinales. Parmi celles-ci, les mutations localisées au niveau des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (BReast CAncer 1 et 2) sont les plus fréquentes (Tableau 1). Ces deux gènes ont été identifiés en 1994 et 1995 et sont localisés sur les chromosomes 17 et 13 respectivement. Ce sont des gènes suppresseurs de tumeurs qui agissent comme un gardien du génome. Ils sont impliqués dans le système de réparation à l'ADN et de contrôle du cycle cellulaire. La mutation de ces deux gènes est associée à un risque supérieur à 50% et de 18 à 40% de développer un cancer du sein et de l'ovaire respectivement (Chen *et al.*, 2007). D'autres gènes sont retrouvés mutés dans les cancers d'origine génétique comme les gènes *PALB2*, *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11* (Tableau 1). Ces mutations sont moins fréquentes et concernent un petit nombre de cas (American Cancer Society).

2. Origine de la cancérogenèse

La cancérogenèse est un ensemble de phénomènes transformant une cellule normale en cellule cancéreuse. Une cellule cancéreuse est définie par une prolifération accrue, une insensibilité aux inhibiteurs de croissance, une résistance au système de mort cellulaire programmée ou apoptose, une capacité à induire l'angiogenèse, un potentiel de réplication illimité et une capacité d'invasion tissulaire (Hanahan *et al.*, 2011).

a. Origine moléculaire

Le déclenchement tumoral résulte d'une accumulation d'altérations génétiques ou épigénétiques d'une cellule, touchant un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération et l'échappement à l'apoptose. Il a été identifié 93 gènes comme porteurs de 1628 mutations pilotes, c'est-à-dire qui sont directement responsables de l'oncogenèse mammaire (Nik-Zainal *et al.*, 2016). Parmi ces gènes, 12 d'entre eux les plus fréquemment mutés sont: *TP53*, *PTEN*, *RBI*, *MYC*, *CCND1*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *chr8 :ZNF703/FGFR1 locus*, *GATA3*, *MAP3K1*, *CDH1* et *TTN* (Tableau 2) (Nik-Zainal *et al.*, 2016 ; Ma *et al.*, 2017). La majorité des gènes mutés peut être classée en deux catégories : les **oncogènes** et les **gènes suppresseurs de tumeur**. Dans une cellule tumorale, les **oncogènes** sont activés et stimulent la prolifération ainsi que la survie cellulaire comme *MYC*, *CCND1* ou encore

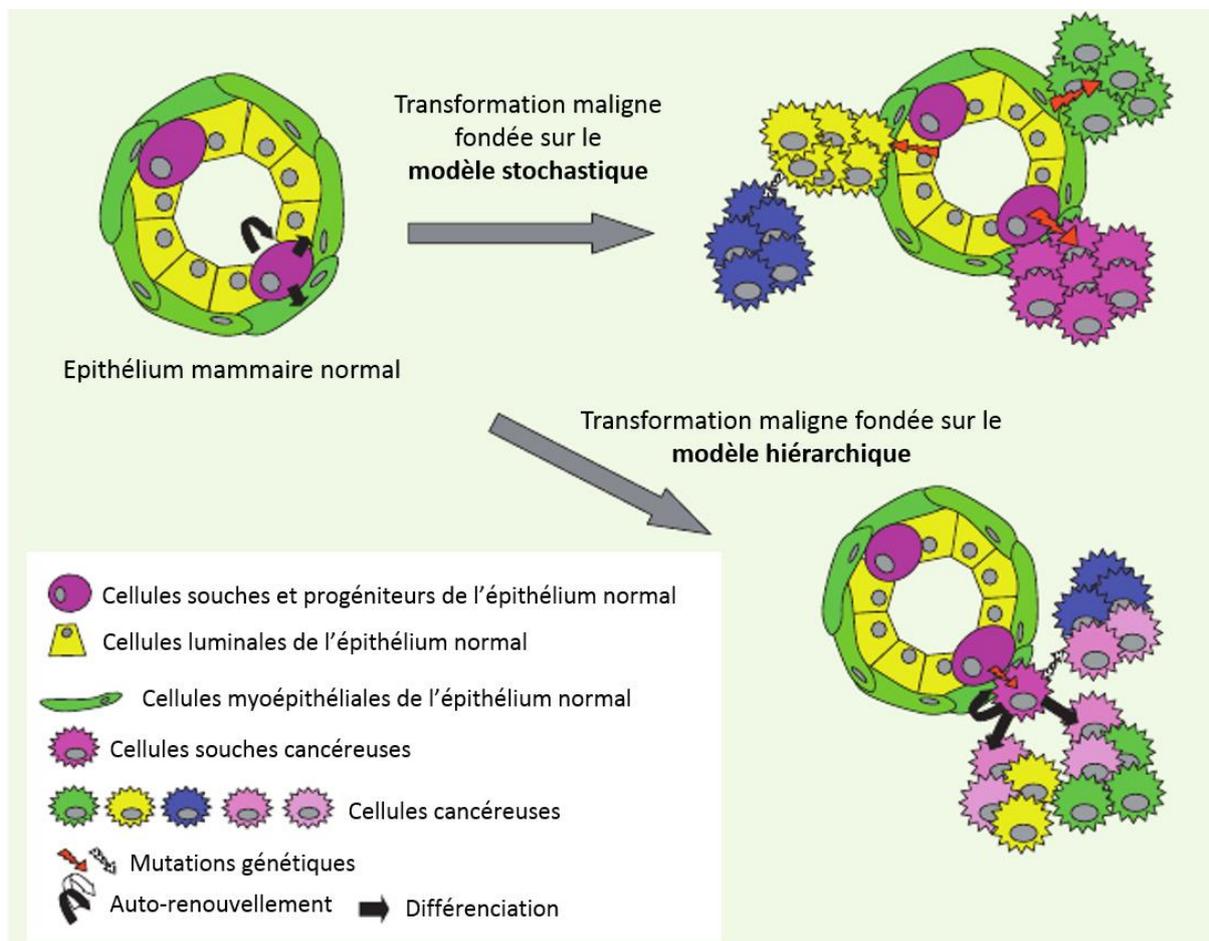


Figure 5 : L'hétérogénéité intra-tumorale : deux théories. Afin d'expliquer l'hétérogénéité tumorale régnant au sein d'une tumeur, deux modèles ont été proposés : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique. Le modèle stochastique s'appuie sur le fait que chaque cellule de l'épithélium mammaire peut subir une mutation oncogénique et donner un clone tumoral. Les clones tumoraux sont composés de cellules qui ont toutes la capacité de proliférer de façon indéfinie et d'évoluer différemment en réponse à l'accumulation de nouvelles altérations oncogéniques. Le modèle hiérarchique s'appuie sur le fait qu'une seule cellule souche ou progénitrice peut être la cible de l'oncogenèse. La cellule souche donnera naissance à une cellule souche cancéreuse qui va proliférer de façon indéfinie et donnera naissance à l'hétérogénéité tumorale en contrôlant la différenciation (d'après Ginestier *et al.*, 2007).

ERBB2 (Tableau 2). En parallèle, les **gènes suppresseurs de tumeur**, régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, sont inhibés. Par exemple, *TP53* et *PTEN* sont les gènes suppresseurs plus connus. Dans une cellule saine, il existe un équilibre entre l'expression de ces deux catégories de gènes.

b. Origine cellulaire

Le cancer du sein est connu pour son hétérogénéité cellulaire intra-tumorale. Cette hétérogénéité contribue à la progression tumorale, à la résistance à la chimiothérapie et à la récurrence du cancer. Deux théories ont été proposées pour expliquer cette hétérogénéité cellulaire : le **modèle stochastique** et le **modèle hiérarchique** (Figure 5).

➤ **Le modèle stochastique ou d'évolution clonale**

D'après le modèle stochastique, chaque cellule du tissu épithélial peut subir une accumulation de mutations somatiques de façon aléatoire. Chaque cellule va proliférer de manière indéfinie et va former un clone tumoral indépendant (Figure 5) (Nowell *et al.*, 1976). Chaque clone a la capacité de proliférer de façon indéfinie et d'évoluer différemment en réponse à l'accumulation de nouvelles altérations génétiques. L'ensemble des clones formés va créer une masse tumorale hétérogène au niveau génétique et phénotypique. Les tumeurs évolueraient selon le même modèle que celui proposé par Charles Darwin pour expliquer l'évolution des espèces (Greaves *et al.*, 2012 ; Shlush *et al.*, 2015).

➤ **Le modèle hiérarchique ou des cellules souches cancéreuses**

Plus récemment, un modèle hiérarchique a été proposé dans lequel une seule cellule souche est à l'origine de la tumeur (Singh *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2004). Dans ce modèle, deux types de sous-population cellulaire seraient présents dans la masse tumorale : **les cellules souches cancéreuses (CSC)** et **les cellules cancéreuses**. L'accumulation de mutations génétiques au sein d'une cellule souche ou d'un progéniteur de l'épithélium normal initierait le processus de cancérogenèse. Cette cellule mutée donne naissance à la CSC, seule moteur de la prolifération tumorale (Figure 5). Présentant les mêmes caractéristiques que les cellules souches d'un épithélium normal, la CSC va s'auto-renouveler, se différencier et subir de nouvelles mutations génétiques. Les cellules différenciées dérivant de la CSC, nommées cellules cancéreuses, constituent la masse tumorale. L'hétérogénéité tumorale résulterait de l'arrêt de la différenciation de ces cellules à différents stades.

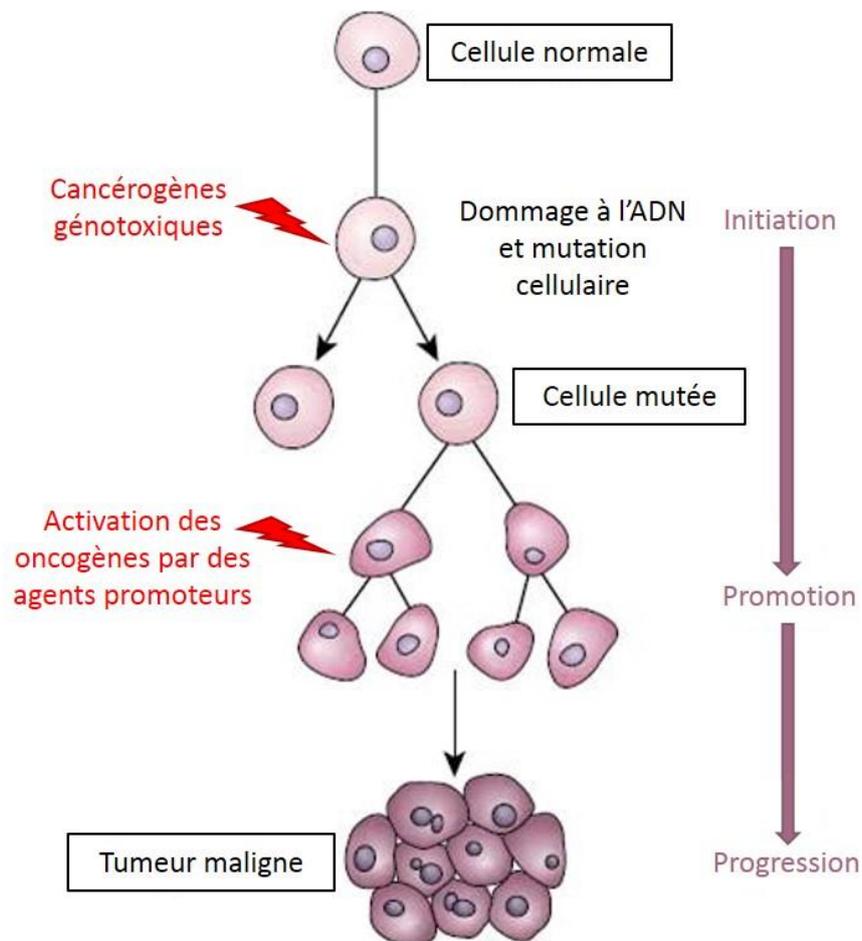


Figure 6 : Etapes du développement tumoral. La cancérogenèse est un processus multi-étapes. Elle débute par une étape d'initiation pendant laquelle une cellule normale va subir une altération génétique. Ensuite, des agents promoteurs vont stimuler la prolifération de cette cellule mutée et créer d'autres altérations génétiques : c'est la phase de promotion. Enfin, au cours de la phase de progression, les cellules provenant de la cellule mutée vont acquérir des caractéristiques cancéreuses et vont former la tumeur maligne.

L'existence d'une organisation hiérarchique a tout d'abord été démontrée en 1994 dans un type de leucémie myéloïde aiguë (LMA) (Lapidot *et al.*, 1994). Des cellules souches tumorales, isolées à partir d'un patient atteint de LMA, sont capables de reproduire la maladie chez des souris immunodéprimées, en générant tous les types de cellules présents dans la leucémie originale. En 2003, des cellules souches mammaires humaines furent isolées pour la première fois. La transplantation de ces cellules chez des souris immunodéprimées permettent la formation d'une tumeur (Al-Hajj *et al.*, 2003). Cette population distincte a pu être identifiée et isolée grâce à la présence du marqueur de surface CD44 et l'absence du marqueur CD24 (CD44⁺/CD24⁻), marqueurs de cellule souche.

Cependant, plusieurs études remettent en cause cette théorie. Par exemple, il a été récemment démontré que des cellules différenciées pouvaient se « dédifférencier » pour être converties en CSC, suggérant une plasticité importante des cellules matures (Auffinger *et al.*, 2014 ; Dahan *et al.*, 2014). Cette plasticité permet d'augmenter l'hétérogénéité intra-tumorale.

3. Mécanisme du développement tumoral

La cancérogenèse comprend une phase d'**initiation**, de **promotion** et de **progression** (Figure 6). L'**initiation** est une phase irréversible pendant laquelle l'ADN d'une cellule normale est altéré par erreur au cours de la division cellulaire ou par un cancérogène génotoxique (chimique, biologique ou physique). Pour qu'une cellule cancéreuse se forme, des agents promoteurs (agents non mutagènes) vont stimuler la prolifération de la cellule mutée : c'est la phase de **promotion**. Pendant cette phase, la cellule va acquérir d'autres mutations génétiques et se multiplier. Pendant la phase de **progression**, les cellules filles issues de la cellule mutée vont former la masse tumorale et vont acquérir des caractéristiques cancéreuses (multiplication anarchique, perte de son état différencié et grande instabilité génétique). L'évolution de la tumeur se fait localement mais peut dériver vers des caractéristiques de plus en plus malignes avec l'acquisition de capacités à créer des métastases vers un autre organe.

4. Mécanisme de formation des métastases

Le mot **métastase** vient du grec « je change de place ». En 1829, le français Joseph Claude Récamier fut le premier à proposer le terme de « métastase » dans son traité sur le cancer (revue Lebret *et al.*, 2008). Toutefois, c'est le chirurgien anglais Stephen Paget qui fut à

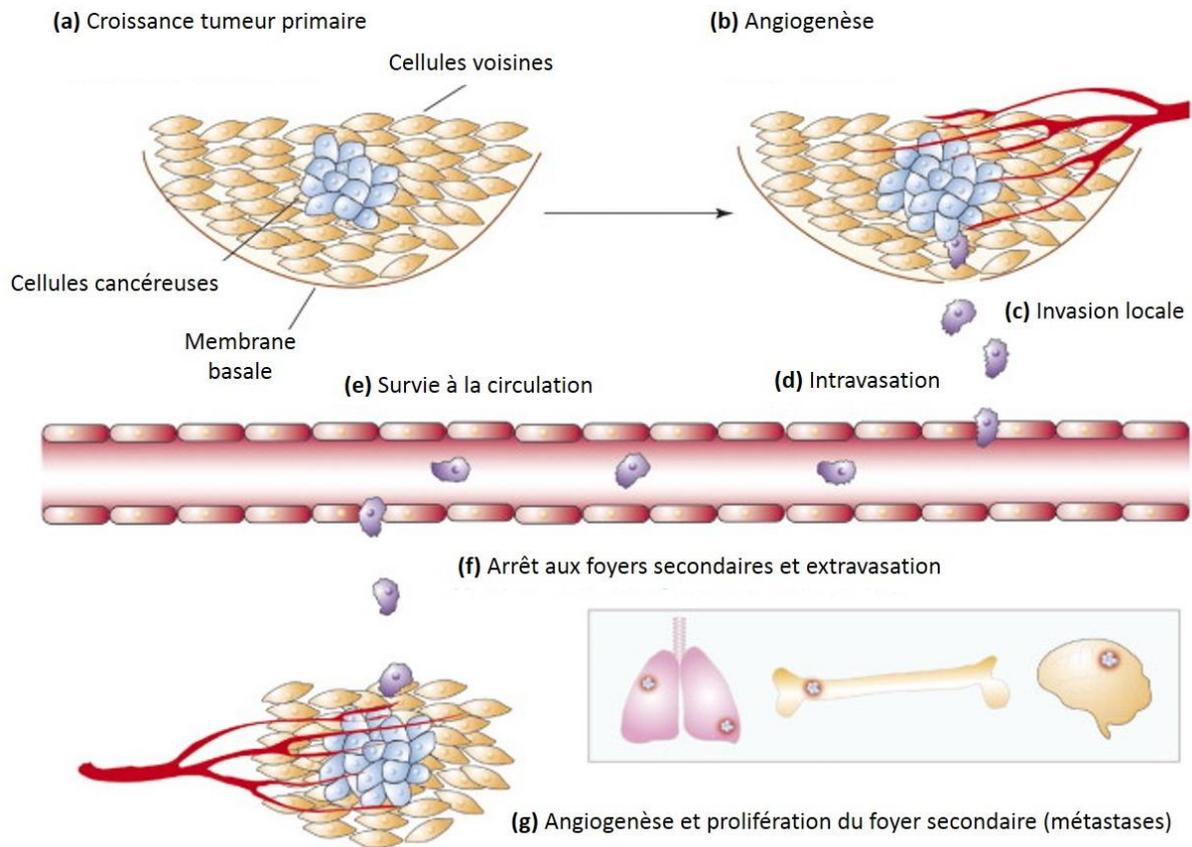


Figure 7 : Processus de la formation de métastases. La formation de métastases est le résultat d'une longue série d'évènements. La tumeur primaire commence par une phase de croissance et d'angiogenèse (a-b). Par la suite, certaines cellules cancéreuses se détachent des cellules voisines et vont envahir localement le tissu environnant en franchissant la membrane basale, la MEC et pénètrent dans la circulation sanguine ou lymphatique : c'est l'intravasation (c-d). Dans le vaisseau sanguin ou lymphatique, quelques cellules cancéreuses résistent à la pression du liquide biologique et vont échapper à la reconnaissance du système immunitaire (e). Aux foyers secondaires, les cellules cancéreuses se fixent au niveau des cellules endothéliales du capillaire cible et sortent de la circulation sanguine ou lymphatique par un processus d'extravasation (f). Dans le nouvel organe, les cellules rentrent en dormance ou bien prolifèrent dans leur nouvel environnement pour former une tumeur secondaire vascularisée, appelée métastases (g) (d'après revue Ma *et al.*, 2008).

l'origine de la compréhension des mécanismes de dissémination en proposant la théorie « de la graine et du sol » en 1889. Après l'analyse de 735 cas mortels de cancer du sein par autopsie, il découvre que le cancer du sein a tendance à métastaser au niveau d'organes particuliers. Il proposait ainsi l'hypothèse de la « graine » pour la cellule cancéreuse et du « sol » pour l'environnement tissulaire de la tumeur métastatique. Sa théorie prône que la « graine » ne peut disséminer que sur un « sol » compatible et favorable afin d'engendrer une métastase. Dans le cancer du sein, la dissémination des cellules cancéreuses peut être locale (ganglions lymphatiques axillaires) ou bien distante (os, foie, poumons, cerveau). Environ 90% des femmes décédant d'un cancer du sein présentaient des métastases distantes.

a. Les métastases : détournement d'un processus physiologique

Les métastases sont un ensemble de cellules cancéreuses issues d'un organe qui migrent vers un autre organe. La migration cellulaire est un phénomène essentiel à de nombreux processus physiologiques comme la mise en place des tissus et des organes au cours du développement embryonnaire ou la régulation de l'immunité, de l'inflammation et de la cicatrisation chez l'adulte. Une dérégulation du processus de la migration cellulaire est à l'origine de la dissémination de cellules cancéreuses. En effet, la migration cellulaire peut être réactivée dans des cellules cancéreuses au cours de la tumorigenèse. Ce processus est le résultat d'une longue série d'évènements (revue Mego *et al.*, 2010) (Figure 7). Après la croissance et l'angiogenèse de la tumeur primaire, certaines cellules tumorales se détachent de la tumeur *in situ*. Ces cellules sont capables de dégrader la membrane basale et la MEC pour envahir le tissu environnant et pénétrer dans la circulation sanguine ou lymphatique : c'est le processus d'intravasation. Dans le vaisseau sanguin ou lymphatique, quelques cellules cancéreuses résistent à la pression du liquide biologique et vont échapper à la reconnaissance du système immunitaire. Au niveau du tissu cible, les cellules cancéreuses adhèrent aux cellules endothéliales du capillaire : c'est l'extravasation. Au niveau de ces foyers secondaires, les cellules rentrent en dormance ou bien prolifèrent dans leur nouvel environnement pour former une tumeur secondaire vascularisée, appelée métastase. Pour effectuer toutes ces étapes, les cellules tumorales doivent acquérir un phénotype particulier leur permettant de se mouvoir, elles doivent subir la **transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)**.

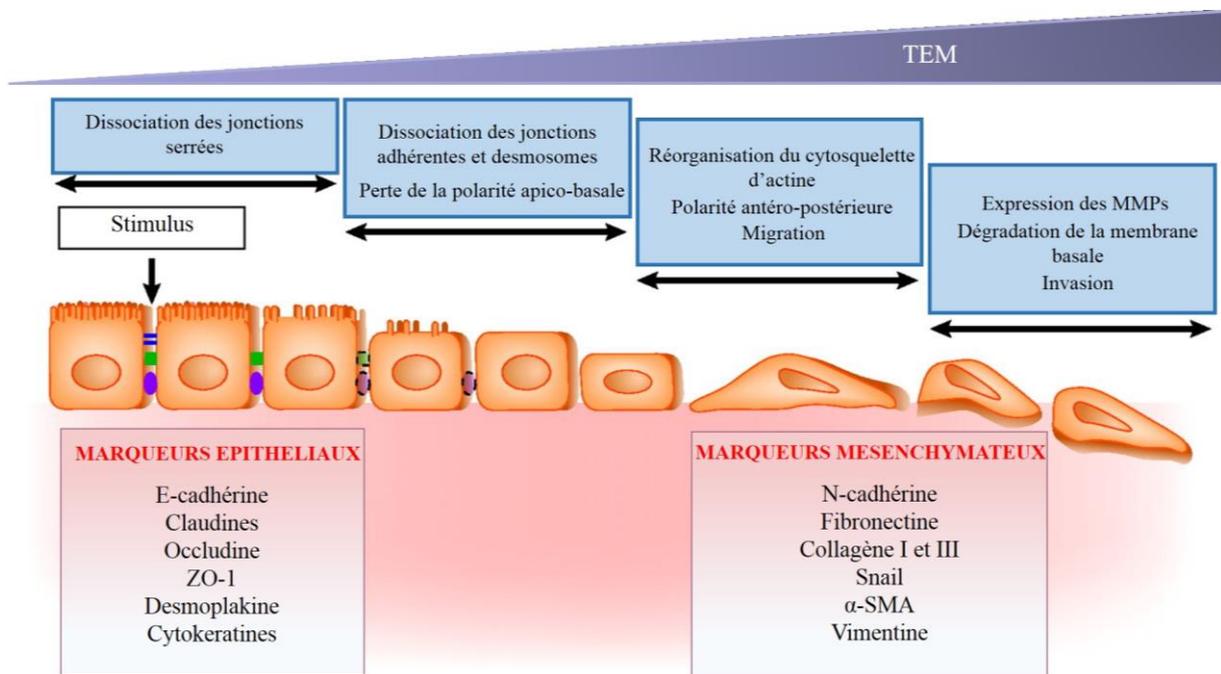


Figure 8 : Mécanisme de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Dans un épithélium, les cellules sont jointives et expriment des marqueurs épithéiaux comme des protéines des jonctions serrées (les claudines, l'occludine, ZO-1), des jonctions adhérentes (l'E-cadhérine), des desmosomes (la desmoplakine) et de leurs filaments intermédiaires (les cytokératines). Après un stimulus, la TEM débute par la dissociation des jonctions intercellulaires ce qui conduit à la perte de la polarité apico-basale. Petit à petit, les cellules vont exprimer des marqueurs mésenchymateux comme des marqueurs de surface (N-cadhérine), du cytosquelette (vimentine et α -SMA (alpha Smooth Muscle Actin)) et des facteurs de transcription (Snail) au détriment des marqueurs épithéiaux. La TEM est également associée à une augmentation de l'expression de protéines de la MEC, la fibronectine et les collagènes de type I et III. En parallèle, le cytosquelette d'actine se réorganise et la cellule présente une polarité antéro-postérieure. Ces phénomènes permettent une modification de la morphologie de la cellule nécessaire à la migration cellulaire. Enfin, l'augmentation de l'expression d'enzymes protéolytiques comme les MMPs permettent à la cellule de dégrader la membrane basale et la MEC environnante afin d'envahir un nouvel organe cible (d'après revue Angadi *et al.*, 2015).

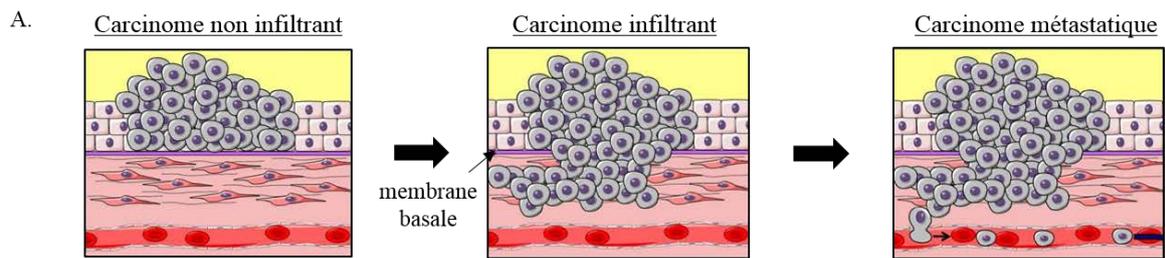
Facteurs SNAIL: Snail1 et Snail2		Facteurs bHLH: Twist1 et Twist2		Facteurs ZEB: Zeb1 et Zeb2	
Repression	Activation	Repression	Activation	Repression	Activation
Claudins	Fibronectin	Claudins	Fibronectin	ZO1	Vitronectin
Occludin	Vitronectin	Occludin	Vitronectin	E-cadherin	N-cadherin
E-cadherin	N-cadherin	E-cadherin	N-cadherin	Plakophilin	MMPs
Desmoplakin	Collagen	Desmoplakin	SPARC	Crumbs3	
Plakophilin	MMPs	Plakoglobin	α 5 integrin		
Crumbs3	TWIST and IDs				
PALS1	ZEB1 and ZEB2				
PATJ					
Cytokeratins					

Figure 9 : Facteurs de transcription impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Il existe trois familles de facteurs de transcription : la famille **Snail** comprenant Snail 1 et Snail 2, la famille **bHLH** (basic Helix-Loop-Helix) constituée de Twist 1 et Twist 2 et la famille **Zeb** (Zinc-finger E-box-binding) composée de Zeb 1 et Zeb 2. Ils vont réprimer l'expression de marqueurs épithélias et vont activer à l'inverse des marqueurs mésenchymateux. E-cadherin: epithelial cadherin; ID: inhibitor of differentiation; MMP: matrix metalloproteinase; N-cadherin: neural cadherin; PALS1: protein associated with Lin-7 1; PATJ: PALS1-associated tight-junction protein; SPARC: secreted protein acidic and rich in Cys; ZO1: zonula occludens 1 (d'après revue Lamouille *et al.*, 2014).

b. La transition épithélio-mésenchymateuse

La TEM est un processus cellulaire réversible permettant aux cellules de passer d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux (revue Lamouille *et al.*, 2014 ; revue Nieto *et al.*, 2016) (Figure 8). Ce phénomène complexe permet aux cellules cancéreuses de se détacher de la tumeur primaire et d'envahir un autre organe. La TEM est un phénomène fondamental qui se produit au cours du développement embryonnaire et qui est réactivé lors de la progression tumorale.

Dans un épithélium, les cellules épithéliales sont jointives entre elles et expriment des marqueurs épithéliaux comme des protéines des jonctions serrées (les claudines, l'occludine, ZO-1), des jonctions adhérentes (l'E-cadhérine), des desmosomes (la desmoplakine) et de leurs filaments intermédiaires (les cytokératines) (Figure 8). Ces cellules présentent une polarité apico-basale, une polarisation du cytosquelette d'actine et reposent sur une membrane basale. Suite à un stimulus comme l'hypoxie, des facteurs de croissance ou des cytokines, des facteurs de transcription de la voie canonique de la TEM sont activés. Les facteurs de transcription les plus importants sont ceux de la famille **Snail**, Snail 1 et Snail 2/Slug, de la famille **bHLH** (basic Helix-Loop-Helix), Twist 1 et Twist 2 et de la famille **Zeb** (Zinc-finger E-box-binding), Zeb 1 et Zeb 2 (Figure 9). Ces facteurs de transcription vont inhiber l'expression de marqueurs protéiques associés à un phénotype épithélial et activer ceux associés à un phénotype mésenchymateux. Par exemple, les facteurs de transcription de la famille Snail sont bien connus pour réprimer l'expression de l'E-cadhérine et de la claudine 1 par une fixation sur leur promoteur au niveau d'un motif « boîte E » (revue Peinado *et al.*, 2007 ; Martínez-Estrada *et al.*, 2006). Ces phénomènes entraînent la dissociation des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes ainsi qu'une perte de la polarité apico-basale (Figure 8). Petit à petit, les cellules vont exprimer des marqueurs mésenchymateux comme des marqueurs de surface (N-cadhérine) et du cytosquelette (vimentine et α -SMA (alpha Smooth Muscle Actin)) au détriment des marqueurs épithéliaux. La TEM est également associée à une augmentation de l'expression de protéines de la MEC comme la fibronectine et les collagènes de type I et III. En parallèle, le cytosquelette d'actine se réorganise et la cellule présente une polarité antéro-postérieure. Ces phénomènes permettent une modification de la morphologie de la cellule nécessaire à la migration cellulaire. Enfin, l'augmentation de l'expression d'enzymes protéolytiques comme les métalloprotéinase



B.

Stade	Description
0	Tis : carcinome in situ N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional M0 : absence de métastases à distance
I	T1 : tumeur ≤ 2 cm N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional M0 : absence de métastases à distance
II	T0 à T3 : pas de signe de la tumeur primitive à tumeur > 5 cm N0 à N1 : absence d'envahissement ganglionnaire régional ou envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires M0 : absence de métastases à distance
III	T0 à T4 : pas de signe de la tumeur à de toutes tailles avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau N0 à N3 : absence d'envahissement ganglionnaire régional à envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires ou des ganglions mammaires internes homolatéraux M0 : absence de métastases à distance
IV	T0 à T4 : pas de signe de la tumeur à de toutes tailles avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau N0 à N3 : absence d'envahissement ganglionnaire régional à envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires ou des ganglions mammaires internes homolatéraux M1 : présence de métastases à distance

C.

Grade	Score total	Description
I (bas)	3 à 5	Cellules bien différenciées, architecture préservée, faible hétérogénéité Noyau de petite taille avec contour uniforme Activité mitotique faible
II (intermédiaire)	6 ou 7	Cellules modérément différenciées Noyau de taille petite à moyenne avec contour uniforme Activité mitotique modérée
III (haut)	8 ou 9	Cellules indifférenciées, perte de l'architecture normale, hétérogénéité élevée Gros noyau avec forme variable Activité mitotique élevée

Figure 10 : Classification clinique et histologique des tumeurs mammaires. A. Classification histologique standard. B. Classification TNM (Tumor Node Metastasis) par stade. C. Classification par grade.

matricielle (MMPs) permettent à la cellule de dégrader la membrane basale et la MEC environnante afin d'envahir un nouvel organe cible.

III. Hétérogénéité des cancers du sein

Il n'existe pas un cancer du sein mais des cancers du sein. Il est donc nécessaire de mettre en place un traitement spécifique et adapté à chaque patiente. L'examen d'imagerie (mammographie, échographie) associé à un prélèvement anatomopathologique d'un fragment du tissu mammaire est nécessaire pour caractériser au mieux le type de cancer de chaque patiente. A l'heure actuelle, il existe plusieurs classifications utilisées dans ce but.

1. Classification clinique et histologique

a. Classification histologique standard

Les cancers du sein les plus fréquents sont les adénocarcinomes (95%), c'est-à-dire qui se développent à partir des cellules épithéliales (=carcinome) de la glande mammaire (=adéno). La tumeur se développe la plupart du temps au niveau des canaux (carcinome canalaire) et plus rarement au niveau des lobules (carcinome lobulaire). On distingue deux types de cancers : les carcinomes **non infiltrants** (ou *in situ*) et les carcinomes **infiltrants** (ou **invasifs**) (Figure 10A).

➤ Carcinomes non infiltrants (*in situ*)

Le carcinome non infiltrant est caractérisé par une localisation bien délimitée de la tumeur sans franchissement de la membrane basale, donc par un non-envahissement du tissu conjonctif voisin (Figure 10A). Il représente 25% des cancers du sein dont 90% d'origine canalaire. Dépisté assez tôt, ce type de cancer est de bon pronostic. Si aucune prise en charge thérapeutique n'est effectuée, la tumeur peut infiltrer le tissu qui entoure les canaux et les lobules.

➤ Carcinomes infiltrants (invasifs)

Les carcinomes infiltrants ou invasifs représentent la majorité des cancers du sein (75%). Le carcinome canalaire infiltrant est le type de cancer le plus fréquent des cancers du sein. Il est caractérisé par une mauvaise délimitation de la masse tumorale, par le passage de la membrane basale et l'envahissement des tissus voisins (Figure 10A). Les cellules tumorales

peuvent se propager vers les ganglions lymphatiques ou vers d'autres organes. Les ganglions les plus souvent atteints sont les ganglions axillaires qui se trouvent sous le bras et au niveau des aisselles. Le carcinome invasif peut également évoluer jusqu'au stade final de l'oncogenèse, qui est le cancer métastatique (Figure 10A).

En France, sur la période 2009-2012, 59% des tumeurs diagnostiquées ont été estimées à un stade local (non infiltrant), 29% à un stade régional (infiltrant) et 13% à un stade avancé (métastatique) (Institut National du Cancer).

b. Classification par stade

Depuis 1953, la classification TNM (Tumor Nodes Metastasis) de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) est la plus reconnue. Elle est universelle et permet de déterminer l'étendue de la maladie par différents stades (Figure 10B). Elle se base sur trois critères : **la taille et l'infiltration de la tumeur (T), l'invasion ou non des ganglions lymphatiques, le nombre et leur emplacement (N) et la présence ou non de métastases (M)**. Chaque critère est évalué et associé à un chiffre dont la valeur augmente avec la gravité. Les tumeurs sont ensuite classées par stade d'évolution allant du stade 0 qui correspond à un cancer localisé (non invasif) jusqu'au stade IV qui désigne un cancer métastatique, en passant par les stades I, II et III correspondant à une invasion locale et/ou une atteinte ganglionnaire satellite plus ou moins importante. La lettre X est utilisée lorsque la détermination est impossible.

c. Classification par grade

Selon l'OMS, un autre système de classification par grade permet de déterminer l'agressivité de la tumeur basée sur trois critères morphologiques des cellules tumorales : **l'apparence des cellules cancéreuses, la forme du noyau et le nombre de cellules en division**. Le pathologiste assigne à chaque critère un score de 1 à 3. L'addition des chiffres obtenus pour chacun des trois critères définit le grade de la tumeur (Figure 10C). Une tumeur de grade I (bas grade) correspond aux tumeurs les moins agressives, bien différenciées, qui ne semblent pas se développer rapidement, ni se propager. Les tumeurs de grade III (haut grade) correspondent aux plus agressives, peu différenciées ou indifférenciées. Elles ont tendance à se développer rapidement et sont susceptibles de se propager.

Ces différentes classifications ne sont pas suffisantes pour choisir un traitement optimal et personnalisé ciblant spécifiquement la tumeur du patient. En effet, l'hétérogénéité d'une

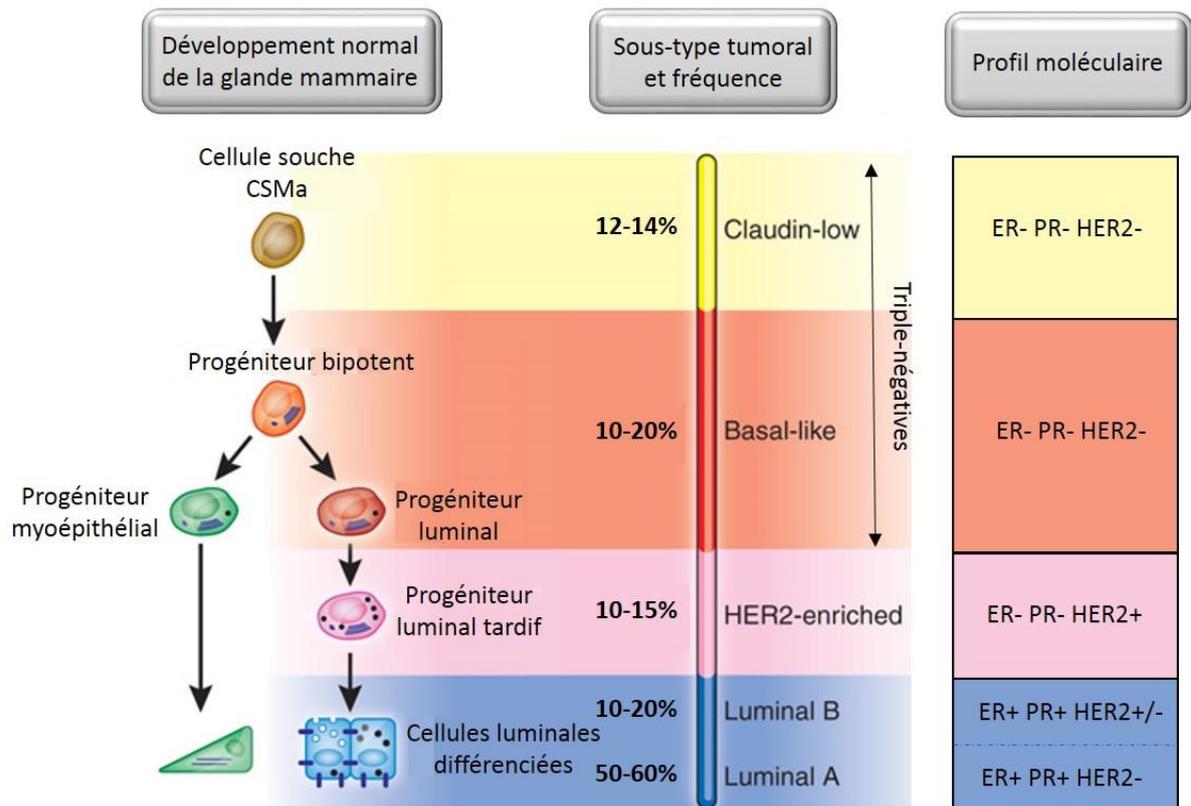


Figure 11 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires et leur origine cellulaire. Depuis les années 2000, les recherches scientifiques ont permis la classification des cancers du sein en 6 sous-types en fonction de l'expression de trois principaux marqueurs moléculaires : le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2). La fréquence des sous-types « luminal A », « luminal B », « HER2-enriched », « basal-like » et « claudin-low » est indiquée. Le sous-type «normal-like» n'apparaît pas sur ce schéma. Les caractéristiques moléculaires et phénotypiques de chaque sous-type tumoral a permis d'établir un lien avec l'origine cellulaire de leur développement tumoral (d'après revue Perou *et al.*, 2010).

tumeur ne varie pas seulement par ses caractéristiques cliniques et morphologiques mais également par ses caractéristiques moléculaires.

2. Classification moléculaire

Une classification moléculaire a été établie par Perou et ses collègues en 2000. Elle repose sur l'étude de l'expression de 8102 gènes chez 42 patientes (Perou *et al.*, 2000, Sorlie *et al.*, 2001). Au fil des années, cette étude a été validée, complétée et affinée par la même équipe sur un nombre plus important de tumeurs, permettant de classer les cancers du sein en 6 sous-types différents : « **luminal A** », « **luminal B** », « **HER2-enriched** », « **basal-like** », « **claudin-low** » et « **normal-like** » (Sorlie *et al.*, 2003, Herschkowitz *et al.*, 2007 ; Prat *et al.*, 2010) (Figure 11). Cette classification est principalement basée sur l'expression de trois récepteurs. Il s'agit des récepteurs aux œstrogènes (ER α), à la progestérone (PR) et le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2).

a. Tumeurs « luminal A et B »

Les tumeurs sont appelées « luminal » car elles ont le même profil d'expression génique que les **cellules lumineales différenciées** de la lumière des canaux ou des lobules du tissu mammaire normal (Figure 11). Elles se caractérisent par l'expression des récepteurs ER α et PR.

➤ « Luminal A »

Les tumeurs « luminal A » sont les plus fréquentes et représentent 50 à 60% des cancers du sein (Figure 11). Elles se caractérisent par l'absence d'expression du récepteur HER2. Ces types de tumeurs sont de bon pronostic avec généralement un grade de type I et des cellules bien différenciées.

➤ « Luminal B »

Les tumeurs « luminal B » expriment en général le récepteur HER2 et représentent 10 à 20% des tumeurs mammaires (Figure 11). Elles ont un phénotype plus agressif que les « luminal A » avec un haut grade histologique, un fort niveau prolifératif et un moins bon pronostic.

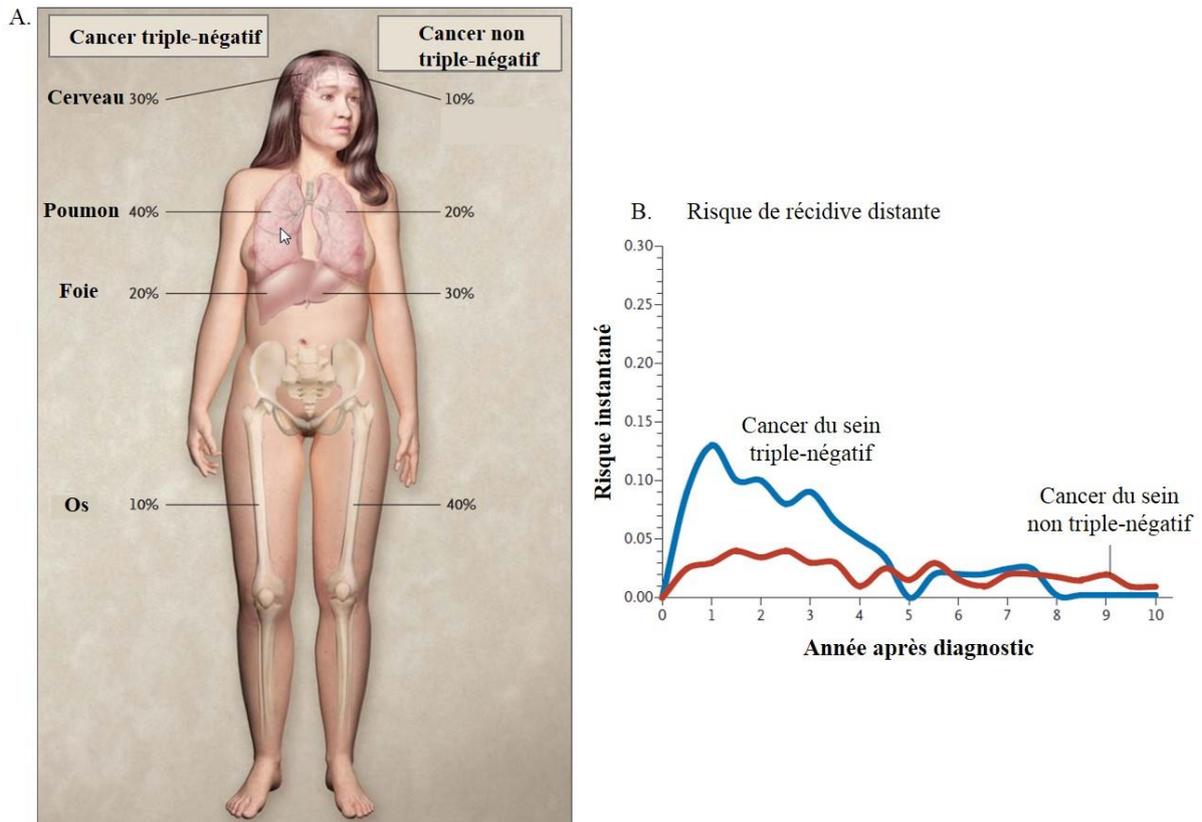


Figure 12 : Principaux sites métastatiques des tumeurs triple-négatives et risque de récurrence distante comparé aux tumeurs non triple-négatives. (A) Les patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif sont plus sujettes à une rechute métastatique au niveau du cerveau et des poumons, comparés aux cancers du sein non triple-négatifs. (B) Les patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif ont un haut risque de récurrence distante les 5 premières années après diagnostic, comparés aux patientes avec un cancer du sein non triple-négatif (d'après Foulkes *et al.*, 2010).

b. Tumeurs « HER2-enriched »

Le sous-type tumoral « HER2-enriched » est diagnostiqué dans 10 à 15% des cas et présente une amplification du gène HER2, qui a pour conséquence une stimulation de la prolifération cellulaire. Selon le profil génétique de ce type de tumeur, son origine serait la mutation génétique d'un **progéniteur luminal tardif** (Figure 11). Ces tumeurs sont de grade élevé (II et III) et sont donc de mauvais pronostic.

c. Tumeurs triple-négatives

Ce profil correspond à des tumeurs qui n'expriment aucun des 3 récepteurs de la classification moléculaire (Figure 11). Ce type de cancer se développe chez environ 10 à 30% des patientes et est souvent associé à des patientes plus jeunes que les autres types tumoraux. Les tumeurs triple-négatives sont plus agressives que les cancers du sein non triple-négatifs avec un haut risque de métastases viscérales (poumon : 40% et foie : 20%) et du cerveau (30%) (Figure 12A). Elles présentent aussi un haut risque de récurrence les 5 premières années après diagnostic et une mauvaise survie globale comparé au cancer du sein non triple-négatif (Figure 12B) (Dent *et al.*, 2009 ; Foulkes *et al.*, 2010). L'agressivité de ce type de tumeur pourrait s'expliquer par l'origine de son développement tumoral. Selon leur profil génétique, les tumeurs triple-négatives auraient pour origine une **cellule souche mammaire (CSMa)** ou bien un **progéniteur précoce luminal ou myoépithélial** (Figure 11).

➤ **Classification de Perou et ses collaborateurs (2000)**

Selon Perou et ses collaborateurs, les cancers du sein triple-négatifs sont divisés en 3 sous-types : « **normal-like** », « **basal-like** » et « **claudin-low** ». Cependant, les tumeurs « **normal-like** » ressemblent beaucoup au tissu mammaire normal. Ce profil tumoral est remis en cause et serait un artéfact provenant d'une contamination de l'échantillon tumoral par du tissu mammaire normal.

Le sous-type de tumeur « **basal-like** » représente 10 à 20% des cancers du sein. Il est caractérisé par le même profil d'expression génique que les cellules myoépithéliales du tissu mammaire normal, mais exprime également des gènes caractéristiques des cellules luminales (Figure 11). Beaucoup de ces tumeurs sont mutées au niveau du gène suppresseur de tumeur *TP53*, ce qui expliquerait leur agressivité et leur mauvais pronostic (Sorlie *et al.*, 2001). De

Sous-types triple-négatifs	Lignées cellulaires	Voies de signalisation « driver »
Basal-like	HCC2157	-Réponse aux dommages à l'ADN -Cycle cellulaire
	HCC1599	
	HCC1937	
	HCC1143	
	HCC3153	
	MDA-MB-468	
	HCC38	
	SUM149PT	
	CAL-851	
	HCC70	
	HCC1806	
	HDQ-P1	
Immune-enriched	HCC1187	-Réponse immunitaire
	DU4475	
Mesenchymal	BT-549	-EMT - Voie de signalisation Wnt -Voie de signalisation Notch
	CAL-51	
	CAL-120	
	HS578T	
	MDA-MB-157	
	SUM159PT	
	MDA-MB-436	
	MDA-MB-231	
LAR	MDA-MB-453	-Récepteur aux androgènes
	SUM185PE	
	HCC2185	
	CAL-148	
	MFEM-223	
Inclassifié	HCC1395	-
	BT20	
	SW527	

Tableau 3 : Classification des tumeurs triple-négatives. La classification des tumeurs triple-négatives décrit 4 sous-groupes en fonction de leur profil moléculaire. L'analyse de leur profil d'expression génique a permis d'identifier les lignées cellulaires cancéreuses mammaires correspondantes à ces sous-types, à partir desquelles des voies de signalisation « driver » pour chaque sous-type tumoral ont été établies (d'après Lehmann *et al.*, 2011 et revue Ahn *et al.*, 2016).

plus, les tumeurs d'origine génétique concernant les mutations du gène *BRCA1* sont fortement associées à ce type de cancer (Sorlie *et al.*, 2003).

Dans 12 à 14% des cas, le cancer du sein est dit « **claudin-low** » (Figure 11). Ces tumeurs sont caractérisées par l'expression très faible des gènes impliqués dans l'adhérence intercellulaire tel que les claudines 3, 4 et 7, la cinguline, l'occludine et l'E-cadhérine. Ces tumeurs expriment fortement les gènes associés à la TEM, à la réponse immunitaire et présentent une signature de cellules souches cancéreuses CD44⁺/CD24^{-low} (Herschkowitz *et al.*, 2007 ; Creighton *et al.*, 2009 ; Prat *et al.*, 2010). Les lignées cellulaires MDA-MB-231 et Hs578T sont identifiées comme étant de sous-type « claudin-low » (Prat *et al.*, 2010). De plus, 1/3 des tumeurs triple-négatives forment un sous-type très agressif correspondant à des cancers du sein dits « métaplasiques » ou « carcinosarcomes » qui comportent à la fois des cellules de type épithélial et mésenchymateux. Ces dernières sont caractérisées par la présence de marqueurs de cellules souches cancéreuses et la perte d'expression des claudines 1, 3, 4 et 7 (Hennessy *et al.*, 2009 ; Gerhard *et al.*, 2012). Récemment, Lu et ses collaborateurs suggèrent une redéfinition du sous-type « claudin-low » par une sous-expression des claudines 1, 3, 4, 7 et 8 (Lu *et al.*, 2013).

➤ **Classification de Ahn et ses collaborateurs (2016)**

Depuis 2011, différentes équipes travaillent sur l'affinement de la classification des tumeurs mammaires triple-négatives. La comparaison de trois classifications a permis de classer les tumeurs triple-négatives en 4 sous-groupes : « **basal-like** », « **immune-enriched** », « **mesenchymal** » et « **luminal androgen receptor (LAR)** » (revue Ahn *et al.*, 2016). Cette classification permet de regrouper ces tumeurs en fonction des voies de signalisation « driver », c'est à dire qui sont responsables à elles seules de la progression de la tumeur (Tableau 3) (Lehmann *et al.*, 2011).

Le sous-type « **basal-like** » est caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans le cycle cellulaire, leur permettant de stimuler la prolifération cellulaire.

Le sous-type de tumeur « **immune-enriched** » est caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, suggérant une infiltration lymphocytaire dans le tissu stromal.

Les tumeurs de sous-type « **mesenchymal** » expriment des groupes de gènes associés à la motilité cellulaire, à l'EMT et à des voies de signalisation activées par des facteurs de croissance. Les lignées MDA-MB-231 et Hs578T sont de type « mesenchymal » (Tableau 3) (Lehmann *et al.*, 2011). Ce sous-type « mesenchymal » présente également une faible expression des claudines 3, 4 et 7 tout comme le sous-type « claudin-low » de Perou et ses collaborateurs. Ce sous-type « mesenchymal » et le sous-type « claudin-low » de la classification de l'équipe de Perou représenteraient donc le même groupe de tumeur (Lehmann *et al.*, 2011).

Le sous-type « **LAR** » est le groupe le plus distinct avec l'activation des voies de signalisation des androgènes.

IV. Mise en place d'une stratégie thérapeutique

La mise en place d'une stratégie thérapeutique dépend du type de cancer, de son stade d'évolution et de la classification moléculaire de la tumeur avec principalement la présence ou non des marqueurs ER α , PR et HER2.

1. Les traitements à visée locale

a. La chirurgie

La chirurgie reste l'acte médical le plus pratiqué face au cancer du sein. Afin d'éviter la propagation de la tumeur, une mastectomie partielle ou totale du sein est pratiquée en fonction de la taille de la tumeur et de son infiltration. La mastectomie partielle est définie comme une chirurgie conservatrice car le chirurgien enlève seulement la masse tumorale avec un peu de tissu sain environnant ou marge d'exérèse. La mastectomie totale consiste à enlever le sein entier lorsque la masse tumorale est trop importante et/ou lorsqu'il s'agit d'une tumeur infiltrante. En cas de suspicion d'infiltration ganglionnaire, l'acte chirurgical est accompagné d'un curage des ganglions lymphatiques situés au creux de l'aisselle (ganglions axillaires). Ce dernier consiste à enlever toute la chaîne ganglionnaire. La chirurgie est souvent associée à la radiothérapie ou bien à la chimiothérapie.

b. La radiothérapie

La radiothérapie permet d'éradiquer les cellules cancéreuses mammaires résiduelles et donc de diminuer le risque de récurrence locale. Elle utilise des rayonnements ionisants pour détruire

les cellules cancéreuses en les empêchant de se multiplier. Ce traitement local permet de cibler plus précisément le tissu tumoral tout en épargnant le tissu sain alentour. Deux types de radiothérapie existent : la radiothérapie externe, la plus fréquente, et la curiethérapie. La radiothérapie externe consiste à une irradiation transcutanée de la zone à traiter alors que la curiethérapie nécessite un matériel radioactif, l'iridium 192, placé à l'intérieur du corps à l'aide de cathéters. Pour le cancer du sein, quatre zones du corps peuvent être traitées : la glande mammaire (après chirurgie conservatrice), le lit tumoral (c'est-à-dire la région du sein où se trouvait la tumeur avant l'intervention chirurgicale), la paroi thoracique (après chirurgie conservatrice) ou les ganglions lymphatiques.

2. Les traitements à visée systémique : la chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique qui occupe une place centrale dans le traitement des cancers du sein infiltrants et notamment les cancers métastatiques. Cette thérapie peut aussi bien être administrée avant la chirurgie (chimiothérapie néo-adjuvante) afin de diminuer la taille de la tumeur ou après chirurgie (chimiothérapie adjuvante) afin de baisser le risque de récurrence en éradiquant les cellules cancéreuses résiduelles. Il existe plusieurs médicaments de chimiothérapie qui présentent un mécanisme d'action différent.

a. Interaction directe avec l'ADN

➤ Les agents alkylants de l'ADN

Les agents alkylants possèdent un groupement chimique qui leur permet de former des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne ADN inhibant ainsi la réplication et la transcription. Les agents alkylants les plus prescrits sont les sels de platine tel que le **cisplatine** ou encore une molécule de la famille des moutardes azotées, le **cyclophosphamide**.

➤ Les anthracyclines

Les anthracyclines s'intercalent entre les paires de bases azotées de l'ADN empêchant la progression des ADN et ARN polymérase, ce qui induit une inhibition de la réplication et de la transcription. Elles inhibent également l'action des ADN topoisomérases, produisant des cassures mono- et bicaténares. La **doxorubicine** est la molécule phare de cette classe de médicaments. Une autre anthracycline couramment utilisée est l'**épirubicine**.

Traitement	Posologie
CMF	Cyclophosphamide 500 mg/m ² Méthotrexate 40 mg/m ² 5-FU 600 mg/m ²
FEC	Cyclophosphamide 500 mg/m ² 5-FU 500 mg/m ² Epirubicine 100 mg/m ²
FAC	5-fluorouracil 500 mg/m ² Doxorubicine 50 mg/m ² Cyclophosphamide 100 mg/m ²
FUN	Epirubicine 30 mg/m ² 5-FU 750 mg/m ²
FT	Docétaxel 75 mg/m ² 5-FU 500 mg/m ²
TAC	Docétaxel 75 mg/m ² Doxorubicine 50 mg/m ² Cyclophosphamide 500 mg/m ²

Tableau 4 : Liste des principales combinaisons d'agents de chimiothérapie utilisées pour le traitement des cancers du sein. Les concentrations utilisées en clinique sont indiquées en mg/m².

b. Inhibition de la synthèse de l'ADN : les anti-métabolites

Les anti-métabolites perturbent la production de l'ADN en bloquant la synthèse des acides nucléiques, soit en se substituant aux bases azotées comme le **5-fluorouracile (5-FU)** ou en inhibant les protéines nécessaires au métabolisme des bases puriques et pyrimidiques comme le **méthotrexate**.

c. Interaction directe avec des protéines : les anti-tubulines

Les anti-tubulines interagissent avec les microtubules en bloquant leur système de polymérisation comme les alcaloïdes avec la **vinblastine** ou en stimulant leur polymérisation comme les taxanes avec le **paclitaxel** et le **docetaxel**.

Un protocole de poly-chimiothérapie est souvent mis en place afin d'augmenter l'efficacité du traitement et empêcher la résistance des cellules cancéreuses. Les principales combinaisons d'agents de chimiothérapie utilisées pour le cancer du sein sont référencées dans le [Tableau 4](#). En général, les protocoles sont administrés en 4 à 6 séances, espacées de 21 jours. Le traitement peut être administré par perfusion ou par voie orale et s'effectue sur une période de 3 à 6 mois. Ces traitements conduisent tous à la mort cellulaire. Ils agissent sur les mécanismes de la division cellulaire donc ciblent préférentiellement les cellules à fort pouvoir prolifératif comme les cellules cancéreuses. Cependant, les cellules à division rapide comme celles du bulbe pileux, de la régénération de l'épithélium intestinal ou les cellules sanguines sont également affectées par les agents de chimiothérapie.

3. Les traitements ciblés

La thérapie ciblée est un traitement personnalisé qui agit spécifiquement sur les cellules cancéreuses en sélectionnant une caractéristique propre à ces dernières.

a. Hormonothérapie

L'hormonothérapie est un traitement systémique qui est souvent associée à la chimiothérapie et à la chirurgie. C'est la première thérapie ciblée mise en place, réservée pour les patientes ayant un type de tumeur hormono-dépendante, exprimant les récepteurs ER α et PR. Les hormones naturelles produites par les ovaires de la patiente vont stimuler la croissance de la tumeur en se fixant sur ces récepteurs. Cette thérapie consiste donc à priver les cellules cancéreuses en œstrogènes, l'hormone principale incriminée dans le développement du cancer

du sein hormono-sensible. Il existe plusieurs méthodes afin de pallier à cette hormono-dépendance.

➤ **Non médicamenteuse**

La méthode la plus ancienne, non médicamenteuse, consiste à effectuer une ablation ou une irradiation des ovaires.

➤ **Médicamenteuse**

Des alternatives à base de médicaments ont été développées, administrables en comprimés par voie orale, en injection intra-musculaire ou sous-cutanée. Ces médicaments ont révolutionné le traitement des tumeurs hormono-dépendantes et ont diminué significativement le taux de mortalité des patients (Jensen *et al.*, 2003 ; revue Johnston *et al.*, 2003).

- **Les anti-oestrogènes**

Le traitement le plus connu est le **tamoxifène** qui a été développé dans les années 1970. Il fait partie de la famille des anti-œstrogènes et empêche la fixation et l'action des œstrogènes sur leur récepteur ER α en prenant leur place par compétition. Il existe d'autres anti-œstrogènes qui peuvent en plus détruire le récepteur ER α , comme le **fulvestrant**. Ce type de traitement est le plus souvent proposé aux femmes non ménopausées comme premier traitement pour une durée de 5 ans.

- **Les inhibiteurs de l'aromatase**

Les inhibiteurs de l'aromatase, tel que le **létrozole**, l'**anastrozole** et l'**exémestane**, permettent de bloquer la synthèse des œstrogènes en inhibant l'aromatase, l'enzyme responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes. Depuis les années 1990, ces inhibiteurs sont proposés comme traitement de première ligne aux femmes ménopausées pour une durée de 5 ans ou 2 ans suivi par un traitement au tamoxifène (pour un total de 5 ans de thérapie hormonale). En effet, malgré l'arrêt du fonctionnement ovarien, le corps de la femme ménopausée continue à produire des œstrogènes par les glandes surrénales.

Molécule (nom commercial)	Cible	Type de cancer	Indications thérapeutiques (association)	Date d'enregistrement	
Trastuzumab (Herceptin)	HER2	métastatique, HER2+	monothérapie ou avec le paclitaxel / docetaxel / inhibiteur de l'aromatase	2000 / 2005 / 2007	
		précoce, HER2+	monothérapie / paclitaxel, docetaxel ou docetaxel et carboplatine	2006 / 2011	
Trastuzumab emtansine (Kadcyla)		métastatique ou localement avancé non résecable, HER2+	monothérapie	2013	
Pertuzumab (Perjeta)		métastatique ou localement récidivant non résecable, HER2+	trastuzumab et docétaxel	2013	
		localement avancé, inflammatoire ou à un stade précoce avec un risque élevé de récurrence, HER2+	trastuzumab et chimiothérapie	2015	
Lapatinib (Tyverb)		HER2+	capécitabine / inhibiteur de l'aromatase / trastuzumab	2008 / 2010 / 2013	
Bevacizumab (Avastin)		VEGF	métastatique	paclitaxel / capécitabine	2007 / 2011
Everolimus (Afinitor)		m-TOR	avancé, ER+, PR+, HER2-	exémestane	2012
Palbociclib (IBRANCE)	CDK4/6	localement avancé/métastatique, ER+, PR+, HER2-	fulvestrant ou inhibiteur de l'aromatase	2016	

Tableau 5 : Liste des thérapies ciblées disposant d'une AMM pour le traitement des cancers du sein en France. Le nom commercial de la molécule, la cible thérapeutique, le type de cancer ciblé, les indications thérapeutiques et la date d'enregistrement du traitement sont indiqués dans le tableau ci-contre (d'après Institut National Du Cancer 2015-2016).

- **Les analogues de la LH-RH**

Les analogues de la LH-RH suppriment la production des hormones par les ovaires chez la femme non ménopausée. La LH-RH est une hormone produite par l'hypothalamus, qui va stimuler l'hypophyse qui sécrète à son tour deux hormones, la LH (Luteinizing Hormone) et la FSH (Follicle Stimulating Hormone). Cette dernière permet quant à elle la sécrétion d'œstrogènes par stimulation des ovaires. Les analogues de la LH-RH vont donc hyperstimuler l'hypophyse qui va finir par devenir insensible à tous stimuli. A terme, la production d'œstrogènes est bloquée. Ce traitement est administré au cas par cas pour une durée de 3 à 5 ans.

b. Thérapie ciblant le récepteur HER2

Le développement de thérapie visant la voie de signalisation HER2 a permis d'améliorer significativement le pronostic des patientes avec une tumeur « HER2-enriched » (Dawood *et al.*, 2010 ; revue Di Modica *et al.*, 2017). Depuis 1998, le traitement de référence est un anticorps monoclonal, le **trastuzumab** (Tableau 5). Il empêche le fonctionnement du récepteur HER2 par liaison de ce dernier bloquant ainsi la prolifération cellulaire. Le trastuzumab est administré seul ou en association dans le cadre d'un cancer « HER2-enriched » de tous grade (Tableau 5). Plus récemment, un autre anticorps monoclonal, le **pertuzumab**, est utilisé en association avec le trastuzumab et avec des agents de chimiothérapie. En cas de résistance, le **lapatinib**, un inhibiteur des domaines intracellulaires de la tyrosine kinase du récepteur HER2 est utilisé (Tableau 5). Il empêche sa phosphorylation et son activation aboutissant à un blocage de la cascade de signalisation. Le lapatinib est utilisé en association avec l'anti-métabolite, la capécitabine, avec un inhibiteur de l'aromatase ou avec le trastuzumab.

c. Thérapie ciblant le récepteur VEGF

L'angiogenèse est un processus clé pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Afin de produire de nouveaux vaisseaux sanguins et irriguer la tumeur, les facteurs de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) vont se fixer sur leur récepteur VEGFR afin d'activer les voies de signalisation impliquées dans ce processus. Les thérapies qui ont été récemment développées vont provoquer l'inhibition de la néo-vascularisation et conduisent à une régression de la croissance tumorale qui n'est plus

alimentée en nutriments et en oxygène par le système sanguin. Dans le cadre d'un cancer du sein, le **bevacizumab**, un anticorps monoclonal ciblant VEGF-A est le seul anti-angiogénique utilisé. Il a obtenu sa première autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2004 en France. Malgré son aptitude à freiner le développement du cancer, il n'est pas capable à lui seul d'éradiquer une tumeur, d'où son association avec le paclitaxel ou la capécitabine pour les cancers du sein métastatiques ([Tableau 5](#)). Malheureusement, cette combinaison avec des agents de chimiothérapie permet l'augmentation de la survie sans progression (PFS) mais pas de la survie globale (OS) (Miller *et al.*, 2007 ; Miles *et al.*, 2010 ; Robert *et al.*, 2011).

d. Thérapie ciblant m-TOR

La protéine m-TOR (mammalian Target Of Rapamycin) est une enzyme de la famille des serine/threonine kinases qui régule de nombreux processus cellulaires. En 2012, un inhibiteur de m-TOR, l'**évérolimus**, est utilisé dans le traitement des cancers du sein avancé (ER+, PR+, HER2-) en association avec l'inhibiteur de l'aromatase, l'exémastane ([Tableau 5](#)). Ce traitement cible les femmes ménopausées après un échec de traitement avec un inhibiteur de l'aromatase seul.

e. Thérapie ciblant les CDK

Les CDK (Cyclin-Dependent Kinase) sont une famille des protéines kinases impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Un inhibiteur des CDK4/6, le **palbociclib**, a obtenu une AMM européenne en 2016 ([Tableau 5](#)). Il est indiqué dans le cas d'un cancer du sein avancé/métastatique (ER+, PR+, HER2-) en association avec l'anti-œstrogène fulvestrant ou avec un inhibiteur de l'aromatase.

f. Essais cliniques

Plus récemment, des **inhibiteurs de PARP** (Poly (ADP-Ribose) Polymérase) comme l'**olaparib** sont en étude clinique de phase III et apparaissent prometteurs pour le traitement des tumeurs triple-négatives possédant une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* (revue Collignon *et al.*, 2016). En effet, une étude de 302 patients possédant un cancer du sein métastatique muté pour *BRCA 1* ou *2* montre que le taux de réponse est de 59.9% avec l'olaparib seul et 28.8% en chimiothérapie classique (Robson *et al.*, 2017). De plus, le risque de progression de la maladie ou la mort des patients est diminué de 42% avec l'olaparib seul comparé à la chimiothérapie classique. En 2014, l'olaparib a bénéficié d'une AMM

européenne et est utilisé en monothérapie dans le cas d'un cancer de l'ovaire récidivant ayant une mutation *BRCA* (Institut National Du Cancer). Le développement d'**immunothérapie** est également en plein essor et permet de restaurer la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules de notre système immunitaire dans un but de les détruire. Cette nouvelle stratégie prometteuse consiste à cibler les récepteurs des cellules immunitaires impliqués dans la tolérance immunitaire comme **PD-1/PD-L1** (Programmed Death-1/Programmed Death Ligand-1). PD-1 est un récepteur qui est exprimé sur les lymphocytes T actifs et PD-L1 est retrouvé sur les cellules tumorales. L'interaction entre PD-1 et PD-L1 est un mécanisme majeur dans l'échappement tumoral. Le **nivolumab** (anti-PD-1), le **pembrolizumab** (anti-PD-1) et l'**atezolizumab** (anti-PD-L1) sont encore en phase d'étude clinique (revue Toss *et al.*, 2017).

La médecine personnalisée a pour but de traiter chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de sa tumeur mais également en prenant en compte l'environnement, le mode de vie du patient, son âge, ses antécédents familiaux etc. Elle se définit comme la médecine qui administre le bon médicament pour le bon patient au bon moment, à la bonne dose et si possible sans effets secondaires. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc primordiale pour contribuer à la personnalisation des traitements. Depuis les années 2000, une révolution est en marche concernant le développement de nouvelles thérapies ciblées avec 43 qui ont déjà reçu une AMM européenne et beaucoup d'autres qui sont encore à l'étude (Institut National du Cancer, 2015). Fin 2015, on dénombre environ 20 voies de signalisation bloquées par ces thérapies ciblées dans différents types de cancers. Cette avancée a été possible grâce à l'amélioration de nos connaissances de la biologie tumorale et la mise en place d'une classification moléculaire des cancers. Les thérapies ciblées qui sont disponibles aujourd'hui ne représentent probablement que la première génération de produits issus de la combinaison de la recherche fondamentale et de la recherche clinique.

CHAPITRE 2: La claudine 1, une

protéine des jonctions serrées : rôle clé

dans le cancer du sein

I.	Les jonctions serrées	43
1.	Structure des jonctions serrées	43
2.	Fonctions des jonctions serrées	43
3.	Principaux constituants des jonctions serrées	45
	a. Les protéines transmembranaires	45
	b. Les protéines de la plaque cytoplasmique	50
	c. Les protéines du cytosquelette	52
4.	Assemblage et formation des jonctions serrées.....	55
II.	Jonctions serrées et cytosquelette : acteurs de la déformation cellulaire nécessaire à la migration	56
1.	Les jonctions serrées et le cytosquelette	56
2.	La migration à l'échelle de la cellule	57
III.	La protéine claudine 1 : une protéine clé dans les jonctions serrées	60
1.	Découverte de la claudine 1	60
2.	Organisation structurale du gène et de la protéine claudine 1.....	60
3.	Régulation de l'expression du gène et de la localisation de la protéine claudine 1	61
4.	Rôles physiologiques et pathologiques de la claudine 1	65
IV.	Implication de la claudine 1 dans le cancer	66
1.	La claudine 1 dans les cancers	66
2.	La claudine 1 dans le cancer du sein	67

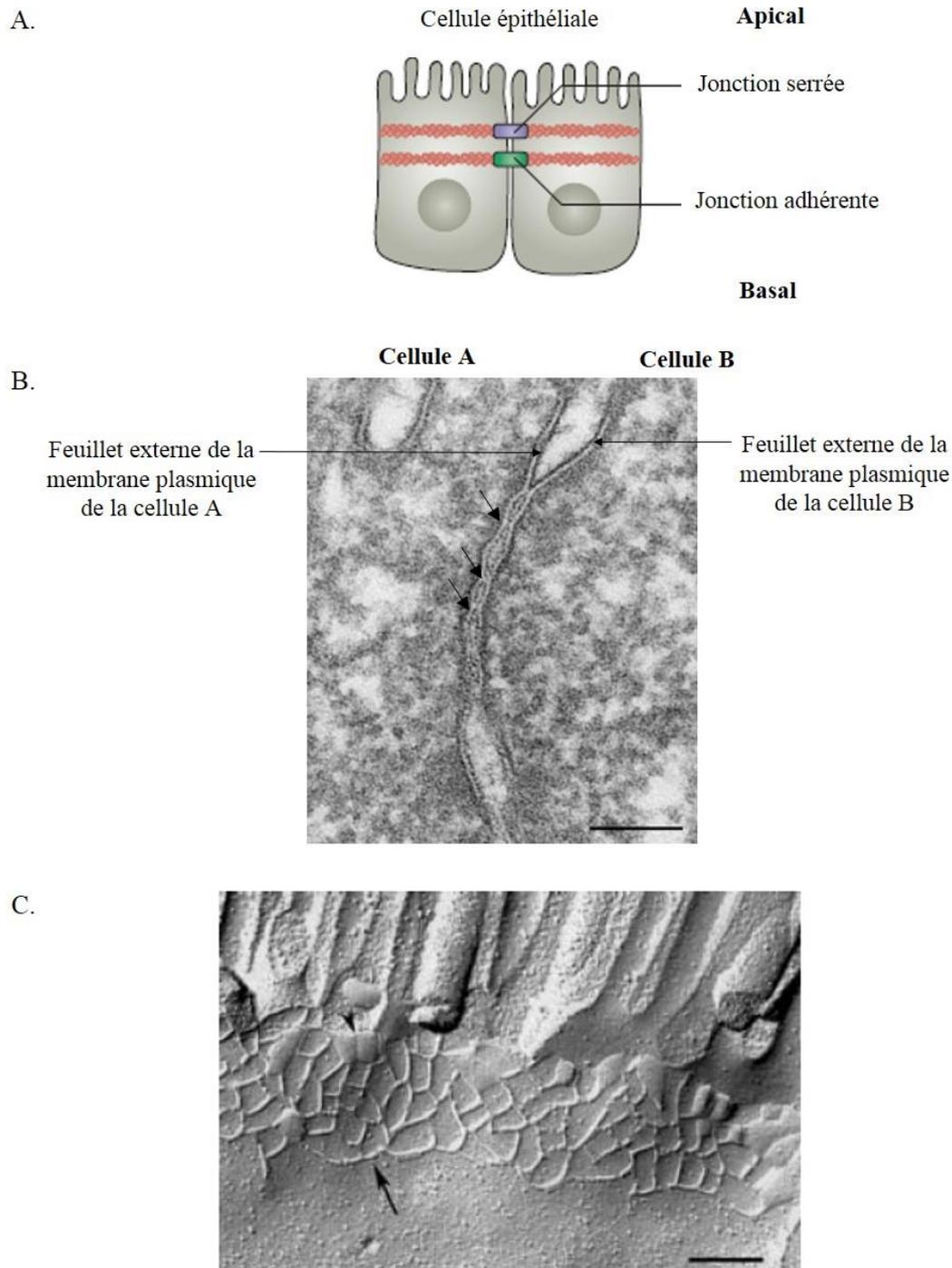


Figure 13 : Localisation et architecture des jonctions serrées. (A) Les jonctions serrées (en violet) sont localisées au niveau du pôle apico-latéral des cellules épithéliales. Les jonctions adhérentes (en vert) sont situées en dessous des jonctions serrées. (B) En microscopie électronique, les jonctions serrées sont définies comme une série de points de fusion ou « kissing points » (flèches noires) entre les feuillets externes de la membrane plasmique d'une cellule A et d'une cellule B. Echelle: 100 nm. (C) Après cryofracture, les jonctions serrées apparaissent, en microscopie électronique à transmission, sous la forme d'un réseau longiligne de fibres ramifiées et anastomosées (flèches noires) qui entoure l'apex de chaque cellule. Echelle : 200 nm (d'après revue Zihni *et al.*, 2016 ; Furuse *et al.*, 2010).

I. Les jonctions serrées

1. Structure des jonctions serrées

Les jonctions serrées ou étanches, dites *zona occludens*, sont caractéristiques des tissus épithéliaux du taxon des chordés (Green *et al.*, 1982 ; Lane *et al.*, 1987). Elles sont localisées au niveau apico-latéral des cellules épithéliales (Figure 13A). Elles forment une bande continue qui assure l'étanchéité et constituent une barrière physiologique entre le compartiment apical et basal aux caractéristiques chimiques différentes. En 1963, Farquhar et Palade sont les premiers à décrire l'architecture des jonctions serrées en microscopie électronique dans différents épithélia (Farquhar *et al.*, 1963). Elles apparaissent comme une série de points de fusion entre les feuillettes externes des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes, à la façon d'une fermeture éclair (Figure 13B). Ces points de contact ou lignes de fermeture sont appelés « kissing points ». Après cryofracture, les jonctions serrées apparaissent, en microscopie électronique à transmission, sous la forme d'un réseau longiligne de fibres ramifiées et anastomosées qui entoure l'apex de chaque cellule (Figure 13C) (Staehlin *et al.*, 1973).

La composition des jonctions serrées est encore controversée. Deux modèles structuraux ont été proposés : le **modèle protéique** et le **modèle hybride lipide-protéine** (revue Zihni *et al.*, 2016). Selon le modèle protéique, la formation des « kissing points » est uniquement due à la succession de protéines transmembranaires interagissant les unes avec les autres, permettant la fusion des feuillettes externes des membranes plasmiques de chaque cellule (Staehlin *et al.*, 1973). Dans les années 1980, le modèle hybride propose que la fusion lipidique des feuillettes externes est également impliquée dans la structure des jonctions serrées (Pinto da Silva *et al.*, 1982 ; revue Lee *et al.*, 2008).

2. Fonctions des jonctions serrées

Les jonctions serrées permettent l'**adhérence** des cellules épithéliales entre elles. Elles assurent également une fonction de barrière : une **barrière paracellulaire** qui contrôle le passage des ions et des macromolécules entre deux cellules adjacentes (« gate function ») et une **barrière de diffusion** qui sert de frontière entre le pôle apical et le pôle basal d'une cellule (« fence function »). Les jonctions serrées ont également un rôle dans la **régulation**

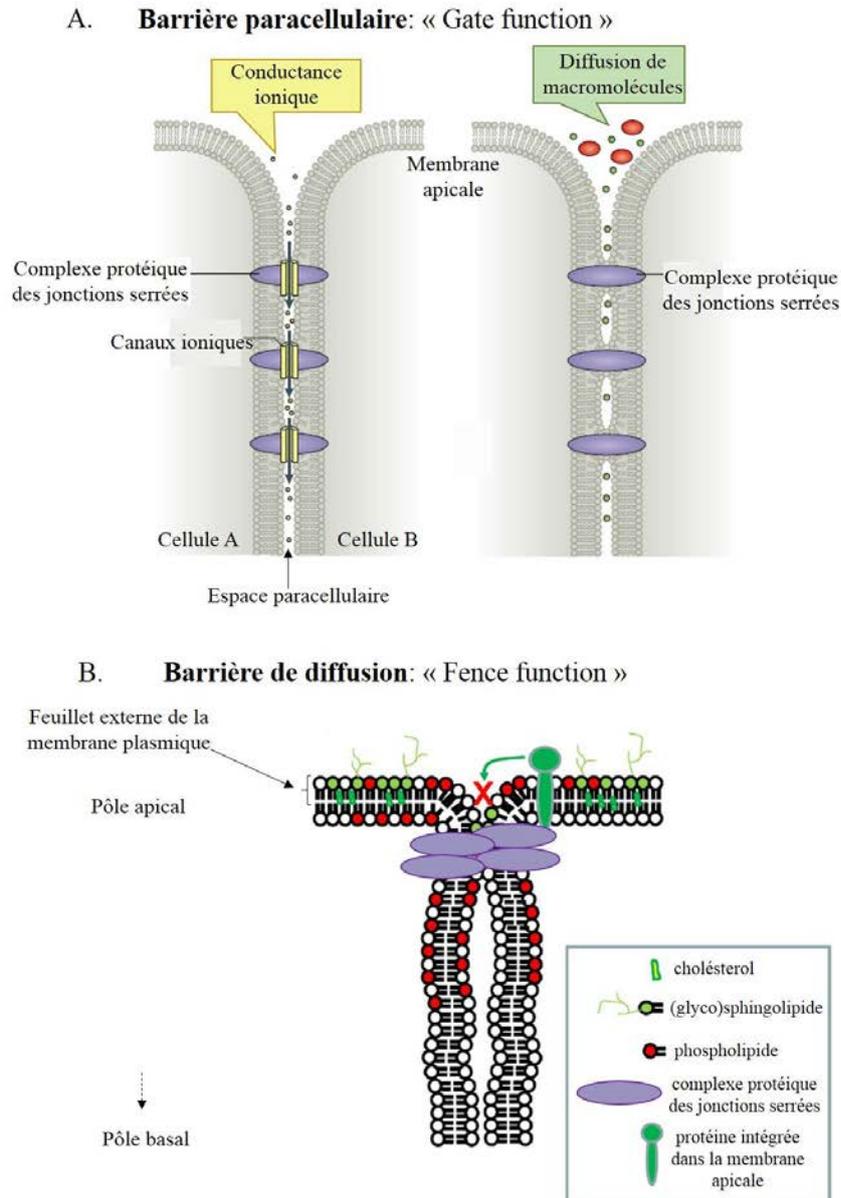


Figure 14 : Fonctions de barrière des jonctions serrées. (A) Les jonctions serrées assurent une fonction de barrière paracellulaire ou « gate function » qui permet de contrôler la diffusion des ions et des macromolécules à travers l'espace paracellulaire entre les cellules A et B. Le passage des ions (conductance ionique) s'effectue en fonction de leur charge à travers des canaux ioniques qui peuvent s'ouvrir et se fermer au niveau des complexes protéiques des jonctions serrées. Pour le passage des macromolécules, le remodelage au niveau des complexes protéiques des jonctions serrées par un système de dissociation et reformation des interactions protéiques permet le passage lent de ces dernières. (B) Les jonctions serrées jouent aussi un rôle de barrière de diffusion ou « fence function » afin d'éviter que les lipides et les protéines du feuillet externe de la membrane plasmique du pôle apical se mélangent à ceux du pôle basal, et vice-versa. Contrairement à la membrane basale, le feuillet externe de la membrane apicale est riche en glycosphingolipides, en sphingomyélines et en cholestérol (d'après revue Zihni *et al.*, 2016 ; revue Giepmans *et al.*, 2009).

transcriptionnelle de processus tel que la prolifération et la différenciation cellulaire (revue Zihni *et al.*, 2016).

a. Adhérence cellulaire

Les jonctions serrées contribuent à l'adhérence des cellules entre elles et permettent l'assemblage de l'ensemble d'un tissu. Elles assurent cette fonction en collaboration avec les jonctions adhérentes, qui sont également importantes au maintien de la structure épithéliale. Les jonctions adhérentes sont localisées au niveau apical juste en dessous des jonctions serrées (Figure 13A). Les jonctions serrées et adhérentes sont composées de protéines transmembranaires différentes qui interagissent entre elles respectivement pour permettre l'adhérence de deux cellules voisines.

b. Barrière paracellulaire

Les jonctions serrées régulent la perméabilité paracellulaire en contrôlant le passage de macromolécules et d'ions entre deux cellules (Figure 14A) (revue Zihni *et al.*, 2016). Le passage des ions (conductance ionique) s'effectue en fonction de leur charge à travers des canaux ioniques qui peuvent s'ouvrir et se fermer. Ces canaux se forment au niveau des complexes protéiques des jonctions serrées. Leur diamètre est estimé entre 4 et 8 Å. Il est dépendant du tissu et du type d'ion. Pour le passage de plus grosses molécules (~30-60 Å), un autre système dépendant de la taille est mis en œuvre. Ce système est encore mal connu mais plusieurs études suggèrent qu'un remodelage au niveau des complexes protéiques des jonctions serrées par un système de dissociation et reformation des interactions protéiques permet le passage lent des macromolécules.

En fonction du tissu, le nombre de complexes protéiques composant les « kissing points » au niveau apical sont plus ou moins nombreux et forment une barrière plus ou moins perméable. Dans l'épithélium mammaire, la perméabilité des jonctions serrées diminue pendant la lactation. Ainsi, la prolactine et les glucocorticoïdes augmentent la production de lait en renforçant la fonction de barrière des jonctions serrées (Kobayashi *et al.*, 2016).

c. Barrière de diffusion

Les jonctions serrées jouent également un rôle de frontière entre le pôle apical et le pôle basal d'une cellule. Elles évitent que les protéines et les lipides du feuillet externe de la membrane

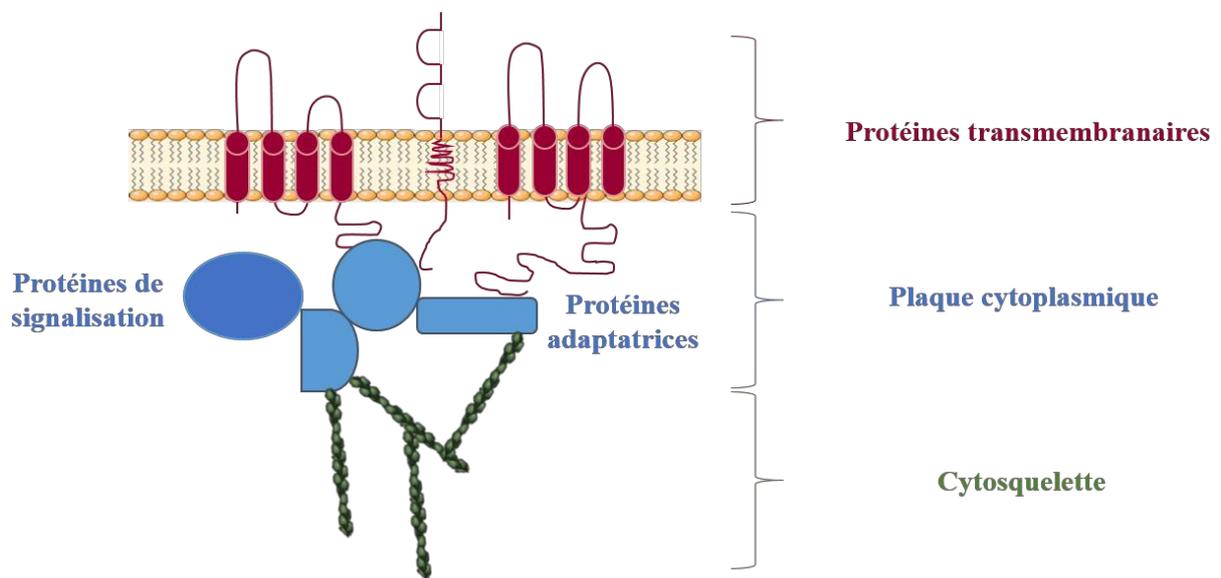


Figure 15 : Composition des jonctions serrées. Les jonctions serrées sont constituées des protéines transmembranaires ainsi que des protéines adaptatrices et de signalisation qui forment la plaque cytoplasmique. Les protéines adaptatrices permettent de lier les protéines transmembranaires au cytosquelette.

plasmique du pôle apical se mélangent à ceux du pôle basal, et vice-versa (Figure 14B) (revue Zihni *et al.*, 2016). Cette propriété permet de maintenir la polarité cellulaire. Contrairement à la membrane basale, le feuillet externe de la membrane apicale est riche en glycosphingolipides, en sphingomyélines et en cholestérol (revue Giepmans *et al.*, 2009). Cette composition confère à la membrane apicale une rigidité plus importante que la membrane latérale et basale.

d. Régulation transcriptionnelle

Les jonctions serrées sont capables de transmettre des signaux à l'intérieur de la cellule afin de réguler de nombreux processus comme la prolifération et la différenciation cellulaire (revue Zihni *et al.*, 2016). La régulation de ces processus cellulaires s'effectue par l'intermédiaire de protéines de signalisation qui sont en interaction avec les constituants des jonctions serrées.

3. Principaux constituants des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont composées de **protéines transmembranaires** et de **protéines de la plaque cytoplasmique** : les **protéines adaptatrices** et les **protéines de signalisation**. Les protéines adaptatrices font le lien entre les protéines transmembranaires et le **cytosquelette** de la cellule. Ces protéines peuvent également interagir avec les **protéines de signalisation** (Figure 15).

a. Les protéines transmembranaires

Il existe trois grands types de protéines transmembranaires : la famille des **claudines**, la famille des **TAMPs** (Tight Junction-Associated MARVEL Proteins) et la superfamille des **immunoglobulines**.

➤ La famille des claudines

Le mot « claudine », du latin *claudere*, signifie « fermer ». Les claudines ont été identifiées pour la première fois en 1998 dans une fraction de jonctions purifiées de foie de poulet par l'équipe de Tsukita (Furuse *et al.*, 1998). La même année, cette équipe a montré que les claudines jouent un rôle clé dans la formation des jonctions serrées. En effet, une surexpression de la claudine 1 ou de la claudine 2 dans des fibroblastes de souris dépourvus de jonctions serrées est suffisante pour reformer un réseau de brins semblable à celui des

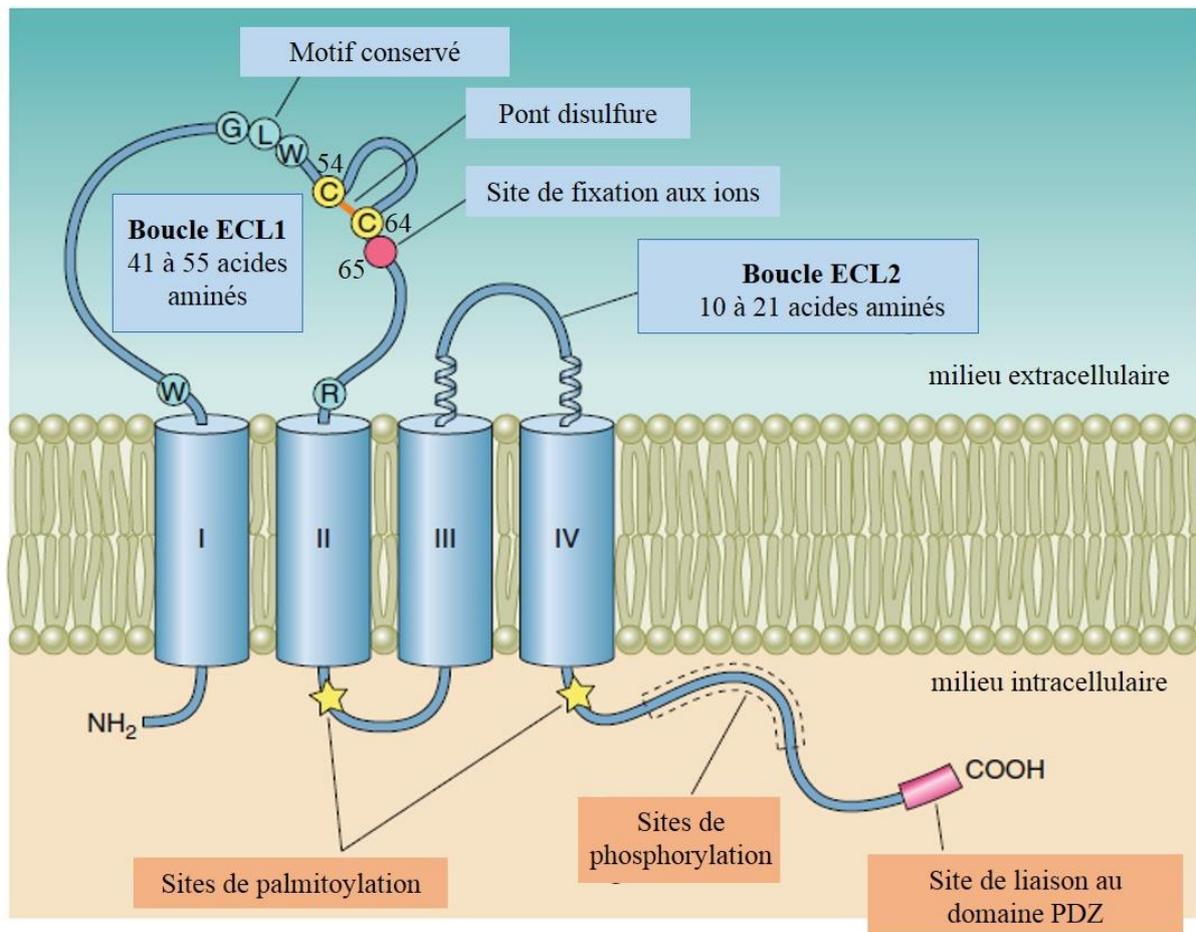


Figure 16 : Structure d'une claudine. Une claudine est constituée de quatre domaines transmembranaires (I, II, III et IV) et de deux boucles extracellulaires ECL1 et ECL2. La boucle ECL1 (41 à 55 acides aminés) possède un motif conservé W-G-L-W-C-C-R (Tryptophane-Glycine-Leucine-Tryptophane-Cystéine-Cystéine-Arginine). Les deux cystéines (positions 54 et 64) forment un pont disulfure qui est impliqué dans la fonction de barrière. Le site de fixation aux ions en position 65 permet de réguler la sélectivité de charges des canaux ioniques. La boucle ECL2 est composée de 10 à 21 acides aminés et est impliquée dans l'interaction en *trans*- des claudines. Une claudine est également composée d'une courte queue N-terminale et d'une longue queue C-terminale intracytoplasmique. La queue C-terminale de presque toutes les claudines possède un site de liaison au domaine PDZ (PSD95 (Post Synaptic Density Protein 95), Dlg1 (Drosophila disc large tumor suppressor 1), ZO-1 (Zonula Occludens-1)). De plus, des sites de palmitoylation et de phosphorylation présents au niveau de la partie C-terminale et de la boucle intracellulaire contrôlent la localisation des claudines (d'après revue Gunzel *et al.*, 2013).

jonctions serrées (Furuse *et al.*, 1998). Les claudines forment une famille de protéines transmembranaires qui comportent 27 membres chez les mammifères et 26 chez l'humain (Mineta *et al.*, 2011). Leur expression est variable selon les espèces. Par exemple, la claudine 13 est exprimée chez les rongeurs mais pas chez l'humain. Les claudines ont une masse moléculaire comprise entre 21 et 34 kDa et sont codées par au moins 17 gènes différents, localisés sur 13 chromosomes différents (revue Liu *et al.*, 2016).

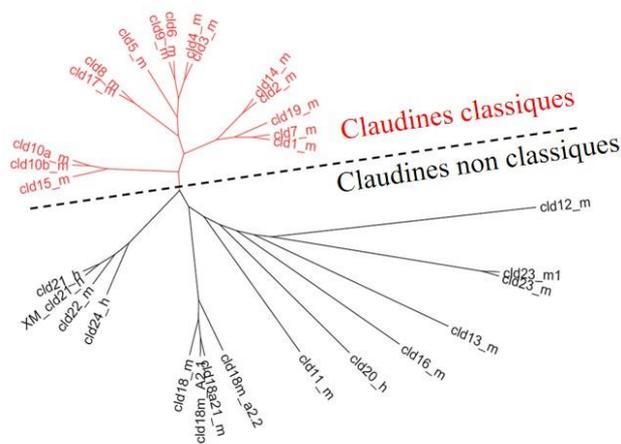
- **Structure et fonctions des claudines**

Toutes les claudines sont constituées de quatre domaines transmembranaires (I-IV) et de deux boucles extracellulaires (ECL1 et ECL2) (Figure 16). Elles sont également composées d'une courte queue N-terminale et d'une longue queue C-terminale comportant un site de liaison au domaine PDZ (PSD95 (Post Synaptic Density Protein 95), Dlg1 (Drosophila disc large tumor suppressor 1), ZO-1 (Zonula Occludens-1)). Plusieurs études se sont intéressées à la relation entre la structure et la fonction des claudines (revue Kraus *et al.*, 2015) (Figure 16).

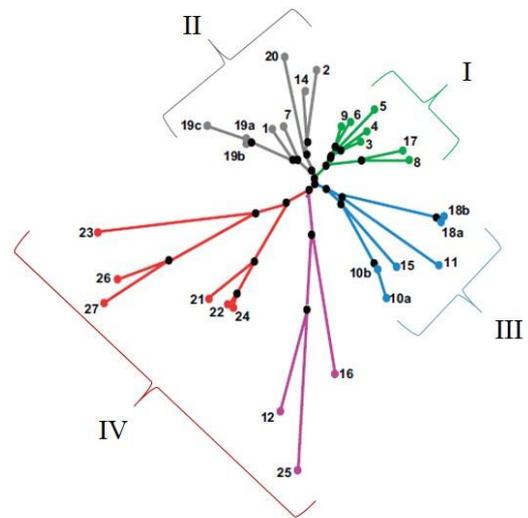
La première boucle extracellulaire (ECL1) détermine la **perméabilité paracellulaire versus l'étanchéité des jonctions serrées**. En fonction de leur sous-type, les claudines peuvent former des barrières ou des pores paracellulaires, nommés également canaux ioniques (revue Gunzel *et al.*, 2013). La boucle ECL1 est la plus grande boucle extracellulaire et est composée de 41 à 55 acides aminés. Cette dernière contient un motif conservé W-GLW-C-C-R (Tryptophane-Glycine-Leucine-Tryptophane-Cystéine-Cystéine-Arginine) (Figure 16). Les deux cystéines (positions 54 et 64) forment un pont disulfure qui est impliqué dans la fonction de barrière permettant la perméabilité à des petits solutés (Wen *et al.*, 2004) et déterminant la sélectivité de taille et de charge des canaux ioniques (Colegio *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2013). Un site de fixation aux ions en position 65 permet également de réguler la sélectivité de charges des canaux ioniques.

La seconde boucle extracellulaire (ECL2) est composée de 10 à 21 acides aminés. Cette boucle ECL2 est impliquée dans l'interaction en *trans*- des claudines (interaction entre deux claudines de deux cellules différentes : « head-by-head ») et contribue ainsi à **l'adhérence cellulaire** (Piontek *et al.*, 2007). L'ensemble des résultats expérimentaux et de modélisation indiquent que les boucles ECL1 et ECL2 sont toutes les deux nécessaires à l'interaction en *trans*- des claudines par interaction homophile (interaction entre des

A. 1^{ère} classification phylogénétique



B. 2^{ème} classification phylogénétique



C. Classification fonctionnelle

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Claudines	1, 3, 5, 11, 14, 19	2, 10, 15, 17	4, 7, 8, 16	6, 9, 12, 13, 18, 20-27
Fonction	Barrière paracellulaire	Pore paracellulaire	Etudes contradictoires	Non connue

Figure 17 : Classification de la famille des claudines. (A) L'analyse de la séquence peptidique de toutes les claudines a permis de les diviser en deux groupes : les claudines classiques (1-10, 14, 15, 17, 19) et les claudines non classiques (11-13, 16, 18, 20-24). (B) Une autre classification phylogénétique décrit quatre groupes de claudines : groupe I (3-6, 8, 9, 17), groupe II (1, 2, 7, 14, 19, 20), groupe III (10, 11, 15, 18) et groupe IV (12, 16, 21-27). (C) Une troisième classification basée sur la fonction des différentes claudines a été établie. Cette classification fonctionnelle est constituée de quatre groupes. Le groupe 1 regroupe les claudines 1, 3, 5, 11, 14 et 19 et est caractérisé par une fonction de barrière. Le groupe 2 comporte les claudines 2, 10, 15 et 17 qui assurent la formation de canaux ioniques et le passage sélectif de cations ou d'anions spécifique du type de claudine. Le groupe 3 regroupe les membres 4, 7, 8 et 16 dont la fonction dépend du type cellulaire et de l'interaction avec ses partenaires. Le groupe 4 regroupe des claudines dont leur fonction n'est pas encore bien connue (claudines 6, 9, 12, 13, 18, 20 à 27) (d'après revue Krause *et al.*, 2008 et revue Gunzel *et al.*, 2012).

claudines identiques) ou hétérophilique (interaction entre des claudines différentes) (revue Kraus *et al.*, 2015).

La queue C-terminale est longue et est très différente en fonction du type de claudine. Elle joue un rôle important dans sa localisation. En effet, une délétion de la queue C-terminale des claudines 1, 5 et 6 provoque la rétention de ces claudines au niveau cytoplasmique et plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (revue Gunzel *et al.*, 2013). De plus, la localisation des claudines est contrôlée par des sites de palmitoylation et de phosphorylation présents au niveau de leur partie C-terminale et de leur boucle intracellulaire (Figure 16) (revue Gunzel *et al.*, 2013). Presque toutes les claudines possèdent un site de liaison au domaine PDZ à l'extrémité C-terminale où des protéines intracytoplasmiques peuvent se fixer.

- **Classification des claudines**

De par leurs quatre régions transmembranaires conservées, les claudines font parties de la famille pfam00822 ou PMP-22/EMP/MP20/Claudin (revue Anderson *et al.*, 2009). Malgré la structure très similaire des protéines de cette famille, leurs fonctions sont très différentes et seulement quelques protéines de cette famille sont capables de former une barrière intercellulaire. L'analyse de la séquence peptidique de toutes les claudines a permis de les diviser en deux groupes : les **claudines classiques** (1-10, 14, 15, 17, 19) et les **claudines non classiques** (11-13, 16, 18, 20-24) (Figure 17A) (revue Kraus *et al.*, 2008). Les claudines classiques possèdent les boucles ECL1 et ECL2 très conservées entre elles. En revanche, les claudines non classiques sont plus variables dans leurs séquences. Une classification phylogénétique plus récente décrit quatre groupes de claudines (I à IV) (Figure 17B) (revue Gunzel *et al.*, 2012). En parallèle, Gunzel et ses collaborateurs se sont appuyés sur plusieurs études pour également proposer une autre classification basée sur la fonction des différentes claudines (Figure 17C) (Gunzel *et al.*, 2012). Cette classification fonctionnelle est aussi constituée de quatre groupes. Le groupe 1 regroupe les claudines qui possèdent une fonction de **barrière paracellulaire**. Le groupe 2 comporte les claudines qui assurent la formation de **pores paracellulaires** et le passage sélectif de cations ou d'anions spécifique du type de claudine. Le groupe 3 regroupe les membres dont la fonction **dépend du type cellulaire** et de l'interaction avec ses partenaires. Enfin, le groupe 4 regroupe des claudines dont leur **fonction n'est pas encore bien connue**.

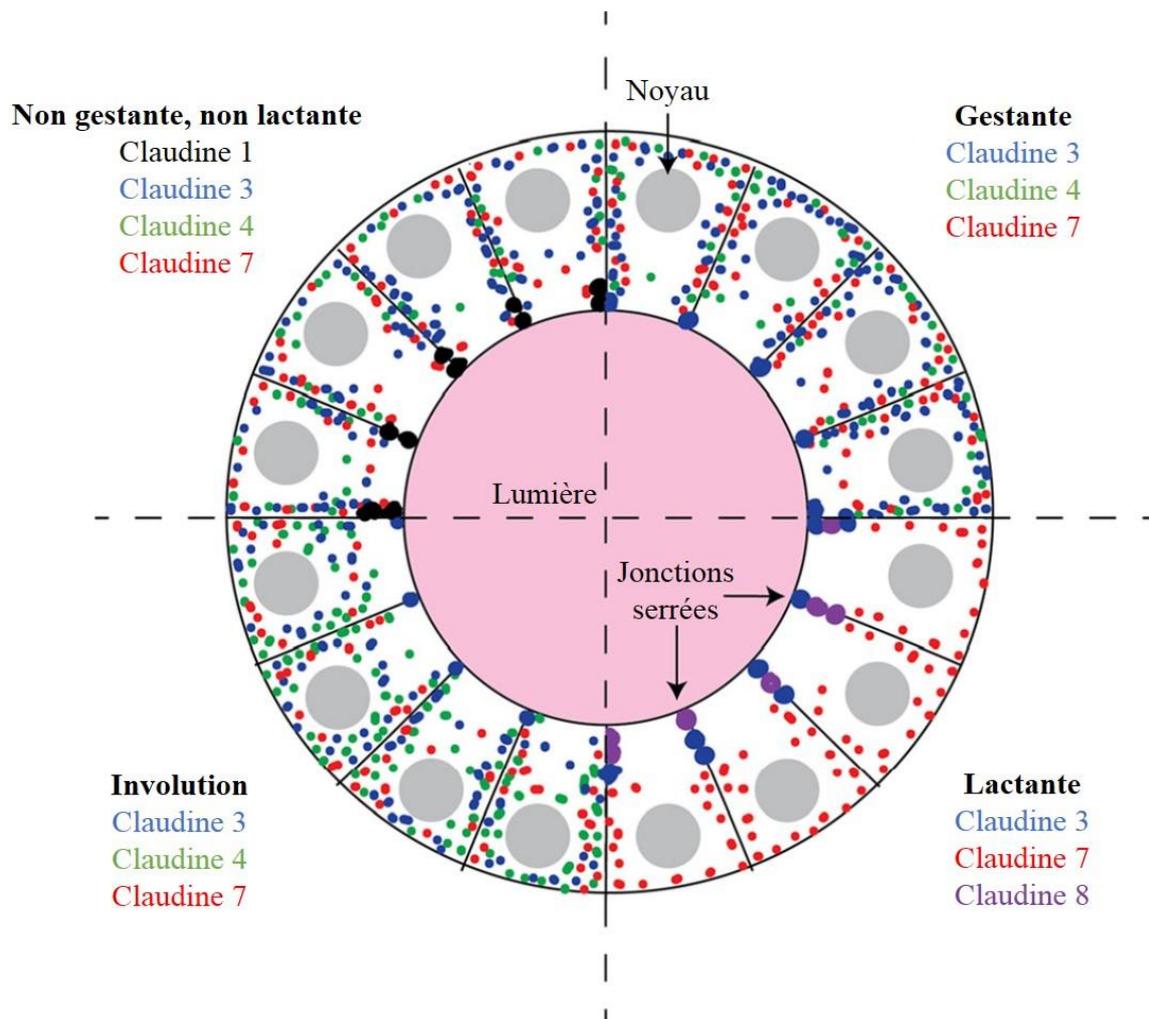


Figure 18 : Expression et localisation des claudines durant le développement mammaire chez la souris. Chez la souris non gestante et non lactante, la claudine 1 est localisée au niveau des jonctions serrées alors que les claudines 3, 4 et 7 sont situées dans le cytoplasme. Pendant la gestation, la claudine 3 remplace la claudine 1 aux jonctions serrées et les claudines 4 et 7 restent au niveau cytoplasmique. Durant la lactation, les jonctions serrées se composent des claudines 3 et 8 et la claudine 7 est localisée au niveau cytoplasmique. L'involution entraîne une perte d'expression de la claudine 8 et une réexpression de la claudine 4 cytoplasmique (d'après revue Baumgartner *et al.*, 2017).

- **Expression et localisation des claudines**

Les claudines sont exprimées dans tous les tissus épithéliaux et également dans les endothéliaux (revue Baumgartner *et al.*, 2017). Des claudines ont aussi été retrouvées dans d'autres types cellulaires comme par exemple au niveau des neurones, des thymocytes et des lymphocytes (revue Gunzel *et al.*, 2013). Le nombre et le type de claudines déterminent la spécificité des jonctions serrées dans un tissu donné. Ces jonctions sont très dynamiques et peuvent être modulées en fonction de certains stimuli. La plasticité des jonctions serrées implique la modulation de l'expression et de la localisation des claudines : ce processus est appelé « claudin switching » (revue Capaldo and Nusrat., 2015). En effet, il est fréquent de retrouver des claudines hors du complexe protéique des jonctions serrées comme au niveau de la membrane baso-latérale, dans le cytoplasme ou dans le noyau (revue Hagen *et al.*, 2017). De nombreuses études ont porté leur attention sur la modulation de l'expression et de la localisation des claudines dans la glande mammaire de souris en fonction du statut hormonal (revue Baumgartner *et al.*, 2017). Chez la souris non gestante et non lactante, la claudine 1 est localisée au niveau des jonctions serrées alors que les claudines 3, 4 et 7 sont situées dans le cytoplasme (Figure 18). Pendant la gestation, la claudine 3 remplace la claudine 1 aux jonctions serrées et les claudines 4 et 7 restent au niveau cytoplasmique. Durant la lactation, les jonctions serrées se composent des claudines 3 et 8 et la claudine 7 est localisée au niveau cytoplasmique. L'involution entraîne une perte d'expression de la claudine 8 et une réexpression de la claudine 4 cytoplasmique.

➤ **La famille des TAMPs : les protéines à domaine MARVEL**

Les TAMPs (Tight Junction-Associated MARVEL Proteins) sont caractérisées par la présence d'un domaine MARVEL (MAL : myelin and lymphocyte protein, and related protein for vesicle trafficking and membrane link). Ce domaine MARVEL est constitué de quatre domaines transmembranaires (revue Van Itallie *et al.*, 2014 ; revue González-Mariscal *et al.*, 2007). L'**occludine**, la **tricelluline** (ou MarvelD2) et **MarvelD3** font partie de cette famille de protéines et composent les jonctions serrées avec les claudines.

L'**occludine** est la protéine la plus connue des TAMPs. Elle est la première protéine transmembranaire à avoir été mise en évidence au niveau des jonctions serrées en 1993. Cette protéine de 60 kDa possède deux boucles extracellulaires de 52 et 44 acides aminés, une queue cytoplasmique N-terminale de 61 acides aminés et une queue C-terminale de 259

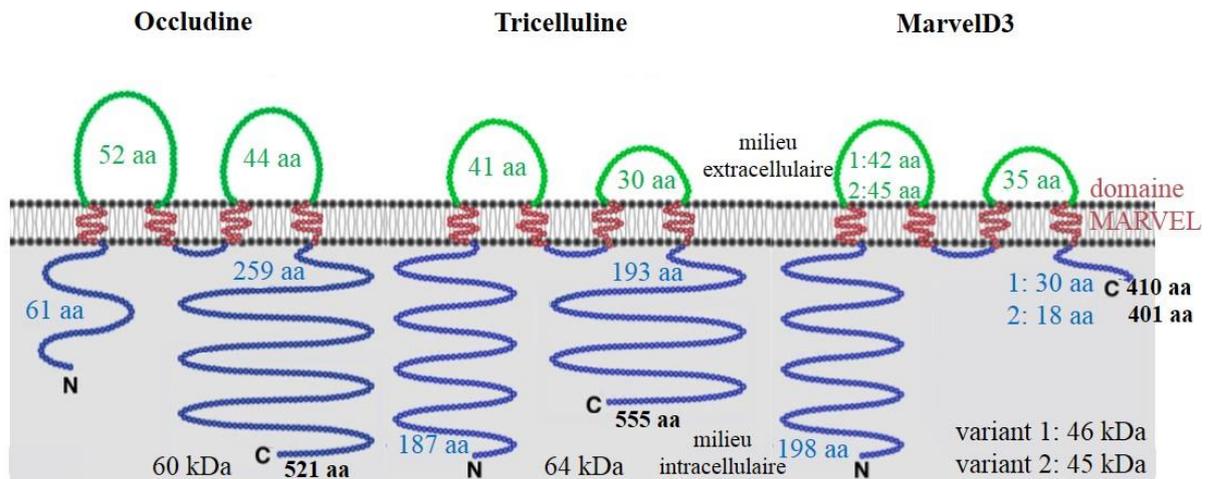


Figure 19 : Structure des TAMs. L'occludine, la tricelluline et MarvelD3 sont composés de deux boucles extracellulaires, de quatre domaines transmembranaires (domaine MARVEL), d'une queue N-terminale et d'une queue C-terminale intracytoplasmique. L'occludine est constituée de 521 acides aminés et son poids moléculaire est de 60 kDa. La tricelluline est composée de 555 acides aminés avec un poids moléculaire de 64 kDa. La protéine MarvelD3 possède deux variants de 46 et 45 kDa constitués de 410 et 401 acides aminés respectivement. Le nombre d'acides aminés composant les différentes parties de chaque protéine est précisé sur le schéma (d'après Ikenouchi *et al.*, 2005 ; Raleigh *et al.*, 2009).

acides aminés (Figure 19). La deuxième boucle extracellulaire permet l'interaction *en trans* des occludines et avec les autres protéines transmembranaires des jonctions serrées, les claudines et les JAM (Nusrat *et al.*, 2005). L'occludine est dispensable à la formation des jonctions serrées mais nécessaire à la fonction de barrière des jonctions serrées. Toutefois, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* sont controversées sur l'importance de l'occludine dans la perméabilité paracellulaire (revue Van Itallie *et al.*, 2014).

La **tricelluline** est une protéine de 64 kDa assez similaire à l'occludine (Figure 19). Elle possède aussi deux boucles extracellulaires de 41 et 30 acides aminés, d'une queue N-terminale de 187 acides aminés et d'une queue C-terminale de 193 acides aminés. Les séquences C-terminale de la tricelluline et de l'occludine sont conservées et leurs gènes sont situés en tandem sur le chromosome 5 de l'humain, suggérant une duplication durant l'évolution (revue González-Mariscal *et al.*, 2007). Sa fonction est encore mal définie mais elle se rapproche de celle de l'occludine.

La protéine **MarvelD3** a été découverte en 2009. Chez les mammifères, il existe deux variants de la protéine issus d'épissage alternatif différent : le variant 1 de 46 kDa et le variant 2 de 45 kDa (Figure 19). Ces variants sont constitués de deux boucles extracellulaires (42/45 acides aminés et 35 acides aminés), d'une queue N-terminale (198 acides aminés) et d'une queue C-terminale (410/401 acides aminés). Tout comme l'occludine, cette protéine n'est pas nécessaire à l'assemblage des jonctions serrées mais joue un rôle important dans la perméabilité paracellulaire.

Ces trois protéines forment un complexe au niveau des jonctions serrées. Au niveau des jonctions bicellulaires (contact entre deux cellules), l'occludine et MarvelD3 interagissent ensemble avec les claudines alors que la tricelluline est préférentiellement localisée avec MarvelD3 au niveau des jonctions tricellulaires (contact entre trois cellules). Le rôle de ces trois protéines est différent, mais se compense. En effet, dans des cellules Caco-2 d'adénocarcinome colorectal, la protéine MarvelD3 est capable de compenser partiellement l'absence de l'occludine ou de la tricelluline, et inversement. Néanmoins, la fonction complète du complexe n'est pas restaurée (Raleigh *et al.*, 2009).

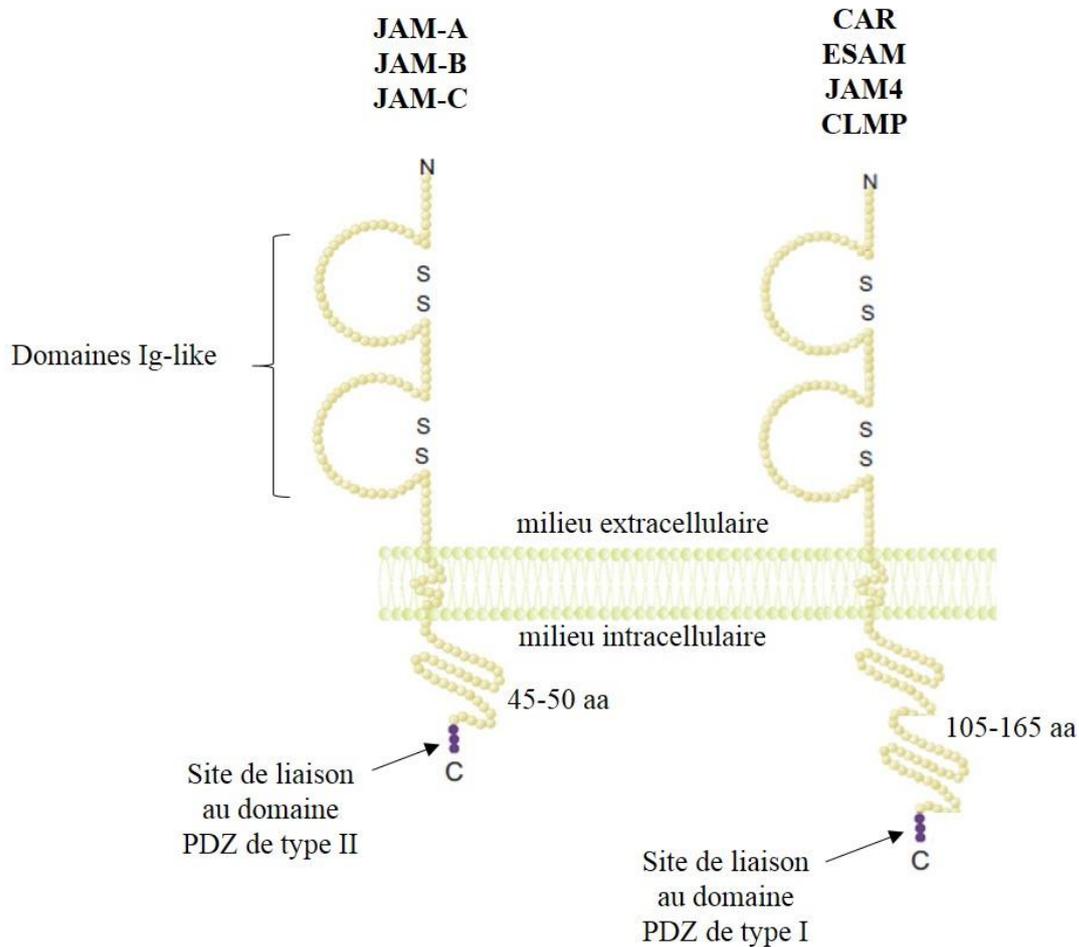


Figure 20 : Structure des protéines JAM. Les protéines JAM sont composées de deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline (domaine Ig-like), d'une région transmembranaire et d'une partie cytoplasmique contenant un site de liaison au domaine PDZ. Il existe deux groupes de JAM. Le premier groupe comprend les JAM-A, -B et -C. Ces dernières possèdent une petite partie cytoplasmique de 45 à 50 acides aminés avec un site de liaison au domaine PDZ de type II. Les protéines CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor), ESAM (Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule), JAM4 et CLMP (CAR-like membrane protein) font partie du deuxième groupe. Leur partie cytoplasmique est composée de 105 à 165 acides aminés et contient un site de liaison au domaine PDZ de type I (d'après González-Mariscal *et al.*, 2007).

➤ **La superfamille des immunoglobulines (Ig-like CAMs)**

Les protéines JAM (Junctional Adhesion Molecules) font partie de la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des protéines transmembranaires qui sont caractérisées par deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline (Ig-like), une région transmembranaire et une partie cytoplasmique contenant un site de liaison au domaine PDZ (Figure 20) (revue González-Mariscal *et al.*, 2007). Il existe deux types de protéines JAM, classées en fonction de la longueur de leur queue C-terminale et du type du site de liaison au domaine PDZ.

JAM-A, -B et **-C** possèdent une queue intra-cytoplasmique courte de 45 à 50 acides aminés. Elles possèdent un site de liaison au domaine PDZ de type II qui est reconnu par son contenu riche en résidus hydrophobes ou aromatiques (Figure 20). Le deuxième type comprend les protéines **CAR** (Coxsackie and Adenovirus Receptor), **ESAM** (Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule), **JAM4** et **CLMP** (CAR-Like Membrane Protein). Ces protéines contiennent une longue queue C-terminale de 105 à 165 acides aminés et possèdent un site de liaison au domaine PDZ de type I (Figure 20). Ce dernier est reconnu grâce au motif consensus Glu-(Ser/Thr)-xxx-(Val/Ile) (Acide glutamique-Sérine/Thréonine-xxx-Valine/Isoleucine).

Les protéines JAM vont essentiellement jouer un rôle dans la polarité cellulaire et dans la fonction de barrière des jonctions serrées.

b. Les protéines de la plaque cytoplasmique

Elles sont classées en deux grands groupes : les **protéines adaptatrices** et les **protéines de signalisation**.

➤ **Les protéines adaptatrices**

Les protéines adaptatrices sont classées en deux groupes : celles possédant un domaine PDZ et celles n'en possédant pas. Un domaine PDZ est composé d'environ 80 à 90 acides aminés, formant une poche hydrophobe dans laquelle vient s'insérer une protéine possédant un site de liaison au domaine PDZ comme les claudines ou les JAM par exemple.

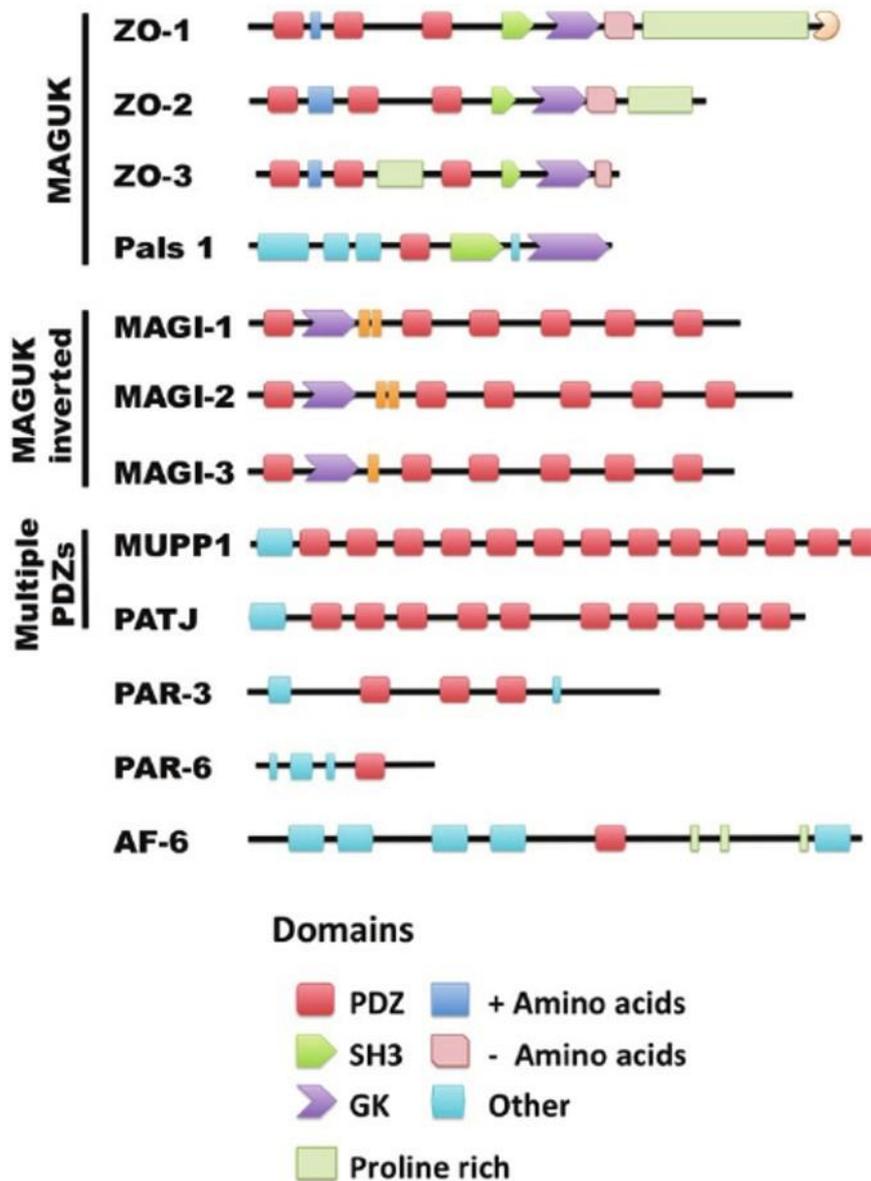


Figure 21 : Structure des protéines adaptatrices à domaines PDZ. (A) Les protéines MAGUK sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs domaines PDZ en position N-terminale, un domaine SH3 et un domaine GUK (GK) en position C-terminale. Cette famille regroupe les Zonula Occludens-1, -2, -3 (ZO-1, -2, -3) et Pals1. Les protéines MAGI (MAGuk Inverted) regroupent les protéines MAGI-1, -2 et -3 et sont caractérisées par la présence d'un domaine GUK en position N-terminale et de 6 domaines PDZ. Elles possèdent des domaines WW (tryptophane-tryptophane) remplaçant les domaines SH3. Les protéines MUPP1, PATJ et PAR-3 sont des protéines à multiples domaines PDZ alors que les protéines PAR-6 et l'afadine (AF-6) n'en possède qu'un (d'après González-Mariscal *et al.*, 2014).

- **Les protéines à domaine PDZ**

Il existe plusieurs groupes de protéines à domaine PDZ. **Les protéines de la famille MAGUK** (Membrane-Associated Guanylate Kinase) sont caractérisées par la présence d'un domaine SH3 (SRC Homology 3), d'un domaine GUK (GUanylate Kinase homology) en position C-terminale et la présence de plusieurs domaines PDZ. Cette famille regroupe les Zonula Occludens-1, -2, -3 (ZO-1, -2, -3) et Pals1 (Figure 21). **Les protéines MAGI** (MAGuk Inverted) regroupent les protéines MAGI-1, -2 et -3 et sont caractérisées par la présence d'un domaine GUK en position N-terminale, d'un ou deux domaines WW (tryptophane-tryptophane) et de 6 domaines PDZ (Figure 21). Enfin, les protéines MUPP1 (MULTI-PDZ domain Protein), PATJ (Pals 1-Associated Tight Junction protein) et Par- 3 sont des protéines à **multiples domaines PDZ**. Elles possèdent 13, 10 et 3 domaines PDZ respectivement. Les protéines Par-6 et l'afadine (AF-6) possèdent un seul domaine PDZ (Figure 21).

- **Les protéines dépourvues de domaine PDZ**

Les protéines dépourvues de domaines PDZ les plus connues sont la **cinguline** et la **symplekine**. La cinguline est une protéine de 140 kDa qui a été découverte par le Professeur Sandra Citi dans des cellules épithéliales intestinales de poulet (Citi *et al.*, 1988 ; Citi *et al.*, 1989). Cette protéine forme des homodimères parallèles. Chaque dimère est constitué d'une tête à domaine globulaire en N-terminal, une petite queue à domaine globulaire en C-terminal et une partie intermédiaire en hélice superenroulée. La symplekine est une protéine multifonctionnelle de 126 kDa que l'on retrouve dans le noyau et dans le cytoplasme. Le rôle de la symplekine est encore mal connu contrairement à celui de la cinguline qui joue un rôle dans l'assemblage des jonctions serrées.

➤ **Les protéines de signalisation**

Différents types de protéines de signalisation sont retrouvés au niveau de la plaque cytoplasmique comme des **protéines G** (Rab13, Cdc42), des **kinases** (PKC), des **phosphatases** (PP2A) et des **facteurs de transcription** (ZONAB, SAF-B).

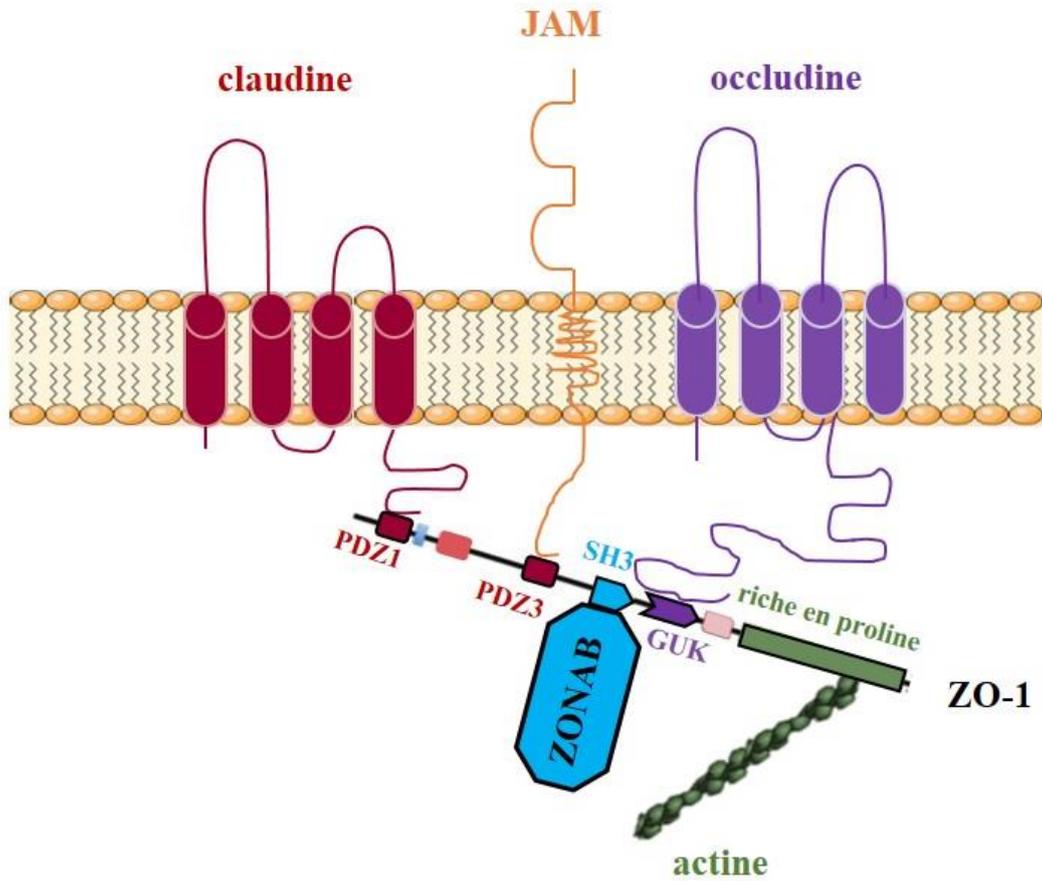


Figure 22 : Interactions entre les protéines transmembranaires, les protéines de la plaque cytoplasmique et le cytosquelette. La protéine ZO-1 fait le lien entre les jonctions serrées et le cytosquelette d'actine. Elle interagit avec les claudines *via* son domaine PDZ1, avec les JAM *via* son domaine PDZ3 et avec l'occludine *via* son domaine GUK. Les microfilaments d'actine interagissent avec ZO-1 à travers sa région riche en proline en position C-terminale. ZO-1 séquestre ZONAB à la membrane *via* son domaine SH3 et empêche l'activation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

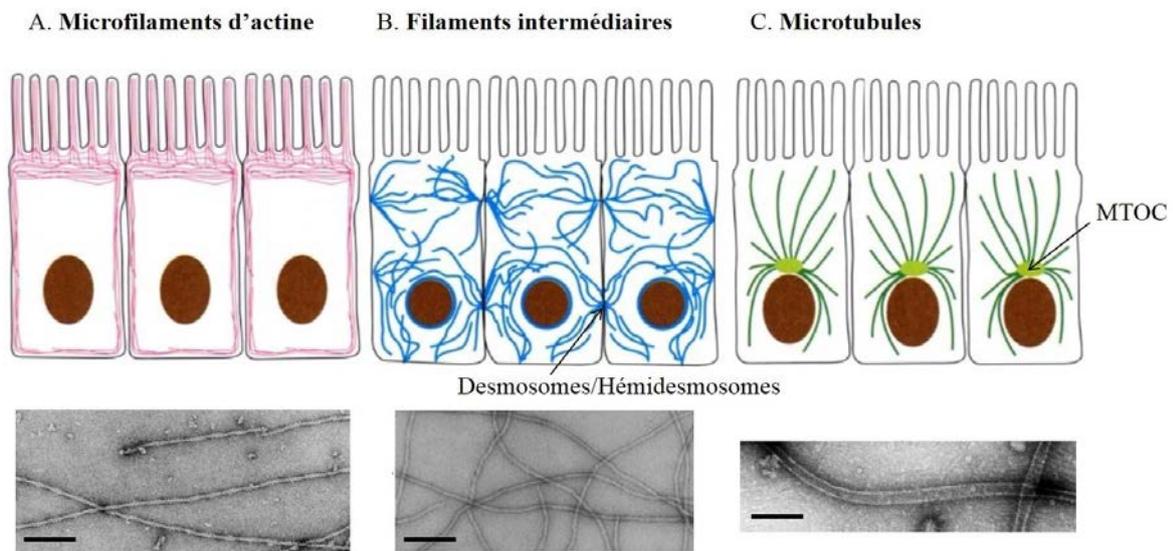


Figure 23 : Structure et caractéristiques des trois constituants du cytosquelette : les microfilaments d'actine (A), les filaments intermédiaires (B) et les microtubules (C). La localisation des trois constituants du cytosquelette au sein de la cellule est schématisée et leur structure observée en microscopie électronique est illustrée en bas. *MTOC* : *Centre Organisateur des Microtubules*. Echelle : 100 nm (d'après revue Herrmann *et al.*, 2009).

➤ **Fonctions des protéines de la plaque cytoplasmique**

Les protéines adaptatrices constituent **une interface entre les jonctions serrées et le cytosquelette** à travers la présence de leurs domaines variés. Par exemple, la protéine ZO-1 fait le lien entre les jonctions serrées et le cytosquelette d'actine. Elle interagit avec les claudines *via* son domaine PDZ1, avec les JAM *via* son domaine PDZ3 et avec l'occludine *via* son domaine GUK (**Figure 22**) (Stevenson *et al.*, 1986 ; Rodgers *et al.*, 2013). Les microfilaments d'actine interagissent avec ZO-1 à travers sa région riche en proline en position C-terminale. D'autres protéines de la plaque cytoplasmique comme la cinguline et l'afadine font également le lien entre les jonctions serrées et le cytosquelette d'actine (revue Van Itallie *et al.*, 2014 ; revue Sluysman *et al.*, 2017).

Les protéines transmembranaires ou adaptatrices permettent également d'interagir avec des **protéines de signalisation** pour la régulation de nombreux processus comme la prolifération et la différenciation cellulaire (revue Gonzales-Mariscal *et al.*, 2007). L'exemple le plus connu est celui de ZONAB (ZO1-associated nucleic acid binding protein), un facteur de transcription qui interagit avec le domaine SH3 de ZO-1 (**Figure 22**). La translocation nucléaire de ZONAB entraîne la prolifération cellulaire par l'activation de l'expression des gènes *PCNA* (Proliferative Cell Nuclear Antigen) et *CCND1* (Cycline D1). Les protéines ZO inhibent ce processus par la séquestration de ZONAB à la membrane plasmique (Spadaro *et al.*, 2014).

c. Les protéines du cytosquelette

Le cytosquelette correspond à « l'ossature et le muscle » de la cellule. C'est une structure très dynamique qui se réorganise continuellement et permet à la cellule de changer de forme et de s'adapter à son environnement en fonction de différents stimuli (hormones, facteurs de croissance, stress mécanique etc ...). Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments protéiques qui s'étend dans tout le cytoplasme de la cellule, du noyau à la membrane plasmique. Il est constitué de trois types de filaments protéiques : les **microfilaments d'actine** (7 à 9 nm de diamètre), les **filaments intermédiaires (FIs)** (10 nm de diamètre) et les **microtubules** (25 nm de diamètre) (**Figure 23**).

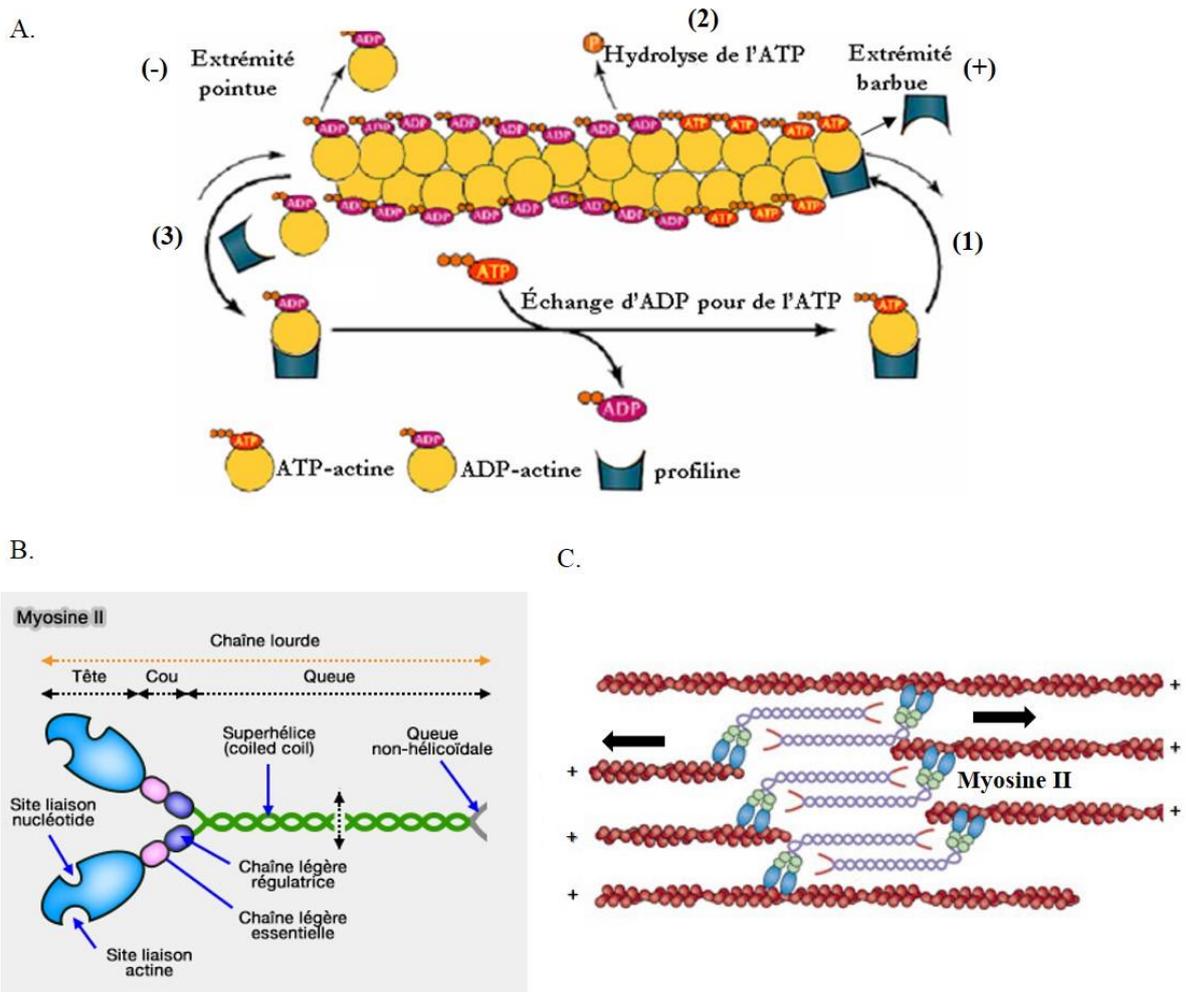
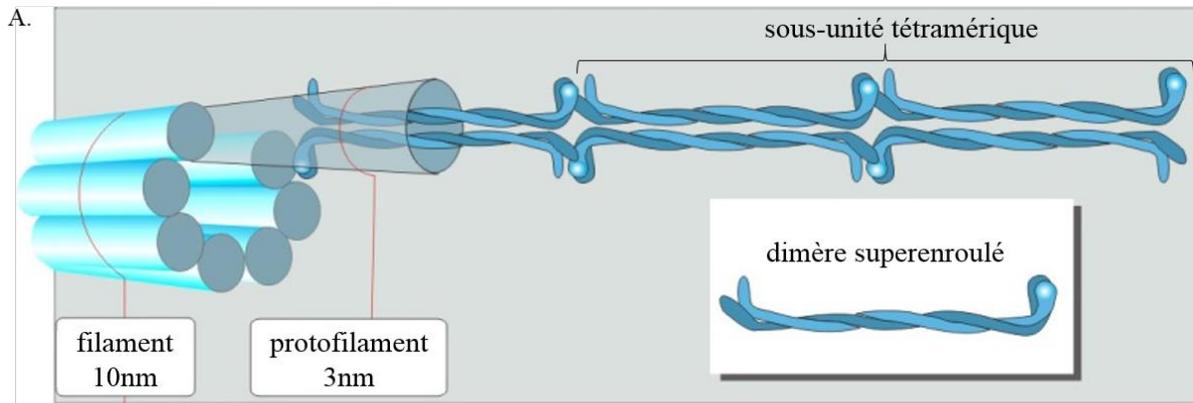


Figure 24 : Les microfilaments d'actine et de myosine. (A) Les filaments d'actine. 1. L'actine G, associée à l'ATP est polymérisée à l'extrémité barbue à l'aide de la profiline. 2. Au cours du temps, l'ATP est hydrolysée le long du polymère. 3. L'extrémité pointue est chargée en actine-ADP et va être dépolymérisée. La profiline permet le recyclage de l'actine G. (B) Les filaments de myosine. La myosine de classe II est composée de deux chaînes lourdes (dimères) et quatre chaînes légères. Elle est divisée en 3 parties : la tête, le cou et la queue. La tête est constituée de deux domaines globulaires qui correspondent au domaine moteur. Chaque domaine globulaire possède un site de liaison à l'actine et un site de liaison au nucléotide (ATP). Le cou est composé de quatre chaînes légères et forment le « bras de levier »: deux chaînes légères essentielles et deux chaînes légères régulatrices. Au niveau de la queue, les dimères en hélice α sont superenroulés et forment une superhélice avec une courte queue non-hélicoïdale. (C) Interaction actine-myosine. Les myosines se lient à l'actine à travers leur tête globulaire. Elles permettent le glissement des filaments d'actine les uns sur les autres grâce à l'hydrolyse de l'ATP (d'après site internet Jon Lieff).

➤ Les microfilaments d'actine

Le cytosquelette d'actine est localisé d'une part juste en dessous de la membrane plasmique, où il constitue un maillage bidimensionnel associé à la membrane, et d'autre part au sein de la cellule, où il constitue un réseau tridimensionnel conférant un aspect gélatineux au cytosol (Figure 23A). Les microfilaments d'actine sont formés par l'assemblage de monomères d'actine G (Globulaire), protéine globulaire de 42 kDa. Ce polymère forme une double hélice serrée de 7 à 9 nm de diamètre (Figure 24A). Le microfilament d'actine possède une extrémité positive (barbue) à croissance rapide et une extrémité négative (pointue) à croissance lente. Les monomères d'actine G, associé à l'ATP, sont préférentiellement polymérisés au niveau de l'extrémité positive. Au cours du temps, l'ATP est hydrolysé en ADP le long du polymère d'actine. Ainsi, l'extrémité négative est riche en actine-ADP et va être dépolymérisée.

Les microfilaments possèdent un moteur moléculaire : la **myosine**. La superfamille des myosines est divisée en environ une trentaine de classes dont la plus connue est la myosine de classe II. Toutes les myosines sont composées d'une tête, d'un cou et d'une queue (Figure 24B). La myosine de classe II est composée de deux chaînes lourdes (dimères) qui forment deux domaines globulaires au niveau de la tête, correspondant au domaine moteur. Chaque domaine globulaire possède un site de liaison à l'actine et un site de liaison au nucléotide (ATP). Au niveau de la queue, les dimères en hélice α sont superenroulés et forment une superhélice avec une courte queue non-hélicoïdale. Le cou est composé de quatre chaînes légères et forment le « bras de levier » : deux chaînes légères essentielles et deux chaînes légères régulatrices. Les myosines de classe II sont retrouvées au niveau des muscles squelettique et cardiaque pour permettre la contraction musculaire. Elles permettent le glissement des filaments d'actine les uns sur les autres grâce à l'hydrolyse de l'ATP (Figure 24C). Dans les cellules non musculaires, la myosine de classe II participe aux processus contractiles avec les microfilaments d'actine, permettant la division cellulaire ainsi que l'adhérence cellulaire à travers les fibres de stress d'actine et les contacts focaux. Ce complexe acto-myosine est également impliqué dans la formation de protrusions membranaires contrôlant la motilité cellulaire. Les autres classes de myosines permettent l'ancrage des organites cellulaires aux microfilaments d'actine ainsi que le transport de ces derniers au sein de la cellule.



B.

Type	Protéines	Spécificité d'expression	Localisation
I	Kératines acides	Epithélium	Cytoplasmique
II	Kératines neutres et basiques	Epithélium	Cytoplasmique
III	Vimentine, desmine et apparentés	Mésenchyme, muscles	Cytoplasmique
IV	Protéines des neurofilaments	Neurones	Cytoplasmique
V	Lamines	Enveloppe nucléaire	Nucléaire
VI	Nestine	Cellules souches neuroépithéliales	Cytoplasmique

Figure 25 : Représentation schématique de l'assemblage des filaments intermédiaires. (A) Les FIs sont formés de protéines fibrillaires qui s'associent sous forme de dimères superenroulés. Deux dimères superenroulés s'associent de manière anti-parallèle pour former une sous-unité tétramérique. Ces dernières se mettent bout à bout pour former un protofilament de 3 nm de diamètre. L'assemblage de 8 protofilaments donne naissance au filament intermédiaire d'environ 10 nm de diamètre. (B) Les protéines constituant ce réseau sont extrêmement variées et leur nature chimique diffère selon le type cellulaire et la localisation intracellulaire. Il existe six types de filaments intermédiaires différents (I à VI): les kératines de type acides, les kératines de type neutres ou basiques, les vimentines et apparentés, les neurofilaments, les lamines et la nestine (d'après Le cytosquelette website).

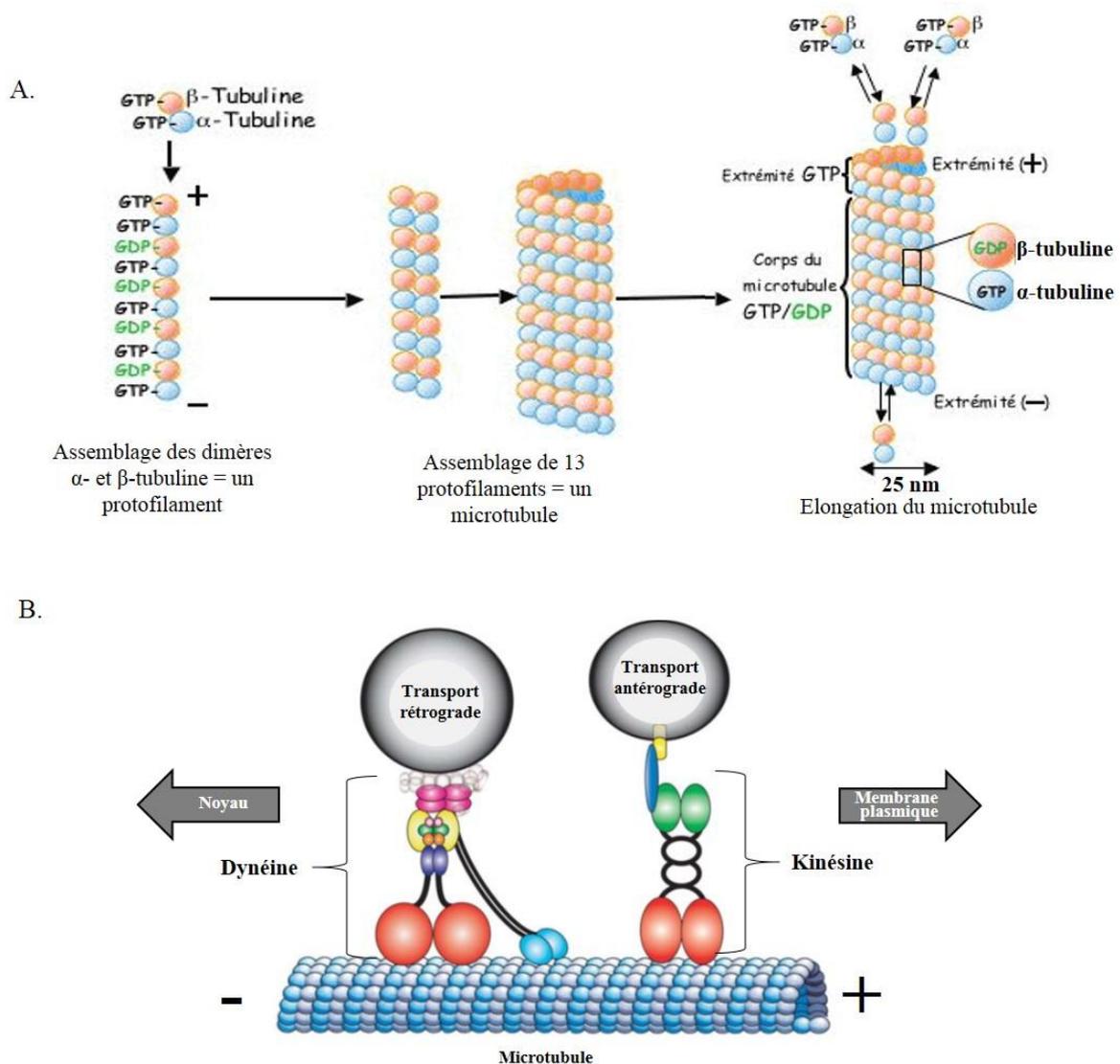


Figure 26 : Modèle d'assemblage des microtubules et leurs moteurs moléculaires. (A) Le microtubule est constitué de l'assemblage de dimères d' α -tubuline et β -tubuline qui forme un protofilament. L'assemblage de 13 protofilaments forme le microtubule de 25 nm de diamètre. L'élongation du microtubule s'effectue au niveau de l'extrémité positive (+) avec la polymérisation de dimères d' α -tubuline et de β -tubuline, associés au GTP. Les microtubules se polymérisent et se dépolymérisent continuellement grâce à l'hydrolyse du GTP de la sous-unité β -tubuline. (B) La dynéine et la kinésine sont les deux protéines moteurs des microtubules. La dynéine permet le transport rétrograde de cargo vers le noyau, c'est à dire de l'extrémité positive (+) vers l'extrémité négative (-), alors que la kinésine se déplace dans le sens opposé vers la membrane plasmique (d'après revue Duncan *et al.*, 2006).

➤ Les filaments intermédiaires

Le réseau de filaments intermédiaires (FIs) s'étend de l'enveloppe nucléaire jusqu'à des points d'attaches situés sur la membrane plasmique, appelés desmosomes et hémidesmosomes (Figure 23B). Les FIs sont formés de protéines fibrillaires qui s'associent sous forme de dimères superenroulés (Figure 25A). Deux dimères superenroulés s'associent de manière anti-parallèle pour former une sous-unité tétramérique. Ces dernières se mettent bout à bout pour former un protofilament de 3 nm de diamètre. L'assemblage de 8 protofilaments donne naissance à un polymère flexible, résistant et non extensible d'environ 10 nm de diamètre. Contrairement aux microfilaments d'actine et aux microtubules, les FIs ne sont pas polarisés et sont capables de se polymériser spontanément sans consommer d'énergie. Ce constituant du cytosquelette est l'élément le plus stable du cytosquelette et n'est pas aussi dynamique que les microtubules et les microfilaments d'actine.

Les protéines constituant ce réseau sont extrêmement variées et leur nature chimique diffère selon le type cellulaire et la localisation intracellulaire. Il existe six types de filaments intermédiaires différents (I à VI): les **kératines de type acides**, les **kératines de type neutres et basiques**, les **vimentines et apparentés**, les **protéines de neurofilaments**, les **lamines** et la **nestine** (Figure 25B). Ces FIs jouent un rôle important au niveau de la structure du noyau. Ils participent au maintien de la forme cellulaire, à l'ancrage des organites et confèrent aux cellules un support mécanique supplémentaire.

➤ Les microtubules

Les microtubules sont les éléments les plus gros du cytosquelette. Ils traversent le cytoplasme de la cellule et se regroupent tous au niveau d'un centre organisateur des microtubules (MTOC : MicroTubule Organizing Center) au niveau du noyau (Figure 23C). Un microtubule est un polymère cylindrique creux et rigide de 25 nm de diamètre. Il est composé de 13 protofilaments, eux même constitués de dimères d' α -tubuline et β -tubuline, protéines globulaires de 55 kDa (Figure 26A). Chaque microtubule est polarisé : l'extrémité positive à croissance rapide se trouve en périphérie au niveau de la membrane plasmique alors que l'extrémité négative à croissance lente est située au niveau du MTOC. Les dimères d' α -tubuline et β -tubuline, associés au GTP, sont préférentiellement polymérisés au niveau de l'extrémité positive du microtubule (Figure 26A). Les microtubules se polymérisent et se dépolymérisent continuellement grâce à l'hydrolyse du GTP de la sous-unité β -tubuline.

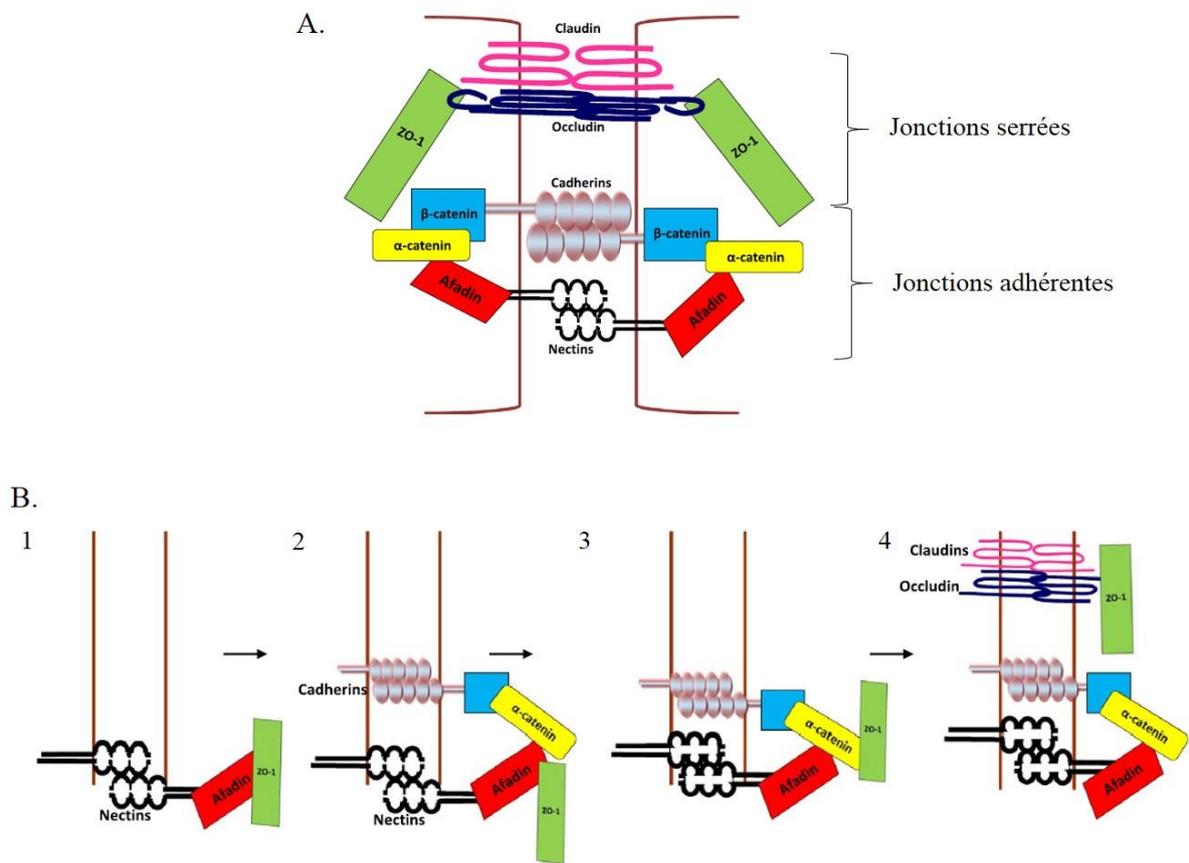


Figure 27 : Modèle d'assemblage des jonctions serrées associé à la formation des jonctions adhérentes. (A) Les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires, les claudines et l'occludine, et de protéines intracytoplasmiques, ZO-1. Les jonctions adhérentes sont composées de protéines transmembranaires, les cadhérines et les nectines, et de protéines intracytoplasmiques, les caténines (α et β) et l'afadine. (B) 1. Les nectines de deux cellules voisines interagissent ensemble et recrutent l'afadine. Cette dernière recrute à son tour la protéine ZO-1. 2. Les domaines extracellulaires des cadhérines des deux cellules se dimérisent. Leurs domaines cytoplasmiques recrutent la β -caténine qui recrute à son tour l' α -caténine, une protéine qui lie l'afadine. 3. La protéine ZO-1 va se lier de façon transitoire à l' α -caténine. 4. Les jonctions serrées commencent à se former avec le recrutement à la membrane de l'occludine puis des claudines. Enfin, ZO-1 est transloqué des jonctions adhérentes vers les jonctions serrées (d'après Campbell *et al.*, 2017).

Deux types de moteurs moléculaires ont été identifiés au niveau des microtubules : les **dynéines** et les **kinésines**. Ces protéines sont capables d'hydrolyser l'ATP, afin de se mouvoir le long du microtubule. Les dynéines sont caractérisées par un déplacement rétrograde et se déplacent vers le noyau, alors que le déplacement des kinésines est antérograde avec un sens de direction vers la membrane plasmique (Figure 26B). Ces moteurs moléculaires assurent le transport de différents organites ainsi que des vésicules de transport, de recyclage ou d'ARN.

Les microtubules permettent également le mouvement des chromosomes lors de la division cellulaire sur le fuseau mitotique. Leur rigidité exceptionnelle supportent les tensions et soutiennent les filaments d'actine lors des changements de forme de la cellule ou lors de la migration.

4. Assemblage et formation des jonctions serrées

L'assemblage des jonctions serrées est dépendant de la formation des jonctions adhérentes. Tout comme les jonctions serrées, les jonctions adhérentes sont composées de protéines transmembranaires, les cadhérines et les nectines, et de protéines intracytoplasmiques, les caténines et l'afadine (Figure 27A). Les jonctions adhérentes et ZO-1 jouent un rôle clé dans la formation des jonctions serrées. En effet, la délétion des nectines, de l'afadine, des cadhérines, de l' α -caténine ou de ZO-1 empêchent la formation des jonctions serrées (revue Campbell *et al.*, 2017).

L'assemblage des jonctions intercellulaires est un processus multi-étapes (revue Campbell *et al.*, 2017). Les nectines d'une cellule forment des interactions homophiliques avec les nectines de la cellule voisine (Figure 27B). Après dimérisation des nectines, celles-ci recrutent l'afadine qui va interagir avec ZO-1. Ensuite, les principales protéines des jonctions adhérentes, les cadhérines, se dimérisent à travers l'espace paracellulaire et établissent les premiers contacts d'adhérence cellule-cellule. Les cadhérines vont recruter la β -caténine qui recrute à son tour l' α -caténine, une protéine qui lie l'afadine. La protéine ZO-1 se lie à l' α -caténine. Une fois les jonctions adhérentes matures, l'assemblage des jonctions serrées commence par le recrutement à la membrane des occludines, des claudines et de ZO-1 qui se transloquent des jonctions adhérentes vers les jonctions serrées.

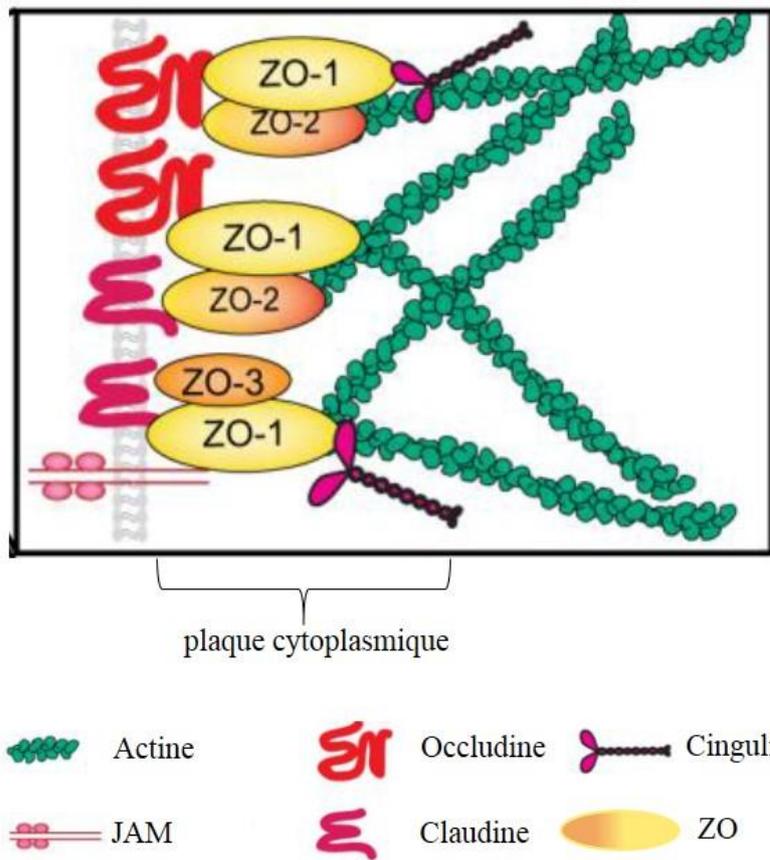


Figure 28 : Interaction du cytosquelette d'actine et des jonctions serrées. Les protéines transmembranaires des jonctions serrées (claudines, occludine et JAM) sont liées au cytosquelette d'actine via les protéines de la plaque cytoplasmique (ZO-1, ZO-2 et cinguline) (d'après revue Sluysman *et al.*, 2017).

L'assemblage des jonctions serrées est contrôlé par des mécanismes de phosphorylation. La phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A) est un régulateur négatif de l'assemblage des jonctions serrées. La PP2A interagit avec ZO-1, la claudine et l'occludine et les déphosphorylent (Nita-Lazar *et al.*, 2010; Nunbhakdi-Craig *et al.*, 2002 ; Seth *et al.*, 2007). Le recrutement de PP2A au niveau des jonctions adhérentes permet la phosphorylation du complexe claudine-occludine-ZO-1 et la reformation des jonctions serrées. Il existe d'autres protéines qui régulent l'assemblage des jonctions serrées par phosphorylation et déphosphorylation comme les phosphatases : PP1, PP2A, PP2B et les kinases : PKC, PKA, MLCK, PI3K, MAPK (revue González-Mariscal *et al.*, 2008).

II. Jonctions serrées et cytosquelette : acteurs de la déformation cellulaire nécessaire à la migration

1. Les jonctions serrées et le cytosquelette

Dans les épithélia et les endothélia des vertébrés, l'organisation et l'intégrité des jonctions serrées sont établies et maintenues grâce au cytosquelette d'actine et de microtubules.

a. Le cytosquelette d'actine et les jonctions serrées

L'association structurale entre le cytosquelette d'actine et les jonctions serrées a été observée pour la première fois en microscopie électronique en transmission. Les microfilaments d'actine apparaissent insérés directement au niveau de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées (Madara and Pappenheimer *et al.*, 1987 ; Madara *et al.*, 1988). Le rôle du cytosquelette d'actine dans l'organisation et la fonction des jonctions serrées a été montré dans un premier temps à l'aide de la cytochalasine, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine. Ce dernier perturbe la fonction de barrière des jonctions serrées dans de nombreux modèles cellulaires et animaux (Bentzel *et al.*, 1980 ; Cerejido *et al.*, 1981 ; Madara *et al.*, 1986 ; Meza *et al.*, 1980). Il altère aussi la structure des jonctions serrées *in vivo* dans des hépatocytes de souris (Rassat *et al.*, 1982a).

Les protéines ZO de la plaque cytoplasmique jouent un rôle central dans l'interaction du cytosquelette d'actine et des jonctions serrées (Figure 28) (Fanning *et al.*, 1998 ; Van Itallie *et al.*, 2009). En effet, une inhibition de l'expression de ZO-1 et ZO-2 dans des cellules épithéliales MDCK provoque une réorganisation de l'actine et de la myosine apicale ce qui altère la fonction de barrière des jonctions serrées (Van Itallie *et al.*, 2009 ; Fanning *et al.*, 2012). De même, une autre étude montre que l'absence de ZO-1 modifie l'organisation de la

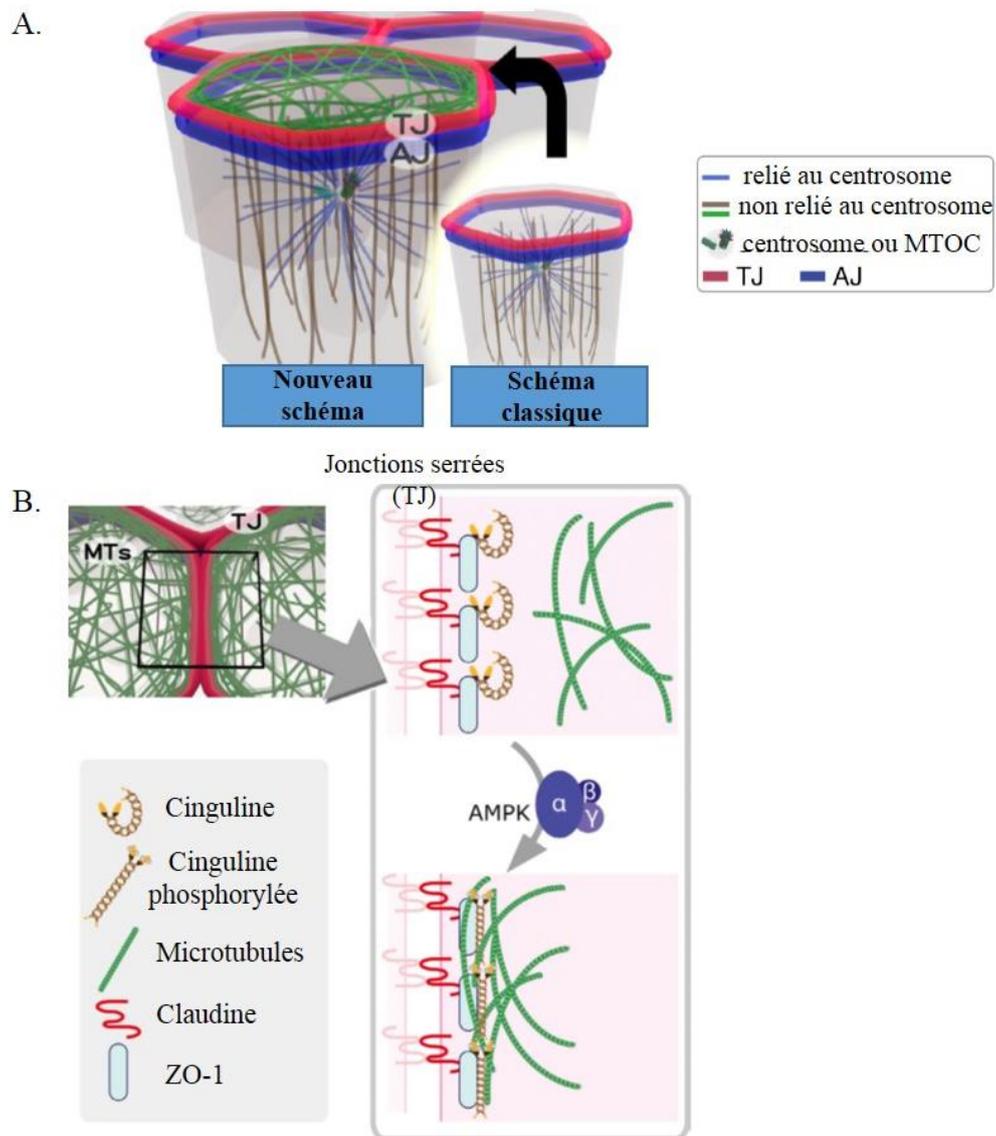


Figure 29 : Interaction du réseau de microtubules aux jonctions serrées. (A) Le schéma classique du réseau de microtubule comprend deux réseaux : un relié au centrosome ou MTOC (en bleu) et un non relié au centrosome (marron). Le nouveau schéma comprend en plus un réseau PAN (Planar Apical Network) (vert) qui est relié aux jonctions serrées (TJ). (B) Au niveau des jonctions serrées, la cinguline est associée à la claudine par ZO-1. Quand la cinguline est phosphorylée par l'AMPK, elle permet la liaison des microtubules et contrôle leur association avec les jonctions serrées (d'après Yano *et al.*, 2013)

myosine et la localisation des protéines des jonctions serrées des cellules MDCK (Tokuda *et al.*, 2014). Une autre protéine de la plaque cytoplasmique, la cinguline, recrutée par ZO-1, interagit directement avec l'actine (Figure 28). Cependant, aucune modification du réseau d'actine n'est observée lors d'une répression ou d'une surexpression de la cinguline (revue Sluysman *et al.*, 2017). Le rôle de la cinguline dans l'organisation et la contraction du réseau d'actine apparaît donc indirect, à travers sa liaison avec différents régulateurs GTPases de la famille des Rho.

b. Le cytosquelette de microtubules et les jonctions serrées

Le lien entre les microtubules et les jonctions serrées est moins bien établi. L'importance des microtubules dans la fonction et l'organisation des jonctions serrées a tout d'abord été montrée par l'utilisation de la colchicine ou le nocodazole, des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules. Dans des hépatocytes de souris *in vivo*, la colchicine altère la perméabilité et l'organisation des jonctions serrées (Rassat *et al.*, 1982 n°2). De même, dans des cellules épithéliales de l'intestin Caco-2, le nocodazole provoque une altération de la structure et de la fonction des jonctions serrées (Goltfelty *et al.*, 2014). Le lien entre microtubules et jonctions serrées a clairement été démontré dans une étude récente avec la découverte du réseau de microtubules PAN (Planar Apical Network) en microscopie à illumination structurée (Yano *et al.*, 2013). Ce réseau a été identifié sous la membrane plasmique au niveau des jonctions des cellules épithéliales mammaires Eph4 (Figure 29A). Il n'est pas relié au centrosome MTOC. L'interaction entre jonctions serrées et microtubules est réalisée par la cinguline lorsqu'elle est phosphorylée *via* AMPK (Figure 29B). L'interaction cinguline-tubuline a été confirmée dans les cellules MDCK (Mangan *et al.*, 2016).

2. La migration à l'échelle de la cellule

Les principaux éléments responsables de la déformation de la cellule nécessaire à la TEM, à la migration et à l'invasion sont les constituants du cytosquelette. Il existe différents modes de migration qui ont été classés en fonction de la morphologie des cellules, l'organisation du cytosquelette d'actine et la structure du tissu dans lequel la cellule migre. On distingue : la **migration collective** et la **migration individuelle** (revue Krakhmal *et al.*, 2015). La migration collective est caractérisée par le déplacement d'un amas de cellules maintenues entre elles par des jonctions cellules-cellules alors que la migration individuelle nécessite le détachement d'une cellule par une perte des jonctions intercellulaires. Dans ce dernier type de

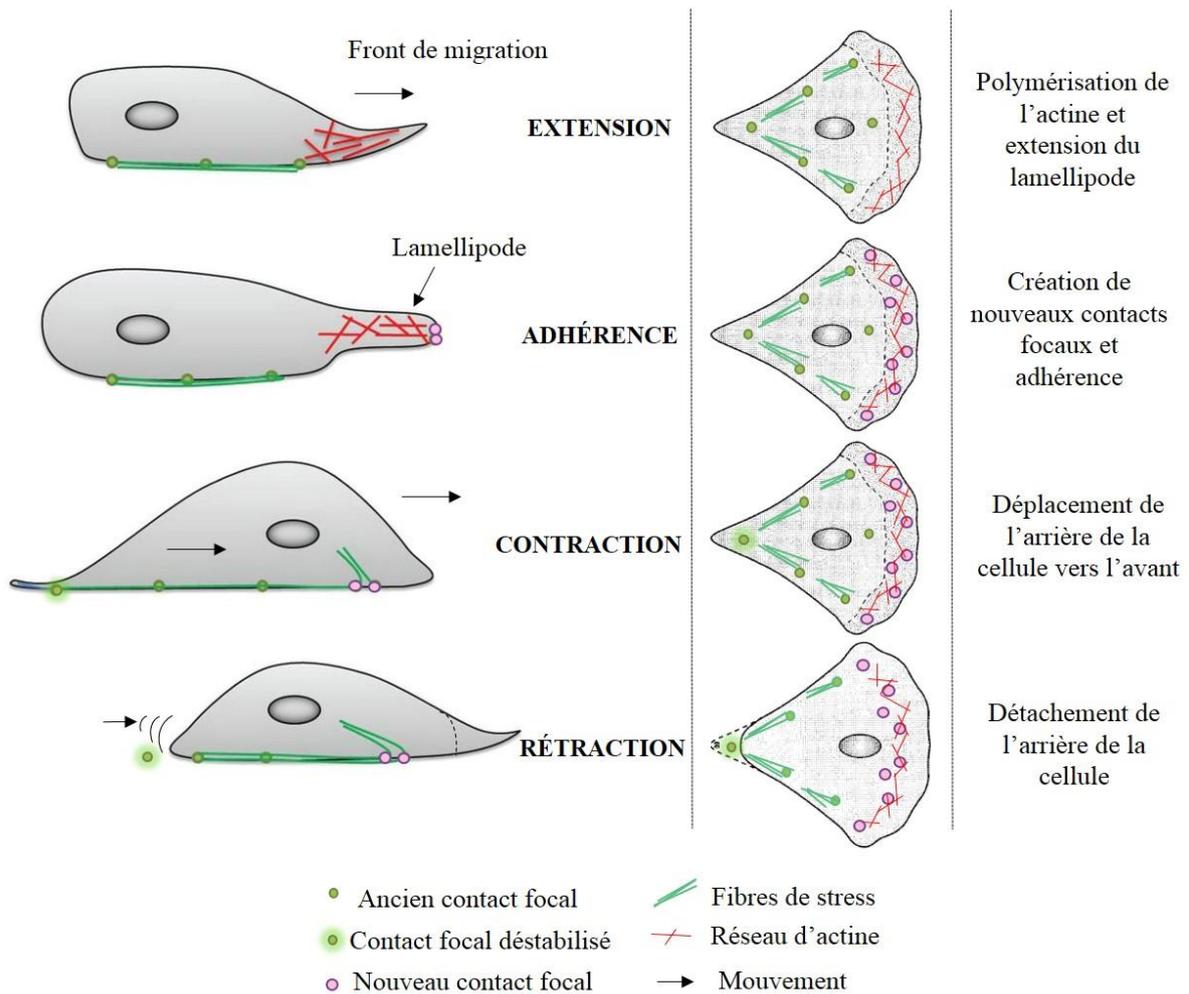


Figure 30 : Les différentes étapes de la migration cellulaire. (A) Le début de la migration commence par la polarisation de la cellule avec la polymérisation du réseau d'actine au niveau du front de migration. Cette polymérisation d'actine provoque la formation d'une protrusion membranaire : le lamellipode. (B) Le lamellipode va créer de nouveaux contacts focaux pour adhérer au support. (C) Ces nouveaux contacts focaux et la tension exercée par les fibres de stress vont permettre à la cellule de se contracter et de basculer l'arrière de la cellule vers l'avant de la cellule. (D) En parallèle, les contacts focaux situés à l'arrière de la cellule sont déstabilisés, ce qui va permettre à l'arrière de la cellule de se détacher du support et de se rétracter (d'après revue Chi *et al.*, 2014).

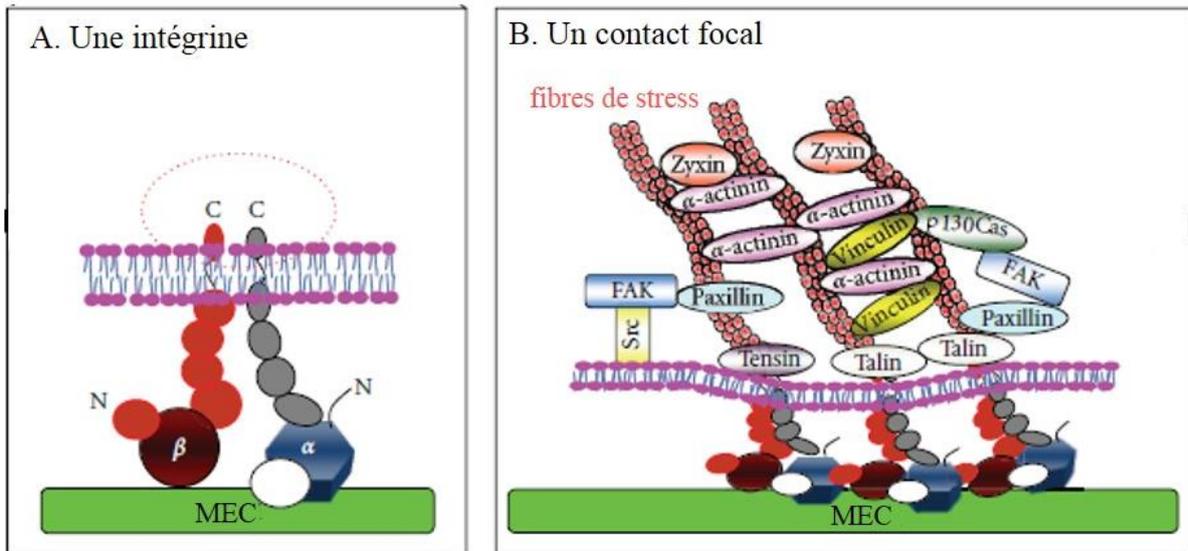


Figure 31 : Structure des contacts focaux. (A) Les contacts focaux sont constitués d'un hétérodimère d'intégrine composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . (B) Les hétérodimères d'intégrine se regroupent en clusters pour former un contact focal, appelé aussi complexe d'adhérence focale. Les intégrines font le lien avec le milieu extérieur, la matrice extracellulaire (MEC) et l'intérieur de la cellule, les fibres de stress d'actine. La partie intracellulaire des intégrines recrutent de nombreuses protéines afin d'assurer le lien avec le cytosquelette d'actine comme la taline, la paxilline, la tensine, l' α -actinine, la FAK (Focal Adhesion Kinase) (d'après revue Nagano *et al.*, 2012).

migration, on distingue la migration amiboïde qui est caractérisée par une forme arrondie des cellules et la migration mésenchymateuse où les cellules adoptent une forme allongée. Cette dernière est le mode de migration le plus commun et le plus décrit. Ici, nous développerons principalement le mode de migration mésenchymateuse.

a. Les différentes étapes de la migration cellulaire

En 1996, Lauffenburger et Horwitz sont les premiers à décrire les mécanismes moléculaires de la migration mésenchymateuse (Lauffenburger *et al.*, 1996). C'est un phénomène cyclique décomposé en plusieurs étapes qui commence par l'**extension** de la cellule (Figure 30). En réponse à un stimulus (stress mécanique, chimioattractant...), la cellule se polarise avec la présence d'un bord arrière et d'un bord avant, nommé le front de migration. A ce niveau, les cellules forment le lamellipode par une extension de sa membrane plasmique. Ce phénomène est effectué grâce à la polymérisation de l'actine au front de migration. A mesure que le lamellipode s'étend, de nouveaux contacts focaux sont créés au niveau de ce dernier ce qui permet l'**adhérence** de la cellule au support sous-jacent. Ces nouveaux contacts focaux servent de sites de traction pour le déplacement de l'arrière de la cellule vers l'avant. Ce phénomène, nommé **contraction**, est permis grâce aux fibres de stress, constituées du système acto-myosine. Parallèlement, les contacts focaux situés à l'arrière de la cellule sont déstabilisés et se détachent du support permettant ainsi la **rétraction** de l'arrière de la cellule.

b. Les structures d'adhérence d'une cellule en migration

Les **contacts focaux** (ou adhérences focales) permettent à la cellule d'adhérer à un support. Ils font le lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine de la cellule. L'interaction de la cellule avec la MEC se fait principalement par une famille de récepteurs d'adhérence cellulaire, les **intégrines**. Ces protéines transmembranaires forment des hétérodimères constituées de deux sous-unités, une chaîne α et une β (Figure 31A). Les intégrines se regroupent en clusters et forme une structure appelée **contact focal** (Figure 31B). Chaque intégrine reconnaît spécifiquement un ligand de la MEC comme le collagène et la fibronectine. Du côté intracytoplasmique, des protéines telles que la vinculine, la taline et la paxilline, font le lien avec le cytosquelette d'actine organisé en fibre de stress.

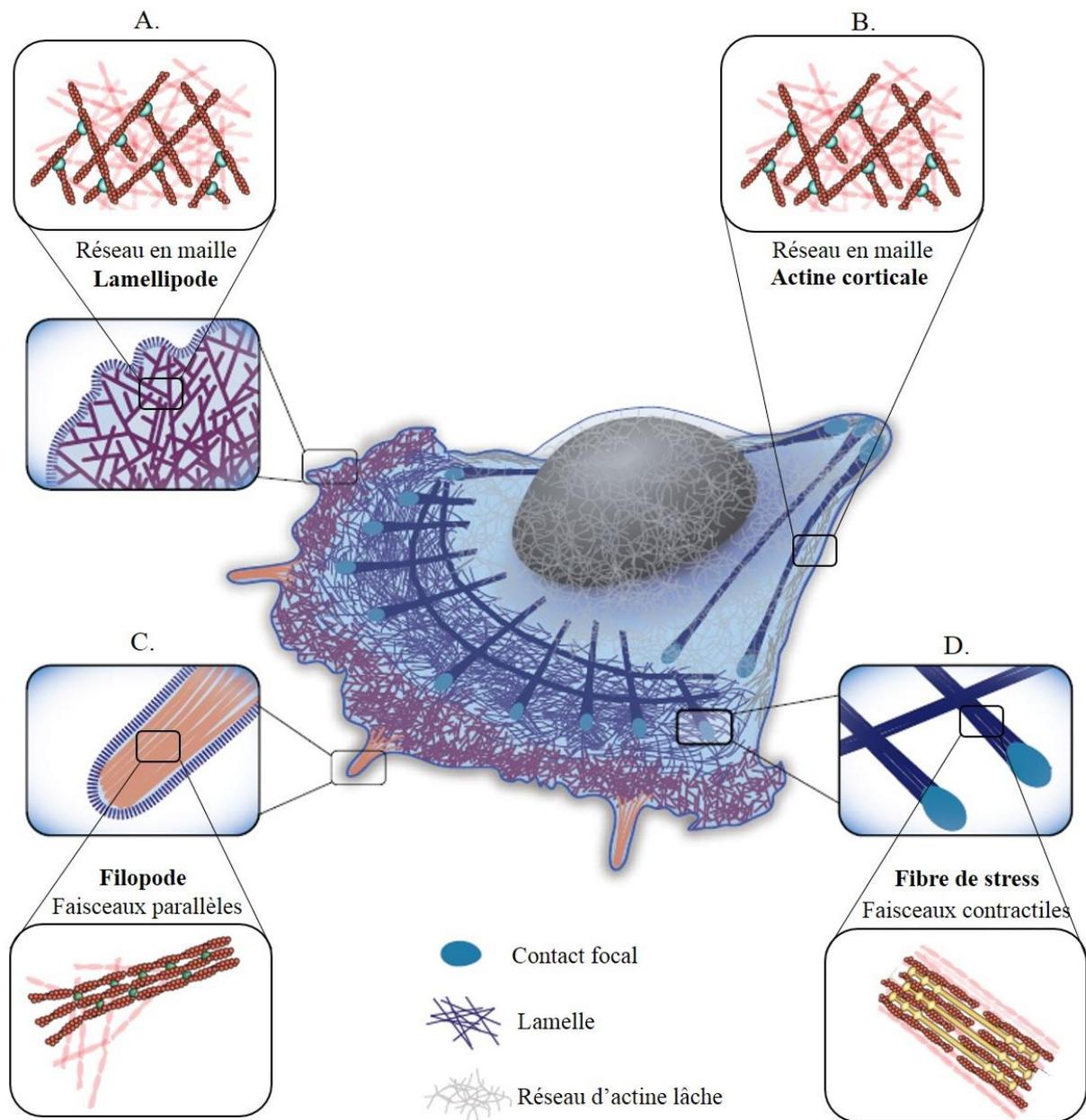


Figure 32 : Organisation de l'actine cellulaire dans une cellule mésenchymateuse. (A) et (B) Dans le lamellipode et l'actine corticale, le réseau d'actine s'organise **en maille** grâce aux interconnexions avec la filamine (bleu). La lamelle est un réseau d'actine formant des mailles, permettant l'interaction entre le lamellipode et l'actine corticale. (C) Dans les **filopodes**, les microfilaments d'actine s'organisent en **faisceaux parallèles** maintenus par une protéine intercalaire, la fimbrine (vert). (D) Les **fibres de stress** s'organisent en **faisceaux contractiles** et sont maintenues par une protéine de liaison, l' α -actinine. Ils sont sous forme de paquets de filaments d'actine associés à la myosine de type II (jaune). Ces fibres de stress sont orientées parallèlement à l'axe de migration et sont ancrées à la MEC grâce à un ou plusieurs contacts focaux (d'après revue Letort *et al.*, 2015 et revue Fletcher *et al.*, 2010).

c. Les différentes structures morphologiques d'une cellule en migration

La migration cellulaire mésoenchymateuse est dépendante de différentes structures des filaments d'actine (revue Letort *et al.*, 2015). Les microfilaments d'actine sont retrouvés dans la cellule sous trois formes d'organisation spatiale.

Le réseau d'actine s'organise **en maille** grâce aux interconnexions avec la filamine dans le **lamellipode** et l'**actine corticale** (Figure 32A-B). Le lamellipode est une protrusion membranaire ou extension cytoplasmique aplatie et large avec un réseau d'actine très dense et dynamique au niveau du front de migration (Figure 32A). L'actine corticale est un réseau dense sous-membranaire qui joue un rôle important dans la forme de la cellule (Figure 32B). Ce réseau sert d'appui à la polymérisation de nouveaux filaments qui repoussent la membrane, formant ainsi progressivement le lamellipode. La lamelle permet l'interaction entre le réseau du lamellipode et l'actine corticale.

Les microfilaments d'actine s'organisent en **faisceaux parallèles** maintenus par une protéine intercalaire, la fimbrine, dans les **filopodes** (Figure 32C). Les filopodes sont fins et cylindriques, mesurent de 1 μm à 10 μm de long et sont constitués de 10 à 30 filaments d'actine liés parallèlement. Le filopode joue un rôle de senseur pour explorer l'environnement local afin de contrôler l'orientation du lamellipode, sur lequel il est fixé.

Le réseau d'actine organisé en **faisceaux contractiles** est maintenu par une protéine de liaison, l' α -actinine, dans les **fibres de stress** (Figure 32D). Ils sont sous forme de paquets de filaments d'actine associés à la myosine de type II. Ces faisceaux sont capables de se contracter et de générer une force mécanique. Ces fibres de stress sont orientées parallèlement à l'axe de migration et sont ancrées à la MEC grâce à un ou plusieurs contacts focaux.

Lors de l'invasion, la cellule peut établir un autre type de protrusion membranaire : l'**invadopode** (revue Murphy *et al.*, 2011). Comme le lamellipode, il est constitué d'un réseau de microfilaments d'actines **en maille**. Il est localisé du côté basal de la cellule en contact avec la MEC. C'est au niveau de cet invadopode que la cellule clive de façon protéolytique les composants de la MEC par les MMPs et va faciliter le passage des cellules à travers la membrane basale. Les cellules se détachent ainsi de la tumeur primaire, migrent à travers le stroma et gagnent la circulation sanguine.

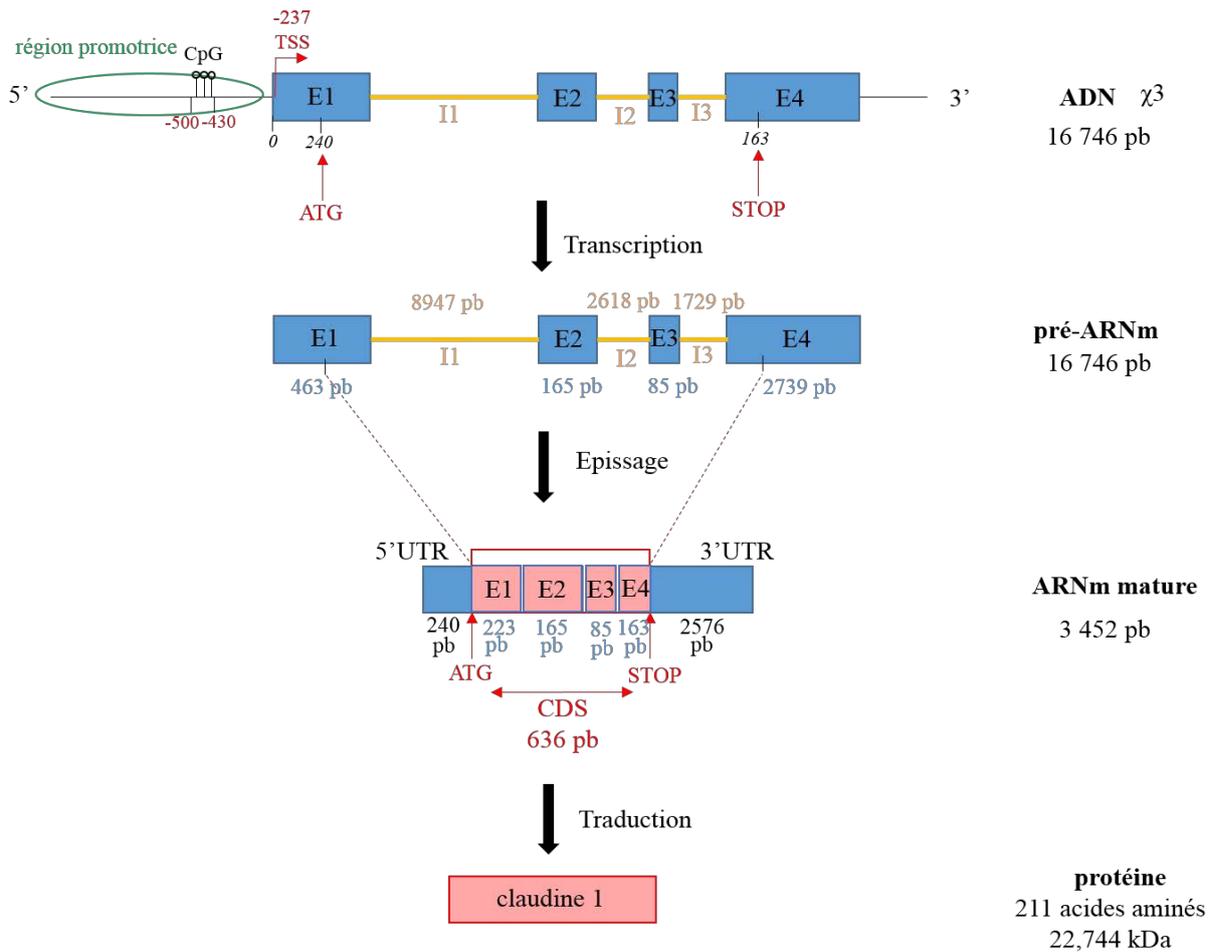


Figure 33 : Structure du gène de la claudine 1 chez l'humain. Le gène de la claudine 1 est positionné sur le chromosome 3 et est composé de 16 746 paires de bases (pb). Il contient de 4 exons (E1 de 463 pb, E2 de 165 pb, E3 de 85 pb et E4 de 2739 pb) et de 3 introns (I1 de 8947 pb , I2 de 2618 pb et I3 de 1729 pb). Le site d'initiation de la traduction (ATG) est situé au niveau du 240^{ème} nucléotide de l'exon 1 et le codon STOP est localisé au niveau du 163^{ème} nucléotide de l'exon 4. Le site d'initiation de la transcription (TSS) a été prédit en position -237 par rapport à l'ATG. Dans la région promotrice du gène de la claudine 1, des régions riches en îlots CpG ont été identifiées en position -430 à -500. L'épissage du pré-ARN messenger donne un ARN messenger mature de 3 452 pb. Cet ARN messenger contient une séquence codante (CDS) de 636 pb avec en amont une région 5'UTR de 240 pb et en aval une région 3'UTR de 2576 pb. L'ARN messenger est ensuite traduit en une protéine de 22,744 kDa, constituée de 211 acides aminés.

Les microtubules et les FIs travaillent en collaboration et interagissent avec le cytosquelette d'actine pour contrôler la migration et l'invasion cellulaire (revue Leduc *et al.*, 2015 ; revue Tang *et al.*, 2017). Les microtubules facilitent la formation de protrusions membranaires en supportant physiquement la structure et en délivrant des vésicules de transport contenant les constituants nécessaires pour l'extension de la membrane. Les microtubules permettent également de réguler la dynamique des contacts focaux, la contraction locale et participent à la polarisation de la cellule (revue Tang *et al.*, 2017). Quant aux FIs, ils rentrent en jeu au niveau de la dynamique des contacts focaux, de la contraction cellulaire et de la rigidité du noyau (revue Tang *et al.*, 2017). Parmi eux, la vimentine joue un rôle important. En effet, la diminution de son expression entraîne un ralentissement de l'invasion des cellules cancéreuses de pancréas (revue Leduc *et al.*, 2015). Dans des cellules épithéliales de la rétine, un knock-down de la vimentine prévient la polarisation et la migration cellulaire au cours d'un test de cicatrisation. En parallèle, l'organisation du réseau de microtubule est affecté (Gan *et al.*, 2016).

III. La protéine claudine 1 : une protéine clé dans les jonctions serrées

1. Découverte de la claudine 1

La protéine claudine 1 a été identifiée par l'équipe de Tsukita en 1998 à partir d'une fraction de jonctions isolée de foie de poulet (Furuse *et al.*, 1998a). L'ADN murin de la claudine 1 a aussi été extrait et séquencé à partir de foie de souris en 1998. En 1999, l'isoforme de la claudine 1 humaine a été identifiée et nommée SEMP1 (Senescence-associated Epithelial Membrane Protein 1). En effet, les cellules HMECs sénescentes expriment fortement SEMP1 au niveau transcriptionnel contrairement aux cellules HMECs en phase de prolifération (Swisshelm *et al.*, 1999). Une analyse de la séquence peptidique de SEMP1 a révélé une homologie de 91% avec la protéine claudine 1 du poulet et de la souris (Swisshelm *et al.*, 1999).

2. Organisation structurale du gène et de la protéine claudine 1

a. Structure du gène de la claudine 1

Chez l'Homme, le gène codant la protéine claudine 1 est localisé sur le chromosome 3 et est composé de 16 746 paires de bases (**Figure 33**) (Halford *et al.*, 2000 ; Krämer *et al.*, 2000). Ce gène est hautement conservé chez de nombreux vertébrés. Il contient **4 exons** (E1-E4) de 463,

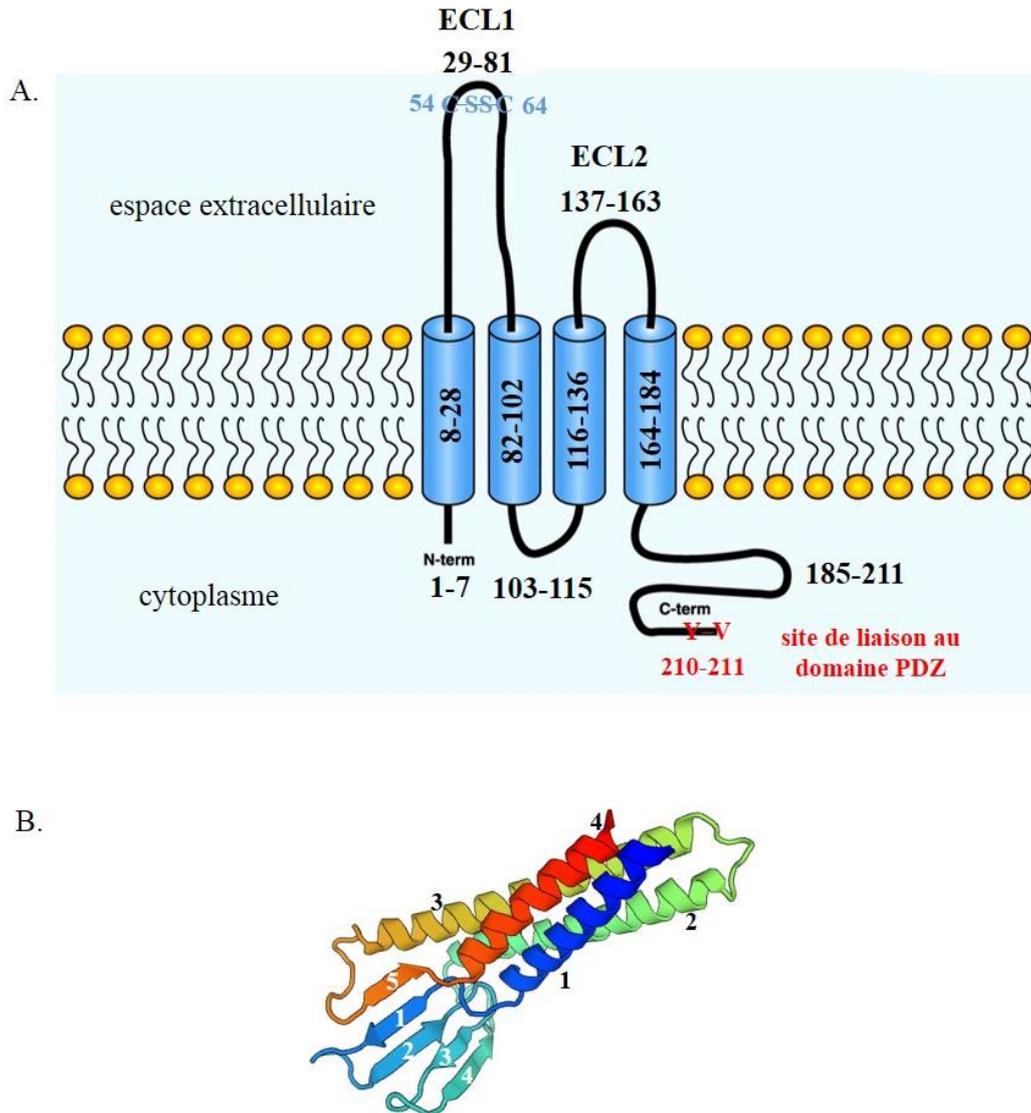


Figure 34 : Structure de la protéine claudine 1 chez l'humain. (A) La protéine claudine 1 possède quatre régions transmembranaires (résidus 8-28, 82-102, 116-136 et 164-184). La partie extracellulaire est organisée en 2 boucles (ECL1 et ECL2) comprenant les résidus 29 à 81 et 137 à 163 respectivement. Au niveau de la boucle ECL1, les résidus cystéines 54 et 64 sont reliés par un pont disulfure (S-S). Du côté cytoplasmique, la protéine commence par une courte queue N-terminale (résidus 1 à 7) et se termine par une longue queue C-terminale (résidus 185 à 211). La boucle intracytoplasmique reliant la 2^{ème} et 3^{ème} région transmembranaire est constituée des résidus 103 à 115. Au niveau de la queue C-terminale, la claudine 1 possède un site de liaison au domaine PDZ comprenant le motif Tyrosine (Y)-Valine (V), conservé chez la majorité des claudines. (B) En modélisation 3D, les domaines transmembranaires sont organisés en forme d'hélice α alors que les deux boucles extracellulaires sont disposées en feuillet β . La boucle ECL1 est composée de 4 feuillets β antiparallèles (1, 2, 3, 4) et la boucle ECL2 d'un seul feuillet β (5) (d'après Swissmodel, Morin *et al.*, 2005).

165, 85 et 2739 paires de bases ainsi que **3 introns** (I1-I3). Le site d'initiation de la traduction (**ATG**) est situé au niveau du 240^{ème} nucléotide de l'exon 1 et le codon **STOP** est localisé au niveau du 163^{ème} nucléotide de l'exon 4 (Yates *et al.*, 2015 (Ensembl consortium)). Le site d'initiation de la transcription (**TSS**) a été prédit en position -237 par rapport à l'ATG (Krämer *et al.*, 2000). Dans la région promotrice du gène de la claudine 1, des régions riches en îlots CpG ont été identifiées en position -430 à -500, par rapport à l'ATG. L'épissage du pré-ARN messager donne un ARN messager mature de 3 452 pb. Cet ARN messager contient une séquence codante (**CDS**) de 636 pb avec en amont une région **5'UTR** de 240 pb et en aval une région **3'UTR** de 2576 pb. La région CDS est traduite et permet la production de la **protéine claudine 1**.

b. Structure de la protéine claudine 1

La protéine claudine 1 a un poids moléculaire de 22,744 kDa et est constituée de 211 acides aminés. Elle possède quatre régions transmembranaires (**Figure 34A**) (UniProt Consortium). La partie extracellulaire est organisée en 2 boucles, ECL1 et ECL2, comprenant les résidus 29 à 81 et 137 à 163 respectivement. Au niveau de la boucle ECL1, les résidus cystéines 54 et 64 sont reliés par un pont disulfure et font partie du motif conservé de la famille des claudines, le motif W-GLW-C-C-R. Du côté cytoplasmique, la protéine commence par une courte queue N-terminale (résidus 1 à 7) et se termine par une longue queue C-terminale (résidus 185 à 211). La boucle intracytoplasmique reliant la 2^{ème} et 3^{ème} région transmembranaire est constituée des résidus 103 à 115. Au niveau de la queue C-terminale, la claudine 1 possède un site de liaison au domaine PDZ comprenant le motif Tyrosine (Y)-Valine (V), conservé chez la majorité des claudines. La modélisation en 3D de la claudine 1 montre que les domaines transmembranaires sont organisés en forme d'hélice α alors que les deux boucles extracellulaires sont disposées en feuillet β (**Figure 34B**) (Suzuki *et al.*, 2014). La boucle ECL1 est composée de 4 feuillets β antiparallèles (1, 2, 3, 4) et la boucle ECL2 d'un seul feuillet β (5). Le pont disulfure, qui permet la stabilité de la structure, se forme entre les feuillets β 3 et β 4.

3. Régulation de l'expression du gène et de la protéine claudine 1

L'expression de la claudine 1 peut être régulée au niveau **transcriptionnel** et au niveau **post-transcriptionnel**. La protéine claudine 1 peut aussi être régulée par de nombreuses modifications **post-traductionnelles**.

Facteur de croissance/cytokine	Modèle d'expérimentation	Expression de la claudine 1	Références
EGF	Culture primaire de thyrocytes de cochon	↑ (protéine)	Grände <i>et al.</i> , 2002
	Cellules de rein canin MDCK	↑ (protéine)	Singh <i>et al.</i> , 2003
	Cellules de rein canin MDCK	↔ (ARN et protéine)	Ikari <i>et al.</i> , 2009
HGF	Cellules cancéreuses mammaires humaine MDA-MB-231	↓ (ARN)	Martin <i>et al.</i> , 2002
	Cellule endothéliale de la veine de cordon ombilical HUVEC	↓ (ARN)	Martin <i>et al.</i> , 2004
	Cellules de rein canin MDCK	↓ (protéine)	Khoury <i>et al.</i> , 2005
TGFβ	Culture primaire de thymocytes porcins	↔ (protéine)	Grände <i>et al.</i> , 2002
	Cellules épithéliales de colon T84	↑ (protéine)	Howe <i>et al.</i> , 2005
	Culture primaire d'hépatocytes de rat	↓ (ARN et protéine)	Kojima <i>et al.</i> , 2007
TNFα	Culture primaire de thyrocytes humains	↑ (protéine)	Tedelind <i>et al.</i> , 2003
	Cellules cancéreuses pancréatiques humaine PANC-1	↑ (ARN et protéine)	Kondo <i>et al.</i> , 2008
	Cellules de carcinome de colon humain HT-29/B6	↓ (ARN) ↑ (protéine)	Amasheh <i>et al.</i> , 2010
	Cellules épithéliales intestinales de rat IEC-18	↑ (ARN et protéine)	Poritz <i>et al.</i> , 2011
	Cellules de carcinome de colon humain HT-29	↑ (ARN et protéine)	Bhat <i>et al.</i> , 2016
IL-1β	Culture primaire d'astrocytes humains	↑ (ARN et protéine)	Duffy <i>et al.</i> , 2000
	Culture primaire de thyrocytes humains	↑ (protéine)	Tedelind <i>et al.</i> , 2003
	Culture primaire de cellules musculaires lisses	↑ (ARN et protéine)	Fujita <i>et al.</i> , 2011
IFN-γ	Culture primaire de thyrocytes humains	↓ (protéine)	Tedelind <i>et al.</i> , 2003
	Cellules de parotides de rat Par-C10	↓ (protéine)	Baker <i>et al.</i> , 2008
	Cellules épithéliales intestinales humaine Caco-2	↓ (ARN et protéine)	Wei <i>et al.</i> , 2009
	Cellules épithéliales de colon T84	↑ (protéine)	Watson <i>et al.</i> , 2005
IL-4 et IL-13	Culture primaire de cellules musculaires lisses	↓ (ARN et protéine)	Fujita <i>et al.</i> , 2011
IL-17	Cellules épithéliales de colon T84	↑ (ARN et protéine)	Kinugasa <i>et al.</i> , 2000

Tableau 6 : Liste des facteurs de croissance et cytokines qui régulent l'expression de la claudine 1.

a. Régulation transcriptionnelle de la claudine 1

Le promoteur de la claudine 1 présente une activité située entre -1160 et +160 pb par rapport au TSS (Shiou *et al.*, 2007). Différents acteurs tels que des **facteurs de croissance**, des **cytokines**, des **facteurs de transcription** ou des **mécanismes épigénétiques** peuvent activer ou réprimer l'expression de la claudine 1.

➤ Facteurs de croissance et cytokines

De nombreux **facteurs de croissance** régulent l'expression de la claudine 1. Le facteur de croissance épidermique **EGF** (Epidermal Growth Factor) induit l'expression protéique de la claudine 1 dans des cultures primaires de thyrocytes porcins et dans les cellules MDCK (**Tableau 6**) (Grände *et al.*, 2002 ; Singh *et al.*, 2003). A l'inverse, l'expression de la claudine 1 est diminuée au niveau transcriptionnel et traductionnel en réponse au facteur de croissance des hépatocytes **HGF** (Hepatocyte Growth Factor) (**Tableau 6**) (Martin *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2004 ; Khoury *et al.*, 2005). Le facteur de croissance **TGFβ** (Transforming Growth factor-β) montre une activité biologique contradictoire. L'expression de la claudine 1 est augmentée dans des cellules épithéliales de colon T84 et est diminuée dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat (**Tableau 6**) (Howe *et al.*, 2005, Kojima *et al.*, 2007).

De nombreuses **cytokines** régulent également l'expression de la claudine 1. Les cytokines pro-inflammatoires **TNFα** (Tumor Necrosis Factor-alpha ou facteur de nécrose tumorale) et **IL-1β** (InterLeukine-1bêta) stimulent l'expression de la claudine 1 dans de nombreux types cellulaires (**Tableau 6**) (Tedelind *et al.*, 2003 ; Kondo *et al.*, 2008 ; Amasheh *et al.*, 2010 ; Poritz *et al.*, 2011 ; Bhat *et al.*, 2016 ; Duffy *et al.*, 2000 ; Fujita *et al.*, 2011). En revanche, la cytokine pro-inflammatoire **IFN-γ** (Interferon gamma) conduit à une diminution du taux d'ARNm et de protéine claudine 1 dans la majorité des modèles cellulaires étudiés (**Tableau 6**) (Tedelind *et al.*, 2003 ; Baker *et al.*, 2008 ; Wei *et al.*, 2009 ; Watson *et al.*, 2005). D'autres interleukines comme l'**IL-4**, l'**IL-13** et l'**IL-17** sont aussi capables de réguler positivement ou négativement l'expression de la claudine 1 (**Tableau 6**) (Fujita *et al.*, 2011 ; Kinugasa *et al.*, 2000).

➤ Facteurs de transcription

Par ailleurs, la claudine 1 peut être régulée par des **facteurs de transcription**.

Facteur de transcription	Modèle d'expérimentation	Expression de la claudine 1	Région promotrice de la claudine 1	Références
Snail et Slug	Cellules de rein canin MDCK	↓	2 motifs de liaison « boîte E » (CACCTG): +171 et +189	Martinez-Estrada <i>et al.</i> , 2006
STAT3	Cellules cancéreuses du foie Huh7 et HepG2	↓	-1723 à -1715, -911 à -903 et -709 à -701	Chen <i>et al.</i> , 2017
DEC1	Cellules cancéreuses mammaires humaine MCF-7 et MDA-MB-231	↓	ND	Liu <i>et al.</i> , 2013
RON	Cellules de rein canin MDCK Cellules cancéreuses mammaires humaine T-47D	↓	2 motifs de liaison « boîte E »	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Smad4	Cellules cancéreuses du côlon SW620 et SW480	↓	-200	Shiou <i>et al.</i> , 2007
HES1	Rat Cellules épithéliales intestinales humaine Caco-2/BBe	↓	ND	Zheng <i>et al.</i> , 2017
NF-κB65	Cellules de carcinome de l'endomètre humain KLE Cellules de carcinome hépatique humain HepG2	↑	motif NF-κB (5'GGGRNNYCC-3'): -310 à -301pb (/ATG)	Fortier <i>et al.</i> , 2013
B-cat/Tcf	Cellules cancéreuses du côlon SW480	↑	2 éléments de réponse Tcf4: -1061 à -1055 et -695 à -689	Miwa <i>et al.</i> , 2001
RUNX3	Cellules épithéliales gastriques SNU16 et SNU719	↑	3 sites de fixation (ACCACA): -1176 à -1080	Chang <i>et al.</i> , 2010
PPARγ	Cellules épithéliales nasales humaine	↑	ND	Ogasawara <i>et al.</i> , 2010
NR3C1	Rat Cellules épithéliales intestinales humaine Caco-2/BBe	↑	éléments de réponse GRE: -18 à -47 et -459 à -488	Zheng <i>et al.</i> , 2017
HIF1	Cellules épithéliales intestinales humaine T84 et Caco-2 Duodénum de souris HIF1 mutant	↑	-226	Saedi <i>et al.</i> , 2015
SP-1	Cellules d'épididyme de rat RCE-1 Cellules épithéliales intestinales humaines cdx2-IEC	↑	2 sites de fixation: -61 à +124 -138 à -76	Dufresne <i>et al.</i> , 2007 Wang <i>et al.</i> , 2012
Cdx-2	Cellules cancéreuses de colon humain SW480 et HTC116	↑	-1160 à -850	Bhat <i>et al.</i> , 2012
p63	Culture primaire de kératinocytes de souris	↑	-1400 à -613 et -61 à +1	Lopardo <i>et al.</i> , 2008

Tableau 7 : Liste des facteurs de transcription qui régulent l'expression de la claudine 1.

Il a été montré que **Snail et Slug**, des facteurs de transcription clés de la TEM, inhibent l'expression de la claudine 1 en se fixant directement sur son promoteur ([Tableau 7](#)) (Martinez-Estrada *et al.*, 2006). Les auteurs ont identifié 2 motifs de liaison « boîte E » (CACCTG) aux positions +171 et +189 pb. Le facteur de transcription **STAT3** permet également la répression de la claudine 1 en se fixant sur son promoteur (Chen *et al.*, 2017). Le facteur de transcription **DEC1** (Differentiated Embryo-Chondrocyte expressed gene 1) inhibe aussi l'expression la claudine 1 et promeut l'invasion cellulaire dans deux lignées cancéreuses mammaires (Liu *et al.*, 2013). Le Récepteur d'Origine Nantais **RON** inhibe l'expression de la claudine 1 en se fixant sur deux motifs de liaison « boîte E » (Zhang *et al.*, 2008). Cette diminution de l'expression de la claudine 1 est associée à une augmentation de la motilité des cellules MDCK et des cellules cancéreuses mammaires T-47D. Les facteurs de transcription **Smad4** et **HES1** (Hairy and Enhancer of Split-1) ont aussi été décrit comme régulateurs négatifs de la claudine 1 (Shiou *et al.*, 2007 ; Zheng *et al.*, 2017).

Un grand nombre de **facteurs de transcription régulent positivement** l'expression de la claudine 1 ([Tableau 7](#)). Le facteur **NF-κBp65** (Nuclear Factor-kappa B sous-unité p65) active la transcription de la claudine 1 en se fixant sur le motif spécifique « 5'GGGRNNYYCC-3' » du promoteur situé en position -310 à -301pb (Fortier *et al.*, 2013). Cette induction est associée à l'augmentation de la motilité des cellules de carcinome de l'endomètre et du foie. Des sites de liaison pour les facteurs de transcription **β-caténine/Tcf**, **RUNX3** (Runt-related transcription factor 3), **PPARγ** (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma), **NR3C1** (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member), **HIF1** (Hypoxia Inducible Factor 1), **SP-1** (Specificity Protein 1), **Cdx-2** (Caudal Homeobox-2) et **p63** ont été identifiés sur le promoteur de la claudine 1. Ils stimulent tous la transcription de la claudine 1 (Miwa *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2010 ; Ogasawara *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2017 ; Saeedi *et al.*, 2015 ; Dufresne *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2012 ; Bhat *et al.*, 2012 ; Lopardo *et al.*, 2008).

➤ Mécanismes épigénétiques

Des études récentes ont montré l'importance des mécanismes épigénétiques dans la régulation de l'expression de la claudine 1. L'**hyperméthylation du promoteur** est corrélée avec une faible expression de la claudine 1 dans les cancers mammaires hormono-dépendants. La 5-azacytidine, un agent déméthylant est capable de ré-induire l'expression de la claudine 1 (Di

	Modèle d'expérimentation	Expression de la claudine 1	Région ciblée de l'ARNm	Références
microARN-155	CSC ovarienne humaine isolées d'une tumeur de patients	↓	3'UTR (AGCAUUA)	Qin <i>et al.</i> , 2013
	Cellules de la barrière hémato-encéphalique hCMEC/D3	↓		Lopez-Ramirez <i>et al.</i> , 2014
microARN-29b	Souris miRNA-29-/- et tissus intestinal de patient	↓	3'UTR (UGGUGCUA)	Zhou <i>et al.</i> , 2015
	Cellules de carcinome hépatique HepG2 et HLE et tissus de carcinome hépatique humain	↓		Mahati <i>et al.</i> , 2017
	Cellules épithélial de l'intestin porcine IPEC-1	↓		Zhu <i>et al.</i> , 2017
microARN-142-5p	Tissus de thyroïde humaine Culture primaire de thyrocytes Cellule épithélial de rein humain HEK293T	↓	3'UTR (ACUUUAU)	Zhu <i>et al.</i> , 2016
microARN-375	Cellules cancéreuses pulmonaires A549, H1650, H1975, H358, SK-MES-1	↓	3'UTR (GAACAAA sur 4 positions différentes)	Yoda <i>et al.</i> , 2014
Protéine HuR	Cellules cancéreuses du côlon SW480 et SW620	Stabilité de l'ARNm	3'UTR (ARE: AU-rich element)	Krishnan <i>et al.</i> , 2009 Sharma <i>et al.</i> , 2013
Protéine Tristetrapolin	Cellules cancéreuses du côlon SW480 et SW620	Déstabilisation de l'ARNm	3'UTR (ARE: AU-rich element)	Krishnan <i>et al.</i> , 2009 Sharma <i>et al.</i> , 2013

Tableau 8 : Liste des microARN et des protéines liant l'ARN impliqués dans la régulation de l'expression de la claudine 1.

Cello *et al.*, 2013). Le facteur de transcription **ZMYND8** (Zinc Finger MYND (Myeloid, Nervy and DEAF-1)-type containing 8) reconnaît les régions riches en marques épigénétiques H3K36me2 et H4K16ac des nucléosomes de la région promotrice de la claudine 1. Il inhibe l'EMT en régulant positivement l'expression de gènes épithéliaux incluant la claudine 1 dans des cellules cancéreuses du sein et du col de l'utérus (Basu *et al.*, 2017).

b. Régulation post-transcriptionnelle de la claudine 1

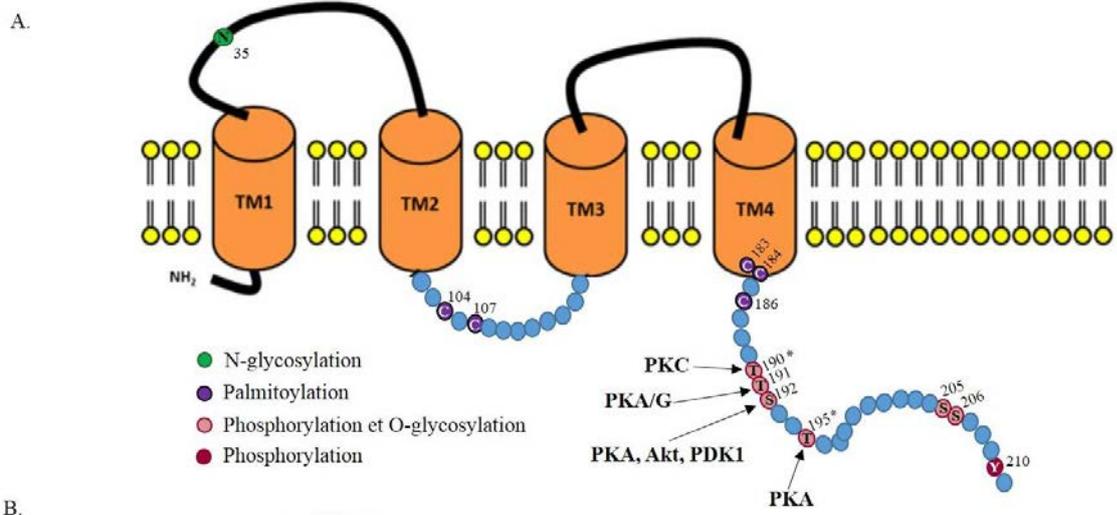
Des études ont montré l'importance de la régulation post-transcriptionnelle de la claudine 1 par des **micro-ARN** ainsi que par des **protéines liant l'ARN**. La longue queue 3'UTR de 2576 pb de la claudine 1 présente des sites de régulation clés.

Dans des cellules souches cancéreuses ovariennes, l'ARNm de la claudine 1 est régulé négativement par le **microARN-155** par le ciblage de 7 nucléotides (AGCAUUA) situés dans la région 3'UTR (**Tableau 8**) (Qin *et al.*, 2013). Le rôle du microARN-155 a aussi été décrit dans la fonction de barrière hémato-encéphalique par un ciblage de la région 3'UTR de l'ARNm de la claudine 1 (Lopez-Ramirez *et al.*, 2014). Les **microARN-29b**, **-142-5p** et **-375** ont également été décrit comme régulateur négatif de l'expression de la claudine 1 par reconnaissance de motifs spécifiques dans la partie 3'UTR (**Tableau 8**) (Zhou *et al.*, 2015 ; Mahati *et al.*, 2017 ; Zhu *et al.*, 2017 ; Zhu *et al.*, 2016 ; Yoda *et al.*, 2014). Trente autres microARN ont été identifiés ciblant la claudine 1 dans sa région 3'UTR à partir de la base de données expérimentales miRTarBase (Chou *et al.*, 2016).

Par ailleurs, dans des cellules cancéreuses du côlon, des inhibiteurs de HDAC (Histone DeAcétylase) tel que la TSA (TrichoStatine A) et le butyrate de sodium modulent l'expression de la claudine 1 en diminuant **la stabilité de son ARNm** (Krishnan *et al.*, 2009). La même équipe a démontré que cette régulation HDAC-dépendante est contrôlée par la fixation de la protéine **HuR** (human antigen R) et de la **tristetraprolin** (**Tableau 8**) (Sharma *et al.*, 2013). La protéine HuR permet de stabiliser le transcrit claudine 1 alors que la tristetraprolin va le déstabiliser. Ces protéines se lient sur des séquences ARE (AU-rich element) ayant pour motif AUUUA dans la région 3'UTR de l'ARNm de la claudine 1.

c. Régulation post-traductionnelle de la claudine 1

La protéine claudine 1 est également la cible de modifications post-traductionnelles au niveau de sa queue C-terminale intracytoplasmique. La claudine 1 peut subir diverses modifications



B.

Type de modification	Enzyme	Site de la modification	Localisation de la claudine 1	Espèces	Références
Phosphorylation	PKA et PKC	T190 et T195	Transport du noyau vers le cytoplasme	Cellules de mélanome G361	French <i>et al.</i> , 2009 *
	MAPK	T203	Membrane	Cellules endothéliales de poumon de rat RLE	Fujibe <i>et al.</i> , 2004
Déphosphorylation	PP2A	ND	Empêche la localisation à la membrane	Cellules de rein canin MDCK	Nunbhakdi-Craig <i>et al.</i> , 2002
Palmitoylation	ND	ND	Membrane	Cellules de rein canin MDCK	Lynch <i>et al.</i> , 2007
Ubiquitinylation	LNX1p80	ND	Transport de la membrane vers des endosomes tardifs et lysosomes	Cellules de rein canin MDCK	Takahashi <i>et al.</i> , 2012

Figure 35 : Modifications post-traductionnelles de la claudine 1. (A) Des études *in silico* ont permis de déterminer de nombreux sites de modifications post-traductionnelles. Au niveau de la première boucle extracellulaire, le résidu asparagine (N) en position 35 est un site potentiel de N-glycosylation. Deux régions de sites de palmitoylation ont été identifiées : les cystéines en position 104 et 107 de la boucle intracellulaire et les cystéines en position 183, 184 et 186 de la queue C-terminale. De plus, les sérines (S) en position 192, 205 et 206, les thréonines (T) en position 190, 191 et 195 peuvent subir une phosphorylation ou une O-glycosylation. La tyrosine (Y) en position 210 peut également être phosphorylée. Les kinases responsables de ces phosphorylations ont également été déterminées *in silico* : la PKC aurait une activité sur le résidu T190, la PKA sur les résidus T191, S192 et T195, la PKG sur le résidu T191 et les kinases Akt (PKB) et PDK1 sur le résidu S192. (B) Des modifications post-traductionnelles de la claudine 1 ont été démontrées expérimentalement. Le type de la modification, l'enzyme, le site de la modification ainsi que le modèle étudié est décrit dans le tableau ci-contre.

chimiques au niveau de certains acides aminés : **phosphorylation, palmitoylation, O-glycosylation, N-glycosylation** ou **ubiquitylation**.

Des études *in silico* ont permis de déterminer de nombreux sites de modifications post-traductionnelles (Butt *et al.*, 2011 ; Price *et al.*, 2005). Au niveau de la première boucle extracellulaire, le résidu asparagine (N) en position 35 est un site potentiel de N-glycosylation (Figure 35A). Deux régions de sites de palmitoylation ont été identifiées : les cystéines en position 104 et 107 de la boucle intracellulaire et les cystéines en position 183, 184 et 186 de la queue C-terminale (Figure 35A). De plus, les sérines (S) en position 192, 205 et 206, les thréonines (T) en position 190, 191 et 195 ainsi que la tyrosine (Y) en position 210 sont prédits comme des sites de phosphorylation (Figure 35A). Les kinases responsables de ces phosphorylations ont également été déterminées *in silico* : la **PKC** aurait une activité sur le résidu T190, la **PKA** sur les résidus T191, S192 et T195, la **PKG** sur le résidu T191 et les **kinases Akt** (PKB) et **PDK1** sur le résidu S192. En parallèle, la **transférase OGT** (O-linked β -N-acetylGlucosamine Transferase) permettrait des modifications de type O-glycosylation sur les résidus T190, T191, S192, T195, S205 et S206. Ces résidus qui sont la cible à la fois de kinases et de l'OGT sont appelés des sites **Yin Yang**.

La phosphorylation des résidus T190 et T195 par les **PKA** et **PKC** a été démontré expérimentalement dans des cellules de mélanome (Figure 35B) (French *et al.*, 2009). Ces modifications entraînent le transport de la claudine 1 du noyau vers le cytoplasme. Dans des cellules endothéliales de poumon de rat, la kinase MAPK induit la phosphorylation de la claudine 1 au niveau du résidu T203 et promeut son insertion dans la membrane (Fujibe *et al.*, 2004). A l'inverse, la phosphatase **PP2A** va déphosphoryler la claudine 1 dans les cellules MDCK et l'empêcher d'être exprimée au niveau des jonctions serrées (Nunbhakdi-Craig *et al.*, 2002). Dans des cellules MDCK, la claudine 1 localisée dans la membrane a été retrouvée avec des modifications de type palmitoylation (Lynch *et al.*, 2007). Dans cette même lignée cellulaire, l'ubiquitine ligase **LNx1p80** entraîne une poly-ubiquitylation de la claudine 1 ce qui la délocalise au niveau d'endosomes tardifs et de lysosomes permettant ainsi sa dégradation (Takahashi *et al.*, 2012).

4. Rôles physiologiques et pathologiques de la claudine 1

La claudine 1 joue un rôle central dans la **formation des jonctions serrées**. En effet, une surexpression de la claudine 1 dans des fibroblastes de souris dépourvus de jonctions serrées

est suffisante pour reformer ces structures (Furuse *et al.*, 1998b). La claudine 1 assure aussi une **fonction de barrière** : sa surexpression dans des cellules MDCK augmente la résistance électrique transépithéliale (Inai *et al.*, 1999 ; McCarthy *et al.*, 2000). Elle est exprimée de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus du corps dont la glande mammaire (Furuse *et al.*, 1998a ; Swisshelm *et al.*, 1999). Au niveau de l'épiderme de la peau, elle joue un rôle important dans la fonction de barrière (revue Tokumasu *et al.*, 2017). En effet, un KO de la claudine 1 chez des souris entraîne une perte de l'eau transépidermique et les animaux meurent un jour après leur naissance. Certaines maladies de la peau associées à une déshydratation comme la dermatite atopique et le psoriasis sont liées à une perte d'expression de la claudine 1 (revue Gunzel *et al.*, 2013). La claudine 1 est aussi exprimée dans les cholangiocytes et les hépatocytes et assure une fonction de barrière au niveau des canaux biliaires hépatiques (Grosse *et al.*, 2012). Depuis 2002, une vingtaine de patients issus de familles consanguines ont été reportés comme portant une mutation du gène de la claudine 1, associé à une perte de sa fonction. Cette anomalie se traduit cliniquement par des dysfonctionnements au niveau de la peau et du foie (peau sèche et couverte de squames, perte définitive de cheveux, inflammation et fibrose des voies biliaires etc). Cette maladie rare autosomique récessive est appelé le **syndrome NISCH** (Neonatal Ichthyosis Sclerosing and Cholangitis syndrome) (Grosse *et al.*, 2012 ; Hadj-Rabia *et al.*, 2004).

La dérégulation de l'expression de la claudine 1 est aussi à l'origine d'une autre pathologie : le **cancer**.

IV. Implication de la claudine 1 dans le cancer

1. La claudine 1 dans les cancers

L'expression de la claudine 1 est altérée dans la plupart des carcinomes humains. En fonction du type de cancers, une **perte d'expression** ou une **surexpression** de la claudine 1 sont observées (revue Ding *et al.*, 2013 ; revue Osanai *et al.*, 2016). La claudine 1 va donc jouer un rôle de **promoteur** ou de **suppresseur de tumeur** en fonction du tissu cancéreux. Par exemple, une forte expression de la claudine 1 joue un rôle de promoteur de tumeur dans le cancer colorectal et dans le mélanome (Kinugasa *et al.*, 2007 ; Leotlela *et al.*, 2007). En effet, la claudine 1 est corrélée à l'augmentation de l'invasion cellulaire. A l'inverse, l'augmentation de l'invasion cellulaire est associée à une perte de l'expression de la claudine 1 dans les adénocarcinomes du poumon et dans les carcinomes de foie, lui conférant un rôle

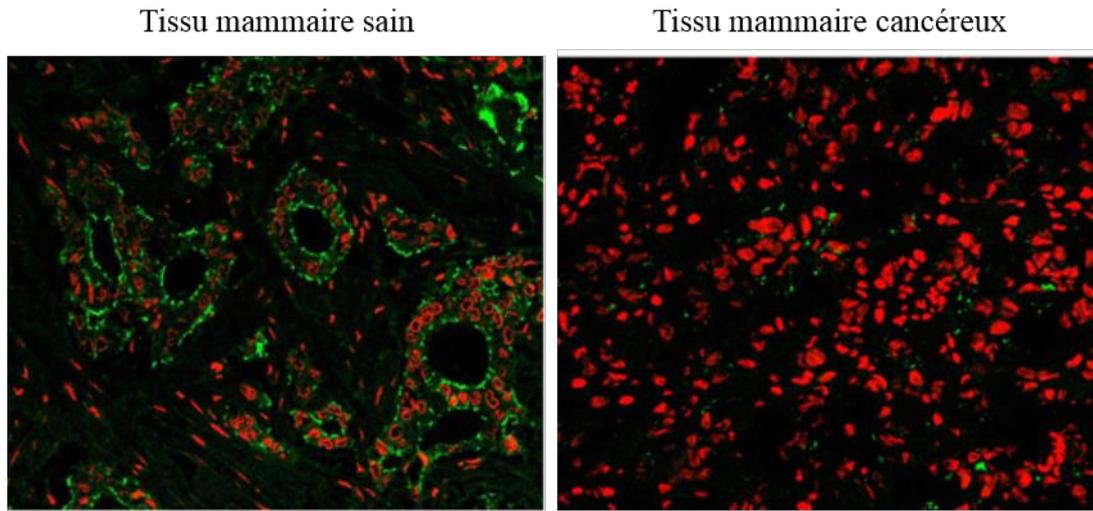


Figure 36 : Localisation de la claudine 1 dans les tissus mammaires sain et cancéreux. Dans un tissu mammaire sain, la claudine 1 est localisée au niveau de la membrane cellulaire. Dans un tissu mammaire cancéreux, le tissu mammaire est désorganisé avec une perte d'expression de la claudine 1. Les noyaux sont marqués en rouge et la claudine 1 en vert (d'après Tokes *et al.*, 2005).

	« claudin 1-low »	« claudin 1-high »	Total
Luminal	95% (54)	5% (3)	100% (57)
HER2	86% (53)	14% (8)	100% (61)
Basal-like	76% (62)	24% (20)	100% (82)
Negative	90% (9)	10% (1)	100% (10)
Total	84% (186)	16% (36)	

Triple-négative

Tableau 9 : Répartition des tumeurs « claudin 1-low » et « claudin 1-high » au sein des différents sous-types moléculaires. Le pourcentage de tumeurs est indiqué pour chaque sous-type avec le nombre de cas correspondant entre parenthèse. L'ensemble des tumeurs « basal-like » et « negative » représentent les tumeurs triple-négatives (d'après Lu *et al.*, 2013).

de suppresseur de tumeur (Chao *et al.*, 2009 ; Higashi *et al.*, 2007). La dérégulation de l'expression de la claudine 1 varie aussi en fonction du sous-type histologique au sein d'un même tissu. Par exemple, au niveau de l'endomètre, l'adénocarcinome endométriode de type I présente une faible expression de la claudine 1 alors qu'elle est fortement exprimée dans l'adénocarcinome séro-papillaire de type II (Sobel *et al.*, 2006). Concernant le cancer du poumon, l'adénocarcinome présente une faible expression de la claudine 1 alors que le carcinome à cellules squameuses l'exprime fortement (Jung *et al.*, 2009).

La **localisation de la claudine 1** au sein de la cellule tumorale joue un rôle important dans sa fonction. Il semblerait que la localisation de la claudine 1 ait une importance capitale dans le processus de cancérogenèse car sa délocalisation des jonctions serrées vers le cytoplasme a été mise en évidence dans nombreux types de tumeurs mammaires (Tokes *et al.*, 2005). Dans le cancer colorectal, la claudine 1 est fortement exprimée avec une localisation cytoplasmique (Miwa *et al.*, 2001). Cette localisation est corrélée à la progression tumorale. De même, dans des cellules cancéreuses du colon SW480 et SW620, il a été montré que la localisation cytoplasmique et nucléaire de la claudine 1 est associée à la progression tumorale ainsi qu'au potentiel métastatique des cellules (Dhawan *et al.*, 2005). Dans des cellules de carcinome thyroïdien FTC-133 et FTC-238, la localisation nucléaire de la claudine 1 module aussi l'agressivité de ces cellules en augmentant leur potentiel invasif (Zwanziger *et al.*, 2015).

2. La claudine 1 dans le cancer du sein

L'expression de la claudine 1 est généralement absente ou fortement diminuée dans le cancer du sein (Figure 36) (Tokes *et al.*, 2005). En effet, 84 % des tumeurs mammaires expriment faiblement la claudine 1 ; ces tumeurs sont appelées « **claudin 1-low** » (Lu *et al.*, 2013). Une étude sur 222 carcinomes mammaires invasifs de grade 3 montre que 95% des tumeurs « luminal », 86% des tumeurs « HER2-enriched » et 78% des tumeurs triple-négatives (« basal-like » et négative) sont des tumeurs de type « claudin 1-low » (Tableau 9). En revanche, dans 16% des cas, la claudine 1 est fortement exprimée. Ces tumeurs sont appelées « **claudin 1-high** » et concernent 5% des tumeurs « luminal », 14% des tumeurs « HER2-enriched » et 22% des tumeurs triple-négatives (« basal-like » et négative) (Tableau 9).

		← Triple-négative →			
	Total	Luminal	HER2-enriched	Basal-like	Negative
« claudin 1-low »	100% (186)	30% (54)	30% (53)	35% (62)	5% (9)
« claudin 1-high »	100% (36)	9% (3)	25% (8)	63% (20)	3% (1)

Tableau 10 : Répartition des différents sous-types moléculaires au sein des tumeurs « claudin 1-low » et « claudin 1-high ». Le pourcentage de tumeurs est indiqué pour chaque sous-type avec le nombre de cas correspondant entre parenthèse. L'ensemble des tumeurs « basal-like » et « negative » représentent les tumeurs triple-négatives (d'après Lu *et al.*, 2013).

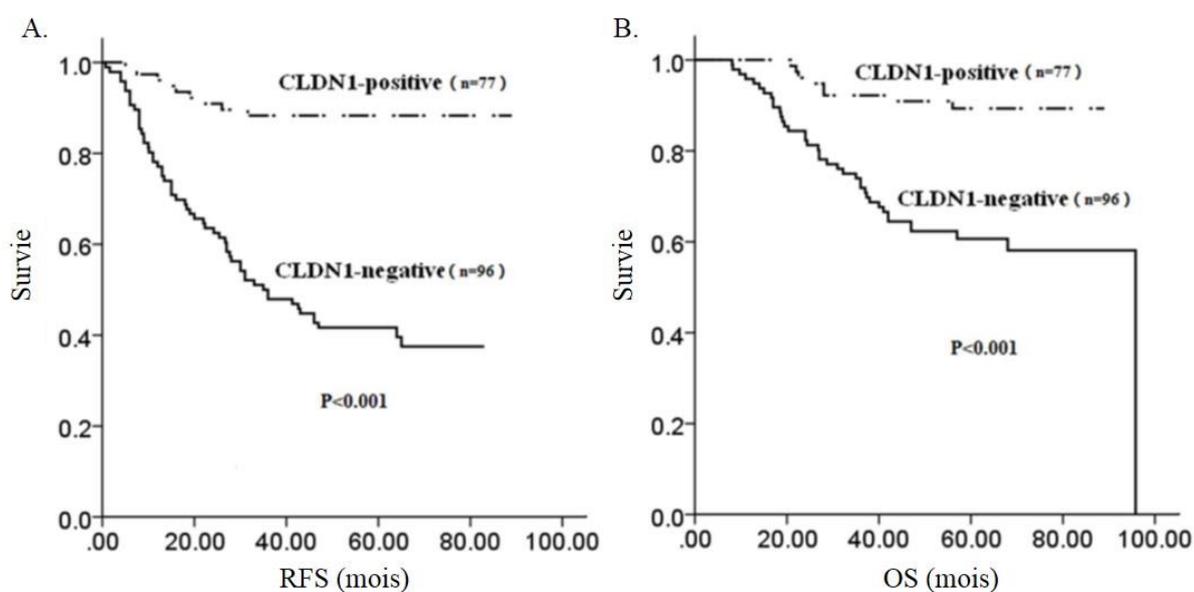


Figure 37 : Courbe de survie Kaplan-Meier de la survie sans récurrence (RFS : Recurrence Free Survival) et survie globale (OS : Overall Survival) basée sur la localisation membranaire de la claudine 1. (A) Les patients (n=96) présentant une tumeur n'exprimant pas la claudine 1 au niveau membranaire ont une mauvaise survie sans récurrence comparé aux patients (n=77) qui présentent une tumeur exprimant la claudine 1 membranaire. (B) Les patients (n=96) présentant une tumeur n'exprimant pas la claudine 1 au niveau membranaire ont une mauvaise survie globale comparé aux patients (n=77) qui présentent une tumeur exprimant la claudine 1 membranaire. Après 90 mois, aucun des patients ayant une tumeur n'exprimant pas la claudine 1 ne survit (d'après Ma *et al.*, 2014).

a. Les tumeurs « claudin 1-low »

Au sein des tumeurs « claudin 1-low », la distribution entre les différents sous-types moléculaires est de 30% de type « luminal » (54/186), 30% de type « HER2-enriched » (53/186) et 40% de type triple-négatives (71/186) (**Tableau 10**) (Lu *et al.*, 2013). De nombreuses études suggèrent que la claudine 1 pourrait agir comme **suppresseur de tumeur** dans ce type de cancer (revue Zhou *et al.*, 2015).

Plusieurs études reportent que la perte d'expression de la claudine 1 est corrélée à une augmentation du potentiel invasif des tumeurs et à un risque accru de récurrence. Dans une étude de 83 cas, un groupe de patient ayant récidivé présente une tumeur de type « claudin 1-low » dans 81% des cas contrairement au groupe de patient n'ayant jamais récidivé (23%) (Moroashi *et al.*, 2007). La diminution de l'expression de la claudine 1 est associée à l'augmentation du potentiel invasif ainsi qu'à la réémergence des tumeurs mammaires (Szasz *et al.*, 2011). Récemment, dans des tumeurs triple-négatives, le phénotype « claudin 1-low » prédit un risque de récurrence et de mort plus important chez ces patients contrairement aux patients ayant une tumeur exprimant la claudine 1 (**Figure 37**) (Ma *et al.*, 2014).

b. Les tumeurs « claudin 1-high »

Blanchard et ses collaborateurs montrent qu'une expression élevée de la claudine 1 est retrouvée en grande majorité dans les tumeurs ER- (Blanchard *et al.*, 2009). Ils identifient un sous-groupe de type « basal-like » qui présente une forte expression de la claudine 1 dans 61% des cas. Ils montrent également une corrélation entre le niveau élevé de claudine 1 dans la tumeur et l'âge élevé des patientes, supérieur à 55 ans. Les travaux de Lu sur 222 tumeurs ont confirmé ces données (Lu *et al.*, 2013). Au sein des tumeurs « claudin 1-high », 9% sont de type « luminal », 25% sont de type « HER2-enriched », 63% de type « basal-like » et 3% de type « négative » (**Tableau 10**). Une analyse immunohistochimique montre une délocalisation de la claudine 1 au niveau cytoplasmique dans ces tumeurs « claudin 1-high ».

c. Rôle de la claudine 1 *in vitro* et *in vivo*

De nombreuses études ont montré que la claudine 1 est un **marqueur de la TEM** et joue un rôle dans la **migration cellulaire**. Dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires, la perte d'expression de la claudine 1 est corrélée à un potentiel métastatique plus élevée (Swisshelm *et al.*, 1999). En effet, la claudine 1 est exprimée dans les cellules « luminal A »

T-47D alors qu'elle n'est pas exprimée dans les lignées triple-négatives MDA-MB-231 et Hs578T au potentiel invasif élevé. De plus, une répression de l'expression de la claudine 1 est associée à une augmentation de la motilité des cellules cancéreuses mammaires non-invasives T-47D (Zhang *et al.*, 2008). Dans les cellules épithéliales mammaires MCF-12A, la déplétion de l'ADN mitochondrial induit une augmentation du potentiel invasif qui s'accompagne d'une diminution de l'expression de la claudine 1 (Kulawiec *et al.*, 2008). Dans la lignée non cancéreuse MCF-10A, la surexpression de la PKC ϵ promeut la TEM accompagnée par une diminution des marqueurs épithéliaux incluant la claudine 1 (Jain *et al.*, 2014). La même corrélation est observée après la surexpression de HOXB7 dans les cellules MCF-10A (Wu *et al.*, 2006). Dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-468, une inhibition de l'expression de TMPRSS4 (TransMembrane PRotease, Serine 2) supprime la TEM en augmentant l'expression de l'E-cadhérine et de la claudine 1 et en diminuant celle de la vimentine et de Slug (Li *et al.*, 2017). De même, la surexpression de ZMYND8 inhibe l'invasion cellulaire en diminuant l'expression de Snail, Zeb et vimentine et en augmentant l'expression de la claudine 1 et de l'E-cadhérine dans les cellules MCF-7 (Basu *et al.*, 2017). Il est à rappeler que les facteurs de transcription Snail et Slug, marqueurs clés dans la TEM, se lient sur le promoteur de la claudine 1 et inhibent son expression (Martinez-Estrada *et al.*, 2006).

Des résultats contradictoires montrent que la claudine 1 promeut la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires. Dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, l'inactivation de la claudine 1 par un vecteur lentiviral inhibe la TEM en induisant les marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine et en inhibant les marqueurs mésenchymateux SMA et Slug (Zhao *et al.*, 2015). L'implication de la claudine 1 dans l'induction de l'expression de gènes clés de la TEM a été confirmée dans les cellules MDA-MB-231 traitées à la stanniocalcine 2. Cette dernière inhibe la migration des cellules cancéreuses triple-négatives en bloquant la voie PKC/claudine 1 (Hou *et al.*, 2015). Récemment, une étude a montré que le facteur de coagulation VIIa conduit à l'accumulation de la β -caténine nucléaire qui à son tour active des gènes cibles dont la claudine 1, la cycline D1, c-Myc, MMP-7 et MMP-14, ce qui est corrélé à une augmentation de la migration des cellules MDA-MB-231 (Roy *et al.*, 2017). Dans les cellules MDA-MB-231, la surexpression de la claudine 1 diminue l'expression de plusieurs miRNAs et conduit à l'induction de la TEM par une inhibition des marqueurs épithéliaux (Majer *et al.*, 2016). Ce rôle promoteur de tumeur a également été montré dans les cellules triple-négatives BT-20, qui sont de type « claudin 1-high ».

L'inhibition de son expression par ARN interférence induit une diminution de la migration cellulaire en modifiant l'expression de gènes clés impliqués dans la TEM (Blanchard *et al.*, 2013). Dans les cellules MCF-7, la surexpression de la claudine 1 augmente aussi la migration cellulaire sans induire l'expression des gènes associés à la TEM (Zhou *et al.*, 2015). Les auteurs suggèrent que la claudine 1 joue un rôle dans la migration collective en accord avec les travaux de Fortier (Fortier *et al.*, 2013). En effet, la claudine 1 localisée à la membrane plasmique augmenterait la cohésion cellulaire et conduirait à la migration collective (Zhou *et al.*, 2015). Cette claudine 1 membranaire augmente aussi la sensibilité des cellules MCF-7 aux tamoxifène, à l'étoposide et au cisplatine (Zhou *et al.*, 2015).

Fortier et ses collaborateurs suggèrent que la claudine 1 membranaire interagit avec les récepteurs de mort et augmente l'**apoptose** *via* la voie extrinsèque. En effet, la surexpression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-361 induit une relocalisation de cette protéine au niveau membranaire, parallèlement à une augmentation de l'entrée en apoptose de ces cellules (Hoevel *et al.*, 2004). De même, le traitement des cellules triple-négatives MDA-MB-453 avec un agent déméthylant, la décitabine, induit l'apoptose ainsi que l'expression de la claudine 1 au niveau membranaire dans un modèle tridimensionnel (Di Cello *et al.*, 2013). Néanmoins, son implication dans l'apoptose est controversée puisqu'un effet anti-apoptotique a été décrit dans les cellules MCF-7 traitées au tamoxifène et au TNF α (Akasaka *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2012). Ces composés augmentent l'expression de la claudine 1 et l'inhibition de son expression par ARN interférence conduit à une augmentation de l'apoptose. Ces deux études suggèrent que la régulation de la localisation de la β -caténine par la claudine 1 joue un rôle clé dans l'effet anti-apoptotique. L'équipe de Liu a montré qu'une inhibition de l'expression de la claudine 1 induit la relocalisation membranaire de la β -caténine favorisant son rôle d'adhérence cellulaire, inhibant la voie pro-proliférative et anti-apoptotique ainsi qu'en augmentant le clivage de la caspase 8 et de PARP (Liu *et al.*, 2012).

CHAPITRE 3: Les thiazolidinediones : **une nouvelle piste thérapeutique**

I.	Découvertes et commercialisation.....	72
II.	Les TZDs : des ligands de PPARγ	72
	1. Le récepteur PPAR γ	72
	2. Activité antidiabétique des TZDs médiée par PPAR γ	73
	3. Activité anti-tumorale des TZDs médiée par PPAR γ	74
	4. Découverte des effets PPAR γ -indépendants	75
III.	Effets des TZDs sur l'apoptose	77
	1. Les différentes étapes de l'apoptose.....	77
	2. Effets des TZDs sur la voie apoptotique	80
IV.	Effets des TZDs sur la migration	81
V.	Vers l'amélioration du composé TGZ	83
	➤ <u>ARTICLE 1</u> : <i>Reprofiling of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment?</i>	

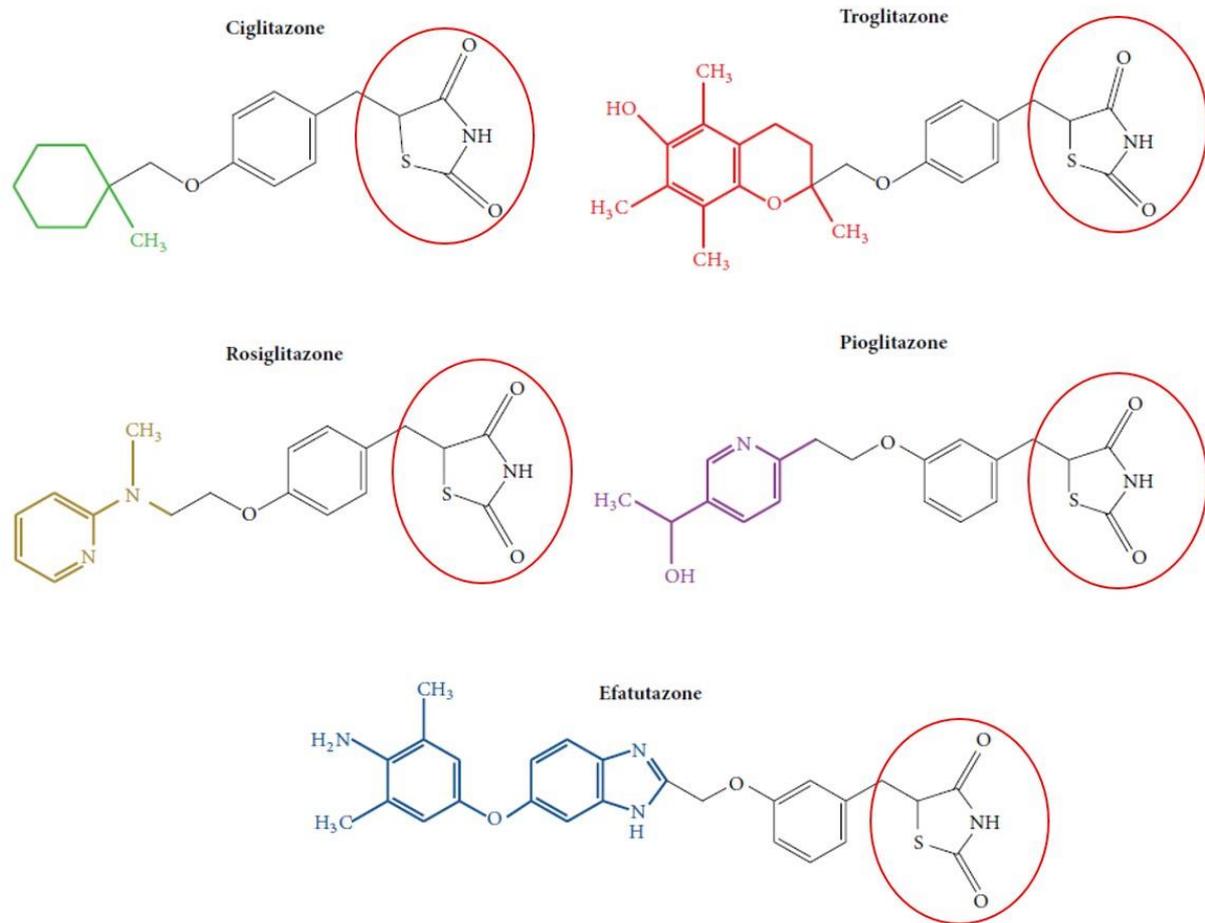


Figure 38 : Structure des thiazolidinediones les plus connues. La ciglitazone, la troglitazone, la rosiglitazone, la pioglitazone et l'efatutazone sont les composés synthétiques les plus connus de la famille des TZDs. La structure des TZDs est très similaire au niveau de leur partie NH_2 : elles possèdent toutes un hétérocycle de 5 atomes (3 de carbones, 1 de soufre et 1 d'azote) appelé « cycle TZD » (cercle rouge). La partie COOH des différentes molécules est très variable. Par exemple, la troglitazone possède un groupement chromane (partie en rouge) (d'après Fröhlich *et al.*, 2015).

I. Découvertes et commercialisation des thiazolidinediones

Les thiazolidinediones (TZDs) sont des composés synthétiques possédant un hétérocycle de 5 atomes appelé « cycle TZD » (Figure 38). La **ciglitazone (CGZ)** est la première TZD qui a été synthétisée par l'industrie pharmaceutique Takeda (Sohda *et al.*, 1982) (Figure 38). Un effet antidiabétique de cette molécule a été montré dans plusieurs modèles d'animaux diabétiques de type II ou obèses par une diminution de la résistance à l'insuline (Fujita *et al.*, 1983). Face à l'efficacité de ce nouveau composé, une autre TZD, la **troglitazone (TGZ)**, a été développée à partir de ce dernier en 1988 par la compagnie pharmaceutique Sankyo. Elle conserve le cycle TZD qui permet l'activité insulino-sensibilisante de la molécule et possède en plus un groupement chromane provenant de l' α -tocophérol (vitamine E) qui lui confère des propriétés anti-oxydantes (Figure 38). En 1997, la TGZ (Rezulin®, Pfizer) est la première TZD utilisée en tant que nouveau médicament oral antidiabétique. Des TZDs de 2^{ème} génération ont été développées et commercialisées par la suite : la **pioglitazone (PGZ)** (Actos®, Takeda) et la **rosiglitazone (RGZ)** (Avandia®, GSK) (revue Day *et al.*, 1999) (Figure 38). A partir des années 2000, la plupart des TZDs ont été soustraites du marché pour cause d'effets secondaires importants. La TGZ provoque une toxicité hépatique sévère chez certains patients d'où son retrait du marché au niveau mondial (revue Chojkier *et al.*, 2005). Depuis 2010, la RGZ a été retirée du marché européen car son utilisation est associée à un risque accru de pathologies cardiaques, alors que la PGZ est suspendue depuis 2011 en France et en Allemagne à cause d'un risque plus important de développer un cancer de la vessie. Plus récemment, des TZDs de 3^{ème} génération ont été développées dont l'**efatutazone (CS-7017 ; RS5444)**. Elle a été développée par l'industrie pharmaceutique Sankyo dans un but anti-cancéreux et est encore en étude clinique de phase I sur des tumeurs solides (Pishvaian *et al.*, 2012 ; Komatsu *et al.*, 2014).

II. Les TZDs : des ligands de PPAR γ

1. Le récepteur PPAR γ

Le récepteur **PPAR γ** (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il joue un rôle de facteur de transcription et contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions biologiques comme l'**adipogenèse**, le **métabolisme lipidique**, l'**homéostasie du glucose** mais aussi l'**inflammation** et l'**athérosclérose** (revue Ahmadian *et al.*, 2013). Le récepteur PPAR γ est

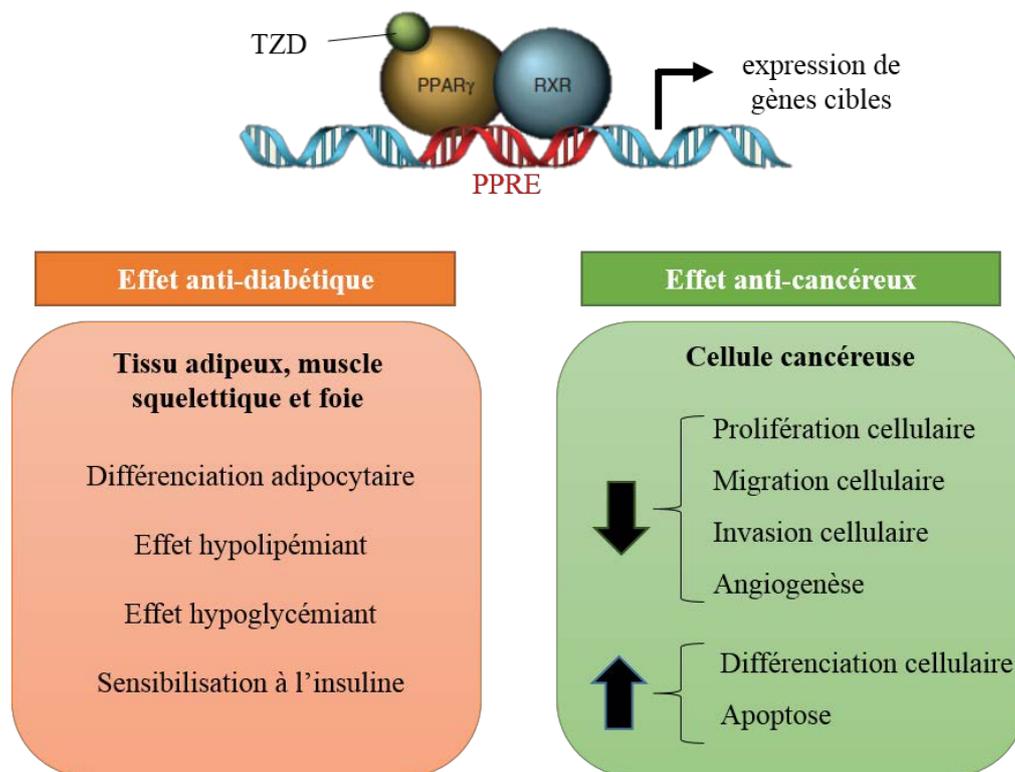


Figure 39 : Effets antidiabétiques et anticancéreux des TZDs médiés par le récepteur PPAR γ . L'activation de PPAR γ par les TZDs se fait par la fixation du domaine de liaison au ligand de PPAR γ . Une fois activé, PPAR γ va s'hétérodimeriser avec le récepteur des rétinoïdes X (RXR). L'hétérodimère PPAR γ -RXR formé peut alors être transloqué dans le noyau et se lier aux éléments de réponse de PPAR appelé PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) situés en amont du promoteur de ses gènes cibles. L'expression de ces gènes va être à l'origine de l'effet antidiabétique des TZDs au niveau de différents organes cibles comme le tissu adipeux, le foie et les muscles squelettiques. Ces gènes vont permettre la différenciation adipocytaire, induire un effet hypolipémiant, un effet hypoglycémiant et augmenter la sensibilité des organes cibles à l'insuline. Les TZDs sont aussi à l'origine d'effets anticancéreux. Les gènes activés vont permettre la diminution de la prolifération, la migration, l'invasion cellulaire et l'angiogenèse des cellules cancéreuses. De plus, les TZDs entraînent la différenciation cellulaire ainsi que la mort des cellules par apoptose (d'après revue Ahmadian *et al.*, 2013 ; revue Joshi *et al.*, 2014).

majoritairement exprimé au niveau du tissu adipeux mais aussi au niveau du tractus gastro-intestinal, du cœur et des muscles squelettiques. Les TZDs sont connues pour être des **agonistes du récepteur PPAR γ** qui l'activent de manière sélective (Lehmann *et al.*, 1995 ; Berger *et al.*, 1996). L'activation de PPAR γ par les TZDs se fait par la fixation du domaine de liaison au ligand de PPAR γ . Une fois activé, PPAR γ va s'hétérodimériser avec le récepteur des rétinoïdes X (RXR) (Figure 39). L'hétérodimère PPAR γ -RXR formé peut alors être transloqué dans le noyau et se lier aux éléments de réponse de PPAR appelé PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) situés en amont du promoteur de ses gènes cibles et activer leur expression.

2. Activité antidiabétique des TZDs médiée par PPAR γ

L'expression des gènes cibles de PPAR γ va conduire à un **effet antidiabétique** au niveau de différents organes cibles, principalement au niveau du tissu adipeux, du foie et des muscles squelettiques. Dans le tissu adipeux, l'action de PPAR γ promeut la **différenciation adipocytaire** ce qui permet d'assurer le maintien et le renouvellement du tissu adipeux et stimule le stockage des lipides au sein des adipocytes (Figure 39) (revue Ahmadian *et al.*, 2013). En condition physiologique, les adipocytes mettent en réserve les lipides sous forme de triglycérides ou libèrent ceux-ci sous forme d'acides gras en fonction du besoin énergétique du corps humain. Les TZDs vont réduire le taux de lipides dans le sang et présentent donc une **activité hypolipémiante**. L'action de PPAR γ permet également de **contrôler la glycémie**, problème majeur chez les diabétiques. En effet, le diabète de type II ou non insulino-dépendant se caractérise par deux phénomènes principaux : une résistance à l'insuline des muscles squelettiques et du foie et un défaut de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Par conséquent, le glucose ne pénètre plus dans les cellules du corps et reste dans la circulation sanguine, augmentant la glycémie et causant des dommages aux organes et aux tissus à long terme. Afin de contrer cette hyperglycémie, les TZDs vont **améliorer la sensibilité à l'insuline** des organes cibles. Pour cela, elles induisent la formation de nouveaux adipocytes plus sensibles à l'insuline (revue Ahmadian *et al.*, 2013). Elles stimulent également l'expression du transporteur de glucose GLUT4 (GLUCose Transporter 4) afin que le glucose pénètre au niveau intracellulaire. D'autres facteurs produits par le tissu adipeux sont stimulés comme l'adiponectine ou la résistine qui vont contrecarrer l'insulinorésistance au niveau du foie et des muscles squelettiques (Figure 39). En conclusion, les TZDs **miment**

certaines actions de l'insuline et ont un effet **hypolipémiant** et **hypoglycémiant** (revue Day *et al.*, 1999 ; revue Ahmadian *et al.*, 2013).

3. Activité anti-tumorale des TZDs médiée par PPAR γ

En plus de leur effet antidiabétique, la différenciation des adipocytes normaux induite par PPAR γ a mis en exergue une application thérapeutique différente des TZDs : le **traitement des cancers**. En effet, des chercheurs ont découvert que la PGZ et la TGZ induisaient à la fois la différenciation de cellules de liposarcome *in vitro* et l'inhibition de la croissance tumorale (Tontonoz *et al.*, 1997). De nombreuses TZDs ont montré des effets anticancéreux *in vitro* et *in vivo* sur un large éventail de cancers (revue Joshi *et al.*, 2014). La **prolifération**, la **migration**, l'**invasion**, l'**angiogenèse**, la **différenciation cellulaire** et l'**apoptose** sont les principaux processus impactés par l'activité anticancéreuse des TZDs induite par leur liaison à PPAR γ (Figure 39). Devant ces résultats encourageants, des essais cliniques ont été initiés à partir de l'année 1999 sur différents types de cancer, notamment le cancer du sein (revue Fröhlich *et al.*, 2015).

Le premier essai clinique a été mené chez trois patients atteints de liposarcome traités à la TGZ (Demetri *et al.*, 1999). Cette étude a permis de conforter les études *in vitro* sur la différenciation adipocytaire des cellules tumorales. Une étude de phase II sur 41 patients atteints d'un cancer de la prostate à un stade avancé mais non métastatique montre un bénéfice du traitement par une stabilisation prolongée du taux de PSA (Prostate-Specific Antigen) (Mueller *et al.*, 2000). La TGZ a aussi été étudiée sur 22 patientes ayant un cancer du sein métastatique réfractaire, ayant déjà bénéficiées d'une polychimiothérapie (Burstein *et al.*, 2003). Leur progression tumorale a été suivie pendant 6 mois après un traitement de 8 semaines et seulement 3 patientes ont vu une évolution de leur cancer stabilisée. La RGZ a aussi montré une efficacité clinique pour 4 patients sur 10 atteints d'un cancer de la thyroïde (Kebebew *et al.*, 2006). Néanmoins, aucun bénéfice thérapeutique n'a été observé sur 9 patients atteints de liposarcome traités à la RGZ en phase II d'étude clinique (Debrock *et al.*, 2003). La TGZ ne montra également aucune efficacité sur une étude de phase II comprenant 25 patients atteints de cancer du colon métastatique (Kulke *et al.*, 2002). De même, en 2007, une étude pilote utilisant la RGZ sur des cancers du sein à un stade précoce n'a révélé aucun effet (Yee *et al.*, 2007). Cette étude a porté sur 38 femmes qui ont été traitées pendant 2 à 6 semaines et n'a révélé aucun effet significatif sur la croissance et la prolifération cellulaire.

Enfin, l'efatutazone a également été étudiée sur 37 patients atteints d'une tumeur solide à un stade avancé (Pishvaian *et al.*, 2012). Un seul des patients atteint d'un liposarcome a montré une réponse partielle au traitement et 10 patients ont vu l'évolution de la tumeur stabilisée.

Les essais cliniques apparaissent non concluants et restent controversés. Une limite de la plupart de ces essais est le traitement sur des périodes très courtes. En revanche, des études rétrospectives sur des patients traités par les TZDs pour un diabète de type II suggèrent que les TZDs auraient un rôle de **chimio-prévention** (revue Fröhlick *et al.*, 2015). Une étude basée sur 22 essais cliniques montre que la RGZ et la PGZ sont associées à une diminution significative du risque de développer un cancer de l'intestin et du sein respectivement (Monami *et al.*, 2014). De nombreuses études montrent que la PGZ est associée à un risque plus élevé de développer un cancer de la vessie (Tuccori *et al.*, 2016), alors que d'autres avancent le contraire (Filipova *et al.*, 2017). Un traitement à base de TZDs, supérieur à 1 an, diminue l'incidence de cancer de la tête et du cou de 40% et du cancer du poumon de 33 % alors que l'incidence concernant le cancer de la prostate et colorectal reste inchangé (revue Fröhlick *et al.*, 2015).

A l'heure actuelle, seule la PGZ et l'efatutazone sont encore en essai clinique sur des tumeurs solides et liquides en monothérapie ou bien en combinaison avec d'autres agents de chimiothérapie. Des essais cliniques de combinaison récent ont relancé l'intérêt des TZDs dans le traitement du cancer. En effet, la PGZ en combinaison avec l'imatinib érode les cellules souches cancéreuses des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Prost *et al.*, 2015). De plus, l'efatutazone en combinaison avec le FOLFIRI contrôle le développement des métastases provenant d'un cancer colorectal (Komatsu *et al.*, 2014).

4. Découverte des effets PPAR γ -indépendants

De nombreuses études ont montré que les effets anticancéreux des TZDs ne sont pas uniquement associés à l'activité du récepteur PPAR γ . Les TZDs présentent également des effets **PPAR γ -indépendants**. Tout d'abord, l'activité anti-cancéreuse des TZDs n'est pas corrélée au niveau d'expression de PPAR γ . En effet, la TGZ inhibe de manière similaire la prolifération des cellules souches embryonnaires (ES) de souris PPAR γ ^{+/+} et PPAR γ ^{-/-}. Ce résultat a été confirmé *in vivo* avec un effet similaire de la TGZ sur l'inhibition de la croissance tumorale induite par l'injection de ces cellules ES (Palakurthi *et al.*, 2001). Par ailleurs, les cellules cancéreuses de prostate LNCaP, exprimant faiblement PPAR γ , sont plus

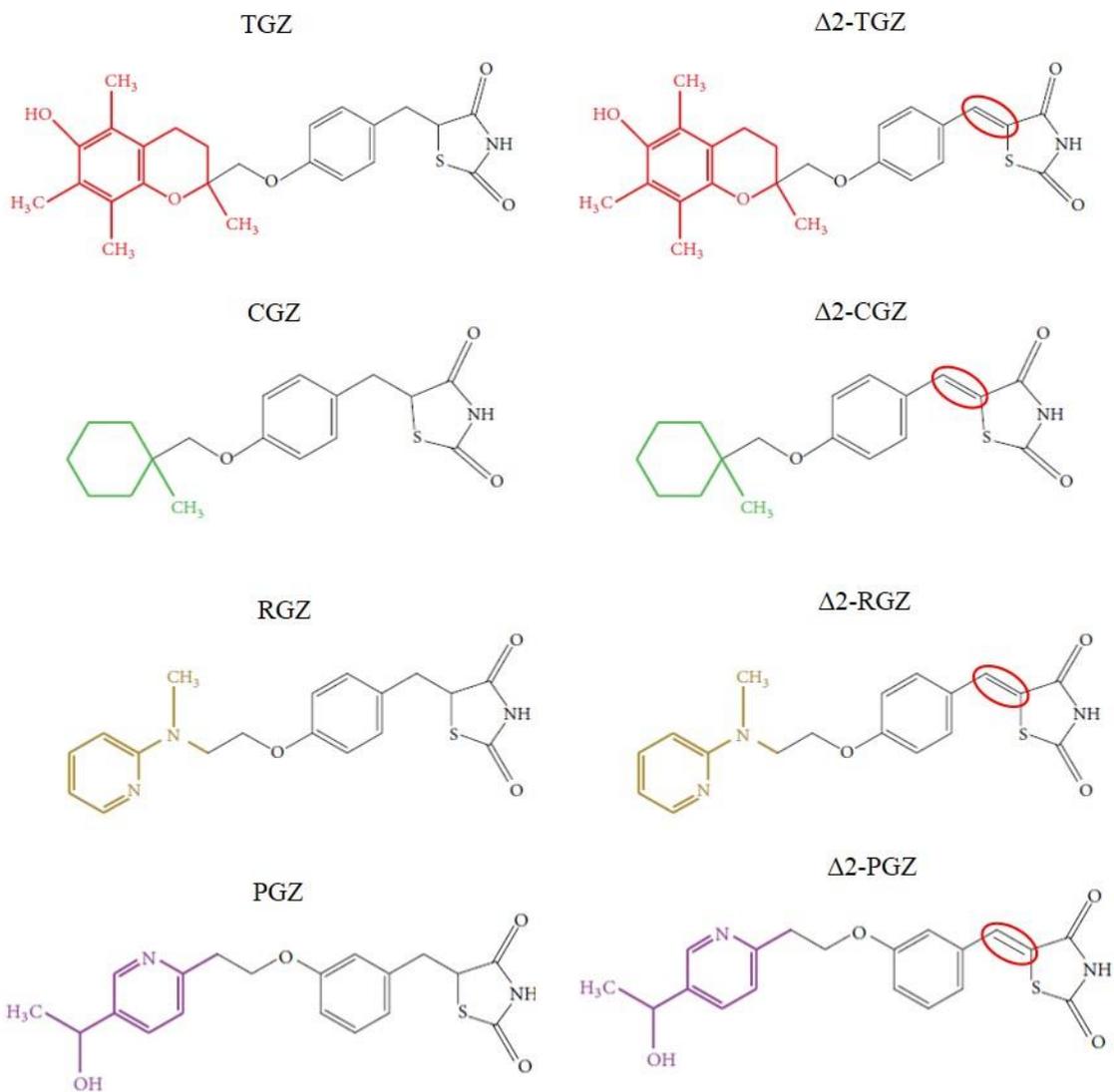


Figure 40: Structure des dérivés $\Delta 2$ et de leur composé parent. La structure des composés parents TGZ, CGZ, RGZ et PGZ est indiquée à gauche. La structure de leurs dérivés $\Delta 2$ est indiquée à droite. Les dérivés $\Delta 2$ possèdent une double liaison accolée au cycle TZD (cercle rouge), ce qui rigidifie la structure et empêche leur fixation sur le récepteur PPAR γ (d'après Fröhlich *et al.*, 2015).

sensibles à l'apoptose induite par la TGZ contrairement aux cellules PC-3 qui expriment fortement le récepteur PPAR γ (Shiau *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 qui présentent un niveau différent de PPAR γ (Huang *et al.*, 2005). De plus, l'effet anti-cancéreux des TZDs n'est pas corrélé à leur capacité à transactiver PPAR γ . Dans différentes lignées de cellules cancéreuses, la RGZ, un puissant activateur de PPAR γ , induit moins la mort cellulaire comparé à la TGZ et la CGZ, qui activent modérément PPAR γ (Shiau *et al.*, 2005 ; Lecomte *et al.*, 2008). Toutes ces observations ont été confirmées par différentes méthodes en utilisant des **antagonistes du récepteur PPAR γ** , des **siRNA** et des **analogues inactifs des TZDs**.

- Un antagoniste spécifique de PPAR γ , **GW9662**, a été utilisé en co-traitement avec les TZDs dans de nombreuses lignées cancéreuses. Les TZDs sont connus pour dégrader des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire comme la cycline D1, ER α , c-myc et la β -caténine. Ces protéines sont toujours dégradées après un co-traitement par la TGZ en présence de l'antagoniste GW9662 (Huang *et al.*, 2005 ; Lecomte *et al.*, 2008 ; Akinyeke *et al.*, 2011 ; Wei *et al.*, 2007).
- L'utilisation d'ARN interférent de type **siRNA** ciblant PPAR γ n'empêche pas la dégradation de ER α , ni de c-myc après un traitement à la TGZ dans des cellules cancéreuses mammaires et de prostate (Lecomte *et al.*, 2008 ; Akinyeke *et al.*, 2011).
- Des analogues inactifs des TZDs ont également été utilisés, les **dérivés $\Delta 2$** (Figure 40). Les dérivés $\Delta 2$ -TGZ, $\Delta 2$ -CGZ, $\Delta 2$ -RGZ et $\Delta 2$ -PGZ ont été synthétisés à partir de leur molécule parent TGZ, CGZ, RGZ et PGZ respectivement. Ils possèdent une double liaison accolée au cycle TZD ce qui rigidifie leur structure empêchant ainsi leur fixation et l'activation du récepteur PPAR γ . Dans des cellules cancéreuses de prostate, ces quatre dérivés $\Delta 2$ inhibent la prolifération cellulaire de manière similaire aux composés parents (Shiau *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que la $\Delta 2$ -TGZ entraîne la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1 et ER α tout comme la TGZ dans des cellules cancéreuses mammaires (Huang *et al.*, 2005 ; Lecomte *et al.*, 2008). Dans les cellules cancéreuses de la prostate LNCaP, la cycline D1 est aussi bien dégradée par la TGZ que la $\Delta 2$ -TGZ (Wei *et al.*, 2007).

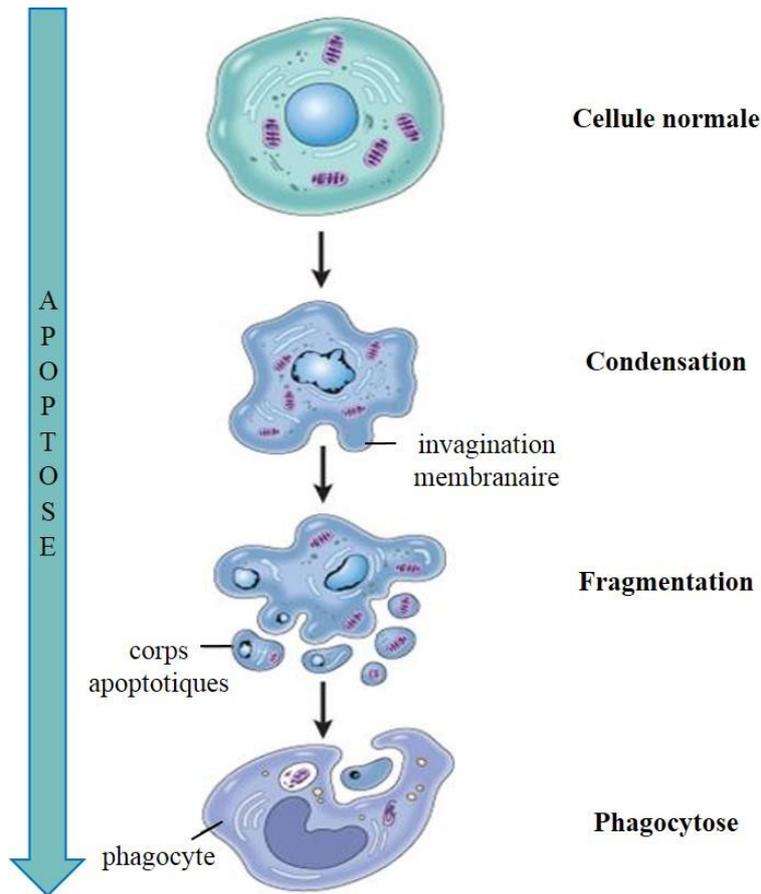


Figure 41 : Modifications morphologiques d'une cellule en apoptose. Une cellule normale qui rentre en apoptose va subir une condensation cytoplasmique et nucléaire ainsi que la formation d'invaginations membranaires. Par la suite, ces invaginations donnent naissance à des corps apoptotiques issus de la fragmentation de la cellule, qui sont rapidement éliminés par phagocytose.

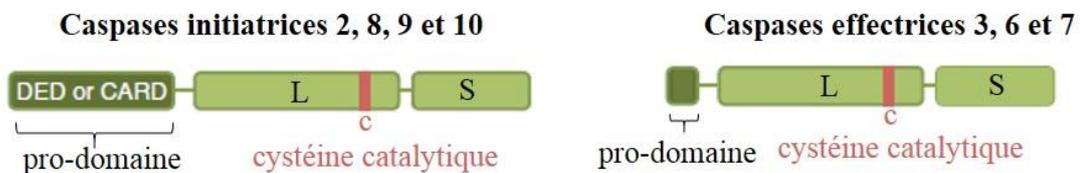


Figure 42 : Les différentes caspases apoptotiques. Les caspases initiatrices 2, 8, 9 et 10 possèdent un pro-domaine long. Celui-ci contient un domaine DED (Death Effector Domain) pour les caspases 8 et 10 ou un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) pour les caspases 2 et 9. Les caspases effectrices 3, 6 et 7 possèdent un pro-domaine court. Toutes les caspases sont constituées d'une grande sous-unité (L), qui contient la cystéine catalytique, et d'une petite sous-unité (S).

De nombreuses études ont montré que les effets anti-cancéreux PPAR γ -indépendants des TZDs sont nombreux comme l'**autophagie**, la **modification de voies de signalisation**, un **stress du réticulum endoplasmique** et une **dégradation protéasomale de nombreuses protéines** (ER α , c-myc, cycline D1, β -caténine, SP1). Ils sont aussi impliqués dans la mort cellulaire par **apoptose** (revue Grillier-Vuissoz *et al.*, 2012).

III. Effets des TZDs sur l'apoptose

1. Les différentes étapes de l'apoptose

L'**apoptose** vient du grec *apo-* (au loin) et *ptosis-* (chute) faisant référence à la « chute des feuilles » à l'automne. Ce processus est également appelé « mort cellulaire programmée » ou « suicide cellulaire ». Une cellule en apoptose se caractérise par une condensation cytoplasmique et nucléaire accompagnée par la formation d'invaginations membranaires (Figure 41) (Kerr *et al.*, 1972). L'invagination des membranes plasmiques donne naissance à des corps apoptotiques issus de la fragmentation de la cellule, qui sont rapidement éliminés par phagocytose. Ce processus physiologique joue un rôle crucial au cours du développement embryonnaire par l'autodestruction des cellules surnuméraires. Par exemple, il permet le remodelage de la palette des mains lors de la morphogenèse des doigts chez les vertébrés terrestres ou celui des voies génitales avec la régression différentielle des canaux de Wolff et de Müller. L'apoptose joue aussi un rôle crucial pour la protection de l'organisme en éliminant les cellules dysfonctionnelles qui ont subies des dommages irréversibles au niveau de l'ADN. Cependant, l'apoptose peut être dérégulée et être à l'origine de nombreuses pathologies comme le cancer.

a. Les caspases : effecteurs de l'apoptose

Les **caspases**, appelées aussi « cysteinyl aspartate specific protease », sont des protéases intracellulaires à l'origine de la majorité des changements morphologiques lors de l'apoptose. A ce jour, 17 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Elles ont toutes une structure conservée et sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Les caspases apoptotiques peuvent être classées en deux groupes : les **caspases initiatrices** et les **caspases effectrices**. Elles se différencient par leur pro-domaine.

- Les **caspases initiatrices** comprennent les caspases **2, 8, 9 et 10** (Figure 42). Elles sont composées d'un pro-domaine long, d'une grande sous-unité (L) suivie d'une petite

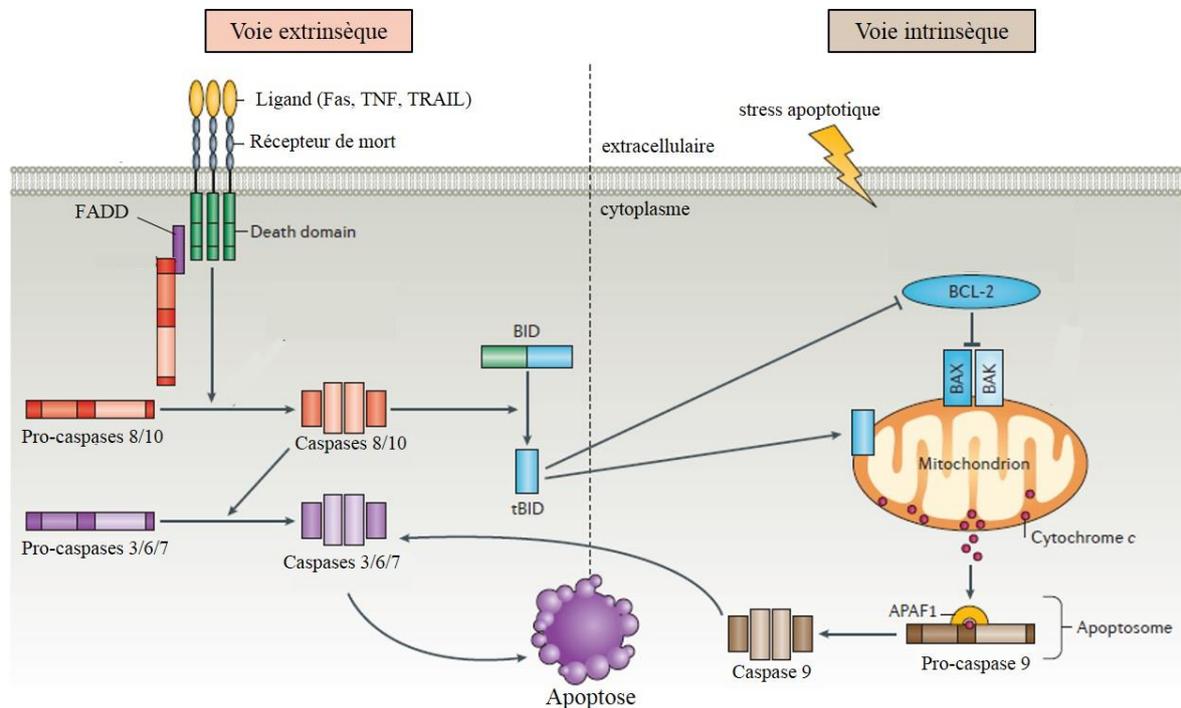


Figure 43: Voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. La fixation du ligand sur son récepteur de mort active la voie extrinsèque. Le récepteur interagit avec FADD (Fas-Associated Death Domain) via leur domaine DD respectif (Death Domain), qui recrute à son tour la pro-caspase 8 ou 10. Par conséquent, il y a activation des caspases initiatrices 8 et 10 par clivage qui vont à leur tour activer les caspases effectrices 3, 6 et 7. Les caspases 8 et 10 peuvent aussi entraîner le clivage de BID en tBID afin d'activer la voie intrinsèque. La voie intrinsèque est déclenchée par un stress apoptotique qui aboutit à la perméabilisation des membranes mitochondriales par les protéines Bax et Bak qui forment des pores dans la membrane. La protéine Bcl-2 va inhiber la formation des pores membranaires. La perméabilisation de la membrane mitochondriale permet la libération de nombreuses protéines dans le cytoplasme comme l'endonucléase-G, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et le cytochrome c. Le cytochrome c va former l'apoptosome avec la protéine APAF-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) et la pro-caspase 9, ce qui entraîne l'activation de cette dernière. La caspase 9 va à son tour activer les caspases effectrices 3, 6 et 7 afin d'induire l'apoptose (d'après Cuda *et al.*, 2016).

sous-unité (S). La grande sous-unité possède un site catalytique comprenant un résidu cystéine (C) essentiel à l'activité enzymatique. Le pro-domaine, impliqué dans l'interaction protéine-protéine, est constitué d'un domaine **CARD** (Caspase Activation and Recruitment Domain) pour les caspases 2 et 9 et d'un domaine **DED** (Death Effector Domain) pour les caspases 8 et 10.

- Les **caspases effectrices** regroupent les caspases **3, 6 et 7**. Elles sont composées d'un pro-domaine court de 10 à 40 résidus, d'une grande sous-unité (L) et d'une petite sous-unité (S) ([Figure 42](#)). La grande sous-unité possède également un site catalytique comprenant un résidu cystéine (C).

Les caspases sont activées après un double clivage libérant les différentes sous-unités (S et L). La caspase sous sa forme active est composée de deux grandes et de deux petites sous-unités, résultat de l'association de deux pro-caspases. Les caspases initiatrices sont capables de s'auto-activer et vont activer à leur tour les caspases effectrices. Ces dernières vont cliver différents substrats cellulaires à l'aide de leur site catalytique. Ces substrats sont importants pour la survie et le maintien de l'intégrité cellulaire tel que PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) impliquée dans la réparation de l'ADN et des constituants du cytosquelette. Le mécanisme d'apoptose induit par ces caspases est gouverné par deux voies principales : la **voie extrinsèque** et la **voie intrinsèque**.

b. Voie extrinsèque

La voie extrinsèque fait intervenir un récepteur transmembranaire appelé « **récepteur de mort** ». Les récepteurs de mort les plus connus font partie de la **famille des TNFR** (Tumor Necrosis Factor Receptor) comme le récepteur de Fas, le récepteur au TNF et le récepteur de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Ceux-ci sont composés d'un domaine extracellulaire N-terminal et d'un domaine de mort DD (Death Domain) du côté intracellulaire en position C-terminale ([Figure 43](#)). Lorsque les ligands **Fas**, **TNF** ou **TRAIL** se lient sur la partie N-terminale extracellulaire de leur récepteur, il y a trimérisation du récepteur et activation de celui-ci, ce qui conduit au recrutement de protéines adaptatrices comme FADD (Fas-Associated Death Domain) au niveau intracytoplasmique. Le complexe ainsi formé est appelé **DISC** (Death Inducing Signaling Complex). La **protéine adaptatrice FADD** est constituée de deux domaines d'interaction : un domaine de mort DD pour interagir avec le récepteur et un domaine DED (Death Effector Domain) pour lier les **pro-caspases**

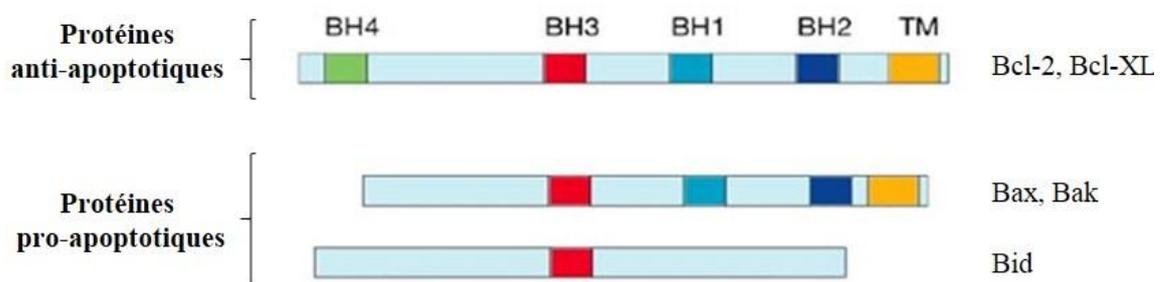


Figure 44: Structure des protéines de la famille Bcl-2. Les protéines anti-apoptotiques, Bcl-2 et Bcl-XL, sont composées de 4 domaines BH (Bcl-2 Homology) (BH1, BH2, BH3 et BH4) et d'un domaine transmembranaire TM. Les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak possèdent 3 domaines BH (BH1, BH2 et BH3) et un domaine transmembranaire (TM). La protéine pro-apoptotique Bid ne possède qu'un domaine BH (BH3). Les domaines BH permettent l'interaction des protéines entre-elles.

initiatrices 8 et 10. La fixation des pro-caspases initiatrices 8 et 10 sur FADD conduit à leur clivage et à la libération de leur forme active dans le cytoplasme. Les caspases 8 et 10 vont à leur tour activer les **pro-caspases effectrices 3, 6 et 7** pour induire l'apoptose. Dans certains types cellulaires, la caspase 8 est capable d'activer directement la voie intrinsèque par le clivage de la protéine Bid en sa forme active tBid (Figure 43).

c. Voie intrinsèque

La voie intrinsèque est dépendante de la **mitochondrie**. Son activation est le résultat d'un **stress apoptotique** comme l'augmentation des ROS (Reactive Oxygen Species), le stress du réticulum endoplasmique, des dommages à l'ADN etc (Figure 43). Ce stress aboutit à la **perméabilisation des membranes mitochondriales** ce qui permet la libération de nombreuses protéines dans le cytoplasme comme l'**endonucléase-G**, l'**AIF** (Apoptosis Inducing Factor) et le **cytochrome c**.

- L'**endonucléase-G** et **AIF** vont migrer dans le noyau pour induire la condensation et la fragmentation de l'ADN.
- Le **cytochrome c** reste dans le cytoplasme et va s'associer la protéine **APAF-1** (Apoptosis Protease Activating Factor-1), qui va recruter à son tour la **pro-caspase 9** (Figure 43). Le complexe multi-protéique, appelé « **apoptosome** », est à l'origine du clivage et de l'activation de la caspase 9. La caspase 9 va ensuite activer les caspases effectrices 3, 6 et 7 pour induire l'apoptose.

La régulation de la perméabilité des membranes mitochondriales est contrôlée par les protéines de **la famille Bcl-2** (B-cell lymphoma 2). Les membres de cette famille possèdent au moins un **domaine BH** (Bcl-2 Homolgy). Elles possèdent toutes un domaine BH3, ce qui leur permet d'interagir entre elles, ainsi qu'un **domaine transmembranaire** sauf pour la protéine Bid. Elles peuvent être divisées en deux grands groupes : les **protéines pro-apoptotiques** et les **protéines anti-apoptotiques** (Figure 44).

- Les **protéines pro-apoptotiques** comme **Bax**, **Bak** et **Bid** activent la voie intrinsèque. Les protéines **Bax** et **Bak** possèdent 3 domaines BH (BH1, BH2 et BH3) et un domaine transmembranaire. Les protéines Bax et Bak sont les deux principaux effecteurs de la régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale. Elles

s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe, s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent pour former des pores libérant ainsi les protéines de l'apoptose dans le cytoplasme (Figure 43). La protéine **Bid** possède uniquement un domaine BH3. Sa forme clivée tBid, par la caspase 8, expose son domaine BH3 qui permet son insertion dans la membrane mitochondriale et sa liaison à d'autres protéines pro-apoptotiques.

- Les **protéines anti-apoptotiques** comme **Bcl-2** et **Bcl-XL** possèdent 4 domaines BH (BH1, BH2, BH3 et BH4) et un domaine transmembranaire. Ces protéines se lient aux protéines pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale externe, bloquant ainsi la formation de pores.

2. Effets des TZDs sur la voie apoptotique

De nombreuses études ont montré que les TZDs induisent l'**apoptose** de différents types de cellules cancéreuses *in vitro* de manière PPAR γ -dépendante et PPAR γ -indépendante (revue Blanquicett *et al.*, 2008 ; revue Griller-Vuissoz *et al.*, 2012). La majorité des effets pro-apoptotiques des ligands de PPAR γ sont PPAR γ -indépendants.

Les pionniers des dérivés $\Delta 2$, l'équipe de Shiau ont mis en exergue l'activité pro-apoptotique PPAR γ -indépendante de ces dérivés TZDs (Shiau *et al.*, 2005). Dans les cellules cancéreuses de prostate PC-3 et LNCaP, les composés TGZ et CGZ ainsi que leurs dérivés $\Delta 2$ diminuent la prolifération cellulaire et induisent la libération de cytochrome c et la fragmentation de l'ADN. Toutefois, aucune apoptose n'est observée avec les composés RGZ et PGZ et leurs dérivés $\Delta 2$. Plus récemment, il a été montré que la $\Delta 2$ -TGZ induit une diminution du potentiel mitochondrial et le clivage de PARP et de la caspase 7 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Colin-Cassin *et al.*, 2015).

L'apoptose induite par les TZDs est généralement **caspase-dépendante** et active les deux voies : la **voie extrinsèque** et la **voie intrinsèque**. En effet, un agoniste de PPAR γ , le composé TZD18, induit l'apoptose des cellules leucémiques SD1 et BV173 par l'activation des **caspases 8 et 9** (Liu *et al.*, 2006). De la même manière, l'activation des **caspases 8 et 9** par TZD18 est observée dans les cellules leucémiques KU812 (Zang *et al.*, 2006). Dans les cellules cancéreuses de la vessie RT4 et T24, la TGZ est capable d'induire le clivage des **caspases 9, 8 et 3** ainsi que celui de PARP de manière PPAR γ -indépendante (Plissonier *et al.*,

2010). Les mêmes observations ont été réalisées dans les cellules T24 en réponse à la CGZ (Plissonier *et al.*, 2011). Dans les cellules cancéreuses rénales 786-O, Caki-2 et ACHN, la condensation nucléaire et l'activation de la **caspase 3** en réponse à la TGZ sont aussi induits par des effets PPAR γ -indépendants (Fujita *et al.*, 2011).

L'activation de la **voie intrinsèque** par les TZDs est contrôlée par la modulation des **protéines pro- et anti-apoptotiques**. Dans les cellules cancéreuses rénales 786-O, Caki-2 et ACHN, le ratio **Bax/Bcl-2** est augmenté en réponse à la TGZ par un mécanisme PPAR γ -indépendant (Fujita *et al.*, 2011). De même, la TGZ entraîne une induction de **Bax** et une diminution de **Bcl-2** dans les cellules de gliomes LN-18, U-87MG et MG-328 (Akasaki *et al.*, 2006). Dans les cellules cancéreuses de prostate PC-3, le niveau d'expression des protéines **Bcl-XL**, **Bcl-2**, **Bax**, **Bak** et **Bid** n'est pas modifié en réponse à la TGZ. En revanche, les composés TGZ et CGZ ainsi que leurs dérivés $\Delta 2$ inhibent les interactions entre les protéines anti-apoptotiques **Bcl-XL** et **Bcl-2** et la protéine pro-apoptotique **Bak** (Shiau *et al.*, 2005).

De nombreuses études ont montré que l'activation de la **voie extrinsèque** est effectuée par l'induction de **récepteurs de mort**, en particulier **DR5**. En effet, la TGZ augmente l'expression des récepteurs **DR4** et **DR5** et de leur ligand **TRAIL** dans les cellules cancéreuses de la vessie T24 par des effets PPAR γ -indépendants (Plissonier *et al.*, 2010). Dans les cellules cancéreuses du colon DLD-1, l'expression de **DR5** est également augmentée au niveau transcriptionnel et traductionnel après un traitement avec la TGZ (Koyama *et al.*, 2014). Ce résultat a été confirmé dans les cellules cancéreuses de poumons A549, de colon HCT116 et d'ostéosarcome Saos2 (Koyama *et al.*, 2014). La TGZ et la CGZ induisent aussi l'expression de **DR5** indépendamment de PPAR γ dans les cellules cancéreuses de poumons A549 (Zou *et al.*, 2007). De même, la RGZ induit l'expression de **DR5** de manière PPAR γ -indépendante dans les cellules cancéreuses rénales Caki, de colon HCT116, de prostate PC-3 et de sein MDA-MB-231. Toutefois, le récepteur **DR4** n'est pas induit après un traitement à la RGZ (Kim *et al.*, 2008).

IV. Effets des TZDs sur la migration

Les TZDs présentent également une **activité anti-migratrice** et **anti-invasive** sur de nombreux modèles cellulaires de manière PPAR γ -dépendante et PPAR γ -indépendante.

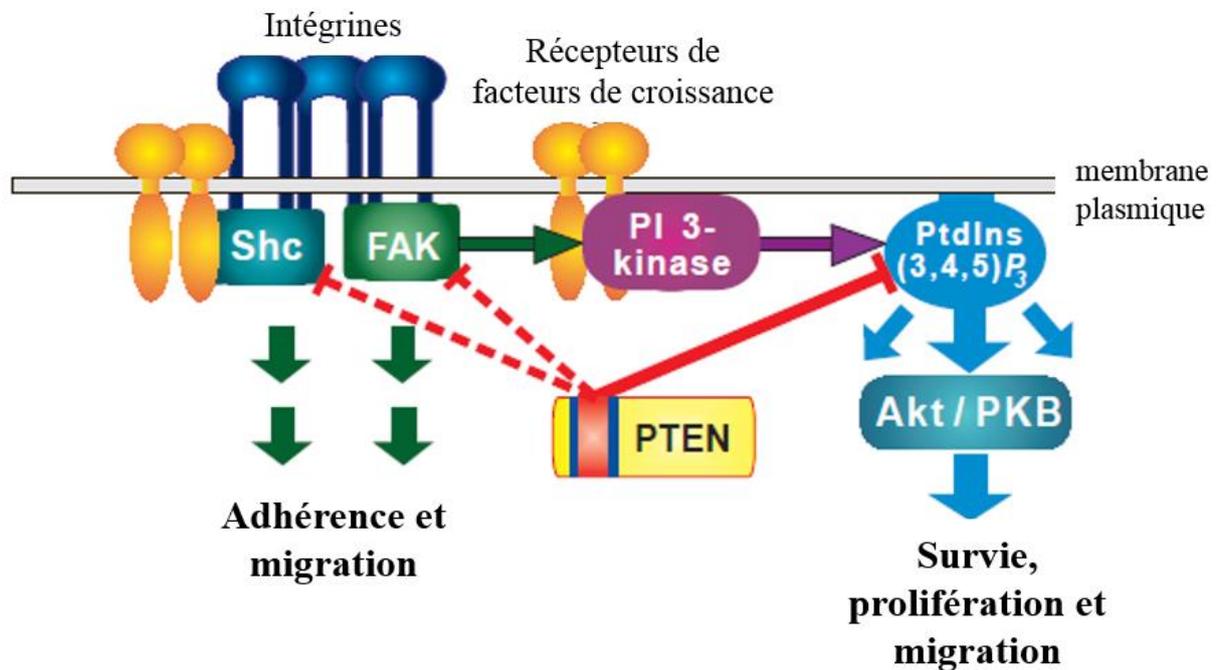


Figure 45: PTEN et ses cibles impliquées dans la migration et la survie cellulaire. Les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase) et Shc sont impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaire. Les voies de signalisation liées à ces deux protéines sont activées par des intégrines ou des récepteurs de facteurs de croissance. La phosphatase PTEN déphosphoryle ces protéines pour inhiber ces voies de signalisation. La kinase FAK interagit avec la PI 3-kinase (Phosphatidylinositol 3-kinase), l'active et conduit à la production de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PtdIns (3,4,5)P₃). Ce dernier active Akt (PKB) qui contrôle la survie, la prolifération et la migration cellulaire. La PI 3-kinase peut également être activée par des récepteurs de facteurs de croissance. La principale fonction de PTEN est d'inhiber la formation de PtdIns (3,4,5)P₃, qui régule Akt (PKB) et ses voies de signalisation (d'après revue Yamada *et al.*, 2001).

Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, la PGZ entraîne une diminution de l'invasion cellulaire après 2, 4 et 6 jours de traitement (Nadarajan *et al.*, 2016). De même, la TGZ inhibe l'invasion des cellules cancéreuses hépatiques HLF (Motomura *et al.*, 2004a). De nombreuses études montrent que l'effet anti-invasif des TZDs est contrôlé par l'activité des **MMP**. En effet, la PGZ inhibe l'invasion des cellules d'hépatocarcinome SMMC-7721 et HepG2 en diminuant l'expression de **MMP-2** (Yang *et al.*, 2014). Dans les cellules de gliome U87-MG, l'inhibition de l'invasion par la RGZ est associée à une diminution de l'expression et de l'activité de **MMP-2** d'une manière PPAR γ -indépendante (Jan *et al.*, 2009). Dans les cellules leucémiques K562 et HL-60, la TGZ diminue l'adhérence cellule-MEC ainsi que l'invasion en baissant l'activité des **MMP-2** et **MMP-9** (Liu *et al.*, 2005). Un effet PPAR γ -indépendant de la PGZ et de la RGZ sur les capacités invasives des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et des cellules cancéreuses pancréatiques PANC-1 et HPAC a aussi été observé avec une diminution de l'activité des **MMP-2** et **MMP-9** (Liu *et al.*, 2003 ; Galli *et al.*, 2004).

D'autres études montrent que l'inhibition de la migration cellulaire par les TZDs est contrôlée par les protéines de signalisation **Akt**, appelé aussi PKB (Protein Kinase B), **FAK** (Focal Adhesion Kinase) et **PTEN**. Il est connu que PTEN inhibe la phosphorylation de FAK et Shc, deux protéines de signalisation impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaire (Figure 45). La phosphatase PTEN agit également en bloquant l'activité de Akt qui contrôle la survie, la prolifération et la migration cellulaire (revue Yamada *et al.*, 2001). Dans les cellules d'hépatocarcinome BEL-7404, la RGZ inhibe la migration cellulaire par une déphosphorylation de **Akt** et de **FAK** ainsi qu'une augmentation de l'expression de **PTEN** (Zhang *et al.*, 2006). La RGZ inhibe également l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques PANC-1 en augmentant l'expression de **PTEN** et en diminuant l'expression de **MMP-2** (Li *et al.*, 2015). De même, les cellules d'ostéosarcomes LM8 traitées à la TGZ sont moins invasives et moins motiles que les cellules non traitées avec une diminution du taux de **Akt** phosphorylé et de l'activité de **MMP-2** (Aizawa *et al.*, 2010).

Plusieurs études montrent une corrélation entre l'**inhibition de la migration et/ou de l'invasion** et le **changement de morphologie** des cellules traitées à la **TGZ**. La TGZ diminue les capacités migratoires des cellules cancéreuses ovariennes ES-2 de manière PPAR γ -indépendante en diminuant le nombre de **contacts focaux** et de **fibres de stress**. Cet effet est accompagné d'une diminution de la phosphorylation de **FAK** et **PTEN** après 4 heures de

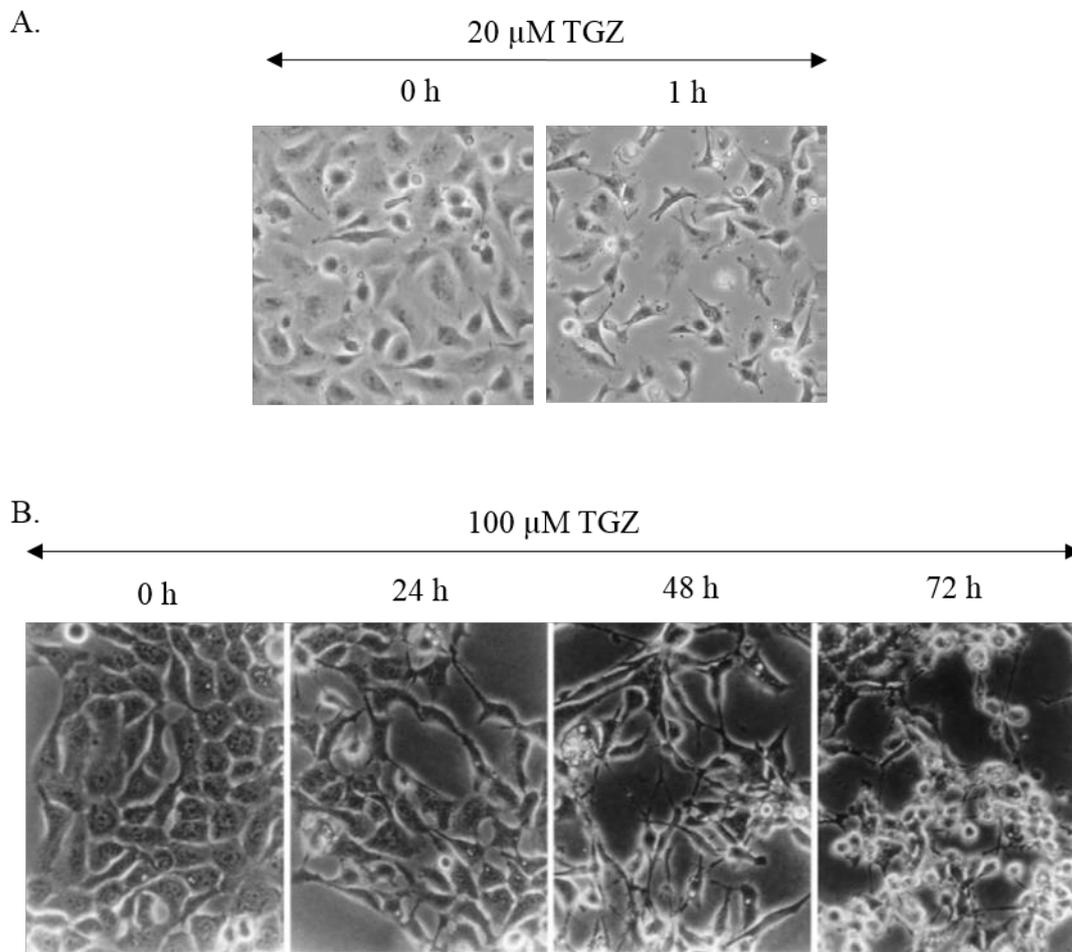


Figure 46: Morphologie des cellules cancéreuses en réponse à la TGZ. (A) Dans les cellules cancéreuses ovariennes ES-2, la TGZ diminue la surface d'étalement des cellules et permet l'extension de protrusions membranaires après 1 heure de traitement. (B) Dans les cellules cancéreuses pancréatiques PK-1, la TGZ entraîne une diminution de la taille des cellules avec la formation de protrusions membranaires après 24 et 48 heures de traitement. Les cellules présentent une morphologie arrondie après 72 heures de traitement (d'après Yang *et al.*, 2007, Motomura *et al.*, 2004).

traitement. Un changement morphologique est aussi observé avec une diminution de la **surface d'étalement** de moitié des cellules traitées à la TGZ, une **perte de contact** avec les cellules voisines et une extension des **protrusions membranaires** (Figure 46A) (Yang *et al.*, 2007). La migration des cellules cancéreuses mammaires T-47D et MDA-MB-231 est également bloquée par la TGZ de manière PPAR γ -indépendante par une inhibition de la **formation de lamellipodes** et de la **polymérisation de l'actine** au sein de ces structures (Wang *et al.*, 2008). De plus, l'**adhérence cellule-MEC** et l'**étalement** des cellules sur un substrat fibronectine sont fortement diminués en corrélation avec une diminution de la phosphorylation de **FAK**. Dans les cellules T-47D, on observe une reformation des contacts intercellulaires par une augmentation de l'**assemblage des filaments d'actine** au niveau des jonctions (Wang *et al.*, 2008). De même, dans les cellules cancéreuses pancréatiques PK-1, la TGZ inhibe la migration et l'invasion cellulaire en diminuant la **taille des cellules** et le nombre de **fibres de stress** et en permettant la formation d'**extensions membranaires** (Figure 46B) (Motomura *et al.*, 2004b).

L'effet anti-migratoire des TZDs est aussi prometteur *in vivo* sur différents types de tumeurs. La RGZ inhibe le développement de métastases pulmonaires chez des souris présentant une tumeur primaire mammaire (Magenta *et al.*, 2008). A partir de coupes histologiques de striatum de rat ayant subi une injection de cellules de gliomes, une diminution de l'invasion des cellules cancéreuses accompagnée d'une diminution de l'expression de **MMP-9** est observée après un traitement à la PGZ (Grommes *et al.*, 2006). De même, l'inhibition de métastases ganglionnaires et pulmonaires par la PGZ a été montré dans un modèle murin de xénogreffe de cellules cancéreuses pancréatiques BxPC-3 (Ninomiya *et al.*, 2014). Chez des souris implantées de cellules d'ostéosarcomes LM8, la TGZ diminue l'activité de la **MMP-2** et inhibe le développement des métastases pulmonaires (Aizawa *et al.*, 2010).

V. Vers l'amélioration du composé troglitazone

Les drogues connues pour une pathologie qui sont utilisées pour une autre pathologie est appelé le « **drug reprofiling** » (Langedijk *et al.*, 2015). Cette stratégie consiste à développer et optimiser des médicaments existants. Dans ce contexte, le laboratoire s'intéresse aux effets anti-tumoraux des TZDs. Ces composés, qui ont été développés et utilisés en clinique pour traiter des patients diabétiques, ont montré une activité anti-tumorale. Le laboratoire a ainsi

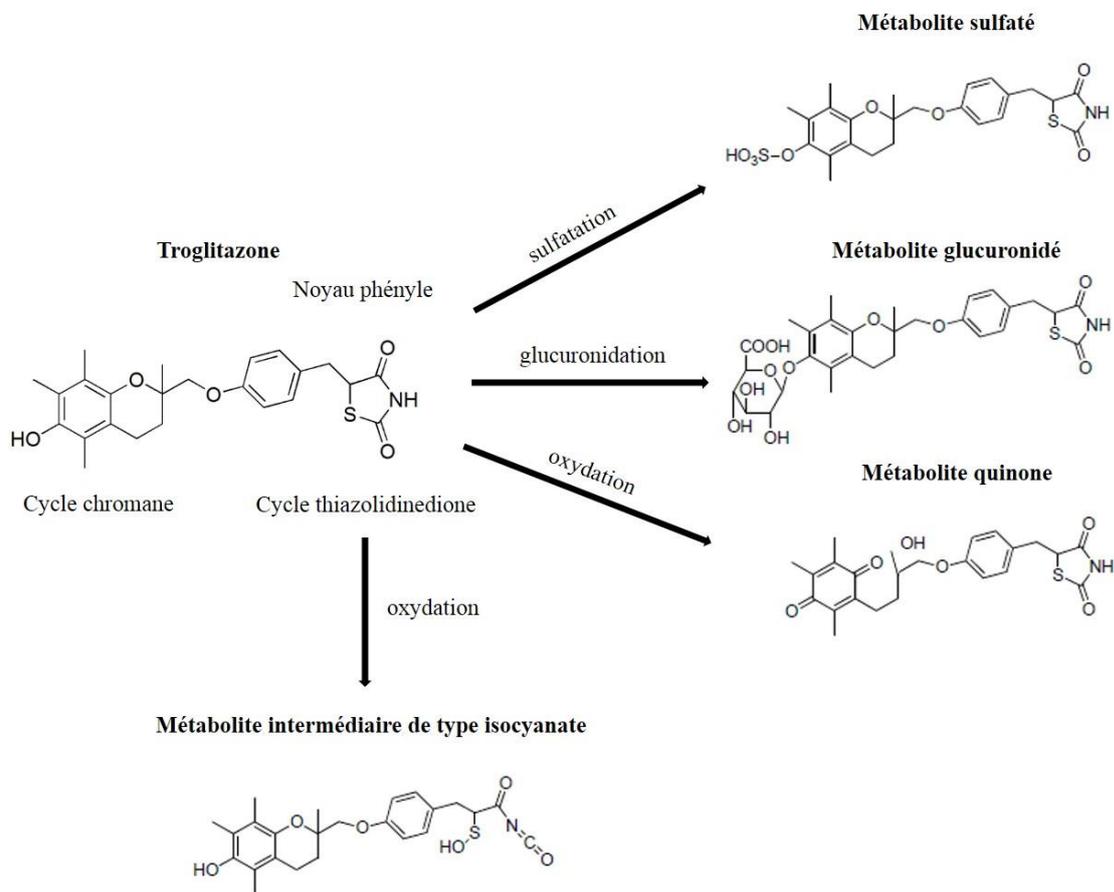


Figure 47: Métabolisme de la troglitazone. La troglitazone est composée d'un cycle chromane, d'un noyau phényle central et d'un cycle thiazolidinedione. Elle est principalement métabolisée par 3 voies : la sulfatation qui conduit à la formation d'un métabolite sulfaté, la glucuronidation qui produit un métabolite glucuronidé et l'oxydation formant un métabolite quinone. Les 3 types de modifications s'effectuent du côté du cycle chromane. Des métabolites sont également produits du côté du cycle TZD. Le soufre de ce dernier peut subir une oxydation formant un métabolite intermédiaire de type isocyanate (d'après Masubuchi *et al.*, 2006).

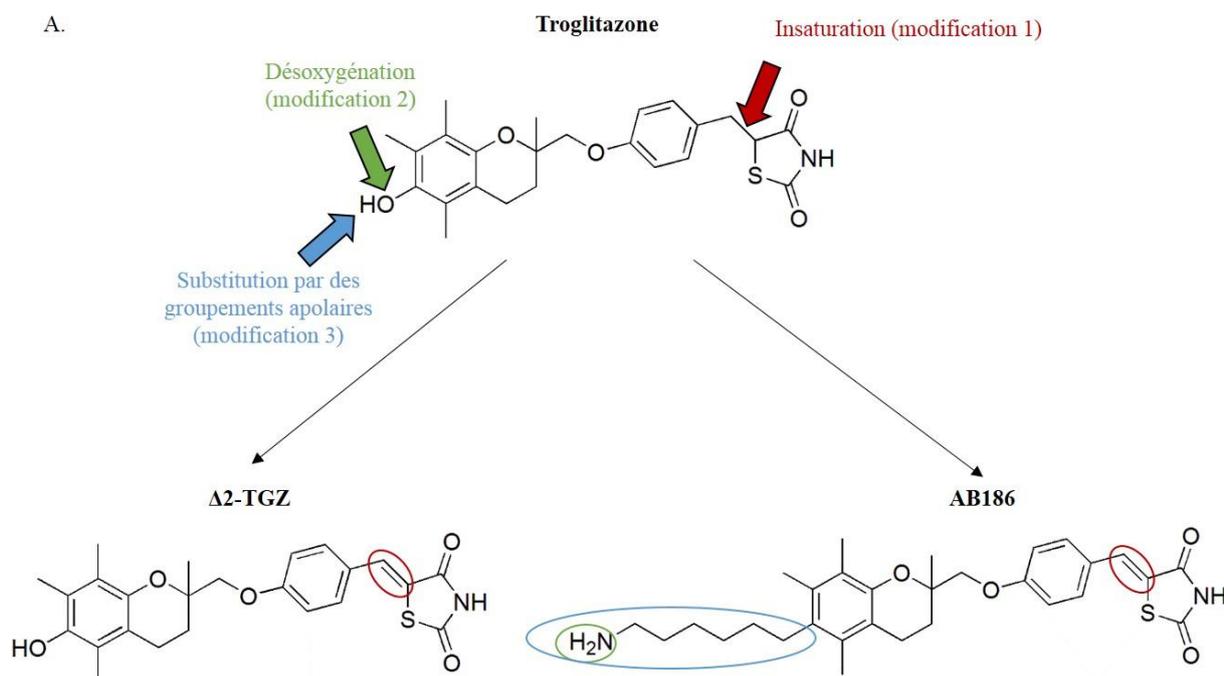
développé des dérivés originaux de TZDs afin d'augmenter leur activité anti-tumorale et diminuer leur toxicité. Ce travail est mené en collaboration avec une équipe de chimiste de l'UMR 7565 CNRS UL (Dr. Michel Boisbrun, équipe MoBAT). Dans ce cadre, j'ai participé à une revue générale sur **l'optimisation de la TGZ (article 1)**.

Reprofiling of Troglitazone More Active and Less Toxic Derivatives : a New Hope for Cancer Treatment ?

Mazerbourg Sabine, Kuntz Sandra, Grillier-Vuissoz Isabelle, Berthe Audrey, Geoffroy Marine, Flament Stéphane, Bordessa Andrea, Boisbrun Michel. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 16(19):2115-24.

La TGZ présente un effet anticancéreux et son amélioration semble être une stratégie intéressante pour le traitement du cancer. En effet, parmi tous les membres de la famille des TZDs, la TGZ est souvent décrite comme l'une des plus puissante (Lecomte *et al.*, 2008). Malheureusement, son développement en tant qu'anticancéreux a rapidement été arrêté à cause de ses effets secondaires hépatotoxiques. Cette toxicité est due à la formation de métabolites hautement toxiques. En effet, dans le foie humain, la TGZ est métabolisée par sulfatation, glucuronidation et oxydation pour former les **métabolites sulfatés, glucuronidés et quinone** respectivement (Figure 47). La TGZ, composée d'un cycle chromane, d'un noyau phényle central et d'un cycle thiazolidinedione (TZD) est métabolisée du côté du cycle chromane. Des métabolites sont également produits du côté du cycle TZD. Le soufre de ce dernier peut subir une oxydation formant un **métabolite intermédiaire de type isocyanate** en partie responsable de la toxicité hépatique (Saha *et al.*, 2010). Les métabolites intermédiaires formés à partir de l'oxydation du cycle chromane (métabolite intermédiaire de type quinone) et du cycle TZD (métabolite intermédiaire de type isocyanate) peuvent réagir avec le glutathion ou se lier de manière covalente à des macromolécules cellulaires engendrant un effet cytotoxique.

Plusieurs équipes ont montré qu'une modification chimique de la structure des TZDs par l'ajout d'une double liaison accolée au cycle TZD, formant les composés insaturés $\Delta 2$, sont plus efficaces que les composés parents dans l'inhibition de la prolifération cellulaire (Fan *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2005). Dans ce cadre, notre équipe a développé des dérivés originaux de la TGZ en modifiant des positions stratégiques de manière à **augmenter l'activité antiproliférative envers les cellules cancéreuses** et de **diminuer la toxicité envers**



B.

Composé	IC ₅₀ MCF-7 (μM)	IC ₅₀ MDA-MB-231 (μM)	Toxicité hépatocytes (% cellules vivantes à 100μM)
TGZ	35,4	15,7	52
Δ2-TGZ	29,7	16,6	63
AB186	3,6	1,52	83

Figure 48: Structure et activité antiproliférative de la troglitazone et de ses dérivés. (A) Trois modifications chimiques de la TGZ ont été réalisées afin d'obtenir les dérivés originaux Δ2-TGZ et AB186 : une insaturation, une désoxygénation et une substitution par des groupements apolaires. Le composé Δ2-TGZ présente une insaturation, c'est-à-dire l'insertion d'une double liaison accolée au cycle thiazolidinedione qui rigidifie le squelette de la molécule. Le composé AB186 présente une insaturation ainsi qu'une désoxygénation et une substitution du groupement hydroxyle du cycle chromane par des groupements apolaires. Le composé AB186 est nommé « composé 18 » (d'après Bordessa *et al.*, 2014 ; Brevet Université de Lorraine/CNRS, FR 2 986 231 A1, PCT WO 2013/110796 A1). (B) L'IC₅₀ ou Concentration Inhibitrice Médiane des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 a été évaluée après 24 heures de traitement en présence des différents composés. La toxicité a été testée sur des cultures primaires d'hépatocytes humains. Les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages de cellules vivantes après 90 minutes d'incubation en présence de 100 μM de composé (d'après Colin *et al.*, 2010, Salamone *et al.*, 2012 ; Bordessa *et al.*, 2014).

les cellules non cancéreuses (Salamone *et al.*, 2012 ; Bordessa *et al.*, 2014). La $\Delta 2$ -TGZ est le premier dérivé insaturé qui a été synthétisé par l'ajout d'une double liaison accolée au cycle TZD (Figure 48A). Nous avons montré que cette **insaturation** (modification 1) permet une meilleure activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 comparé au composé parent (Colin *et al.*, 2010). Après 24 heures de traitement, l'IC₅₀ est de 29,7 μ M pour la $\Delta 2$ -TGZ alors qu'il est de 35,4 μ M pour le TGZ (Figure 48B). Dans les cellules MDA-MB-231, l'IC₅₀, quasiment identique, est de 16,6 μ M pour la $\Delta 2$ -TGZ et est de 15,7 μ M pour la TGZ. La $\Delta 2$ -TGZ est également moins cytotoxique sur une culture primaire d'hépatocytes humains à des doses de 100 μ M. En effet, la viabilité cellulaire est de 63% pour la $\Delta 2$ -TGZ alors qu'elle est de 52% pour la TGZ (Figure 48B) (Salamone *et al.*, 2012). De nouveaux dérivés TGZ ont été développés par des modifications du groupe hydroxyle (OH) polaire du phénol du cycle chromane de la TGZ et de la $\Delta 2$ -TGZ donnant la molécule TGZ désoxygénée et $\Delta 2$ -TGZ désoxygénée. Nous avons montré que cette **désoxygénation** (modification 2) augmente l'activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses mammaires (Salamone *et al.*, 2012). De même, cette désoxygénation permet une diminution de la toxicité sur les hépatocytes. Ceci s'expliquerait par l'absence de l'atome d'oxygène qui empêcherait la formation de métabolites toxiques de type quinone. De plus, la présence de **groupements apolaires** (modification 3) au niveau du groupe hydroxyle (OH) polaire du phénol du côté du cycle chromane augmente l'activité antiproliférative et diminue l'hépatotoxicité de la TGZ et de la $\Delta 2$ -TGZ (Salamone *et al.*, 2012).

Dans l'optique d'obtenir un effet cumulatif sur l'inhibition de la prolifération et sur la toxicité, des composés présentant simultanément toutes ces modifications ont été synthétisés par nos collègues chimistes (Bordessa *et al.*, 2014). Leur effet antiprolifératif a été évalué sur un large spectre de cellules cancéreuses : les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231, les cellules cancéreuses de colon HTC116, les cellules cancéreuses de mélanome métastasé MDA-MB-435, les cellules cancéreuses de pancréas Mia-PaCa, les cellules cancéreuses de foie HepG2 et les cellules cancéreuses de prostate PC3 et LNCaP. La toxicité des composés les plus actifs a été également testée sur des cultures d'hépatocytes humains à des doses allant jusque 200 μ M. Les dérivés les plus prometteurs ont été brevetés en 2013 dont le composé nommé **AB186** (Brevet Université de Lorraine/CNRS, FR 2 986 231 A1, PCT WO 2013/110796 A1). Ce dernier possède les trois types de modifications : une insaturation, une désoxygénation et une substitution par des groupements apolaires au niveau du cycle chromane (Figure 48A). Ces modifications chimiques lui

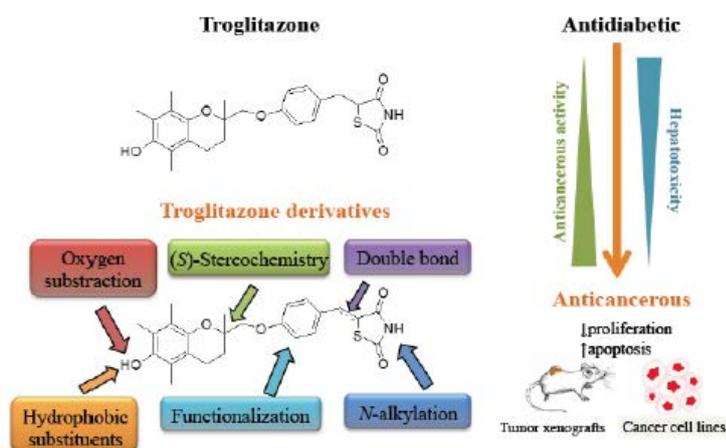
confèrent une activité antiproliférative 10 fois supérieure au composé parent sur les cellules cancéreuses mammaires. En effet, l'IC₅₀ de la molécule est de 3,6 µM et de 1,52 µM pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement ([Figure 48B](#)) (Bordessa *et al.*, 2014). De plus, 83% et 80% de viabilité cellulaire est observée sur une culture primaire d'hépatocytes humains à des doses de 100 µM et 200 µM respectivement. *In fine*, ces études de relation **structure-activité** et **structure-toxicité** sur la TGZ et ses nombreux dérivés ont permis d'identifier le composé AB186 comme le plus prometteur qui ouvre de nouvelles perspectives cliniques.

Graphical Abstract

Current Topics in Medicinal Chemistry; Vol. 16; 2016, 00

Reprofiling of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment?

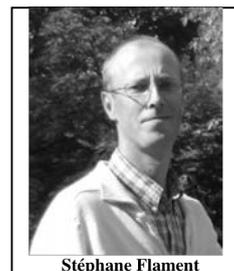
Sabine Mazerbourg, Sandra Kuntz, Isabelle Grillier-Vuissoz, Audrey Berthe, Marine Geoffroy, Stéphane Flament*, Andrea Bordessa and Michel Boisbrun

^aUniversité de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France; ^bCNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

Reprofiling of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment?

Sabine Mazerbourg^{a,b}, Sandra Kuntz^{a,b}, Isabelle Grillier-Vuissoz^{a,b}, Audrey Berthe^{a,b}, Marine Geoffroy^{a,b}, Stéphane Flament^{a,b,*}, Andrea Bordessa^{c,d} and Michel Boisbrun^{c,d}

^aUniversité de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France; ^bCNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France; ^cUniversité de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France; ^dCNRS, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France



Stéphane Flament

Abstract: The existence of unresponsive tumors and the appearance of resistant tumors during the course of treatments both justify that we increase urgently the panel of pharmacological molecules able to fight cancer. An interesting strategy is drug reprofiling (also known as drug repositioning, drug repurposing or drug retasking) that consists of identifying and developing new uses for existing drugs. This review illustrates drug reprofiling with troglitazone (TGZ), a synthetic PPAR γ agonist initially used for the treatment of type II diabetes. The fact that TGZ also displays anticancer effects is known since the end of the nineties but its development as an anticancer agent was slowed down due to hepatotoxic side effects. Part of the knowledge available for TGZ, mainly the molecular basis for PPAR γ activation, its metabolization pathways and the side effects on hepatocytes, were taken into account to elaborate new molecules. Key findings were that unsaturated TGZ derivatives, when compared to TGZ, do not activate PPAR γ , exhibit a higher efficiency on cancer cells and a lower toxicity towards hepatocytes. However, a weakness is that the mechanisms involved in the anticancer effects are still not completely understood and that the efficiency of such derivatives has not yet been completely studied *in vivo*. Data about this point should become available very soon from animal models and this will be a prerequisite to initiate clinical trials with these potential new anticancer drugs developed from a drug repurposing strategy.

Keywords: Drug reprofiling, troglitazone, thiazolidinedione, cancer, diabetes, hepatotoxicity.

1. INTRODUCTION

The traditional approach to drug discovery involves *de novo* identification and validation of new molecules, which is a time-consuming and very expensive process. Despite huge investment, the number of new drugs identified by this approach has not increased significantly during past decades. An interesting alternative is drug reprofiling (also known as drug repositioning, drug repurposing or drug retasking) that consists of identifying and developing new uses for existing drugs [1]. More and more companies are scanning the existing pharmacopoeia for reprofiling candidates. This can be achieved by two approaches: *in silico* drug reprofiling which utilizes public databases and bioinformatics tools to systematically identify interaction networks between drugs and protein targets whereas activity-based drug reprofiling refers to the use of existing drugs for screening. Several governments worldwide are investing in drug repositioning and related activities [2]. Drug reprofiling has gained particular attention from the scientific community engaged in anticancer research due to the combination of great demand for new anticancer drugs and the availability of a wide variety of cell-

and target-based screening assays [3]. With the successful clinical introduction of a number of non-cancer drugs for cancer treatment, drug repositioning now becomes a powerful alternative strategy to discover and develop novel anticancer drug candidates from the existing drug space. In this review, we expose the case of troglitazone (TGZ) (Fig. 1), a drug that was used for the treatment of type II diabetes and whose reprofiling could be very interesting for cancer treatment. Indeed, among members of the same family that reached the market for diabetes treatment, TGZ was often described as the most potent one, justifying that a specific attention was paid to this compound [4]. The exact mechanism involved in its anticancer action has remained elusive.

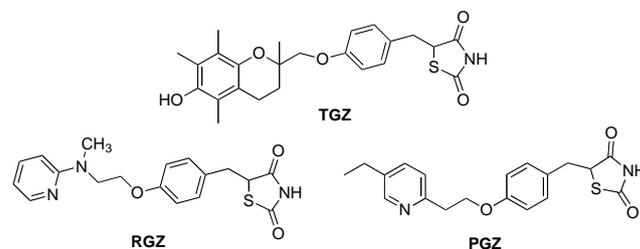


Fig. (1). Chemical structures of TGZ, RGZ, and PGZ.

Original derivatives have been synthesized and exhibit a higher efficiency and a lower toxicity. Ongoing studies are

*Address correspondence to this author at: CRAN, UMR 7039, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy; Cedex France; Tel: 011 33(0) 3 83 68 42 52; Fax: 011 33(0) 3 83 68 40 01; E-mail: stephane.flament@univ-lorraine.fr

being focused on identifying the molecular target of these derivatives in cancer cells. This will increase our knowledge of their mode of action, facilitating their development as new anticancer drugs.

2. TGZ AND HEPATOTOXICITY

Thiazolidine-2,4-diones (TZD) are synthetic agonists of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR γ), a ligand-activated transcription factor belonging to the steroid hormone receptor superfamily. TZD became famous after the discovery of ciglitazone (CGZ) by scientists at the Takeda Pharmaceuticals Company [5, 6]. This compound reduced insulin resistance by potentiating the action of insulin in diabetic or obese animals. Several other TZDs were developed thereafter. TGZ was derived from CGZ by replacing the methylcyclohexylmethyl ether moiety with a vitamin E residue. Pioglitazone (PGZ) and rosiglitazone (RGZ) were developed by modifications based on the metabolites of CGZ. TGZ (Rezulin®, Pfizer) was launched in 1997 as a new oral antidiabetic drug. The recommended dosage was 400 to 800 mg once daily and TGZ was used as monotherapy as well as in combination with metformin, sulfonyleureas or insulin. In 2000, TGZ was withdrawn from the market because it was associated with the development of acute liver failure [7, 8]. TGZ was the only TZD to be withdrawn from the market worldwide. RGZ (Avandia®, GSK), another TZD-based antidiabetic drug, was suspended from the European market in 2010 because its use was associated with increased risks of heart attacks, whereas PGZ (Actos®, Takeda) was withdrawn from the French and German markets in 2011 in regards to high risks of bladder cancer (Fig. 1).

Thus, there was a great interest in designing novel PPAR γ ligands that retain insulin-sensitizing properties while minimizing adverse side effects. This led to a second generation of TZD for which attention was put mainly on the tail part of the compounds. Efatutazone (CS-7017; RS5444), developed by the Daiichi Sankyo Company, is a novel third-generation TZD that activates very potently PPAR γ -mediated transcription [9].

As reported by Chojkier [7], the liver injury associated with TGZ was idiosyncratic, unpredictable, neither time- nor dose-dependent and cannot be reproduced in animals. A great amount of literature was devoted to the study of TGZ-associated Drug Induced Liver Injury (DILI) in order to better understand the mechanisms involved, but this topic still remains controversial. Smith [10] and later Yokoi [11] have reviewed these aspects. The toxicity of TGZ seems to be PPAR γ -independent since molecules with higher PPAR γ agonist potency such as RGZ and PGZ exhibited less hepatotoxic effects [12]. Numerous mechanisms were reported to explain TGZ toxicity.

Many articles report on a mitochondria-related toxicity [13-19]. Oxidative stress, reduction of mitochondrial membrane potential, alteration in mitochondrial respiratory function, and mitochondrial DNA damage were evoked. Lee *et al.* [20] used a proteomic approach to detect off-target effects of TGZ, out of which was identified an impaired mitochondrial glutathione import protein. All these phenomena should be attributed not only to TGZ but also to its metabolites and

there is mounting evidence that the latter are responsible for at least a significant part of the observed DILI. In this way, many studies have focused on TGZ metabolism. Fig. (2) summaries the pathways leading to the various metabolites which were identified. Conjugation as a sulfate is catalyzed by phenol sulfotransferase ST1A3 [28] and this accounts for 70% of the metabolites detected in human plasma [29]. Glucuronic acid conjugation is mediated by UDP-glucuronyltransferase (UGT), leading to a minor metabolite [30]. While these phase II metabolites are generally considered as detoxifying species, it was suggested that TGZ sulfate (TGZS) might have some toxicological potential. Funk *et al.* [31, 32] showed that TGZS interacts with the canalicular Bile salt export pump (Bsep), leading to bile salts accumulation in the liver, inducing cholestasis. It was more recently shown that TGZS has also a direct toxic effect on human liver cells [33].

Many articles also report on the toxicity of Reactive Metabolites (RM) formed after oxidation resulting from phase I metabolism reactions. As depicted in Fig. (2), TGZ may be oxidized in the liver by CYP2C8 and CYP3A4 at the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane or at the TZD heterocycles. In the latter case, the heterocycle is converted into a sulfoxide which leads to a reactive isocyanate. One molecule of glutathione may then react directly on the isocyanate carbonyl group or establish a disulfide linkage via a loss of water. Both reactions are catalyzed by the action of glutathione *S*-transferase (GST) [34]. These reactions induce a depletion of glutathione, which may account for the observed toxicity. But RGZ and PGZ also contain a TZD ring, and no such hepatotoxicity was reported. Yet, the recommended doses for these two drugs were much lower than for TGZ, but it is assumed that the difference should arise from the absence of the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman group in RGZ and PGZ. Thus, the phenol group in TGZ enables the formation of the toxic sulfate derivative, but as depicted in Fig. (2), it can also be oxidized, giving a radical species leading subsequently to a quinone or a quinone-methide metabolite. The former revealed to be not as toxic as TGZ itself, but the highly reactive quinone-methide is assumed to be very toxic and may react with glutathione [35]. All these metabolites were identified in hepatocytes incubated with TGZ and their production could be reproduced by means of electrochemical oxidation [36-42]. Quantum calculations could afford the mechanistic pathways involved at the atomic level [43].

One may then wonder how could occur a so huge variability in hepatotoxicity among the patients, leading to the observed idiosyncratic DILI. TGZ has been shown to induce CYP3A in human and rat hepatocytes, which stimulates the formation of quinone-type metabolites [44, 45]. Thus, the large interindividual variability of CYP3A4 activities in human liver may be related to the variable risk of DILI. Furthermore, Watanabe *et al.* [46] reported from a group of Japanese patients treated with TGZ a huge correlation between the occurrence of an abnormal increase of the hepatic enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and the double null genotype of GSTM1 and GSTT1 isoforms. This was later confirmed *in vitro* [47]. Meanwhile, Okada *et al.* [34] showed that the various GST isoforms contributed differently to the GSH

Table 1. Overview of TGZ and TG-88 action on xenografted tumor development in mice.

<i>p.o.</i> administration (mg/kg /day)	Beginning of treatment after tumor cells injection	Mice	Cancer cell line	Effects on tumor development			
TGZ (200)	Same day	Balb/c nude	Huh7 (liver)	89 % reduction tumor growth	↓ proliferation ↑ apoptosis	[21]	
	12 days (tumor 2-4mm)			88 % reduction tumor growth			
	15 days (tumor 8-10 mm)			42 % reduction tumor growth			
TGZ (500)	Next day	BNX triple immunodeficient nude	PC3 (prostate)	20% reduction tumor weight	nd	[22]	
TG-88 (100 and 200)	2 days	Male NCr athymic nude	PC3 (prostate)	Tumor growth inhibition: 50 % when 100 mg/kg/day 61 % when 200 mg/kg/day	nd	[12]	
TGZ (1000)	Next day	Female BNX triple immunodeficient nude	MCF-7 (breast)	No tumor development	↑ apoptosis	[23]	
TGZ (350)	4 days	DBA/2J	KLN (lung)	63 % reduction tumor volume	nd	[24]	
TGZ (200)	Same day	Balb/c nude	HCT116 (colon)	XIAP+/+	63 % reduction tumor volume 54 % reduction tumor weight	↓ proliferation ↑ apoptosis	[25]
				XIAP-/-	87.5 % reduction tumor volume 79 % reduction tumor weight		
TGZ (200)	10 days (tumor 70 mm ³)	Swiss nude	CX-1 (colon)	50 % reduction tumor volume	nd	[26]	
TGZ (500)	Next day	Balb/c nude	BHP 18-21 (thyroid)	98 % reduction tumor volume No metastasis in the liver	nd	[27]	

TG-88: Δ2-TGZ derivative ; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein; nd: not determined

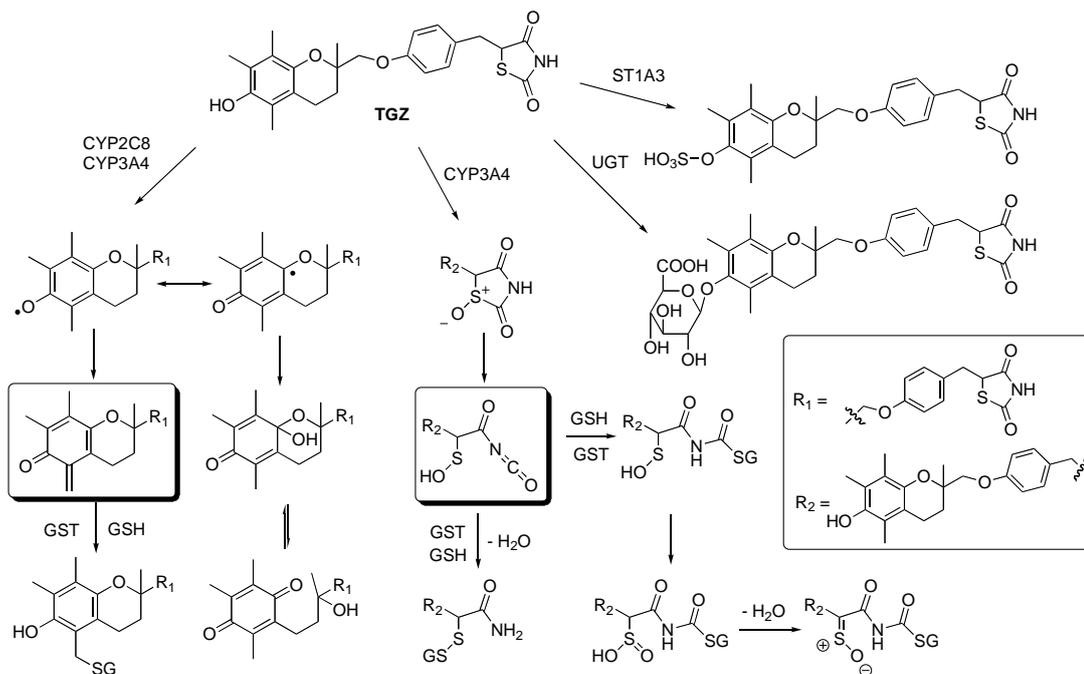


Fig. (2). Metabolization pathways of TGZ.

conjugation of individual reactive metabolites of TGZ. In particular, GSTM1 is the most important GST isoform in the production of the above reported disulfide GSH adduct when the chromane had been previously metabolized into the quinone form. Thus, interindividual differences in detoxification ability may contribute to the susceptibility to TGZ hepatotoxicity.

Thus, in order to use TGZ as a template for the design of new anti-cancer drugs, one should alter its toxicological profile by modifying its metabolism ability.

3. TGZ AND CANCER

TGZ also display anticancer properties [48-50]. Regarding TGZ, its anticancer effects were initially revealed from *in vitro* studies performed on breast cancer cells [23, 51]. The anticancer effects of TGZ have also been demonstrated on various cell types in animal models (Table 1). The TGZ clinical evaluation on refractory cancer patients started in 1999. Interestingly, on liposarcoma, TGZ induced terminal adipocyte differentiation of the tumor and on advanced prostate cancer, a phase II trial showed that the TGZ treatment stabilized the prostate-specific antigen (PSA) level [52, 53]. In addition, one patient had a dramatic decrease in PSA serum concentration, near undetectable level [53]. On advanced breast and colon cancer, no objective response was observed [54, 55].

Several lines of evidence suggest that the antitumor effects of TGZ are PPAR γ -independent. First, TGZ anticancer activity is not correlated to PPAR γ expression level. Indeed, LNCaP PPAR γ -deficient prostate cancer cells were more sensitive to the antitumor effect of TGZ than the PPAR γ -rich PC-3 cells [12]. In the MDA-MB-231 breast cancer cell line, TGZ reduced expression of the human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) and telomerase activity even in the absence of PPAR γ . The expression of hTERT was not correlated with the expression level of PPAR γ in clinical breast cancer patients [56]. Moreover, the antitumor effect was not correlated to PPAR γ transactivation. Indeed, although being a lower PPAR γ agonist than RGZ, TGZ was more potent in reducing cancer cell viability in different cancer cell lines [4, 12]. Second, several *in vitro* experiments have shown that the effects of TGZ were still observed in the presence of PPAR γ antagonists or in cells where PPAR γ expression was abrogated by RNA interference. The proteasomal degradation of several proliferation regulatory proteins such as estrogen receptor α , cyclin D1, c-Myc and β -catenin was one of the first TGZ-induced mechanisms, demonstrated as being PPAR γ -independent. For instance, in C4-2 human prostate cancer cells, the proteasome-mediated degradation of the transcription factor c-Myc induced by TGZ still occurred in the presence of the PPAR γ antagonist GW9662 and in cells where PPAR γ level was knocked down by siRNA technology [57]. Likewise, the PPAR γ antagonist GW9662 did not prevent cyclin D1 and estrogen receptor α degradation induced by TGZ in MCF-7 breast cancer cells [4, 58]. These data were comforted by the absence of correlation between PPAR γ expression level and TGZ-induced cyclin D1 degradation in breast cancer cell lines [58]. Moreover, estrogen receptor α proteolysis still occurred in MCF-7 cells submitted to PPAR γ silencing [4].

The TGZ-induced suppression of β -catenin, a regulator of the Wnt signaling pathway, was also unaffected by GW9662 in PC-3 prostate cancer cells [59]. Besides, different cancer cell lines were equally susceptible to TGZ-mediated repression of β -catenin irrespective of their PPAR γ expression level [59].

Several studies also evaluated the effect of combined therapies with TGZ and other agents both *in vitro* and *in vivo*. Herceptin, an antibody against the EGF-receptor HER2, sensitized breast cancer cells to the differentiating effect of TGZ [60]. When combined with platinum-based compounds TGZ increased the survival of mesothelioma-xenografted mice [61]. In combination with Paclitaxel, TGZ inhibited the growth of lung carcinoma cell lines (A549, H522) [62]. A similar effect was observed on the breast cancer cell line MCF-7 in case of co-treatment with the anti-estrogen tamoxifen [63]. TGZ also increased radiation sensitivity of cervix cancer cell lines (HeLa, Me180, and SiHa) [64].

4. Δ 2-TGZ, A PPAR γ -INDEPENDENT TGZ DERIVATIVE

Δ 2-TGZ (Fig. 3) has a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring and lacks PPAR γ agonist activity [58, 65]. This unsaturated derivative of TGZ was used to confirm the PPAR γ -independent anticancer effects. Δ 2-TGZ still suppressed proliferation of various cancer cell lines [12, 58, 65]. Compared to TGZ, Δ 2-TGZ inhibited prostate cancer cell proliferation more efficiently in both PPAR γ -expressing PC-3 cells and PPAR γ -deficient LNCaP cells [12]. Estrogen receptor α , a major regulator of cell proliferation in hormone-dependent breast cancer cells, was subjected to a proteasome-dependent degradation in response to Δ 2-TGZ in both MCF-7 and ZR-75 cell lines [4, 58, 66]. Δ 2-TGZ also induced cyclin D1 proteasomal degradation in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cells [65]. Furthermore, Δ 2-TGZ was more potent than TGZ since the complete ablation of cyclin D1 was observed for 30 μ M of Δ 2-TGZ compared with 40 μ M of TGZ [58]. In LNCaP cells, TGZ and Δ 2-TGZ also triggered the degradation of the transcription factor Sp1 leading to the suppression of the expression of the androgen receptor, a major regulator of prostate cell growth [59]. Moreover, in several prostate cancer cells, β -catenin was also degraded after phosphorylation by glycogen synthase kinase 3- β on a site of ubiquitination (Ser33/Ser37/Thr41) [59]. The proteasomal degradation of β -catenin, but also cyclin D1 and Sp1 was the consequence of their ubiquitination by the Skp-cullin-F box (SCF) E3 ubiquitin ligase, β -TrCP. Like TGZ, Δ 2-TGZ was shown to upregulate β -TrCP through mRNA stabilization in prostate cancer cells [59]. Interestingly, no change in β -catenin levels was observed in normal prostate epithelial cells [59]. Interestingly, when incubated at 100 μ M with human non-malignant hepatocytes in primary culture, Δ 2-TGZ was less toxic than TGZ for hepatocytes (63 % versus 52% of viable cells) [67].

5. MORE ACTIVE AND LESS HEPATOTOXIC Δ 2-TGZ DERIVATIVES

Since anticancer effects of TGZ appeared to be mainly PPAR γ -independent and since Δ 2-TGZ exhibited less toxic-

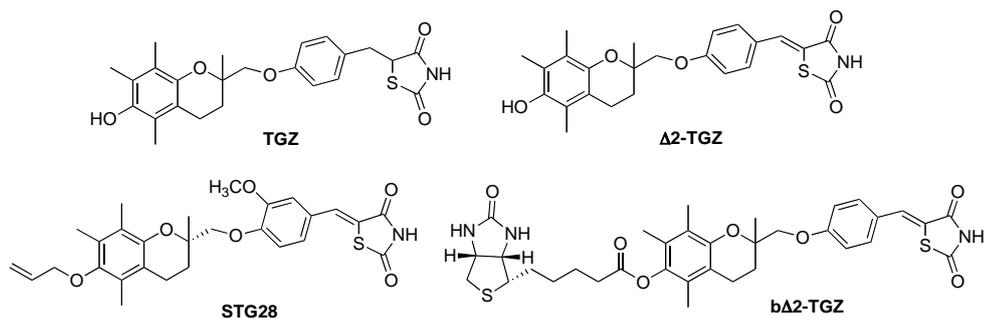


Fig. (3). TGZ and three unsaturated derivatives: Δ2-TGZ, biotinylated Δ2-TGZ and STG28.

ity towards hepatocytes than TGZ, it was then challenging to develop Δ2-TGZ derivatives exhibiting high anticancer properties but devoid of hepatotoxicity, taking advantage of our knowledge about the mechanisms involved in TGZ toxicity.

Huang *et al.* used Δ2-TGZ as a template to increase its potency as an anticancer agent [68]. Special efforts were made in order to slightly change its structure with the aim of increasing its cyclin D1 degradation ability in MCF-7 breast cancer cells. They functionalized the chromane heterocycle at the 6-hydroxy position with various substituents, yielding a series of ethers. The most potent compound bore an allyl group. Additional methoxy moiety on the central phenyl group and a (*S*) stereochemistry of the chiral center of the chromane heterocycle gave STG28 which exhibited the best potency (Fig. 3). These authors did not study the hepatotoxicity of these compounds.

Colin *et al.* [65] also functionalized the chromane at the same position, but via an ester linkage. Biotinylation of the molecule (Fig. 3) highly increased both its antiproliferative activity and its cyclin D1 ablative ability both in hormone-dependent MCF-7 and in hormone-independent MDA-MB-231 cell lines. However, the biotin group was not responsible for this phenomenon, since competition experiments with free biotin did not alter the potency of the molecule. Furthermore, related compounds devoid of the biotin group exhibited the same potency.

In an extension of this work, Salamone *et al.* [67] compared the antiproliferative activity of TGZ and Δ2-TGZ derivatives on both aforementioned breast cancer cell lines. This enabled them to check the influence of both the insaturation adjacent to the TZD ring and of the nature of the substituents linked to the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chromane heterocycle. The presence of the double bond (Δ2-TGZ series) slightly but significantly increased the anticancer potency of all the compounds. TGZ and Δ2-TGZ derivatives were also incubated with human non-malignant hepatocytes in primary culture. At 100 μM, all the Δ2-TGZ derivatives (unsaturated compounds) were associated with higher cell viability than the TGZ derivatives (saturated compounds). The rationale for this phenomenon is under investigation. Besides, this study overall showed that non-polar substituents at the 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chromane position greatly enhanced the antiproliferative activity of the compounds, whereas polar moieties totally abolished the activity. For example, the compound bearing the unpolar tertio-

loxy carbonyl moiety (Boc-Δ2-TGZ, Fig. 4) exhibited a lower IC₅₀ than Δ2-TGZ ($3.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$, versus $16.6 \pm 1.0 \mu\text{M}$ MDA-MB-231). Polar groups were tolerated if they were distant from the chromane heterocycle thanks to a non-polar linker. Interestingly, the decrease of polarity caused by the simple replacement of the 6-hydroxyl group by a hydrogen atom also increased the anticancer potency of the molecule compared to Δ2-TGZ (IC₅₀ = $10.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$, MDA-MB231 cells Fig. 4). Due to the absence of the oxygen atom in para-position to the remaining intracyclic oxygen, this derivative was expected to be non-metabolizable into a quinone-type derivative. As a result, this compound was associated with the lowest hepatocyte toxicity of the series (84% of viable cells at 100 μM). Thus, this desoxy-Δ2-TGZ compound was much attractive.

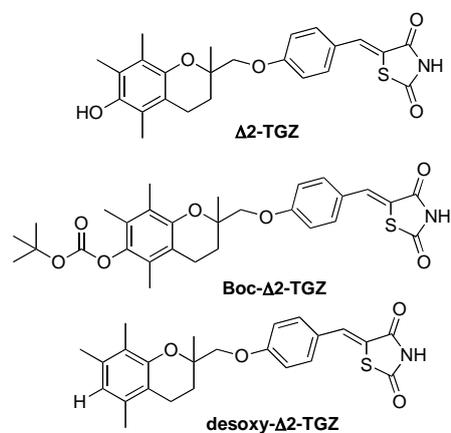


Fig. (4). Δ2-TGZ derivatives [67].

The same team further explored the possibility to simultaneously remove the chromane 6-hydroxyl group and link this heterocycle to a non-polar linker through a stable C-C bond [69]. Meanwhile, *N*-alkylation of the TZD ring was also conducted. This yielded two very active molecules (IC₅₀ up to $1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ against MDA-MB-231, compared to $15.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ for TGZ) which displayed very low toxicity towards non-malignant human hepatocytes (viability $\geq 80\%$ at 200 μM versus 30% for TGZ). Since these compounds (Fig. 5) also exhibited a low acute toxicity on a rodent model (maximum tolerated dose up to 65.5 mg/kg), they were selected for further *in vivo* evaluation and a patent was deposited [70]. *In vivo* studies are ongoing to check their antitumor activity and their stability, hoping for an increased stability compared to TGZ.

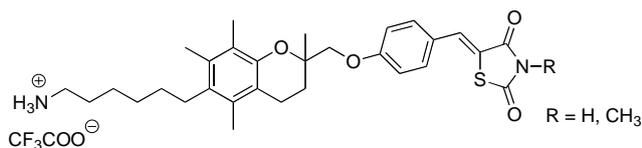


Fig. (5). Molecules prepared by Bordessa *et al.* with attractive activity/toxicity profile [69].

Surprisingly, the simple *N*-methylation of $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 6) gave a compound with no activity on MCF-7 while keeping a fair activity on MDA-MB-231 cell line. This was the only compound of the series showing such selectivity. Additionally, this compound exhibited no toxicity on human non-malignant hepatocyte in primary culture, showing unexpectedly a slight increase of cell number: viability = 127% at 200 μ M. One could rationalize this fact as follows. As depicted in Fig. (2), the metabolization of the TZD involves the formation of a reactive isocyanate, which needs the abstraction of a labile proton on the TZD nitrogen. The *N*-methylation of the TZD ring prevents the formation of the isocyanate, and thus prevents the metabolization of the TZD. These considerations should be confirmed by *in vivo* studies in order to determine the metabolites of such *N*-alkylated TZD derivatives.

Saha *et al.* [33] previously used another strategy to decrease the metabolization of the TZD heterocycle. In order to get a PPAR γ agonist similar to TGZ but with a lower hepatotoxicity, they replaced the sulfur atom of TZD by a methylene moiety, giving trosuccinimide (TSN, Fig. 6). Since the initial stage of the TZD metabolization lies in the sulfur atom oxidation, TSN was expected to be less metabolized. TGZ and TSN were incubated with human liver microsomes enriched with glutathione and with THLE-2 human hepatocytes. As a result, only TGZ afforded detectable GSH conjugates. Yet, the PPAR γ binding affinity was lower for TSN than for TGZ, but TSN was less toxic in THLE-2 hepatocytes. Similar results were obtained by the same team with RGZ and PGZ derivatives [71]. Such TSN-like derivatives exhibited less hepatotoxicity but were not studied for their anticancer potency. It might be interesting to apply such a structural modification on the previously reported molecules in order to get antiproliferative compounds with even less hepatotoxic property.

Besides, Yang *et al.* [72] showed that a permutational rearrangement of $\Delta 2$ -CGZ, an unsaturated derivative of CGZ, yielded molecules exhibiting promising androgen receptor-ablative and antiproliferative activities on LNCaP prostate

cancer cell line with activities at the low-micromolar range, and a patent was deposited [73]. Among them, OSU-CG12 was particularly interesting (Fig. 7). Further optimization of this molecule gave compounds for which the abilities to suppress the viability of LNCaP cells paralleled their respective inhibitory activities on glucose uptake [74]. They were shown to be inhibitors of glucose transporter GLUT1 and low-micromolar antiproliferative activity was associated with no toxicity towards prostate and mammary epithelial cells at 10 μ M. Bordessa *et al.* [69] took into account this structural approach and synthesized a $\Delta 2$ -TGZ derivative where the chromane heterocycle was directly linked to the nitrogen atom of the TZD (Fig. 7). One of the resulting compounds was very active and showed no toxicity towards human non-malignant hepatocyte in primary culture, even at 200 μ M. Further modifications of the $\Delta 2$ -CGZ template enabled the synthesis of structurally less similar compounds like OSU-53 (Fig. 8) with interesting adenosine monophosphate-activated protein kinase activator property [75, 76]. Meyer *et al.* [77] also prepared new molecules with interesting activity/toxicity profile. Some exhibited a biphenyle core linked to the $\Delta 2$ -TGZ template, but most of them showed a low chemical similarity with the TGZ structure (Fig. 8). Overall, the TZD heterocycle and particularly the benzilidenethiazolidine-2,4-dione template gave access to numerous compounds with anti-cancer properties which were recently reviewed [48].

CONCLUSION

This review clearly illustrates some aspects of drug re-profiling. Indeed, we show that TGZ could be reprofiled to evolve from a drug that was used for the treatment of type II diabetes, towards an anticancer agent. This is very interesting since the existence of unresponsive tumors and the appearance of resistant tumors during the course of treatments both justify that we increase urgently the panel of pharmacological molecules able to fight cancer. Part of the knowledge available for TGZ, mainly the molecular basis for PPAR γ activation, its metabolization pathways and the side effects on hepatocytes, were taken into account to elaborate new candidates. We should focus on unsaturated derivatives since, when compared to TGZ, they do not activate PPAR γ , they exhibit a higher efficiency on cancer cells and a lower toxicity towards hepatocytes.

Several studies have been performed with $\Delta 2$ -TGZ and STG28 to understand their mechanism of action. Like TGZ, these compounds induced apoptosis in different cancer cell lines [12, 78]. The authors searched for the reason leading to

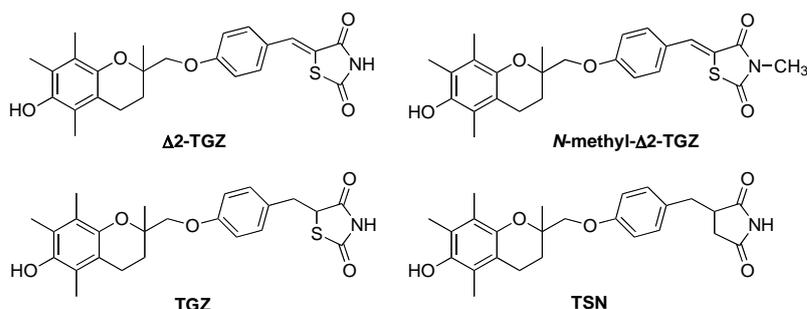


Fig. (6). *N*-methyl- $\Delta 2$ -TGZ derivative and TGZ derivative trosuccinimide (TSN).

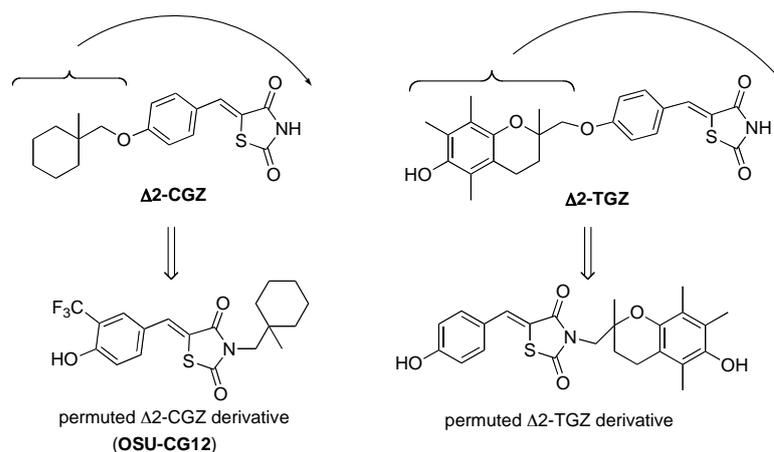


Fig. (7). Permutation strategy from $\Delta 2$ -CGZ and $\Delta 2$ -TGZ [69, 72]

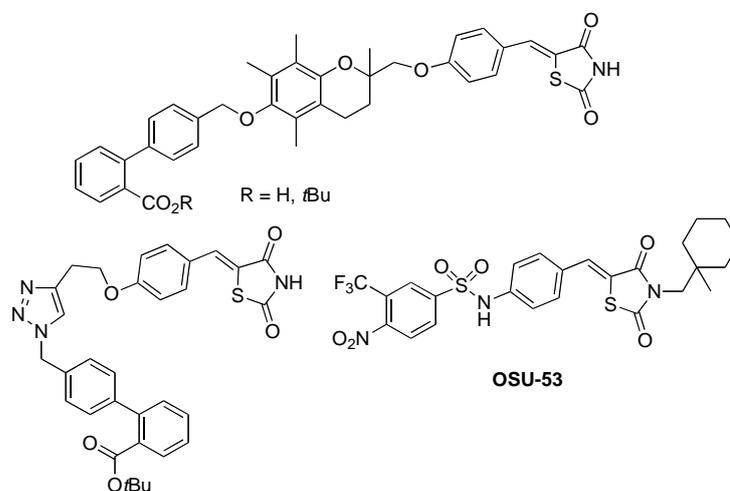


Fig. (8). Other molecules with anti-cancer properties [75, 77].

this apoptotic mechanism. It was reported that TGZ and its unsaturated derivatives induced endoplasmic reticulum (ER) stress which could lead, when being prolonged, to apoptotic cell death [79]. In various cancer cell lines, in tumors collected from animal models, and from patients with liposarcoma, exposure to TGZ led to the phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) on Ser⁵¹, a negative regulator of protein translation involved in ER stress response [24]. This was probably the result of an effect of TGZ on calcium homeostasis. Indeed, TGZ induced a release of calcium from intracellular stores only in cell lines whose proliferation was affected by this compound [24]. In breast cancer cells, intracellular calcium release and ER stress were also described in response to TGZ and $\Delta 2$ -TGZ treatment [78, 80]. Nevertheless, up to now, the authors could not demonstrate a direct link between TGZ-derivatives induced ER stress and apoptosis [78]. At the mitochondrial level, TGZ and $\Delta 2$ -TGZ induced changes associated with apoptosis, such as alteration of the mitochondrial membrane potential in breast cancer cell lines and release of cytochrome c in prostate cancer cells [12, 78]. In case of mitochondria dysfunction, energetic metabolism could be dysregulated and this could be a potential reason for subsequent apoptosis [81]. A recent study reports that in human T47D breast and

HCT116 colon cancer cells, TGZ stimulated cancer cell ¹⁸F-FDG uptake through a shift of metabolism toward glycolytic flux, likely as an adaptive response to impaired mitochondrial oxidative respiration [82]. In various cancer cell lines, TGZ also sensitized cells to TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-induced apoptosis [83-85]. Our knowledge is very poor about the mechanism of action of the recently synthesized $\Delta 2$ -TGZ derivatives that are more active and less hepatotoxic. Ongoing studies are being focused on identifying their molecular target(s) in cancer cells.

Since TGZ is not in active use in a patient population for anticancer indication, and since unsaturated derivatives are envisioned for this therapeutic usage, a development cycle and clinical trials will be required. Since this will come from a drug reprofiling strategy, it will be less time and money consuming than the complete development of a new anticancer drug.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of the results cited in this review was performed at Université de Lorraine in CRAN and SRSMC labs. They were supported by grants of the Université de Lorraine, the Conseil Régional de Lorraine, and La Ligue contre le Cancer. Audrey Berthe and Marine Geoffroy were recipient of a PhD grant of the “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche”.

REFERENCES

- [1] Ashburn, T. T.; Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, *3*, 673-83.
- [2] Langedijk, J.; Mantel-Teeuwisse, A. K.; Slijkerman, D. S.; Schutjens, M. H. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov. Today*, **2015**, doi: 10.1016/j.drudis.2015.05.001.
- [3] Shim, J. S.; Liu, J. O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *Int. J. Biol. Sci.*, **2014**, *10*(7), 654-63.
- [4] Lecomte, J.; Flamant, S.; Salamone, S.; Boisbrun, M.; Mazerbourg, S.; Chapleur, Y.; Grillier-Vuissoz, I. Disruption of ERalpha signaling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2008**, *112*, 437-51.
- [5] Fujita, T.; Sugiyama, Y.; Taketom, S.; Shoda, T.; Kawamatsu, Y.; Iwatsuka, H.; Suzuoki, Z. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 3-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3870, U63287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes*, **1983**, *32*(9), 804-810.
- [6] Day, C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med.*, **1999**, *16*(3), 179-192.
- [7] Chojkier, M. Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology*, **2005**, *41*, 237-46.
- [8] Gale, E. A. Troglitazone: the lesson that nobody learned? *Diabetologia*, **2006**, *49*, 1-6.
- [9] Chen, L.; Bush, C. R.; Necela, B. M.; Su, W.; Yanagisawa, M.; Anastasiadis, P. Z.; Fields, A. P.; Thompson, E. A. RS5444, a novel PPARgamma agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2006**, *251*(1-2), 17-32.
- [10] Smith, M. T. Mechanisms of Troglitazone Hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, *16*, 679-687.
- [11] Yokoi, T. Troglitazone. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2010**, *196*, 419-35.
- [12] Shiau, C. W.; Yang, C. C.; Kulp, S. K.; Chen, K. F.; Chen, C. S.; Huang, J. W. Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 1561-9.
- [13] Tirmenstein, M. A.; Hu, C. X.; Gales, T. L.; Maleeff, B. E.; Narayanan, P. K.; Kurali, E.; Hart, T. K.; Thomas, H. C.; Schwartz, L. W. Effects of troglitazone on HepG2 viability and mitochondrial function. *Toxicol. Sci.*, **2002**, *69*, 131-8.
- [14] Narayanan, P. K.; Hart, T.; Elcock, F.; Zhang, C.; Hahn, L.; McFarland, D.; Schwartz, L.; Morgan, D. G.; Bugelski, P. Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment. *Cytometry Part A*, **2003**, *52*(1), 28-35.
- [15] Bova, M. P.; Tam, D.; McMahon, G.; Mattson, M. N. Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells. *Toxicol. Lett.*, **2005**, *155*(1), 41-50.
- [16] Lim, P. L.; Liu, J.; Go, M. L.; Boelsterli, U. A. The mitochondrial superoxide/thioredoxin-2/Ask1 signaling pathway is critically involved in troglitazone-induced cell injury to human hepatocytes. *Toxicol. Sci.*, **2008**, *101*, 341-9.
- [17] Rachek, L. I.; Yuzefovych, L. V.; Ledoux, S. P.; Julie, N. L.; Wilson, G. L. Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2009**, *240*(3), 348-54.
- [18] Okuda, T.; Norioka, M.; Shitara, Y.; Horie, T. Multiple mechanisms underlying troglitazone-induced mitochondrial permeability transition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010**, *248*, 242-248.
- [19] Hu, D.; Wu, C.-q.; Li, Z.-j.; Liu, Y.; Fan, X.; Wang, Q.-j.; Ding, R.-g. Characterizing the mechanism of thiazolidinedione-induced hepatotoxicity: An *in vitro* model in mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2015**, *284*, 134-141.
- [20] Lee, Y. H.; Goh, W. W.; Ng, C. K.; Raida, M.; Wong, L.; Lin, Q.; Boelsterli, U. A.; Chung, M. C. Integrative toxicoproteomics implicates impaired mitochondrial glutathione import as an off-target effect of troglitazone. *J. Proteome Res.*, **2013**, *12*(6), 2933-45.
- [21] Yu, J.; Qiao, L.; Zimmermann, L.; Ebert, M. P.; Zhang, H.; Lin, W.; Röcken, C.; Malfertheiner, P.; Farrell, G. C. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*, **2006**, *43*, 134-43.
- [22] Kubota, T.; Koshizuka, K.; Williamson, E. A.; Asou, H.; Said, J. W.; Holden, S.; Miyoshi, I.; Koeffler, H. P. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 3344-52.
- [23] Elstner, E.; Muller, C.; Koshizuka, K.; Williamson, E. A.; Park, D.; Asou, H.; Shintaku, P.; Said, J. W.; Heber, D.; Koeffler, H. P. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BNX mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, *95*, 8806-11.
- [24] Aktas, B. H.; Qiao, Y.; Ozdelen, E.; sra; Schubert, R.; Sevinc, S.; Harbinski, F.; Grubissich, L.; Singer, S.; Halperin, J. A. Small-molecule targeting of translation initiation for cancer therapy. *Oncotarget*, **2013**, *4*, 1606.
- [25] Qiao, L.; Dai, Y.; Gu, Q.; Chan, K. W.; Zou, B.; Ma, J.; Wang, J.; Lan, H. Y.; Wong, B. C. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis synergistically enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition in colon cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, *7*, 2203-11.
- [26] Sarraf, P.; Mueller, E.; Jones, D.; King, F. J.; DeAngelo, D. J.; Partridge, J. B.; Holden, S. A.; Chen, L. B.; Singer, S.; Fletcher, C.; Spiegelman, B. M. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.*, **1998**, *4*, 1046-52.
- [27] Ohta, K.; Endo, T.; Haraguchi, K.; Hershman, J. M.; Onaya, T. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2001**, *86*, 2170-7.
- [28] Honma, W.; Shimada, M.; Sasano, H.; Ozawa, M.; Miyata, M.; Nagata, K.; Ikeda, T.; Yamazoe, Y. Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab. Dispos.*, **2002**, *30*, 944-949.
- [29] Loi, C.-M.; Young, M.; Randinitis, E.; Vassos, A.; Koup, J. R. Clinical Pharmacokinetics of Troglitazone. *Clin. Pharmacokinet.*, **1999**, *37*, 91-104.
- [30] Yoshigae, Y.; Konno, K.; Takasaki, W.; Ikeda, T. Characterization of UDP-glucuronosyltransferases (UGTS) involved in the metabolism of troglitazone in rats and humans. *J. Toxicol. Sci.*, **2000**, *25*(5), 433-41.
- [31] Funk, C.; Pantze, M.; Jehle, L.; Ponelle, C.; Scheuermann, G.; Lazendic, M.; Gasser, R. Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology*, **2001**, *167*, 83-98.
- [32] Funk, C.; Ponelle, C.; Scheuermann, G.; Pantze, M. Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: *in vivo* and *in vitro* interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *59*(3), 627-35.
- [33] Saha, S.; New, L. S.; n; Ho, H. K.; Chui, W. K.; Chan, E. C. Y. Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.*, **2010**, *192*, 141-149.
- [34] Okada, R.; Maeda, K.; Nishiyama, T.; Aoyama, S.; Tozuka, Z.; Hiratsuka, A.; Ikeda, T.; Kusuhara, H.; Sugiyama, Y. Involvement of different human glutathione transferase isoforms in the glutathione conjugation of reactive metabolites of troglitazone. *Drug Metab. Dispos.*, **2011**, *39*(12), 2290-7.

- [35] Yamamoto, Y.; Nakajima, M.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. *Life Sci.*, **2001**, *70*, 471-482.
- [36] Kassahun, K.; Pearson, P. G.; Tang, W.; McIntosh, I.; Leung, K.; Elmore, C.; Dean, D.; Wang, R.; Doss, G.; Baillie, T. A. Studies on the Metabolism of Troglitazone to Reactive Intermediates *in Vitro* and *in Vivo*. Evidence for Novel Biotransformation Pathways Involving Quinone Methide Formation and Thiazolidinedione Ring Scission. *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, *14*, 62-70.
- [37] He, K.; Talaat, R. E.; Pool, W. F.; Reily, M. D.; Reed, J. E.; Bridges, A. J.; Woolf, T. F. Metabolic activation of troglitazone: identification of a reactive metabolite and mechanisms involved. *Drug Metab. Disposition*, **2004**, *32*, 639-646.
- [38] Prabhu, S.; Fackett, A.; Lloyd, S.; McClellan, H. A.; Terrell, C. M.; Silber, P. M.; Li, A. P. Identification of glutathione conjugates of troglitazone in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, **2002**, *142*(1-2), 83-97.
- [39] Alvarez-Sanchez, R.; Montavon, F.; Hartung, T.; Pahler, A. Thiazolidinedione bioactivation: a comparison of the bioactivation potentials of troglitazone, rosiglitazone, and pioglitazone using stable isotope-labeled analogues and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**, *19*(8), 1106-16.
- [40] Tahara, K.; Yano, Y.; Kanagawa, K.; Abe, Y.; Yamada, J.; Iijima, S.; Mochizuki, M.; Nishikawa, T. Successful preparation of metabolite of troglitazone by in-flow electrochemical reaction on coulometric electrode. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2007**, *55*(8), 1207-12.
- [41] Étienne, S.; Matt, M.; Oster, Thierry; Samadi, M.; Beley, M. Preparation and characterisation of a quinone-functionalised polythiophene film on a modified electrode. Application to the potentiometric determination of glutathione and cysteine concentrations. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 9619-9624.
- [42] Tahara, K.; Nishikawa, T.; Hattori, Y.; Iijima, S.; Kouno, Y.; Abe, Y. Production of a reactive metabolite of troglitazone by electrochemical oxidation performed in nonaqueous medium. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2009**, *50*, 1030-1036.
- [43] Dixit, V. A.; Bharatam, P. V. Toxic metabolite formation from Troglitazone (TGZ): new insights from a DFT study. *Chem. Res. Toxicol.*, **2011**, *24*(7), 1113-22.
- [44] Ramachandran, V.; Kostrubsky, V. E.; Komoroski, B. J.; Zhang, S.; Dorko, K.; Esplen, J. E.; Strom, S. C.; Venkataraman, R. Troglitazone Increases Cytochrome P-450 3A Protein and Activity in Primary Cultures of Human Hepatocytes. *Drug Metab. Disposition*, **1999**, *27*, 1194-1199.
- [45] Sahi, J.; Hamilton, G.; Sinz, M.; Barros, S.; Huang, S. M.; Lesko, L. J.; LeCluyse, E. L. Effect of troglitazone on cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Xenobiotica*, **2000**, *30*(3), 273-84.
- [46] Watanabe, I.; Tomita, A.; Shimizu, M.; Sugawara, M.; Yasuno, H.; Koishi, R.; Takahashi, T.; Miyoshi, K.; Nakamura, K.; Izumi, T.; Matsushita, Y.; Furukawa, H.; Haruyama, H.; Koga, T. A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2003**, *73*(5), 435-55.
- [47] Usui, T.; Hashizume, T.; Katsumata, T.; Yokoi, T.; Komuro, S. *In Vitro* Investigation of the Glutathione Transferase M1 and T1 Null Genotypes as Risk Factors for Troglitazone-Induced Liver Injury. *Drug Metab. Disposition*, **2011**, *39*, 1303-1310.
- [48] Asati, V.; Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *87*, 814-33.
- [49] Joshi, H.; Pal, T.; Ramaa, C. S. A new dawn for the use of thiazolidinediones in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, **2014**, *23*(4), 501-10.
- [50] Frohlich, E.; Wahl, R. Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. *Biomed Res Int*, **2015**, *2015*, 845340.
- [51] Mueller, E.; Sarraf, P.; Tontonoz, P.; Evans, R. M.; Martin, K. J.; Zhang, M.; Fletcher, C.; Singer, S.; Spiegelman, B. M. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol. Cell*, **1998**, *1*(3), 465-70.
- [52] Demetri, G. D.; Fletcher, C. D.; Mueller, E.; Sarraf, P.; Naujoks, R.; Campbell, N.; Spiegelman, B. M.; Singer, S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*(7), 3951-6.
- [53] Mueller, E.; Smith, M.; Sarraf, P.; Kroll, T.; Aiyer, A.; Kaufman, D. S.; Oh, W.; Demetri, G.; Figg, W. D.; Zhou, X. P.; Eng, C.; Spiegelman, B. M.; Kantoff, P. W. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, *97*, 10990-5.
- [54] Burstein, H. J.; Demetri, G. D.; Mueller, E.; Sarraf, P.; Spiegelman, B. M.; Winer, E. P. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2003**, *79*, 391-7.
- [55] Kulke, M. H.; Demetri, G. D.; Sharpless, N. E.; Ryan, D. P.; Shivdasani, R.; Clark, J. S.; Spiegelman, B. M.; Kim, H.; Mayer, R. J.; Fuchs, C. S. A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J.*, **2002**, *8*(5), 395-9.
- [56] Rashid-Kolvear, F.; Taboski, M. A.; Nguyen, J.; Wang, D. Y.; Harrington, L. A.; Done, S. J. Troglitazone suppresses telomerase activity independently of PPARgamma in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, **2010**, *10*, 390.
- [57] Akinyeke, T. O.; Stewart, L. V. Troglitazone suppresses c-Myc levels in human prostate cancer cells via a PPARgamma-independent mechanism. *Cancer Biol. Ther.*, **2011**, *11*(12), 1046-58.
- [58] Huang, J. W.; Shiau, C. W.; Yang, Y. T.; Kulp, S. K.; Chen, K. F.; Brueggemeier, R. W.; Shapiro, C. L.; Chen, C. S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *67*, 1342-8.
- [59] Wei, S.; Lin, L. F.; Yang, C. C.; Wang, Y. C.; Chang, G. D.; Chen, H.; Chen, C. S. Thiazolidinediones modulate the expression of beta-catenin and other cell-cycle regulatory proteins by targeting the F-box proteins of Skp1-Cull1-F-box protein E3 ubiquitin ligase independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Pharmacol.*, **2007**, *72*, 725-33.
- [60] Yang, Z.; Bagheri-Yarmand, R.; Balasenthil, S.; Hortobagyi, G.; Sahin, A. A.; Barnes, C. J.; Kumar, R. HER2 regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and sensitivity of breast cancer cells to PPARgamma ligand therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*(8), 3198-203.
- [61] Hamaguchi, N.; Hamada, H.; Miyoshi, S.; Irifune, K.; Ito, R.; Miyazaki, T.; Higaki, J. *In vitro* and *in vivo* therapeutic efficacy of the PPAR-gamma agonist troglitazone in combination with cisplatin against malignant pleural mesothelioma cell growth. *Cancer Sci*, **2010**, *101*(9), 1955-64.
- [62] Reddy, R. C.; Srirangam, A.; Reddy, K.; Chen, J.; Gangireddy, S.; Kalemkerian, G. P.; Standiford, T. J.; Keshamouni, V. G. Chemotherapeutic drugs induce PPAR-gamma expression and show sequence-specific synergy with PPAR-gamma ligands in inhibition of non-small cell lung cancer. *Neoplasia*, **2008**, *10*(6), 597-603.
- [63] Yu, H. N.; Noh, E. M.; Lee, Y. R.; Roh, S. G.; Song, E. K.; Han, M. K.; Lee, Y. C.; Shim, I. K.; Lee, S. J.; Jung, S. H.; Kim, J. S.; Youn, H. J. Troglitazone enhances tamoxifen-induced growth inhibitory activity of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, *377*(1), 242-7.
- [64] An, Z.; Liu, X.; Song, H.; Choi, C.; Kim, W. D.; Yu, J. R.; Park, W. Y. Effect of troglitazone on radiation sensitivity in cervix cancer cells. *Radiat Oncol J*, **2012**, *30*(2), 78-87.
- [65] Colin, C.; Salamone, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Boisbrun, M.; Kuntz, S.; Lecomte, J.; Chapleur, Y.; Flament, S. New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2010**, *124*, 101-10.
- [66] Qin, C.; Burghardt, R.; Smith, R.; Wormke, M.; Stewart, J.; Safe, S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, **2003**, *63*(5), 958-64.
- [67] Salamone, S.; Colin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Flament, S.; Martin, H.; Richert, L.; Chapleur, Y.; ves; Boisbrun, M. Synthesis of new troglitazone derivatives: Antiproliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *51*, 206-215.
- [68] Huang, J.-W.; Shiau, C.-W.; Yang, J.; Wang, D.-S.; Chiu, H.-C.; Chen, C.-Y.; Chen, C.-S. Development of Small-Molecule Cyclin D1-Ablative Agents. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 4684-4689.

- [69] Bordessa, A.; Colin-Cassin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Husson, G.; Vo, M.; Flament, S.; Martin, H.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: Towards more active and less toxic compounds. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *83*, 129-140.
- [70] Boisbrun, M.; Chapleur, Y.; Bordessa, A.; Flament, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S. Thiazolidinediones derivatives, preparation thereof and use thereof in cancer treatment. Patent WO2013110796 (A1), August 1, 2013.
- [71] Saha, S.; Chan, D. S. Z.; Lee, C. Y.; Wong, W.; New, L. S.; Chui, W. K.; Yap, C. W.; Chan, E. C. Y.; Ho, H. K. Pyrrolidinediones reduce the toxicity of thiazolidinediones and modify their anti-diabetic and anti-cancer properties. *Eur. J. Pharmacol.*, **2012**, *697*, 13-23.
- [72] Yang, J.; Wei, S.; Wang, D. S.; Wang, Y. C.; Kulp, S. K.; Chen, C. S. Pharmacological exploitation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ciglitazone to develop a novel class of androgen receptor-ablative agents. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*(7), 2100-7.
- [73] Chen, C. S.; Wang, D.; Wang, J. Androgen receptor-ablative agents. Patent WO 2009105621 A1, August 27, 2009.
- [74] Wang, D.; Chu, P.-C.; Yang, C.-N.; Yan, R.; Chuang, Y.-C.; Kulp, S. K.; Chen, C.-S. Development of a Novel Class of Glucose Transporter Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 3827-3836.
- [75] Guh, J. H.; Chang, W. L.; Yang, J.; Lee, S. L.; Wei, S.; Wang, D.; Kulp, S. K.; Chen, C. S. Development of novel adenosine monophosphate-activated protein kinase activators. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*(6), 2552-61.
- [76] Lee, K. H.; Hsu, E. C.; Guh, J. H.; Yang, H. C.; Wang, D.; Kulp, S. K.; Shapiro, C. L.; Chen, C. S. Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*(45), 39247-58.
- [77] Meyer, M.; Kuntz, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Martin, H.; Richert, L.; Flament, S.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. Synthesis and Anti-Proliferative Activity of New Biphenyle-Benzylidenethiazolidine-2,4-Dione Bis-Adducts Containing Various Heterocyclic Cores. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2014**, *11*(3), 256-264.
- [78] Colin-Cassin, C.; Yao, X.; Cerella, C.; Chbicheb, S.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Boisbrun, M.; Chapleur, Y.; Diederich, M.; Flament, S.; Grillier-Vuissoz, I. PPAR γ -inactive Δ 2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells: PPAR γ -independent effects in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.*, **2015**, *54*, 393-404.
- [79] Chevet, E.; Hetz, C.; Samali, A. Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis. *Cancer Discov.*, **2015**, *5*(6), 586-597.
- [80] Chbicheb, S.; Yao, X.; Rodeau, J.-L.; Salamone, S.; Boisbrun, M.; Thiel, G.; Spohn, D.; Grillier-Vuissoz, I.; Chapleur, Y.; Flament, S.; Mazerbourg, S. EGR1 expression: A calcium and ERK1/2 mediated PPAR γ -independent event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, **2011**, *81*, 1087-1097.
- [81] Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Boisbrun, M.; Cerella, C.; Diederich, M.; Grillier-Vuissoz, I.; Flament, S. Energy restriction mimetic agents to target cancer cells: comparison between 2-deoxyglucose and thiazolidinediones. *Biochem. Pharmacol.*, **2015**, *92*(1), 102-11.
- [82] Moon, S. H.; Lee, S. J.; Jung, K. H.; Quach, C. H.; Park, J. W.; Lee, J. H.; Cho, Y. S.; Lee, K. H. Troglitazone Stimulates Cancer Cell 18F-FDG uptake by Suppressing Mitochondrial Respiration and Augments Sensitivity to Glucose Restriction. *J. Nucl. Med.*, **2015**.
- [83] Plissonnier, M. L.; Fauconnet, S.; Bittard, H.; Lascombe, I. Insights on distinct pathways of thiazolidinediones (PPAR γ ligand)-promoted apoptosis in TRAIL-sensitive or -resistant malignant urothelial cells. *Int. J. Cancer*, **2010**, *127*(8), 1769-84.
- [84] Zou, W.; Liu, X.; Yue, P.; Khuri, F. R.; Sun, S. Y. PPAR γ ligands enhance TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and c-FLIP downregulation in human lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, **2007**, *6*, 99-106.
- [85] Lu, M.; Kwan, T.; Yu, C.; Chen, F.; Freedman, B.; Schafer, J. M.; Lee, E. J.; Jameson, J. L.; Jordan, V. C.; Cryns, V. L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists promote TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*(8), 6742-51.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

En cancérologie, un des enjeux majeurs est de développer de nouvelles thérapies pour les tumeurs réfractaires aux traitements conventionnels. Dans ce contexte, le laboratoire s'intéresse aux dérivés de la TGZ qui montrent des effets anticancéreux prometteurs sur les tumeurs mammaires. Au sein du laboratoire, nous avons développé de nombreux dérivés de TGZ en collaboration avec une équipe de chimiste de l'UMR 7565 CNRS UL (Dr. Michel Boisbrun, équipe MoBAT). Ces composés, dont la **Δ 2-TGZ et l'AB186**, ont montré une activité antiproliférative accrue sur les cellules cancéreuses mammaires et une toxicité moindre sur des hépatocytes comparé au composé parent, la TGZ (Salamone *et al.*, 2012 ; Bordessa *et al.*, 2014). Nous avons montré que la Δ 2-TGZ induit un stress du réticulum endoplasmique et une entrée en **apoptose** des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Colin-Cassin *et al.*, 2015). Dans le but de comprendre le mécanisme d'action de la Δ 2-TGZ, une analyse par puce à ADN réalisée sur des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 a montré que le gène le plus exprimé après 12 heures de traitement est celui d'une protéine des jonctions serrées, la **claudine 1**. A partir de cette piste intéressante, nous sommes partis de l'hypothèse que **la claudine 1 pourrait jouer un rôle crucial dans les effets anticancéreux de nos composés**. Pour cela, nous avons travaillé sur trois lignées cancéreuses mammaires qui expriment peu la claudine 1 : les cellules MCF-7 de sous-type « luminal A » et les cellules MDA-MB-231 et Hs578T de sous-type « triple-négatif ».

La première partie de ma thèse a consisté à **déterminer l'implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la Δ 2-TGZ dans les cellules « triple-négatives » « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T**. Ce travail a donné lieu à une publication acceptée (Geoffroy *et al.*, 2017).

La deuxième partie de ma thèse a porté sur l'étude **des mécanismes d'action de la Δ 2-TGZ et l'AB186 à des temps précoces dans les cellules « claudin 1-low » MCF-7, MDA-MB-231 et Hs578T**. Nous avons déterminé si la claudine 1 pouvait être impliquée dans les modifications précoces induites par la Δ 2-TGZ et l'AB186, avant l'induction de l'apoptose qui est un mécanisme plus tardif. La préparation d'une publication est en cours sur l'ensemble de ce travail.

La troisième partie de ma thèse a consisté à **évaluer si la claudine 1 sensibilise les cellules « triple-négatives » « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T aux agents de**

chimiothérapie. Nos travaux précédents montrent que la surexpression de la claudine 1 peut sensibiliser les cellules MDA-MB-231 à la $\Delta 2$ -TGZ (Geoffroy *et al.*, 2017). Ces données suggèrent que la claudine 1 pourrait être un marqueur prédictif de sensibilité à différents agents de chimiothérapie. Nos études préliminaires ont montré que la ré-expression de la claudine 1 permet d'induire la réponse apoptotique des cellules MDA-MB-231 résistantes à l'agent de chimiothérapie, le 5-FU.

MATERIELS ET METHODES

I.	Culture cellulaire	90
	1. Lignées cellulaires.....	90
	2. Entretien des cellules.....	91
	3. Traitement des cellules.....	91
	4. Transfection transitoire.....	92
	5. Etablissement de lignées stables.....	93
	6. Culture tridimensionnelle.....	94
II.	Analyse des transcrits	95
	1. Extraction d'ARN.....	95
	2. Transcription inverse.....	96
	3. PCR quantitative.....	96
III.	Analyse protéique	96
	1. Extraction protéique.....	96
	2. Western blot.....	97
	3. Immunofluorescence.....	98
	4. Fractionnement sub-cellulaire.....	98
IV.	Analyse de la réponse apoptotique	99
	1. Par luminescence.....	99
	2. Par immunofluorescence.....	99
	3. Par cytométrie en flux.....	100
V.	Analyse des propriétés migratrices	100
	1. Par le test de la blessure.....	100
	2. En chambre de Boyden.....	101
VI.	Analyse du cytosquelette d'actine	101
VII.	Analyse de l'agrégation cellulaire	102
VIII.	Analyse de la réponse cytotoxique des composés TZDs en temps réel	102
IX.	Analyses statistiques	103

A.

Lignée cellulaire	Statut ER	Statut PR	Statut HER2	Statut claudine 1	Sous-type moléculaire
MCF-10A	+	+	+	+	Non cancéreuse
MCF-7	+	+	-	-	Luminal A
MDA-MB-231	-	-	-	-	Triple-négative
Hs578T	-	-	-	-	Triple-négative
BT-20	-	-	-	++	Triple-négative

B.

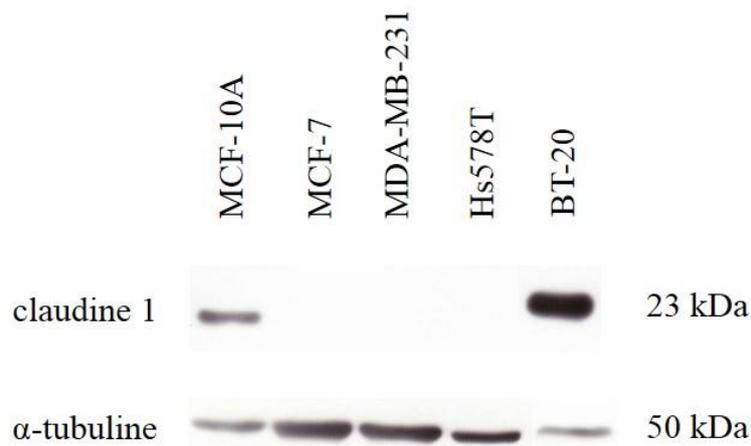


Figure 49 : Caractérisation des lignées mammaires en fonction de leur statut ER α , PR, HER2 et claudine 1. (A) Le statut ER α , PR, HER2, claudine 1 ainsi que le sous-type moléculaire sont référencés dans le tableau ci-contre pour chaque lignée cellulaire. (B) Les taux de protéines claudine 1 et α -tubuline ont été révélés par Western Blot dans la lignée non-tumorale MCF-10A et dans les lignées tumorales mammaires MCF-7, MDA-MB-231, Hs578T et BT-20.

I. Culture cellulaire

1. Lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires utilisées au laboratoire proviennent de l'ATCC (Figure 49A).

La lignée mammaire MCF-10A est une lignée de cellules épithéliales immortalisées et non-tumorales, isolée en 1984 à partir de tissu mammaire fibrokystique d'une femme de 36 ans (Soule *et al.*, 1990). Cette lignée est utilisée en tant que modèle de tissu épithélial mammaire sain.

La lignée cancéreuse mammaire MCF-7 a été établie en 1970 en culture *in vitro* à partir d'un épanchement pleural prélevé chez une patiente de 69 ans atteinte d'un carcinome canalaire infiltrant (Soule *et al.*, 1973). C'est une lignée de cellules épithéliales hormono-dépendante de type « luminal A » qui exprime les récepteurs ER α et PR.

La lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 a été isolée en 1973 à partir d'un épanchement pleural d'une femme de 51 ans atteinte d'un adénocarcinome (Cailleau *et al.*, 1974). Elle est dite « triple-négative » car elle est caractérisée par l'absence d'expression des trois récepteurs ER α , PR et HER2. Cette lignée fibroblastique présente un fort pouvoir métastatique et est de type « claudin-low ».

La lignée cancéreuse mammaire Hs578T a été établie en 1971 à partir de la tumeur primaire d'une femme de 74 ans atteinte d'un carcinosarcome mammaire (Hackett *et al.*, 1977). Elle fait également partie des tumeurs « triple-négatives » de sous-type « claudin-low ».

La lignée cancéreuse mammaire BT-20 a été isolée en 1958 à partir d'une tumeur primaire d'une femme de 74 ans atteinte d'un carcinome mammaire (Lasfargues *et al.*, 1958). Cette lignée est de type « triple-négative » tout comme MDA-MB-231 et Hs578T.

L'expression protéique de la claudine 1 a été révélée en western blot afin de vérifier et comparer l'expression de cette protéine dans toutes les lignées cellulaires utilisées au cours de ma thèse (Figure 49B). La lignée de cellules épithéliales immortalisées et non-tumorales MCF-10A exprime la claudine 1 alors que les lignées cancéreuses mammaires MCF-7, MDA-MB-231 et Hs578T ne l'expriment pas. En revanche, la lignée cancéreuse mammaire BT-20 exprime fortement la claudine 1.

A.

Molécule	Concentration mère	Solvant	Condition de culture	Temps d'incubation
TZDs	50 mM	DMSO	1% SVF	De 2h30 à 48 h
Doxorubicine	2 mg/mL	Eau stérile	10% SVF	72 h
5-FU	250 mM	DMSO	10% SVF	72 h
Paclitaxel	1 mM	Ethanol absolu	10% SVF	72 h
5-azacytidine	500 µM	Eau stérile	10% SVF	6 h et 72h

B.

Lignée cellulaire	TGZ, CGZ, Δ2-TGZ (µM)	AB186 (µM)	Doxorubicine (ng/mL)	5-FU (µM)	Paclitaxel (nM)	5-azacytidine (µM)
MCF-10A	20	4	-	-	-	-
MCF-7	25	5	-	-	-	-
BT-20	-	-	50	50	5	5
MDA-MB-231	20	4	50	50	5	5
Hs578T	20	4	50	50	5	5

Tableau 11 : Condition de traitement des lignées cellulaires avec différentes molécules. (A) La concentration mère, le solvant utilisé, les conditions de culture et les temps d'incubation sont indiqués pour les TZDs, la doxorubicine, le 5-fluorouracile (5-FU), le paclitaxel et la 5-azacytidine. (B) Les doses d'exposition en fonction de la molécule utilisée sont indiquées pour chaque lignée cellulaire.

2. Entretien des cellules

La lignée mammaire saine MCF-10A est cultivée en monocouche dans du milieu DMEM/F12 sans rouge phénol (Life Technologies) supplémenté de 5 % de sérum de cheval (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de pénicilline (Sigma-Aldrich), 100 µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL d'insuline bovine (Sigma-Aldrich), 0,5 µg/mL d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 100 ng/mL de toxine cholérique (Sigma-Aldrich) et 20 ng/mL d'EGFh (Sigma-Aldrich). Les cellules des lignées cancéreuses MCF-7 et Hs578T sont cultivées dans du milieu DMEM avec rouge phénol (Life Technologies) alors que les cellules MDA-MB-231 et BT-20 prolifèrent dans du milieu RPMI 1640 avec rouge phénol (Life Technologies). Leur milieu de culture est supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma-Aldrich) et 2 mM de L-glutamine. Le milieu de culture des cellules Hs578T contiennent en plus 10 µg/mL d'insuline bovine. Toutes les lignées sont placées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Lorsqu'elles atteignent leur confluence, elles sont rincées avec 5 mL de PBS (Life Technologies) et décollées avec 2 mL de trypsine 1X + EDTA 1% (Life Technologies). Les cellules sont réensemencées dans une boîte de culture T₇₅ au tiers (MCF-7), au quart (MDA-MB-231 et Hs578T), au sixième (BT-20) et au dixième (MCF-10A) deux fois par semaine.

3. Traitements des cellules

a. Traitements avec des TZDs

Vingt heures après l'ensemencement, les cellules sont incubées en présence de TGZ (ChemScene), RGZ (Interchim), Δ²-TGZ ou AB186 dans du milieu supplémenté de 1% de SVF. Δ²-TGZ et AB186 sont synthétisés par une équipe de chimistes du laboratoire SRSMC (Salamone *et al.*, 2012 ; Bordessa *et al.*, 2014). Les solutions intermédiaires sont préparées dans de l'éthanol absolu (Sigma-Aldrich) à partir d'une solution mère à 50 mM ([Tableau 11A](#)). Les cellules sont incubées pendant des temps différents et sont exposées à des concentrations différentes en fonction de la lignée cellulaire ([Tableau 11B](#)). Les cellules non traitées servant de témoin sont cultivées dans un milieu contenant le solvant avec lequel la molécule a été reprise, ne dépassant pas 0,1% de DMSO et d'éthanol absolu.

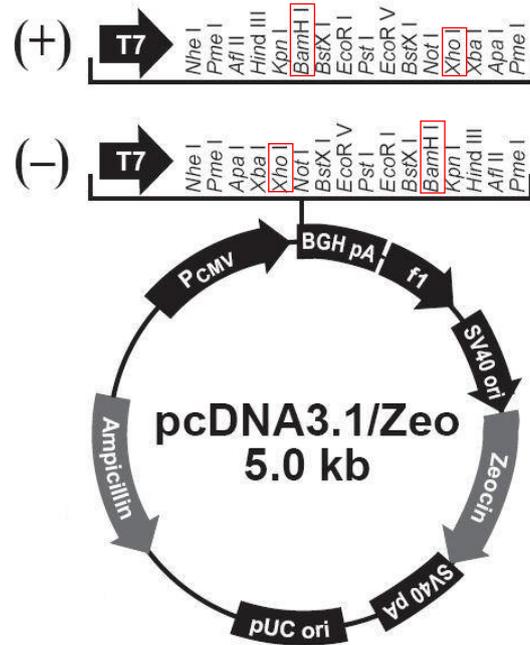


Figure 50: Carte du vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo. Le vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo de 5kb est composé du promoteur fort du cytomégalovirus (P_{CMV}), de multiples sites de clonage (T7), de 3 origines de réplication dont une procaryote (pUC ori), une du phage M13 monobrin (f1) et une du virus SV40 (SV40 ori), de 2 signaux de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH pA) et du virus SV40 (SV40 pA), de 2 cassettes de résistance à l'ampicilline (Ampicillin) et à la zéocine (Zeocin). L'ADNc du gène de la claudine 1 a été cloné au niveau des sites de restriction BamH I et Xho I, encadrés en rouge.

b. Traitements avec des agents de chimiothérapie

Vingt heures après l'ensemencement, les cellules sont incubées en présence de doxorubicine (TEVA), 5-fluorouracile (5-FU) (Sigma-Aldrich) et paclitaxel (Sigma-Aldrich) dans du milieu supplémenté de 10% de SVF pendant 72 heures. Les cellules sont traitées aux doses indiquées dans le [Tableau 11](#). Les cellules non traitées servant de témoin sont cultivées dans un milieu contenant le solvant avec lequel la molécule a été reprise, ne dépassant pas 0,1% de DMSO ou d'éthanol absolu.

c. Traitement avec un agent déméthylant : la 5-azacytidine

Vingt heures après l'ensemencement, les cellules sont incubées en présence de 5-azacytidine (Sigma-Aldrich) dans du milieu supplémenté de 10% de SVF pendant 72 heures. Nous avons également utilisé la 5-azacytidine en tant que pré-traitement d'une durée de 6 heures. Les cellules sont traitées à la dose indiquée dans le [Tableau 11B](#) à partir d'une solution mère à 500 μM ([Tableau 11A](#)).

4. Transfection transitoire

a. Transfection de plasmides

Les cellules MDA-MB-231 (4.10^5 cellules/puits) et Hs578T (16.10^4 cellules/puits) sont ensemencées dans des plaques 6 puits et transfectées le lendemain avec le vecteur pcDNA3.1/Zeo (ThermoFisher Scientific) ([Figure 50](#)) ou le vecteur pcDNA3.1 recombinant contenant l'ADNc humain du gène de la claudine 1 (2,5 μg /puits). Tout d'abord, 7,5 μL de polymère cationique TransIT-LT1 (Mirus Bio), préalablement préchauffé à température ambiante, sont ajoutés à 250 μL de milieu OptiMEM (Gibco). Après une douce homogénéisation, 2,5 μg de vecteur sont incorporés au mélange. La solution finale est homogénéisée doucement par pipetage. Après 15 à 20 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est déposé goutte à goutte dans le puits de culture et incubé pendant 48 heures.

b. Transfection d'ARN interférents

Les cellules MDA-MB-231 (4.10^5 cellules/puits) et Hs578T (16.10^4 cellules/puits) sont ensemencées dans des plaques 6 puits et transfectées le lendemain avec des ARN interférents aléatoires (siGENOME Non-Targeting siRNA Pool, ThermoFisher Scientific) ou spécifiques

Référence	Séquences des ARNi
human claudin-1 (M-017369-01-0005 siGENOME SMARTpool siRNA CLDN1)	5'-GCAAUAGAAUCGUUCAAGA-3' 5'GCAUGAAGUGUAUGAAGU-3' 5'AGAAUUCUAUGACCUAUG-3' 5'ACGAUGAGGUGCAGAAGAU-3'
scrambled duplex ScRNAs (D-001206-14-05, siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #2)	Contrôle négatif avec au moins 4 séquences aléatoires

Tableau 12 : Séquences des ARN interférents spécifiques de la claudine 1. Les références ainsi que les séquences des ARN interférents utilisées sont répertoriées dans ce tableau.

de la claudine 1 (siGENOME SMARTpool siRNA CLDN1, ThermoFisher Scientific). Les séquences spécifiques de la claudine 1 sont indiquées dans le [Tableau 12](#). Tout d'abord, 10 μL de la solution d'ARN interférents à une concentration de 200 nM sont dilués dans 175 μL de milieu OptiMEM. En parallèle, 5 μL d'Oligofectamine (ThermoFisher Scientific) sont ajoutés à 10 μL d'OptiMEM. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les deux préparations sont mélangées doucement et incubées pendant 15 à 20 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, les cellules sont rincées avec du milieu de culture sans SVF. Enfin, 200 μL du mélange sont ajoutés goutte à goutte dans le puits avec 800 μL de milieu sans SVF. Après 4 heures d'incubation à 37°C, la transfection est arrêtée en ajoutant 500 μL de milieu supplémenté de 30% de SVF.

5. Etablissement de lignées stables

a. Détermination des conditions de sélections

Afin d'établir une lignée stable, il est nécessaire de déterminer la concentration d'antibiotique optimale pour éliminer toutes les cellules non transfectées. Puisque le vecteur d'expression contient une cassette de résistance à la zéocine, les cellules MDA-MB-231 sontensemencées à $25 \cdot 10^4$ cellules/puits dans des plaques 24 puits dans du milieu de culture RPMI supplémenté d'une gamme de concentrations de zéocine (0-100-150-300-500-700-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le milieu de culture supplémenté de zéocine est remplacé tous les 2 à 3 jours. Au bout de 2 semaines, la concentration minimale pour éliminer toutes les cellules a été déterminée à 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

b. Transfection

Les cellules MDA-MB-231 ($4 \cdot 10^5$ cellules/puits) sontensemencées dans des plaques 6 puits et transfectées comme décrit ci-dessus (Transfection transitoire => Transfection de plasmides).

c. Sélection

Après 48 heures de transfection, les cellules sont décollées à l'aide de la trypsine et transférées dans des plaques 24 puits à $25 \cdot 10^4$ cellules/puits dans un milieu RPMI supplémenté de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zéocine. Le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours. Durant la 2^{ème} semaine, des clones résistants à la zéocine commencent à apparaître et prolifèrent.

d. Isolement des clones

Au bout de 3 semaines, les cellules sont décollées et transférées dans des plaques 96 puits afin d'obtenir 1 cellule / puits pour isoler des clones différents. Une fois qu'un clone a constitué un tapis cellulaire dans la plaque 96 puits, il est amplifié par passage dans des plaques de surface croissante pour finir dans des boîtes de culture T₇₅. Durant cette amplification, les cellules sont toujours cultivées dans du milieu supplémenté de 150 µg/mL de zéocine jusqu'au passage dans le T₇₅.

6. Culture tridimensionnelle

Les conditions de culture 3D pour les cellules MDA-MB-231 ont été mis au point à l'aide de la matrice de membrane basale Matrigel (Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (EHS), Sigma-Aldrich) (Nath *et al.*, 2016). Ce matrigel est une matrice extraite du sarcome EHS de la souris, une tumeur riche en protéines de la matrice extracellulaire. Elle est principalement constituée de laminine, mais aussi de collagène IV, de protéoglycanes de sulfate d'héparane, d'entactine et de nidogène. La matrice Matrigel permet de reconstituer un microenvironnement tumoral pour les cultures 3D.

a. Préparation de la plaque

Le Matrigel est stocké à -80°C. Il est nécessaire de placer le Matrigel à 4°C pendant une nuit avant l'utilisation. Le jour de l'ensemencement, tout le matériel (cônes, plaque, eppendorf) qui sera en contact avec le gel est placé à -20°C pendant 1 heure avant utilisation. Ensuite, le Matrigel est dilué à une concentration de 6 mg/mL dans du milieu de culture froid supplémenté de 10% SVF, sur glace. Le fond des puits d'une plaque 48 puits est « coaté » avec 80 µL de Matrigel sur glace. La plaque « coatée » est incubée pendant 30 minutes à 37°C afin que le gel polymérise.

b. Ensemencement des cellules

Les cellules sont ensuite décollées à l'aide de la trypsine, comptées et $12 \cdot 10^4$ cellules sont placées dans un eppendorf pour une condition. Après une centrifugation de 115 g pendant 10 minutes à température ambiante, le culot cellulaire est resuspendu dans 200 µL de Matrigel sur glace puis étalé sur la surface « pré-coatée ». Après une incubation de 45 minutes à 37°C, 300 µL de milieu de culture préchauffé supplémenté de 10% SVF sont ajoutés délicatement.

La culture est ensuite placée à 37°C. Elle est maintenue pendant 10 à 12 jours en remplaçant le milieu de culture tous les 2 à 3 jours.

c. Récupération des sphères

Le milieu de culture est enlevé et les sphères sont rincées 2 fois au PBS 1X préchauffé. Le Matrigel est dissous à l'aide de 100 µL dispase I (Sigma-Aldrich) dilué dans 400 µL de PBS 1X préchauffé (1,4 U dispase /puits). Après ajout du mélange dispase-PBS dans le puits, il est nécessaire d'homogénéiser doucement avec la pipette P1000 pour dissoudre le Matrigel sans casser les sphères. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 2 fois 5 minutes en homogénéisant doucement toutes les 5 minutes. Le contenu de chaque puits est placé dans un falcon 15 mL puis 5 mL de PBS y est ajouté. Après une centrifugation de 115 g pendant 3 minutes, le culot est repris dans 50 µL de PBS. On étale ensuite les sphères en déposant 10 µL du mélange sur une lamelle de verre. Une immunofluorescence est réalisée par la suite de la manière décrite ci-dessous (3.c Immunofluorescence).

II. Analyse des transcrits

1. Extraction d'ARN

Les cellules sontensemencées à $4 \cdot 10^5$ cellules/puits dans une plaque 6 puits. Après traitement, le surnageant est éliminé et 500 µL de Trizol (Ambion-Life Technologies) est ajouté afin de lyser les cellules en gardant l'intégrité des ARN. Les lysats cellulaires sont transférés dans un microtube où l'on ajoute 20 µg de glycogène (Fermentas) et 100 µL de chloroforme puis le tout est vortexé. Après 2 minutes à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 15 minutes. La phase aqueuse obtenue est transférée dans un nouveau tube et un volume équivalent d'isopropanol est ajouté. Après 30 minutes à -20°C, une centrifugation est réalisée à 13 000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 75%. Les échantillons sont centrifugés une dernière fois à 13 000 rpm à 4°C pendant 15 minutes. L'éthanol est éliminé et le culot est mis à sécher à température ambiante pendant 20 minutes. Il est ensuite repris dans 12 µL d'eau. Chaque échantillon est ensuite dosé au spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Scientific) et la pureté est estimée par le rapport d'absorbance A_{260}/A_{280} .

Nom du gène	Type d'amorce	Séquence de l'amorce	Nombre de paire de bases
RPLPO	Amorce sens	5'-GGCGACCGTGAAGTCCAAC-3'	149
	Amorce antisens	5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3'	
Claudine 1	Amorce sens	5'-CCTATGACCCCAGTCAATG-3'	87
	Amorce antisens	5'-ACCTCCCAGAAGGCAGAGA-3'	

Tableau 13 : Liste des couples d'amorces utilisés pour la PCR quantitative. Le type d'amorce, les séquences ainsi que le nombre de paires de bases sont indiqués pour les gènes RPLPO et claudine 1.

2. Transcription inverse

1 µg d'ARN totaux est utilisé pour la rétrotranscription auquel est ajouté 3 µg d'amorces aléatoires (Invitrogen) dans un volume final de 12 µL. Le tout est chauffé à 65°C pendant 5 minutes dans un thermocycleur (BioRad) puis déposé sur glace. Ensuite, un mélange contenant 1 µL de dNTP 25 mM, 100 U de transcriptase inverse RevertAid (Thermo Scientific) et 4 µL de tampon 5X est ajouté. Enfin, les échantillons sont placés dans le thermocycleur pendant 10 minutes à 25°C, 1 heure à 42°C et 15 minutes à 70°C.

3. PCR quantitative

Les ADNc pour chaque échantillon ont été dosés au NanoDrop. Pour chaque PCR quantitative, 50 ng d'ADNc RPLPO (gène de référence) et 300 ng d'ADNc claudine 1 ont été utilisés. On a ensuite ajouté 12 µL d'un mélange contenant 7,5 µL de SYBR Green (Biorad), 1,5 µL d'eau ultra pure, 1,5 µL de chaque amorce sens et anti-sens à 300 nM final ([Tableau 13](#)). L'amplification est réalisée par le Real-Time PCR Detector (DNA Engine, Opticon 2) avec le programme suivant : 5 minutes à 95°C, puis une répétition de 40 fois du cycle suivant : 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 58°C. La PCR se termine par l'établissement de la courbe de fusion. Les C(t) claudine 1 sont normalisés par rapport aux C(t) du gène de référence RPLPO, puis sont rapportés au témoin. Nous avons utilisé la technique du ΔC_t , où l'expression relative de la claudine 1 a été analysée par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$, avec RPLPO comme gène de référence.

III. Analyse protéique

1. Extraction protéique

Les cellules MDA-MB-231 ($4 \cdot 10^5$ cellules/puits), Hs578T ($16 \cdot 10^4$ cellules/puits), MCF-7 ($2 \cdot 10^5$ cellules/puits) et MCF-10A ($3 \cdot 10^5$ cellules/puits) sontensemencées dans des plaques 6 puits. Après 24 ou 48 heures de traitement, les surnageants de culture sont récupérés et les cellules sont décollées sur glace dans du milieu froid à l'aide d'un grattoir. Le tout est centrifugé à 1 200 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 25 µL de tampon de lyse (Triton 100X, sodium déoxycholate 10%, Tris pH 7,5 1 M, NaCl 5 M, EDTA 200mM, cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Calbiochem)). Les cellules subissent ensuite trois cycles de chocs thermiques (azote liquide-bain marie 37°C) afin d'améliorer la lyse cellulaire. Les débris cellulaires sont éliminés par

Anticorps primaire	Référence	Poids moléculaire	Nature de l'anticorps primaire	Dilution (Western Blot)	Dilution (IF)
Claudine 1	CB1046 Calbiochem	23 kDa	Souris	-	1/200
Claudine 1	C5838-02C USBiological	23 kDa	Lapin	1/800	-
PARP clivée	552596 BD Pharmingen TM	89 kDa	Souris	1/1000	-
Caspase 7	#9494 Cell Signaling	20; 30; 35 kDa	Souris	1/1000	-
Vimentine	MAB1633 Chemicon	57 kDa	Souris	1/1000	1/250
Occludine	13409-1-AP Proteintech	59 kDa	Lapin	1/1000	1/100
β -caténine	E247 Epitomics #1247-S	92 kDa	Lapin	1/1500	1/250
ZO-1	GTX108587S GeneTex	187 kDa	Lapin	1/1000	1/400
Snail 1	GTX100754 GeneTex	29 kDa	Lapin	1/500	-
α -tubuline	GTX102079 GeneTex	50 kDa	Lapin	1/4000	1/250
β -actine	SC-1615 Santa Cruz	42 kDa	Lapin	1/4000	-
E-cadhérine	#3195 Cell Signaling	135 kDa	Lapin	1/1000	-
N-cadhérine	TA326835 OriGene	130 kDa	Lapin	1/1000	-
SP1	Sc-59 Santa Cruz	106 kDa	Lapin	1/500	-
LSR	#AP22065B Abgent	70 kDa	Lapin	1/500	-

Tableau 14 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot et en immunofluorescence (IF). Les anticorps dirigés contre les protéines d'intérêts utilisés en western blot et en immunofluorescence sont indiqués dans le tableau. Leur référence, leur poids moléculaire, la nature de l'anticorps et leur dilution sont précisés.

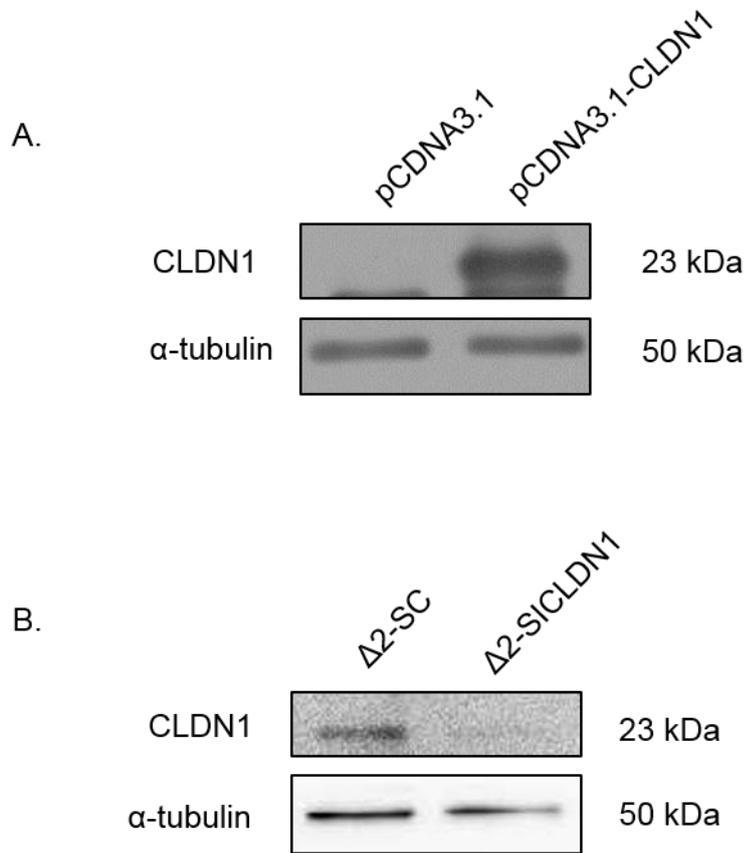


Figure 51 : Validation de l'anticorps dirigé contre la claudine 1 utilisés en Western Blot : C5838-02C USBiological. (A) Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière transitoire avec le plasmide pcDNA3.1 ou le plasmide pcDNA3.1 recombinant (pcDNA3.1-CLDN1). Après 48 heures, les taux de protéines claudine 1 (CLDN1), et α -tubuline (α -tubulin) ont été révélés par Western Blot, avec la tubuline utilisée comme référence interne. (B) Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière transitoire avec des ARN interférents aléatoires (SC) ou spécifiques de la claudine 1 (SICLDN1) puis traitées avec 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2$ -SC et $\Delta 2$ -SICLDN1) afin d'induire l'expression de la claudine 1. Après 24 heures de traitement, les taux de protéines claudine 1 (CLDN1), et α -tubuline (α -tubulin) ont été révélés par Western Blot, avec la tubuline utilisée comme référence interne.

une centrifugation à 13 000 rpm à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube et constitue l'extrait protéique.

Le dosage des protéines totales est réalisé à l'aide du kit BioRad Protein Assay, basé sur la méthode de Bradford. Chaque échantillon est dilué au vingtième et une gamme étalon de BSA est préparée afin de déterminer la concentration protéique à partir de l'équation de droite de régression. Pour cela, on dépose 10 µL de chaque point de notre gamme ou 10 µL de l'échantillon dilué dans une plaque 96 puits auquel on ajoute 200 µL de réactif Bradford dilué au 1/4. Enfin, la densité optique est mesurée à 595nm par un luminomètre VictorX3.

2. Western Blot

Pour chaque dépôt, on prélève 50 µg de protéines auxquelles on ajoute du tampon Laemmli 5X (125 mM Tris/HCl pH 6,8, SDS 10%, saccharose 50%, bleu de bromophénol 0,05%, DTT 0,5 M). Les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes et déposées sur un gel de polyacrylamide à 12%. La séparation des protéines est réalisée par une électrophorèse à 100 V pendant 1 heure et 30 minutes dans du tampon de migration 1X (Tris/HCl 24,7 mM pH 8, glycine 191 mM, SDS 0,1%) en condition dénaturante (SDS-PAGE). Après la migration, les échantillons sont transférés sur une membrane de nitrocellulose (BioRad) en milieu liquide dans du tampon de transfert 1x (Tris 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM, méthanol 20%) à 100 V pendant 50 minutes.

Après le transfert, la membrane est colorée au rouge ponceau afin de vérifier la qualité du transfert. La membrane est saturée dans une solution de TNT 1X (Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 170 mM, Tween 20 0,1%) contenant 5% de lait pendant 2 heures sous agitation. La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire ([Tableau 14](#)) pendant la nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois dans du TNT 1X. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire dilué au 1/2000 pendant 1 heure à température ambiante (Anticorps anti-immunoglobuline de lapin ou de souris couplé à la peroxydase, Santa Cruz). Après 3 rinçages au TNT 1X pendant 5 minutes, l'activité peroxydase est révélée à l'aide d'un substrat chimioluminescent Clarity™ ECL (BioRad). L'exposition des membranes est réalisée grâce au Chemidoc Touch (BioRad). L'intensité du signal est ensuite quantifiée grâce au logiciel Image Lab (BioRad). Les taux relatifs de protéines d'intérêts sont normalisés par rapport à la protéine de référence l' α -actine ou la β -tubuline. L'anticorps dirigé contre la claudine 1 (C5838-02C USBiological) a été vérifié en surexprimant la claudine 1 par transfection transitoire ou en inhibant son expression par ARN interférence ([Figure 51](#)).

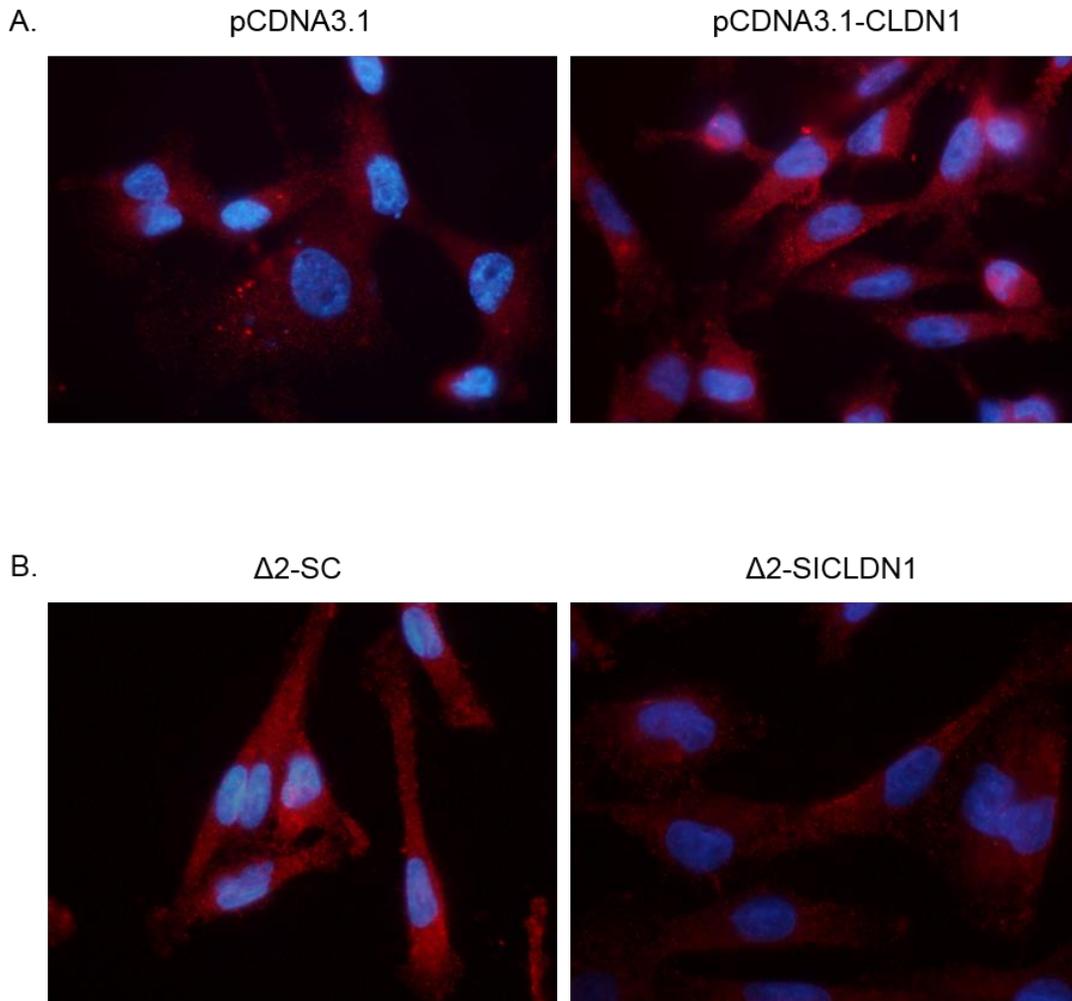


Figure 52 : Validation de l'anticorps dirigé contre la claudine 1 utilisés en immunofluorescence : **CB1046 Calbiochem.** (A) Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière transitoire avec le plasmide pCDNA3.1 ou le plasmide pCDNA3.1 recombinant (pCDNA3.1-CLDN1). Après 48 heures, la claudine 1 est révélée par immunofluorescence et le noyau est coloré en bleu par un marquage au DRAQ5. (B) Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière transitoire avec des ARN interférents aléatoires (SC) ou spécifiques de la claudine 1 (SICLDN1) puis traitées avec 20 μ M de Δ 2-TGZ (Δ 2-SC et Δ 2-SICLDN1) afin d'induire l'expression de la claudine 1. Après 48 heures, la claudine 1 est révélée par immunofluorescence et le noyau est coloré en bleu par un marquage au DRAQ5.

3. Immunofluorescence

Les cellules MDA-MB-231 (8.10^4 cellules/puits), Hs578T (3.10^4 cellules/puits) et MCF-7 (4.10^4 cellules/puits) sont ensemencées dans des plaques 24 puits sur des lamelles de verres rondes. Après 24 ou 48 heures de traitement, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées au PBS 1X puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, une étape de perméabilisation de 10 minutes au PBT (PBS 1X, Triton 0,5%) est uniquement réalisée pour des anticorps ciblant des protéines cytoplasmiques. Après rinçage au PBT (PBS 1X, Triton 0.1 %), une étape de saturation est réalisée par une solution de PBT-BSA (PBS 1X, Triton 0,1%, BSA 4%) pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, l'anticorps primaire est dilué dans le PBT-BSA (Tableau 14) et ajouté pendant toute la nuit à 4°C. L'anticorps dirigé contre la claudine 1 (CB1046 Calbiochem) a été vérifié en surexprimant la claudine 1 par transfection transitoire ou en inhibant son expression par ARN interférence (Figure 52). Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois au PBT-BSA puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome l'Alexa Fluor 488 ou 555 (Invitrogen) dilué au 1/1000 pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, les noyaux sont colorés à l'aide d'une solution de Hoechst 33342 (AAT Bioquest) diluée au 1/10000 dans du PBS 1X ou à l'aide d'une solution de DRAQ5 (Cell signaling) dilué au 1/500 dans du PBS 1X pendant 15 minutes à température ambiante. Enfin, après 5 rinçages successifs au PBS 1X, les lamelles sont déposées sur une lame avec une solution de montage (80% glycérol, 15% PBS 1X, 5% propylgallate). Les photographies sont prises à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra (Eclipse 80i microscope, Nikon Champigny sur Marne, France) grâce au logiciel NIS-Elements Basic Research ou bien à l'aide de la plateforme IBISA qui possède un microscope confocal LEICA TCS SPX AOBS CLSM.

4. Fractionnement sub-cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 (4.10^5 cellules/puits) et MCF-7 (2.10^5 cellules/puits) sont ensemencées dans des plaques 6 puits. Après 9 heures de traitement, la suspension cellulaire est récupérée. Les cellules adhérentes sont ensuite rincées au PBS 1X, trypsinées, resuspendues dans du milieu de culture supplémenté de 1% de sérum de veau fœtal et ajoutées à la suspension cellulaire. Après une centrifugation (5 minutes à 500 rpm à 4°C), les cellules sont rincées au PBS 1X. En parallèle, les cellules sont comptées et 2.10^6 cellules par condition

sont centrifugées pendant 3 minutes à 500 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 100 µL de tampon d'extraction cytoplasmique provenant du kit de fractionnement sub-cellulaire (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, #78840, ThermoFisher Scientific). Les cellules sont placées à 4°C pendant 10 minutes sur un disque rotatif. Après une centrifugation (5 minutes à 500 rpm à 4°C), le surnageant correspondant à la fraction cytoplasmique est récupéré. Le culot est resuspendu dans 100 µL de tampon d'extraction membranaire, vortexé pendant 5 secondes et incubé à 4°C pendant 10 minutes sur un disque rotatif. Après une centrifugation (5 minutes à 3000 rpm à 4°C), le surnageant correspondant à la fraction membranaire est récupéré. Le culot restant est resuspendu dans 50 µL de tampon d'extraction nucléaire, vortexé pendant 15 secondes et incubé à 4°C pendant 30 minutes sur un disque rotatif. Après une centrifugation (5 minutes à 5000 rpm à 4°C), le dernier surnageant correspondant à la fraction nucléaire est récupéré. Les différentes fractions de chaque échantillon sont soumises à une analyse par western blot. Pour cela, 1/5 de chaque fraction est déposé sur un gel de polyacrylamide.

IV. Analyse de la réponse apoptotique

1. Par luminescence

Les cellules MDA-MB-231 (4.10^5 cellules/puits) et Hs578T (16.10^4 cellules/puits) sontensemencées dans des plaques 6 puits. Après un traitement ou une transfection transitoire, les cellules sont décollées et comptées. Dans une plaque 96 puits blanche, 10 000 cellules/puits sontensemencées en triplicat dans un volume de 50 µL pour chaque condition. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 50 µL de substrat luminescent du kit Caspase-Glo® 3/7 (Promega) sont ajoutés aux 50 µL de cellules présents dans la plaque. La plaque est ensuite placée pendant 30 secondes à 400 rpm sur un agitateur et incubée 1 heure à température ambiante à l'obscurité. Enfin, la luminescence est mesurée par un lecteur de microplaque Victor X3 (PerkinElmer).

2. Par immunofluorescence

Les cellules MDA-MB-231 (8.10^4 cellules/puits) et Hs578T (3.10^4 cellules/puits) sontensemencées dans des plaques 24 puits sur des lamelles de verres rondes. Après un traitement ou une transfection transitoire, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées au PBS 1X puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, une étape de perméabilisation est réalisée

avec une solution de PBT (PBS 1X, Triton 0,5%) pendant 10 minutes à température ambiante. A partir du kit *In situ* Cell Death detection, TMR red (Roche), on prépare un mélange contenant 50 et 150 μL des solutions « enzyme solution » et « label solution » respectivement. Les cellules sont mises en présence de 50 μL de ce mélange en chambre humide pendant 1 heure dans l'obscurité puis les noyaux des cellules sont colorés au Hoechst 33342 dilué au 1/10000 dans du PBS 1X pendant 15 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, les lamelles sont déposées sur une lame avec une solution de montage (80% glycérol, 15% PBS 1X, 5% propylgallate). Les photographies sont prises à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra (Eclipse 80i microscope, Nikon Champigny sur Marne, France) grâce au logiciel NIS-Elements Basic Research.

3. Par cytométrie en flux

Les cellules MDA-MB-231 (4.10^5 cellules/puits), Hs578T (16.10^4 cellules/puits) et MCF-10A (3.10^5 cellules/puits), sontensemencées dans des plaques 6 puits. Après un traitement de 24 ou 48 heures, la suspension cellulaire est récupérée. Les cellules adhérentes sont ensuite rincées au PBS 1X, trypsinées, resuspendues dans du milieu de culture supplémenté de 1% de sérum de veau fœtal et ajoutées à la suspension cellulaire. Après centrifugation (5 minutes à 1000 rpm), les cellules sont rincées 2 fois au PBS 1X. Le culot cellulaire est resuspendu à une concentration finale de 1.10^6 cellules/mL dans le tampon de liaison 1X (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2). Ensuite, on prélève 100 μL de cellules auxquelles sont ajoutés 2,5 μL d'annexine V-FITC (556419, BD Biosciences) et 2,5 μL d'iodure de propidium (PI) à 1 mg/mL (P3566, Life technologies) pendant 15 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. Ensuite, on complète avec 200 μL de tampon de liaison 1X. La détection des cellules marquées positivement au FITC et au PI est réalisée par cytométrie en flux (FACSCalibur; BD Biosciences) à l'aide du logiciel CellQuest Pro. La fluorescence est quantifiée sur 10 000 évènements. Le % d'apoptose correspond à la somme du nombre de cellules marquées à l'annexine V-FITC et celles co-marquées à l'annexineV-FITC/PI.

V. Analyse des propriétés migratrices

1. Par le test de la blessure

Les cellules MDA-MB-231 (6.10^5 cellules/puits) et Hs578T (2.10^5 cellules/puits) sontensemencées dans des plaques 6 puits jusqu'à confluence. Le lendemain, une blessure est effectuée dans le tapis cellulaire à l'aide d'un cône P200 puis les cellules sont transfectées ou

exposées aux différents composés. La mesure de la blessure est effectuée aux temps 0, 3, 6, 12, 24, 48 heures. Cette mesure s'effectue à 3 endroits différents le long de la blessure à l'aide d'un microscope à contraste de phase couplé à une caméra (Nikon, Champigny sur Marne, France) grâce au logiciel NIS-Elements Basic Research.

2. En chambre de Boyden

Cette technique permet de déterminer la capacité migratrice des cellules à l'aide d'un insert qui possède des pores de 8 µm de diamètre (6,5 mm Transwell® 8.0 µm Pore Polyester Membrane Insert, #3464, Corning). Les cellules, qui ont des propriétés migratrices, vont se déformer, traverser les pores et venir s'adhérer sur la partie inférieure de l'insert. Les cellules MDA-MB-231 (13 750 cellules/puits) et Hs578T (13 750 cellules/puits) sontensemencées dans un milieu de culture avec 1 % SVF dans un volume de 150 µL et traitées avec différents composés pendant 9 heures. Les transfectants stables (13 750 cellules/puits) sontensemencées dans un milieu de culture avec 10 % SVF dans un volume de 150 µL pendant 24 heures. Les inserts sont ensuite placés dans un puits d'une plaque 24 puits contenant 600 µL de milieu de culture avec 10 % SVF pour les traitements et 20 % de SVF pour les transfectants stables, afin de créer un gradient chimiotactique. Après le traitement ou la transfection, l'insert est rincé deux fois dans une solution de PBS 1X puis mis en présence d'une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à température ambiante afin de fixer les cellules. Après 3 rinçages au PBS 1X, l'insert est mis en présence d'une solution de 0,2% de Crystal Violet dilué dans 2% d'éthanol pendant 20 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages à l'eau distillée, les cellules situées sur la membrane supérieure de l'insert sont éliminées à l'aide d'un coton tige. Les inserts sont mis à sécher à température ambiante. Ensuite, 300 µL d'acide acétique 10% sont ajoutés pendant 10 minutes dans la plaque 24 puits afin de dénombrer les cellules fixées sur la membrane inférieure de l'insert. L'absorbance à 595 nm est lue par spectrométrie grâce à un lecteur de plaque (PerkinElmer).

VI. Analyse du cytosquelette d'actine

Les cellules MDA-MB-231 (8.10^4 cellules/puits), Hs578T (3.10^4 cellules/puits) et MCF-7 (4.10^4 cellules/puits) sontensemencées dans des plaques 24 puits sur des lamelles de verres rondes. Après le traitement, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées au PBS 1X puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, une étape de perméabilisation de 10 minutes au PBT

(PBS 1X, Triton 0,5%) est réalisée. Après rinçage au PBT (PBS 1X, Triton 0.1 %), une étape de saturation est réalisée par une solution de PBT-BSA (PBS 1X, Triton 0,1%, BSA 4%) pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules ainsi fixées et perméabilisées sont mises en présence de Phalloïdine couplée à l'AlexaFluor 488 (A12379, ThermoFisher Scientific), dilué 30 fois dans du PBS 1X pendant 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière. Après 3 rinçages au PBS 1X, les noyaux sont colorés à l'aide d'une solution de Hoechst 33342 (AAT Bioquest) diluée au 1/10000 dans du PBS 1X ou à l'aide d'une solution de DRAQ5 (Cell signaling) dilué au 1/500 dans du PBS 1X pendant 15 minutes à température ambiante. Enfin, après 5 rinçages successifs au PBS 1X, les lamelles sont déposées sur une lame avec une solution de montage (80% glycérol, 15% PBS, 5% propylgallate). Les photographies sont prises à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra (Eclipse 80i microscope, Nikon Champigny sur Marne, France) grâce au logiciel NIS-Elements Basic Research ou bien à l'aide de la plateforme IBISA qui possède un microscope confocal LEICA TCS SPX AOBS CLSM.

VII. Analyse de l'agrégation cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 sont comptées et 250 000 cellules sont placées dans un eppendorf pendant 30 minutes sous agitation orbitale. Il est important de bien séparer les cellules entre elles. Aux temps 0 et 30 minutes, les cellules sont photographiées et les cellules isolées sont comptées. Deux cellules accolées sont également comptabilisées comme cellule isolée. L'index d'agrégation est définie par la formule qui suit : $1 - (\text{nombre de cellules isolées à T30} / \text{nombre de cellules isolées à T0})$. Plus l'index est proche de 1, plus le nombre d'agrégats cellulaires est important. Pour chaque condition, la moyenne de cinq photographies est réalisée pour le calcul de l'index d'agrégation.

VIII. Analyse de la réponse cytotoxique des composés en temps réel

1. Principe

Le « xCELLigence » (RTCA SP, Roche, Mannheim, Allemagne) est un système qui permet d'obtenir en temps réel de façon sensible et non invasive des informations quantitatives sur l'état biologique des cellules. L'unité de mesure est le Cell Index (CI) qui est proportionnel au nombre, à l'adhérence et à la morphologie cellulaire. Cette mesure est réalisée grâce à des microélectrodes, localisées en dessous d'une plaque 96 puits, qui vont analyser l'impédance cellulaire par un courant alternatif sinusoïdal. Le CI est augmenté lorsque les cellules

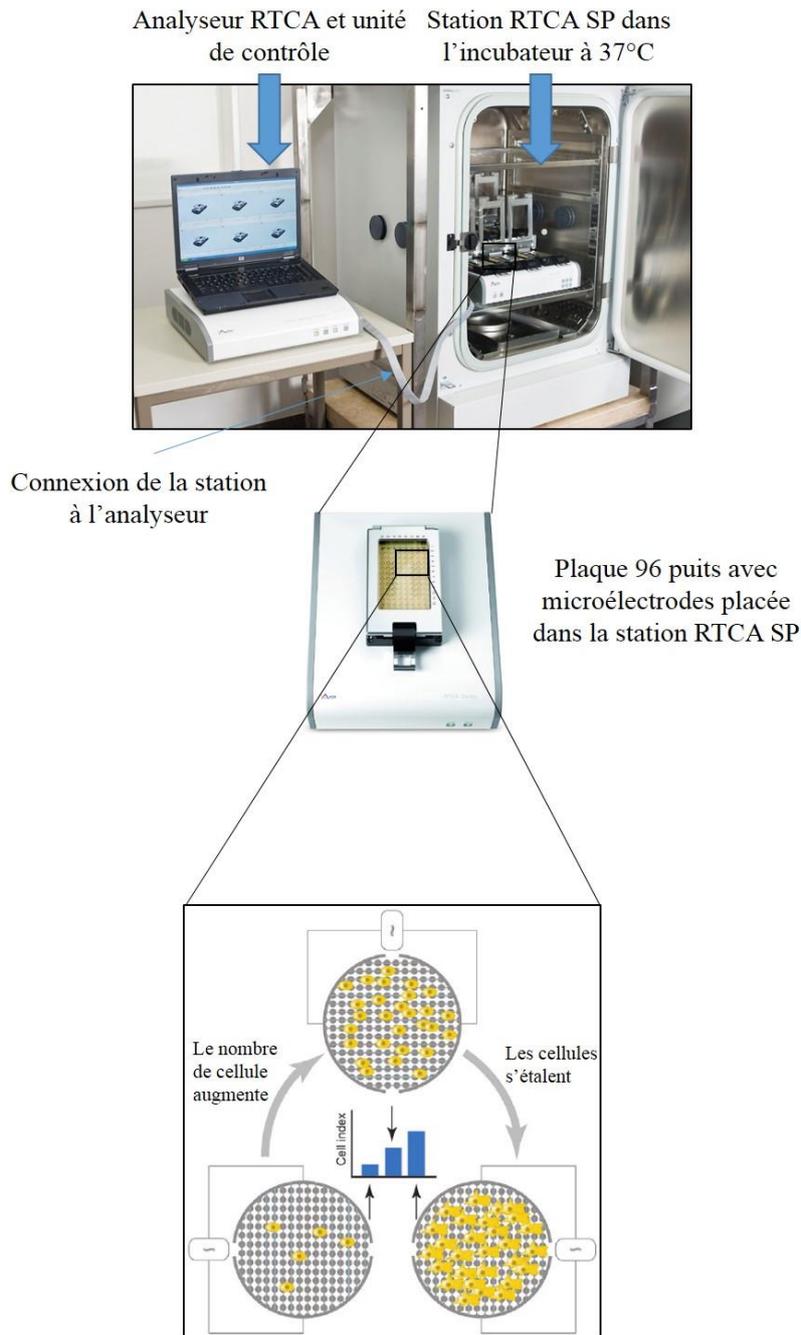


Figure 53 : Principe du système xCELLigence. Les mesures du xCELLigence sont réalisées par la station RTCA SP qui est placée dans un incubateur à 37°C à 5% de CO₂. Cette station est connectée à l'analyseur RTCA et à l'unité de contrôle qui analyse les mesures par le logiciel RTCA 1.2.1 (Roche Diagnostics). L'unité de mesure est le Cell Index (CI) qui est proportionnel au nombre, à l'adhérence et à la morphologie cellulaire. Cette mesure est réalisée grâce à des microélectrodes, localisées en dessous d'une plaque 96 puits, qui vont analyser l'impédance cellulaire par un courant alternatif sinusoïdal. Le CI est augmenté lorsque les cellules s'étalent et prolifèrent et diminue lorsque les cellules se détachent et meurent.

prolifèrent et adhèrent, et diminue lorsque les cellules se détachent et meurent (Figure 53). Le CI est calculé à partir de la formule suivante : $R_n - R_b / R_b$ avec R_b correspondant au bruit de fond du milieu dans le puits et R_n à la valeur d'impédance dans le puits en présence des cellules.

2. Protocole

Les mesures sont réalisées par la station RTCA SP qui est placée dans un incubateur à 37°C à 5% de CO₂ (Figure 53). Cette station est connectée à l'analyseur RTCA et à l'unité de contrôle qui analyse les mesures par le logiciel RTCA 1.2.1 (Roche Diagnostics). Une vérification des contacts électriques est réalisée à l'aide d'une plaque de résistance RTCA. Ensuite, la plaque 96 puits est placée dans la station avec 50 µL de milieu afin de mesurer le bruit de fond qui sera soustrait aux mesures d'impédance. Par la suite, on ajoute 150 µL de suspension cellulaire dans chaque puits à des concentrations de 4.10⁵ cellules/puits pour les cellules MDA-MB-231 et de 8.10³ cellules/puits pour les cellules MCF-7. Après 20 minutes dans la station, le programme est lancé avec une mesure toutes les 15 minutes pendant 96 heures. Après 30 heures d'incubation, les cellules sont traitées avec la Δ2-TGZ ou l'AB186. Chaque condition est réalisée en quadruple.

IX. Analyses statistiques

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (SEM) de 3 à 6 expériences indépendantes. Pour une même lignée cellulaire, la comparaison entre 2 conditions est réalisée par l'utilisation du test *t* de Student. La comparaison entre 3 conditions est analysée par un test ANOVA à 1 facteur (test posthoc : Bonferroni). La valeur de *p* est calculée et les résultats sont considérés statistiquement significatif à partir de *p*<0,05 (SPSS v11.0).

RESULTATS

I. Implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives « claudin 1-low »..... 105

- **ARTICLE 2** : *Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in “claudin 1-low” triple negative breast cancer cells: involvement of claudin 1*

II. Effets précoces des dérivés TGZ sur les cellules cancéreuses mammaires « claudin 1-low » : implication de la claudine 1 dans la migration cellulaire 108

- **ARTICLE 3** : *Troglitazone derivatives induce early modifications of the cytoskeleton and inhibition of migration in « claudin 1-low » breast cancer cells : a key of role claudin 1 in cell migration*

III. La claudine 1, un marqueur prédictif de sensibilité aux agents de chimiothérapie ?117

I. Implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives « claudin 1-low » (Article 2)

Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in “claudin 1-low” triple negative breast cancer cells: involvement of claudin 1.

Geoffroy Marine, Kleinclauss Alexandra, Grandemange Stéphanie, Hupont Sébastien, Boisbrun Michel, Flament Stéphane, Grillier-Vuissoz Isabelle, Kuntz Sandra. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017, 165: 517.

Introduction

Des études menées précédemment au laboratoire ont montré d'une part, que la $\Delta 2$ -TGZ induit l'apoptose des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 dès 24 heures de traitement (Colin-Cassin *et al.*, 2015). D'autre part, que le gène le plus induit après 12 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ est celui de la claudine 1 dans les cellules MCF-7 grâce à une analyse par puce à ADN. Par ailleurs, les données de la littérature suggéraient un rôle suppresseur de tumeur de la claudine 1 dans les tumeurs mammaires. En effet, la ré-expression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-361 induit l'apoptose de ces cellules (Hoevel *et al.*, 2004). De même, le traitement des cellules triple-négatives MDA-MB-453 avec un agent déméthylant, la décitabine, augmente l'expression protéique de la claudine 1 menant à l'apoptose (DiCello *et al.*, 2013). Ces données pré-cliniques sont en accord avec des études cliniques récemment publiées qui montrent une corrélation entre l'espérance de vie des patientes et l'expression de la claudine 1 dans leur tumeur mammaire (Szasz *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2014). A partir de ces données, l'objectif de cette partie a été de déterminer si **la ré-expression de la claudine 1 induite par la $\Delta 2$ -TGZ pourrait jouer un rôle dans sa réponse pro-apoptotique.**

Principaux résultats

1. $\Delta 2$ -TGZ induit l'expression de la claudine 1 et l'apoptose des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T

Comme l'expression de la claudine 1 est induite dans les cellules MCF-7 par la $\Delta 2$ -TGZ, nous avons étudié si ce composé pouvait également permettre l'expression de la claudine 1 dans les cellules triple-négatives « claudin 1-low », MDA-MB-231 et Hs578T. Nous avons traité ces

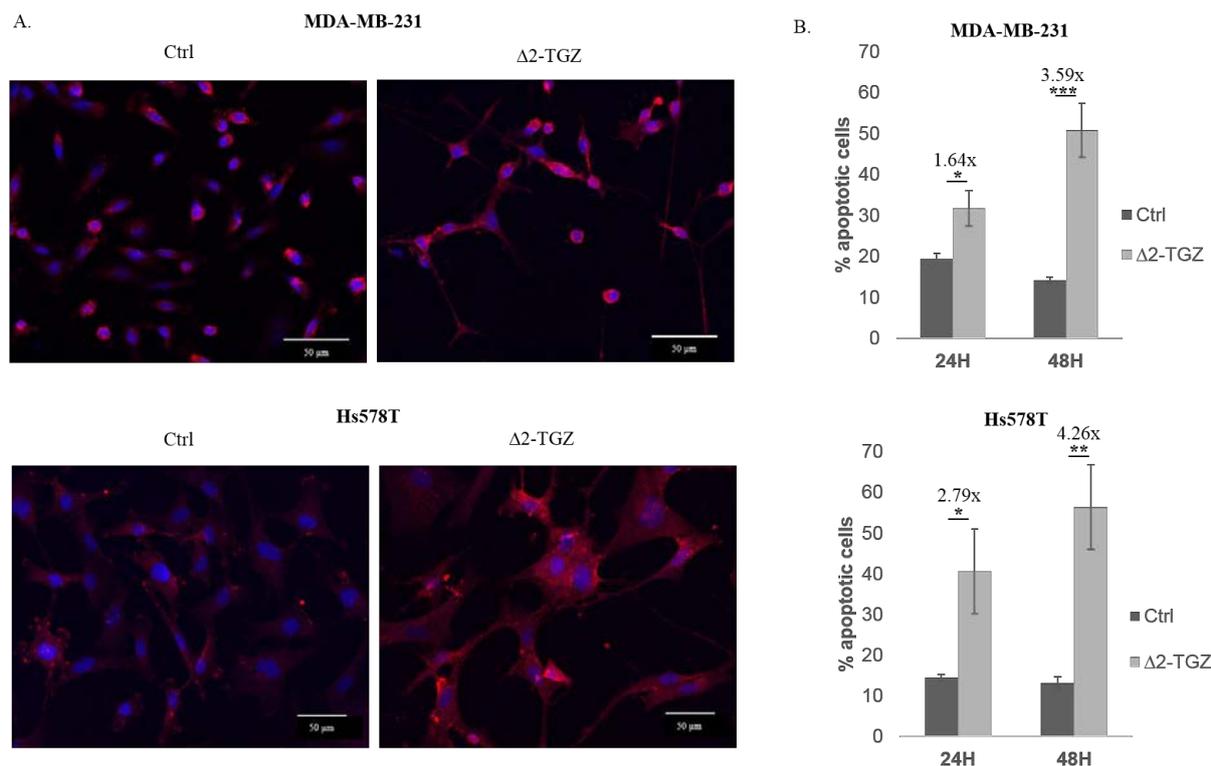


Figure 54 : Effet de la $\Delta 2$ -TGZ sur l'expression de la claudine 1 et l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et Hs578T. (A) Les cellules MDA-MB-231 et Hs578T sont traitées pendant 24 heures avec le solvant DMSO (Ctrl) ou avec 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ. La claudine 1 (en rouge) est révélée par immunofluorescence et le noyau est coloré en bleu par un marquage au DRAQ5. Les cellules sont observées au microscope confocal avec un zoom x400 pour les cellules Hs578T et x536 pour les cellules MDA-MB-231. Chaque photo représente la superposition de 6 images dans l'axe z. Les photos montrent une augmentation du signal ponctiforme de la claudine 1 dans les cellules traitées à la $\Delta 2$ -TGZ. L'échelle représente 50 μ m. (B) Après 24 et 48 heures de traitement avec le solvant DMSO (Ctrl) ou avec 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ, les cellules MDA-MB-231 et Hs578T sont co-marquées avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et sont analysées par cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V et aux cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Une augmentation significative du taux d'apoptose est observée dans les cellules traitées à la $\Delta 2$ -TGZ à 24 et 48 heures de traitement. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 à 6 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

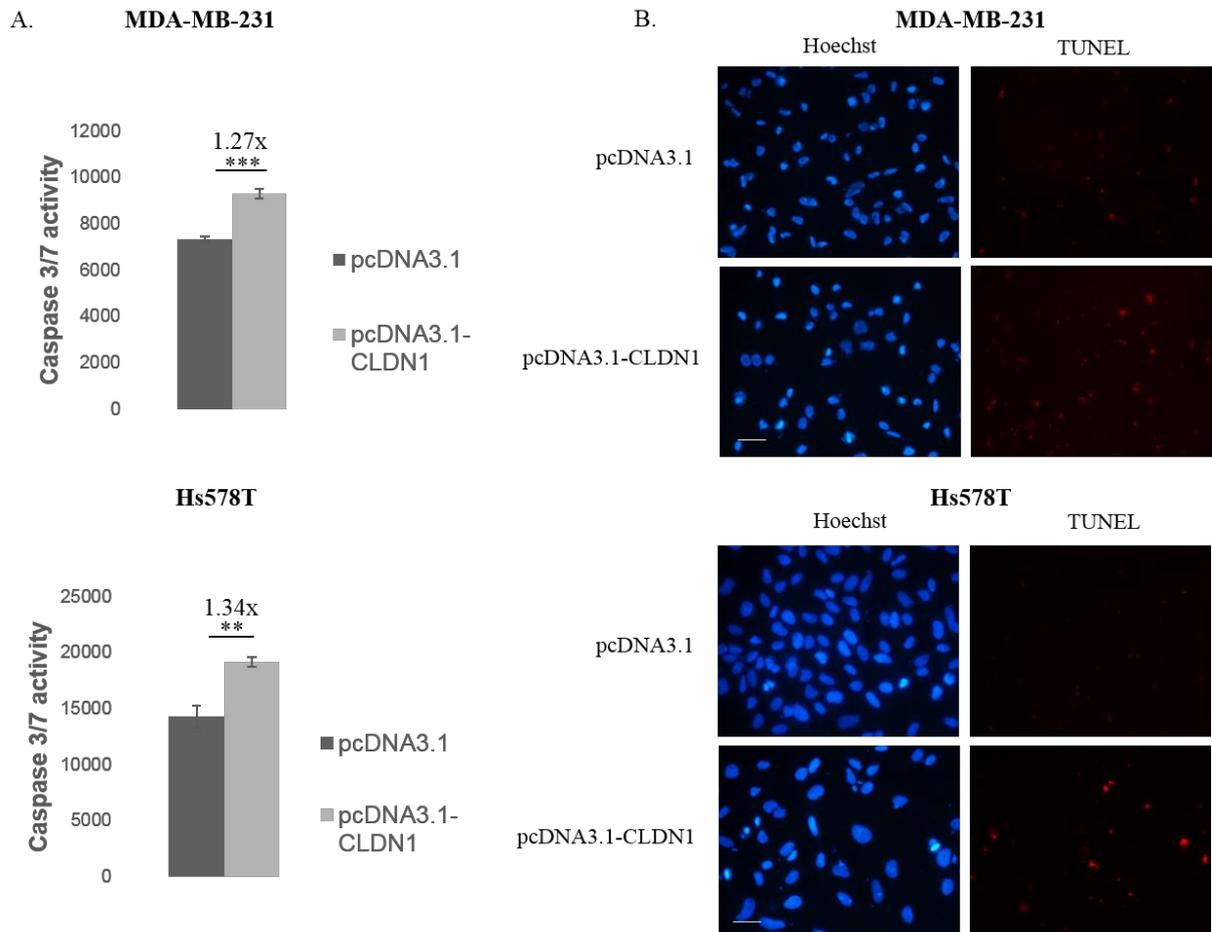


Figure 55 : Effet de la surexpression de la claudine 1 sur l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et Hs578T. Les cellules MDA-MB-231 et Hs578T ont été transfectées de manière transitoire avec le plasmide pcDNA3.1 ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (pcDNA3.1-CLDN1). Après 48 heures, l'activité des caspases 3/7 et un marquage TUNEL sont réalisés. (A) La surexpression de la claudine 1 (pcDNA3.1-CLDN1) induit une augmentation significative de l'activité des caspases 3/7 dans les deux lignées cellulaires comparé aux cellules témoins (pcDNA3.1). Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 4 à 5 expériences indépendantes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (B) La surexpression de la claudine 1 (pcDNA3.1-CLDN1) augmente le marquage TUNEL (en rouge) dans les deux lignées cellulaires comparé aux cellules témoins (pcDNA3.1). Les noyaux sont colorés en bleu par un marquage au Hoechst. L'échelle représente 50 μm .

cellules en présence de 20 μ M de Δ 2-TGZ, RGZ et TGZ pendant 24 heures. Seule la Δ 2-TGZ restaure l'expression de la claudine 1 dans les deux lignées cellulaires. Ce résultat a été confirmé par immunofluorescence (Figure 54A). Dans les cellules témoins, un niveau basal de claudine 1 est observé dans les deux lignées cellulaires, en accord avec leur profil moléculaire de sous-type « claudin 1-low ». En réponse à la Δ 2-TGZ, l'intensité de la fluorescence augmente après 24 heures de traitement dans les deux lignées cellulaires, confirmant les données du western blot. Les cellules changent de forme, elles deviennent allongées avec un marquage ponctiforme de la claudine 1 dans le cytoplasme et/ou à la membrane.

Nous avons ensuite étudié s'il existait une corrélation entre le niveau d'expression de la claudine 1 et la réponse pro-apoptotique induite par la Δ 2-TGZ. Nous avons ainsi réalisé un co-marquage à l'annexine V/PI des cellules MDA-MB-231 et Hs578T après 24 et 48 heures de traitement par la Δ 2-TGZ. Dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T, le taux de marquage annexine V/PI est significativement augmenté pour les deux temps de traitements (Figure 54B). De manière intéressante, nous n'avons observé aucune induction d'apoptose et aucune modification du niveau de la protéine claudine 1 sous l'effet de la Δ 2-TGZ dans les cellules non cancéreuses MCF-10A qui expriment la claudine 1.

2. La surexpression de la claudine 1 conduit à l'apoptose des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T.

Nous avons émis l'hypothèse que la claudine 1 pourrait être impliquée dans l'apoptose des cellules triple-négatives « claudin 1-low ». Dans cette optique, nous avons surexprimé la claudine 1 et nous avons analysé l'apoptose par l'expression de deux marqueurs classiques PARP-1 clivée et caspase 7 clivée par western blot. La surexpression transitoire de la claudine 1 entraîne une augmentation significative du clivage de ces deux marqueurs dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T. Ces données ont été confirmées par une mesure de l'activité des caspases 3/7 et un marquage TUNEL (Figure 55).

3. La claudine 1 est impliquée dans l'apoptose des cellules MDA-MB-231 induite par la Δ 2-TGZ.

Comme la claudine 1 est capable de stimuler l'apoptose des cellules triple-négatives, nous supposons qu'elle pourrait être impliquée également dans l'apoptose induite par la Δ 2-TGZ.

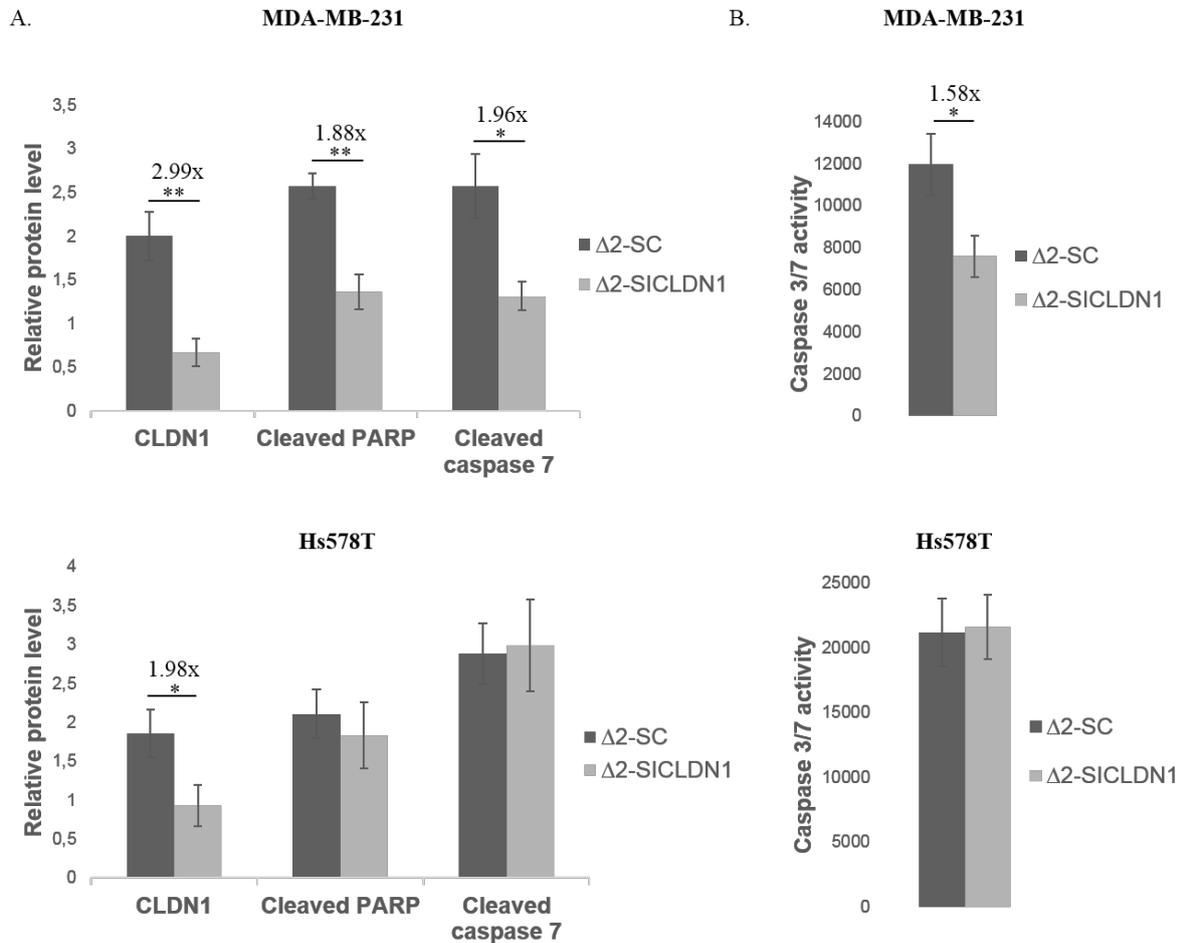


Figure 56 : Implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ des cellules MDA-MB-231 et Hs578T. Les cellules MDA-MB-231 et Hs578T ont été transfectées de manière transitoire avec des ARN interférents aléatoires (SC) ou spécifiques de la claudine 1 (SICLDN1) puis traitées avec 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2$ -SC et $\Delta 2$ -SICLDN1). Après 24 heures de traitement, un western blot et l'activité des caspases 3/7 sont réalisés. (A) Les taux de protéines claudine 1 (CLDN1), PARP clivée (Cleaved PARP) et caspase 7 clivée (Cleaved caspase 7) ont été révélés par western Blot, avec la tubuline utilisée comme référence interne. Les graphiques représentent la quantification des bandes CLDN1/tubuline, PARP clivée/tubuline et caspase 7 clivée/tubuline. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 4 à 6 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (B) L'activité des caspases 3/7 a été mesurée sur les cellules MDA-MB-231 et Hs578T $\Delta 2$ -SC et $\Delta 2$ -SICLDN1. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 4 à 6 expériences indépendantes. * $p < 0,05$.

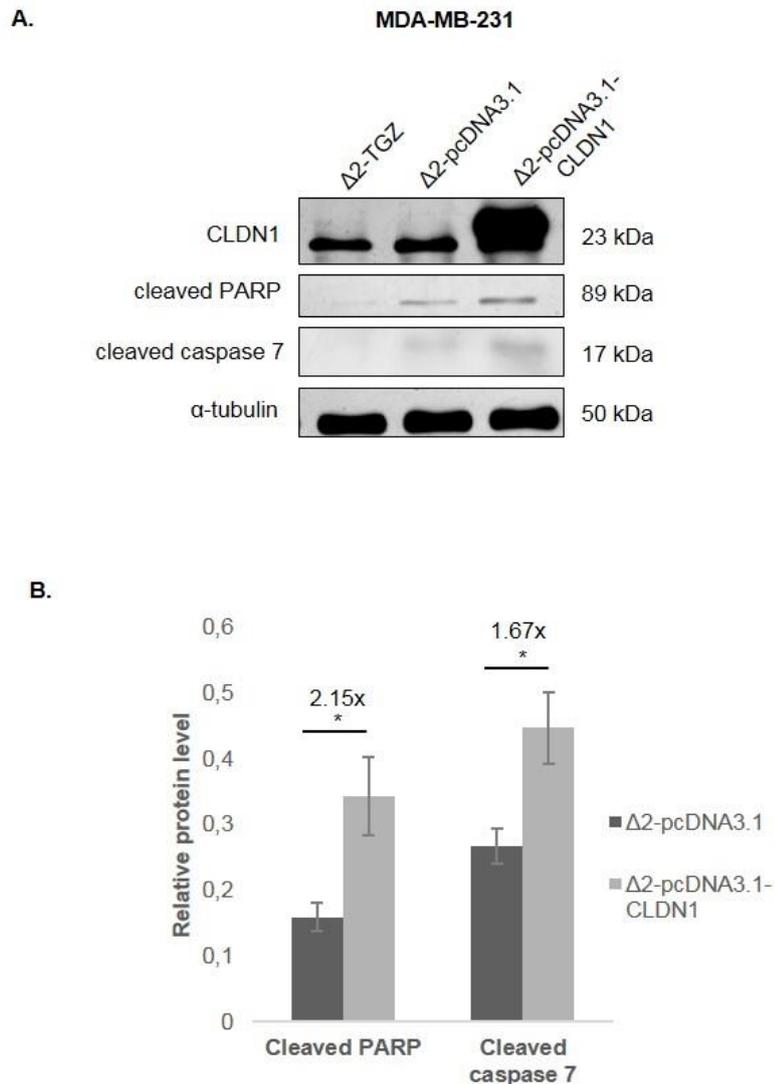


Figure 57 : La surexpression de la claudine 1 potentialise l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ des cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière transitoire avec le plasmide pcDNA3.1 ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (pcDNA3.1-CLDN1) puis traitées avec 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ ($\Delta 2$ -TGZ, $\Delta 2$ -pcDNA3.1 et $\Delta 2$ -pcDNA3.1-CLDN1). Après 48 heures de transfection et 24 heures de traitement, une analyse par western blot est réalisée. (A) Les taux de protéines claudine 1 (CLDN1), PARP-1 clivée (cleaved PARP), caspase 7 clivée (cleaved caspase 7) et α -tubuline (α -tubulin) ont été révélés par western Blot, avec l' α -tubuline utilisée comme référence interne. (B) Les graphiques représentent la quantification des bandes cleaved PARP/tubuline et cleaved caaspase 7/tubuline. Ils correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$.

Afin d'étayer notre hypothèse, nous avons inhibé l'expression de la claudine 1 par ARN interférence et mesuré l'apoptose en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ. Dans les cellules MDA-MB-231 traitées à la $\Delta 2$ -TGZ, il existe une corrélation significative entre la baisse du taux de claudine 1 et celle des formes clivées de PARP-1 et de caspase 7 en western blot (Figure 56A). Cependant, aucune différence significative n'est observée dans les cellules Hs578T. Ces données ont été confirmées par une mesure de l'activité des caspases 3/7 (Figure 56B).

Conclusion

Nous avons montré que la surexpression de la claudine 1 et le composé $\Delta 2$ -TGZ induisent l'**apoptose** des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T. De plus, la claudine 1 est impliquée dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MDA-MB-231. Ces données montrent l'implication de la claudine 1 dans l'apoptose des lignées triple-négatives « claudin 1-low ». Par ailleurs, nous avons montré que la surexpression de la claudine 1 potentialise l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 57). Récemment, il a été montré que les cellules cancéreuses mammaires lumineales MCF-7 surexprimant la claudine 1 présentent une sensibilité accrue à trois agents anticancéreux : le cisplatine, l'etoposide et le tamoxifène (Zhou *et al.*, 2015). Cette étude préliminaire suggère que la ré-expression de la claudine 1 pourrait restaurer la sensibilité des cellules triple-négatives « claudin 1-low » aux agents de chimiothérapie classique. ***In fine***, **l'utilisation de la $\Delta 2$ -TGZ seule ou en association avec d'autres agents anticancéreux pourrait constituer une piste thérapeutique novatrice pour les tumeurs triple-négatives, en particulier les tumeurs « claudin 1-low » qui sont de mauvais pronostic.**

Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in “claudin-1-low” triple-negative breast cancer cells: involvement of claudin-1

Geoffroy Marine^{1,2}  · Kleinclauss Alexandra^{1,2} · Grandemange Stéphanie^{1,2} · Hupont Sébastien⁵ · Boisbrun Michel^{3,4} · Flament Stéphane^{1,2} · Grillier-Vuissoz Isabelle^{1,2} · Kuntz Sandra^{1,2}

Received: 11 May 2017 / Accepted: 1 July 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract

Purpose 40% of triple-negative breast cancer (TNBC) do not express claudin-1, a major constituent of tight junction. Patients with these “claudin-1-low” tumors present a higher relapse incidence. A major challenge in oncology is the development of innovative therapies for such poor prognosis tumors. In this context, we study the anticancer effects of $\Delta 2$ -TGZ, a compound derived from troglitazone (TGZ), on cell models of these tumors.

Methods and results In MDA-MB-231 and Hs578T “claudin-1-low” TNBC cells, $\Delta 2$ -TGZ treatment induced claudin-1 protein expression and triggered apoptosis as measured by FACS analysis (annexin V/PI co-staining). Interestingly, in the non-tumorigenic human breast epithelial cell line MCF-10A, the basal level of claudin-1 was not modified following $\Delta 2$ -TGZ treatment, which did

not induce apoptosis. Furthermore, claudin-1-transfected MDA-MB-231 and Hs578T cells displayed a significant increase of cleaved PARP-1 and caspase 7, caspase 3/7 activities, and TUNEL staining. RNA interference was performed in order to inhibit $\Delta 2$ -TGZ-induced claudin-1 expression in both the cells. In absence of claudin-1, a decrease of cleaved PARP-1 and caspase 7 and caspase 3/7 activities were observed in MDA-MB-231 but not in Hs578T cells.

Conclusion Claudin-1 overexpression and $\Delta 2$ -TGZ treatment are associated to apoptosis in MDA-MB-231 and Hs578T “claudin-1-low” TNBC. Moreover, in MDA-MB-231 cells, claudin-1 is involved in the pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ. Our results suggest that claudin-1 re-expression could be an interesting therapeutic strategy for “claudin-1-low” TNBC.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s10549-017-4378-2](https://doi.org/10.1007/s10549-017-4378-2)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Grillier-Vuissoz Isabelle
isabelle.grillier-vuissoz@univ-lorraine.fr

- ¹ Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France
- ² CNRS, CRAN, UMR 7039, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France
- ³ Université de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France
- ⁴ CNRS, SRSMC, UMR 7565, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France
- ⁵ CNRS, FR3209 Biologie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique (BMCT), Plateforme d’Imagerie Cellulaire et Tissulaire PTIBC-IBISA, Biopôle de l’Université de Lorraine, Campus Biologie-Santé, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Keywords Triple-negative breast cancer · Apoptosis · Claudin-1 · Troglitazone derivatives

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women and represents the most lethal malignancy across the world after lung cancer [1]. Three major groups of tumors can be identified using the presence or the lack of three biomarkers: luminal tumors that express estrogen receptor alpha (ER α) and progesterone receptor (PR), HER2 “enriched” tumors that overexpress human EGF receptor 2 (HER2), and triple-negative breast cancer (TNBC) that do not express ER α , PR, and HER2 [2]. These markers allowed the development of hormone therapies against estrogen-sensitive tumors and targeted therapies against HER2 overexpressing tumors [3]. Unfortunately, no

Gene name	Genbank	Description	Fold induction	p value
CLDN1	NM_021101	claudin 1	19.19	0.0001
CLDN2	NM_020384	claudin 2	1.01	0.8510
CLDN3	NM_001306	claudin 3	0.84	0.0088
CLDN4	NM_001305	claudin 4	1.02	0.8412
CLDN7	NM_001307	claudin 7	1.19	0.0018
CLDN8	NM_199328	claudin 8	0.95	0.1931
OCLN	NM_002538	occludin	1.47	0.0037
TJP1	NM_003257	tight junction protein 1 (zonula occludens 1)	1.23	0.0898
CDH1	NM_004360	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	0.92	0.0950
CDH2	NM_001792	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	1.14	0.0934
CTNNB1	NM_001904	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	1.15	0.0772

Supplementary data.1 Changes in expression level of genes related to cell adhesion and associated with cancer progression in $\Delta 2$ -TGZ-treated MCF-7 cells after microarray analysis

specific therapy is available for TNBC. The latter accounts for 15–20% of breast cancers and is more common in young women [4]. TNBC can be particularly aggressive and has a higher risk of recurrence as compared to other subtypes of breast cancer. In 40% of TNBC, the expression of claudin-1, a major constituent of tight junctions, has been shown to be absent or strongly diminished [5, 6]. Most studies reported that a loss of claudin-1 expression correlates with increased malignant potential and invasiveness associated with recurrence of disease in invasive breast carcinoma patients and specifically those with TNBC [7–9]. In tight junction, occludins and junctional adhesion molecules (JAMs) are also present. However, claudins constitute the backbone of tight junctions, and have been shown to be capable to reconstitute tight junction in mouse fibroblasts lacking them [10, 11]. They play crucial roles in the maintenance of cell adhesion, cell polarity, and regulation of paracellular permeability. Although the role of claudin-1 in breast cancer is not clearly defined, several *in vitro* studies suggested that claudin-1 functions as a tumor suppressor [12]. Indeed, downregulation of claudin-1 was associated with increased motility of non-invasive T-47D breast cancer cells [13] and with neoplastic transformation of mammary epithelial MCF-12A cells [14]. Re-expression of claudin-1 was shown to be sufficient to induce apoptosis in MDA-MB-361 breast cancer cells [15]. In fact, its potential role in apoptosis remains controversial since some studies described an anti-apoptotic effect of claudin-1 in luminal MCF-7 breast cancer cell line [16, 17]. Recently, it was reported in MCF-7 breast cancer cells that claudin-1 increased the sensitivity to tamoxifen, etoposide, and cisplatin [18]. Taken together, these data led us to hypothesize that claudin-1 re-expression could constitute a new therapeutic option in “claudin-1-low” TNBC.

In the search for potential anticancer agents, numerous studies focused on thiazolidinediones (TZD), a family of synthetic compounds including rosiglitazone (RGZ), troglitazone (TGZ), and pioglitazone (PGZ). Although these agonists of PPAR γ were initially developed for their anti-diabetic properties, they also present anti-tumoral activity not only *in vitro* but also *in vivo* [19]. Moreover, several trials showed an overall lower incidence of cancer in diabetic patients treated with TZD [20, 21]. On liposarcoma, TGZ-induced terminal adipocytic differentiation of the tumor and on advanced prostate cancer; a phase II trial showed that TGZ treatment stabilized the prostate-specific antigen (PSA) [22]. Recently, on chronic myeloid leukemia (CML), a phase II trial has resulted in a renewed interest in the TZD treatment. These studies provided evidence that a combination with imatinib and PGZ improved the erosion of cancer stem cells pool in CML patients [23]. Although TZD have revolutionized the

treatment of diabetes, the clinical use has been limited due to its side effects. In 2000, TGZ was withdrawn from the market because it was associated with the development of acute liver failure [24]. In this context, we synthesized Δ 2-TGZ, a TGZ derivative with a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring and devoid of PPAR γ activity [25]. We have demonstrated that Δ 2-TGZ exhibits a lower toxicity towards human non-malignant hepatocytes in primary culture than TGZ and an improved anti-proliferative activity compared to TGZ on breast cancer cell lines [25, 26]. Moreover, the TNBC “claudin-1-low” cell line MDA-MB-231 was more sensitive to Δ 2-TGZ than the luminal MCF-7 cells [27]. Recently, we showed that Δ 2-TGZ-induced apoptosis in luminal MCF-7 and TNBC MDA-MB-231 cells as illustrated by DNA fragmentation, dysfunctional mitochondria, cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), and caspase 7 [28].

Nevertheless, the molecular mechanisms involved in Δ 2-TGZ-induced apoptosis remain to be elucidated. In order to better understand Δ 2-TGZ mechanism of action, we previously used a microarray approach on the breast cancer cell line MCF-7 [28]. Among 33,297 genes, claudin-1 was the most upregulated gene after 12 h of treatment (Supplementary data. 1). Based on this important data, we aimed to determine whether claudin-1 re-expression could be involved in Δ 2-TGZ-induced apoptosis in TNBC cells. In the present study, we demonstrated that Δ 2-TGZ-induced apoptosis and claudin-1 protein expression in MDA-MB-231 and Hs578T “claudin-1-low” TNBC cells, but not in the non-tumorigenic human breast epithelial cell line MCF-10A. Furthermore, we showed that claudin-1 overexpression plays an important role in apoptosis in MDA-MB-231 and Hs578T cells. Concerning Δ 2-TGZ-induced apoptosis, we showed that claudin-1 is involved in MDA-MB-231 cells but not in Hs578T cells suggesting a different mechanism of action.

Materials and methods

Materials

The experimental procedures for the synthesis of Δ 2-TGZ were performed as described previously [25]. TGZ and RGZ were obtained from ChemScene and Interchim, respectively. The small-interfering RNA (siRNA) duplexes for targeting claudin-1, non-specific control siRNA, and plasmid pcDNA3.1/Zeo were purchased from ThermoFisher Scientific. The human breast cancer cell lines MDA-MB-231, Hs578T, and MCF-10A were purchased from the American Type Culture Collection. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (DMEM/F12), RPMI Medium 1640

(RPMI), Trypsin–EDTA, and PBS were purchased from Life technologies. Ethanol (EtOH), dimethylsulfoxide (DMSO), fetal calf serum (FCS), L-glutamine, horse serum, bovine insulin, human epidermal growth factor (hEGF), cholera toxin, and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

Methods

Cell culture and treatment

The human breast cancer cell lines and the non-tumorigenic human breast epithelial cell line were cultured at 37 °C under 5% CO₂. MDA-MB-231 cells were cultured in phenol red RPMI respectively, supplemented with 10% FCS, and 2 mM L-glutamine. Hs578T cells were grown in DMEM medium containing phenol red supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and 10 µg/mL bovine insulin. MCF-10A cells were grown in DMEM/F12 supplemented with 5% horse serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10 µg/mL bovine insulin, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 100 ng/mL cholera toxin, and 20 ng/mL hEGF. Cells were treated with 0.01% DMSO (vehicle) or various concentrations of TGZ, RGZ, and Δ2-TGZ in 1% FCS containing medium. All these compounds were dissolved at 50 mM in sterile DMSO and were stored at –20 °C.

Transient plasmid transfection assays

MDA-MB-231 (4.10⁵ cells/well) and Hs578T (16.10⁴ cells/well) cells were seeded in 6-well culture plates and transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1 containing a human claudin-1 expression vector (2.5 µg/well). Transfections were performed using TransIT-LT1 (Euromedex) according to the manufacturer's protocol.

RNA interference

MDA-MB-231 (4.10⁵ cells/well) and Hs578T (16.10⁴ cells/well) cells were plated in 6-well culture plates. For the transient transfection procedure, cells were grown to 70% confluence and claudin-1 siRNAs cocktail (150 nM) or control scRNAs (150 nM) were transfected using the Oligofectamine™ Reagent (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. siRNAs sequences against human claudin-1 were 5'-GCAAUA-GAAUCGUUCAAGA-3', 5'-GGCAUGAAGUGUAU-GAAGU-3', 5'AGAAUUCUAUGACCUAUG-3' and 5'-ACGAUGAGGUGCAGAAGAU-3'.

Western immunoblotting

MDA-MB-231 (4.10⁵ cells/well), Hs578T (16.10⁴ cells/well) and MCF-10A (3.10⁵ cells/well) cells were seeded in 6-well plates. After 24 h of treatment or 48 h of transfection, western blot experiment was performed as described previously [28]. The antibodies raised against cleaved PARP-1 (552596, BD Biosciences) and caspase 7 (9494, Cell Signaling Technology) were diluted at 1:1000. The antibody against alpha-tubulin (EP1332Y, Epitomics) was used diluted at 1:4000. The polyclonal antibody against claudin-1 (C538-02C, Euromedex) was used diluted at 1:800. Membranes were probed with appropriate horse-radish peroxidase-conjugated secondary antibodies (SC-2005 for mouse antibody and SC-2004 for rabbit antibody, Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. The immunostaining was observed using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories). Quantification of band intensity was performed using Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as described previously [28]. The monoclonal antibody against claudin-1 (CB1046, Calbiochem) was diluted at 1:200, and the polyclonal antibody against occludin (13409-1-AP, Proteintech) was diluted at 1:100. Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG antibody (A-21422, Invitrogen) was used diluted at 1:1000, and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (A-11008, Invitrogen) was used diluted 1:500. Confocal observations of samples were carried out with a LEICA TCS SPX AOBs CLSM. Images at a 0.282 µm sidelength square pixel size were obtained for each case in 1024 × 1024 matrices at ×40 magnification (numerical aperture = 0.8) of the CLSM. Fluorescence emissions were recorded within an Airy disk confocal pinhole setting (Airy 1). Each channel was acquired sequentially. The first channel detection (occludin) was set from 502 to 545 nm with a 486 nm excitation laser lines. The second channel detection (claudin-1) was set from 565 to 640 nm with a 555 nm excitation laser line. The third channel detection (DRAQ 5, Cell signaling, #4084) was set from 683 to 730 nm with a 650 nm excitation laser line. Confocal 3D Acquisitions (xyz) were performed by a z-axis projection maximum intensity mode on 6 micron thick of each condition.

Caspase 3/7 activity

Caspase 3 and 7 activities were measured using luminescent Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega). MDA-MB-231 (16.10³ cells/well) and Hs578T (6.10³ cells/well) cells

were plated in 96-well white culture plates (356,651, Corning), and experiments were performed according to manufacturer's instructions.

TUNEL assay

Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated UTP Nick End Labeling assays were performed as described previously [28]. Hoechst stain used for TUNEL assay was Hoechst 33342 (Abcam).

Flow cytometry

After treatment (24 or 48 h), culture medium containing non adherent cells was collected. Adherent cells were then washed with PBS, trypsinized, and resuspended in medium containing 1% FCS. Non-adherent cells and trypsinised cells were pooled. After centrifugation (5 min at 1000 rpm), cells were washed twice with PBS, and were resuspended at 1.10^6 cells/mL in binding buffer 1X (10 mM Hepes (pH 7.4), 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl_2). Then, 2.5 μL FITC-Annexin V (556419, BD Biosciences) and 2.5 μL propidium iodide (PI) at 1 mg/mL (P3566, Life technologies) were added to 100 μL of cells for 15 min in the dark at room temperature. Finally, 200 μL of binding buffer 1X was added. The apoptotic cells were determined by FITC-Annexin V and PI combined fluorescence levels using a FACScalibur flow cytometer (Becton–Dickinson), and the 488 nm line of an argon laser was used to excite the dye. For each treatment, fluorescence intensity of 10,000 cells was analyzed using CellQuest Pro Software.

Statistical analysis

The results of each experiment were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of three to six different experiments. Bars represent mean \pm SEM. Statistical differences in western blotting, flow cytometry, caspase 3/7 activity, and TUNEL assay were determined using Student's *t* test. Differences in which *P* was less than 0.05 were statistically significant (SPSS v11.0 Computer Software).

Results

$\Delta 2$ -TGZ induces claudin-1 expression and apoptosis in MDA-MB-231 and Hs578T “claudin-1-low” TNBC cells

Since $\Delta 2$ -TGZ induces claudin-1 expression in MCF-7 breast cancer cell line (Supplementary data. 1), we

investigated if $\Delta 2$ -TGZ allowed claudin-1 re-expression in MDA-MB-231 and Hs578T “claudin-1-low” TNBC cells. We exposed these cells to 20 μM of $\Delta 2$ -TGZ or TGZ, a dose that was just above the cell viability IC_{50} value that we previously measured in MDA-MB-231 cells [27]. After 24 h of treatment, an increase of claudin-1 protein expression was only observed in response to $\Delta 2$ -TGZ in TNBC cells (Fig. 1a). This claudin-1 induction was associated with apoptosis of MDA-MB-231 and Hs578T cells in response to 24 and 48 h of $\Delta 2$ -TGZ treatment measured by Annexin V/PI co-staining (Fig. 1b). In MDA-MB-231 cells, Annexin V/PI co-staining was significantly stimulated: 1.64-fold and 3.59-fold at 24 and 48 h, respectively. We also found a similar result in Hs578T cells: 2.79-fold and 4.26-fold at 24 and 48 h, respectively (Fig. 1b). Used at the same dose, RGZ did not modify claudin-1 expression.

In non-tumorigenic human breast epithelial cell line MCF-10A, at 24 and 48 h of $\Delta 2$ -TGZ treatment, claudin-1 protein was not modulated, and the percentage of apoptotic cells was not significantly different from control cells (Fig. 1).

Claudin-1 localization in response to $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 and Hs578T cells

Claudin-1 localization has been studied in cancers, showing that membrane relocalization of claudin-1 induces apoptosis [15, 29]. Here, claudin-1 localization was studied by immunofluorescence in MDA-MB-231 and Hs578T cells in response to $\Delta 2$ -TGZ (Fig. 2). In control cells, a low basal level of claudin-1 was observed in both cell lines according to molecular profile of “claudin-1-low” subtype. In response to $\Delta 2$ -TGZ, fluorescence intensity was increased in both cell lines after 24 h of treatment that was in accordance with our western blot analysis. We observed elongated cells which displayed a punctiform signal in the cytoplasm and/or at the membrane in MDA-MB-231 and Hs578T cells. Some MDA-MB-231 cells were round-shaped and appeared entering in the apoptotic process. They presented also a punctiform claudin-1 labeling but with a perinuclear location (Fig. 2).

Claudin-1 overexpression leads to apoptosis in MDA-MB-231 and Hs578T cells

We hypothesized that claudin-1 could be involved in the apoptosis of TNBC. In this purpose, we overexpressed claudin-1 in both cell lines and studied apoptosis by several methods. First, we performed a western blot analysis of two apoptosis markers: cleaved caspase 7 and cleaved PARP-1. Claudin-1-transfected MDA-MB-231 cells displayed a significant increase of cleaved PARP-1 and

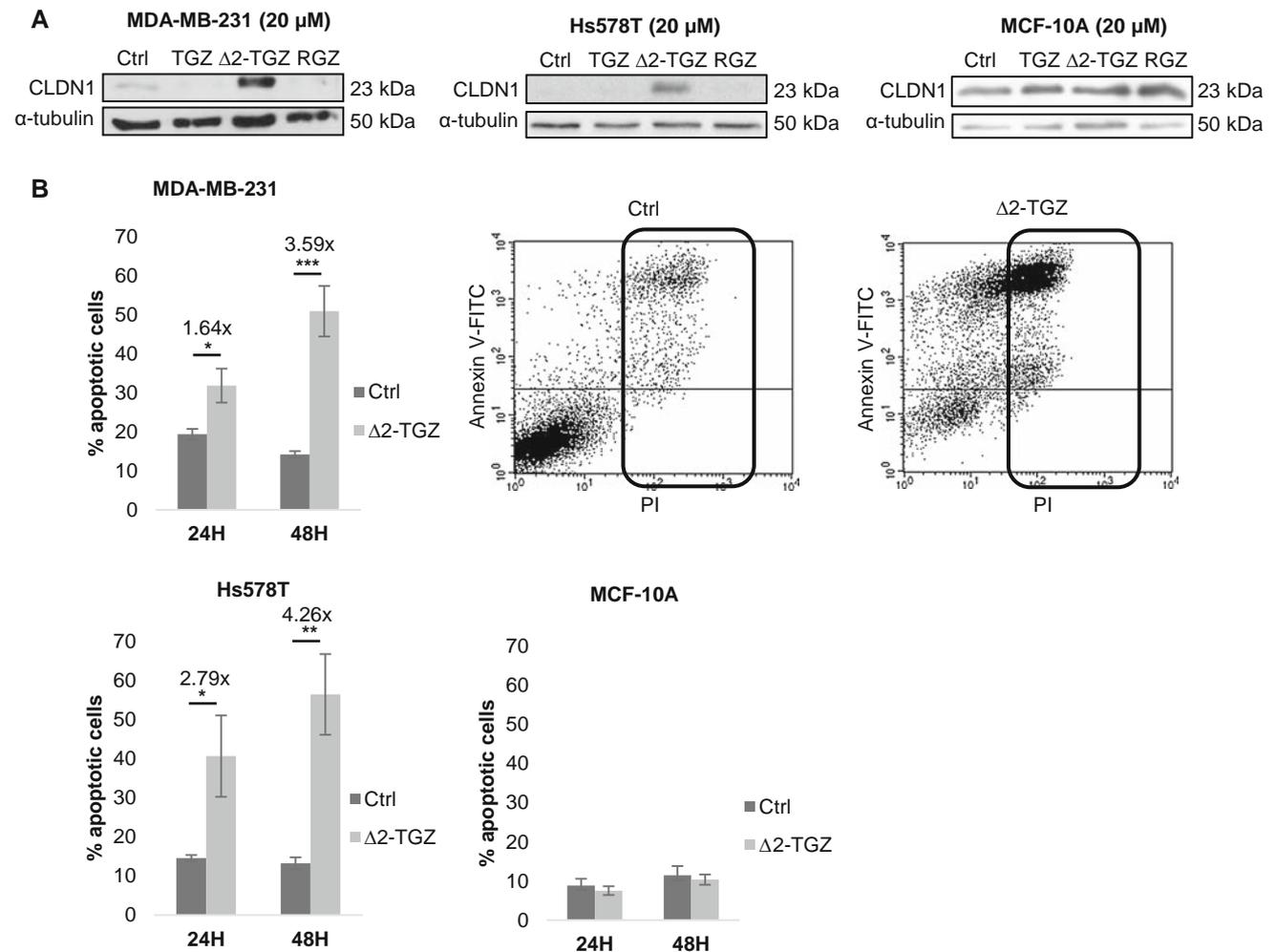


Fig. 1 Δ 2-TGZ induces claudin-1 expression and apoptosis in TNBC cells. **a** MDA-MB-231 and Hs578T TNBC “claudin-1-low” cells, and the non-tumorigenic human breast epithelial cell line MCF-10A were treated with 20 μ M of TGZ, RGZ, Δ 2-TGZ, or DMSO (Ctrl) for 24 h and subjected to western blot analysis with claudin-1 (CLDN1) antibody. α -tubulin was used as loading control. **b** After treatment for 24 and 48 h with DMSO (Ctrl) or 20 μ M of Δ 2-TGZ, MDA-MB-231,

Hs578T, and MCF-10A cells were co-stained with FITC-Annexin V/PI and analyzed by FACS. The percentage of total apoptotic cells corresponds to Annexin V positive cells and Annexin V/PI positive cells (*dot plot*). The values represent the mean \pm SEM of 3–6 different experiments. Student-*t* test was used to determine significant difference from control cells, were **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001

cleaved caspase 7 (2.53-fold and 4.56-fold, respectively) (Fig. 3a). Similar results were obtained in Hs578T cells: 1.59-fold and 3.72-fold for cleaved PARP-1 and cleaved caspase 7, respectively (Fig. 3a). In addition, caspase 3/7 activity was increased: 1.27-fold and 1.34-fold for claudin-1-transfected MDA-MB-231 and Hs578T cells, respectively (Fig. 3b). These data were confirmed by TUNEL assay in both cell lines (Fig. 4). Representative images of the experiments are shown in Fig. 4a. An increase of TUNEL positive cells and a significant decrease of Hoechst positive cells were observed in MDA-MB-231 and Hs578T cells overexpressing claudin-1 (Fig. 4b). These two parameters allowed to calculate the percentage of apoptotic cells which increased 2.16-fold and 3.56-fold for claudin-1-

overexpressing MDA-MB-231 and Hs578T cells, respectively (Fig. 4c).

Claudin-1 is involved in Δ 2-TGZ-triggered apoptosis of MDA-MB-231 cells

Since claudin-1 was involved in apoptosis of TNBC cells, we supposed that claudin-1 played a role in Δ 2-TGZ proapoptotic effect. To test this hypothesis, we performed RNA interference targeting claudin-1 in MDA-MB-231 and Hs578T cells and then studied the effect of Δ 2-TGZ. The claudin-1 signal was strongly diminished in siRNA transfected cells compared to scramble transfected cells: 2.99-fold in MDA-MB-231 and 1.98-fold in Hs578T. In

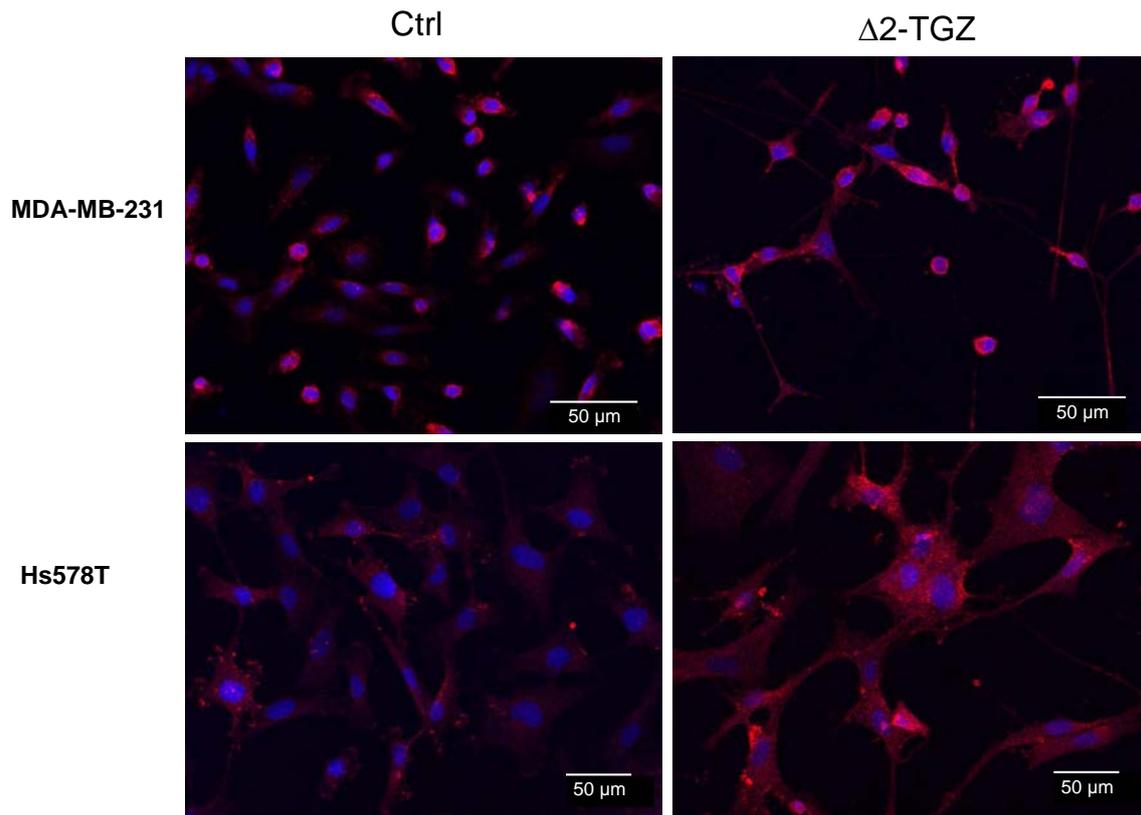


Fig. 2 Claudin-1 localization in response to $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 and Hs578T cells. After treatment for 24 h with DMSO (Ctrl) or 20 μ M of $\Delta 2$ -TGZ, immunofluorescence staining for claudin-1 was performed in MDA-MB-231 and Hs578T cells. DRAQ 5 staining was used for visualization of the nuclei. Cells were observed by confocal microscopy with magnification from $\times 400$ for Hs578T to $\times 536$ for

MDA-MB-231 depending on digital confocal zooming combine with $\times 40$ objective (NA 0.8). The z -axis projection on 6 micron thick of each condition is presented. Merged pictures show an increase of punctiform signal of claudin-1 staining in $\Delta 2$ -TGZ-treated cells. Bar represents 50 μ m

absence of claudin-1 expression, the cleavage of PARP-1 and caspase 7 was significantly reduced in MDA-MB-231 cells treated with $\Delta 2$ -TGZ: 1.88-fold and 1.96-fold, respectively. No significant difference was observed in Hs578T cells (Fig. 5a). These results were confirmed by caspase 3/7 activity measurements that showed a 1.58-fold decrease in MDA-MB-231 cells. In accordance with the results of western blot analysis, no significant change was observed in caspase 3/7 activity in Hs578T cells (Fig. 5b).

Discussion

In breast cancer, the TNBC subtype with a low level of claudin-1 constitutes a challenge in oncology. Indeed, “claudin-1-low” TNBC patients display a low life expectancy [9]. Its downregulation is associated with the most aggressive tumors [7–9]. Besides, there is a lack of therapeutic tools for TNBC patients. In this context, we studied $\Delta 2$ -TGZ, a TGZ derivative, that we have previously shown to induce apoptosis of MDA-MB-231 cells, a model of

“claudin-1-low” TNBC [28]. The aim of this work was to determine if this compound could allow claudin-1 re-expression in TNBC cell lines and if claudin-1 was involved in $\Delta 2$ -TGZ-triggered apoptosis.

We first showed an increase of claudin-1 protein level in MDA-MB-231 and Hs578T TNBC cells in response to $\Delta 2$ -TGZ treatment, but not to TGZ and RGZ. This result was confirmed by immunofluorescence staining for claudin-1. This is the first report of claudin-1 upregulation by $\Delta 2$ -TGZ, a derivative devoid of PPAR γ activity, in breast cancer cells. Moreover, TGZ and RGZ, two PPAR γ agonists, had no effect on claudin-1 protein level in breast cancer cells. This result is different from those obtained in human nasal epithelial cells where RGZ and TGZ-induced activation of PPAR γ and tight junction proteins expression such as claudin-1, claudin 4, and occludin, enhancing barrier function [30]. In the same way, a combined treatment of human urothelial cells with both TGZ and PD153035, an EGF pathway inhibitor, induced their differentiation, which was accompanied by a slight upregulation of claudin-1 and 7 expression and their relocalization

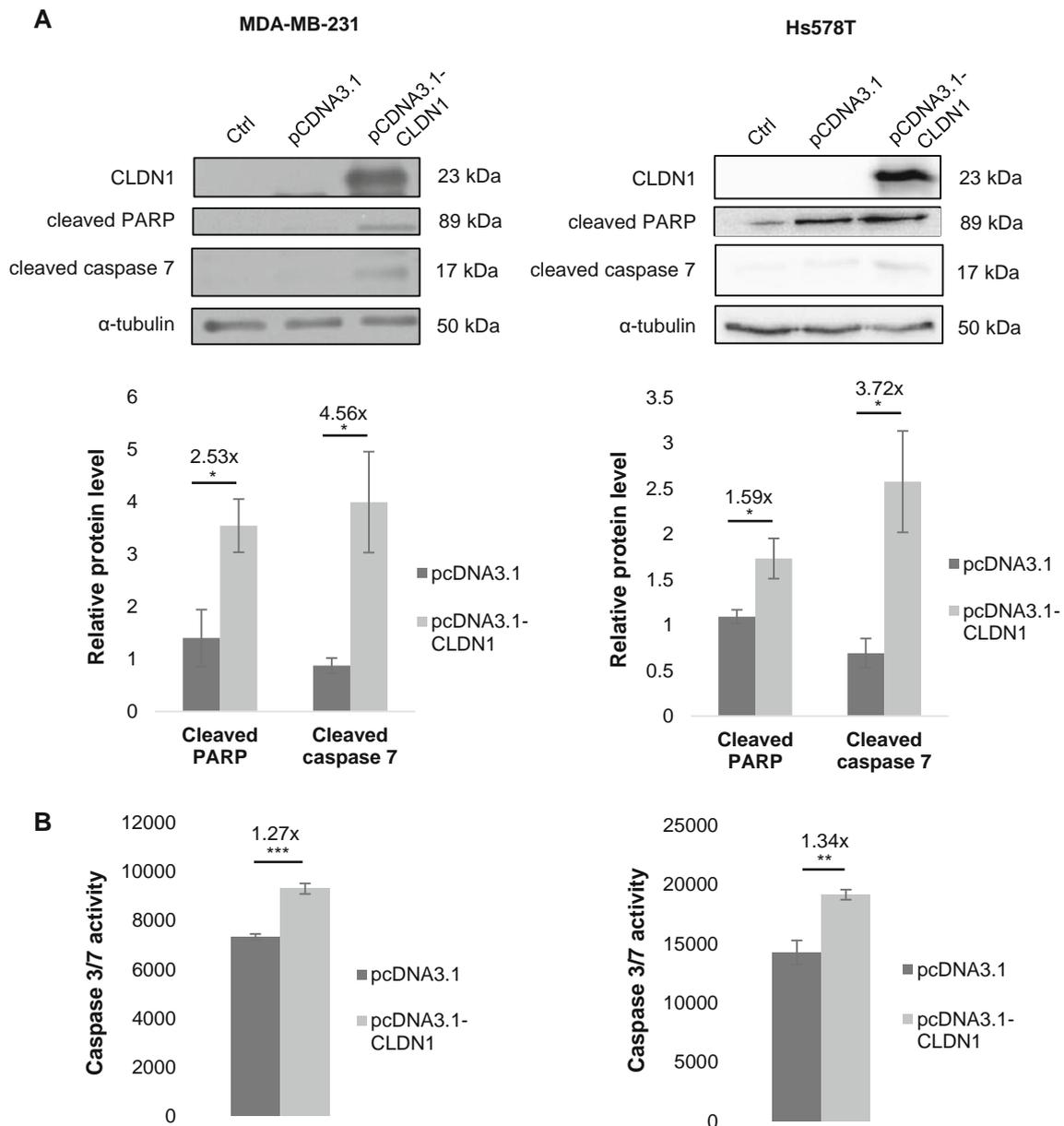


Fig. 3 Overexpression of claudin-1 induces apoptosis in TNBC cells. MDA-MB-231 and Hs578T cells were transiently transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1 containing a human claudin-1 expression vector (pcDNA3.1-CLDN1). After 48 h, the cells were subjected to western blot and caspase 3/7 activity analysis. **a** Western blot analysis was performed with antibodies recognizing claudin-1 (CLDN1), cleaved PARP-1 (PARP), and cleaved caspase 7. α -tubulin was used as loading control. Relative protein level corresponds to claudin-1, cleaved PARP-1, and cleaved caspase 7 band intensity value adjusted

to α -tubulin for pcDNA3.1 and pcDNA3.1-CLDN1. The values represent the mean \pm SEM of 4–5 different experiments. Student-*t* test was used to determine significant difference from control cells, were * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. **b** Caspase 3/7 activity was measured for pcDNA3.1 and pcDNA3.1-CLDN1 MDA-MB-231 and Hs578T-transfected cells. The values represent the mean \pm SEM of 4–5 different experiments. Student-*t* test was used to determine significant difference from control cells, were * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

to tight junction [31]. TGZ also increased dose-dependently the expression of claudin 4 in pancreatic cancer cells in a PPAR γ -independent way [32, 33].

Another important finding of this study was that we observed a correlation between claudin-1 expression and pro-apoptotic effect in response to $\Delta 2$ -TGZ. In addition to

the induction of claudin-1 expression, $\Delta 2$ -TGZ-induced a pro-apoptotic effect in MDA-MB-231 and Hs578T cells. This latest result was in agreement with our previous data in MDA-MB-231 cells [28]. In contrast, no pro-apoptotic effect was observed on non-tumorigenic human breast epithelial cell line MCF-10A where no increase of claudin-

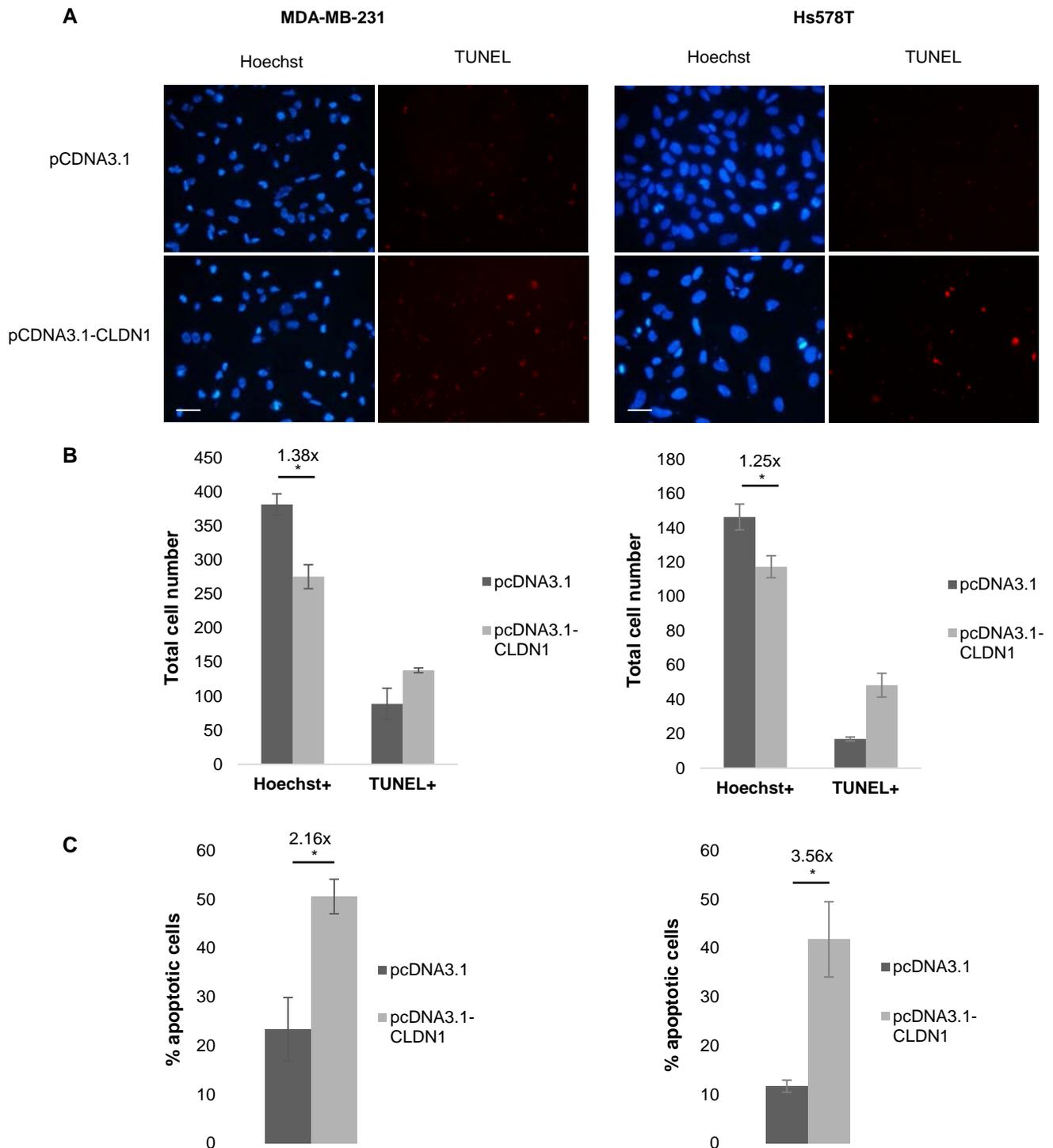


Fig. 4 TUNEL positive cells in MDA-MB-231 and Hs578T cells overexpressing claudin-1. MDA-MB-231 and Hs578T cells were transiently transfected with pCDNA3.1 or pCDNA3.1 containing a human claudin-1 expression vector (pCDNA3.1-CLDN1). After 48 h, cells were subjected to TUNEL assay and counterstained using Hoechst staining. **a** Representative images of the TUNEL assay. **b** Hoechst positive cells and TUNEL positive cells were counted. The

total number of Hoechst positive cells and total number of TUNEL positive cells were counted from at least five images from each sample. The values represent the mean \pm SEM of 3 different experiments. **c** Percentage of TUNEL positive cells. Student-*t* test was used to determine significant difference from control cells, were * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Bar represents 50 μ m

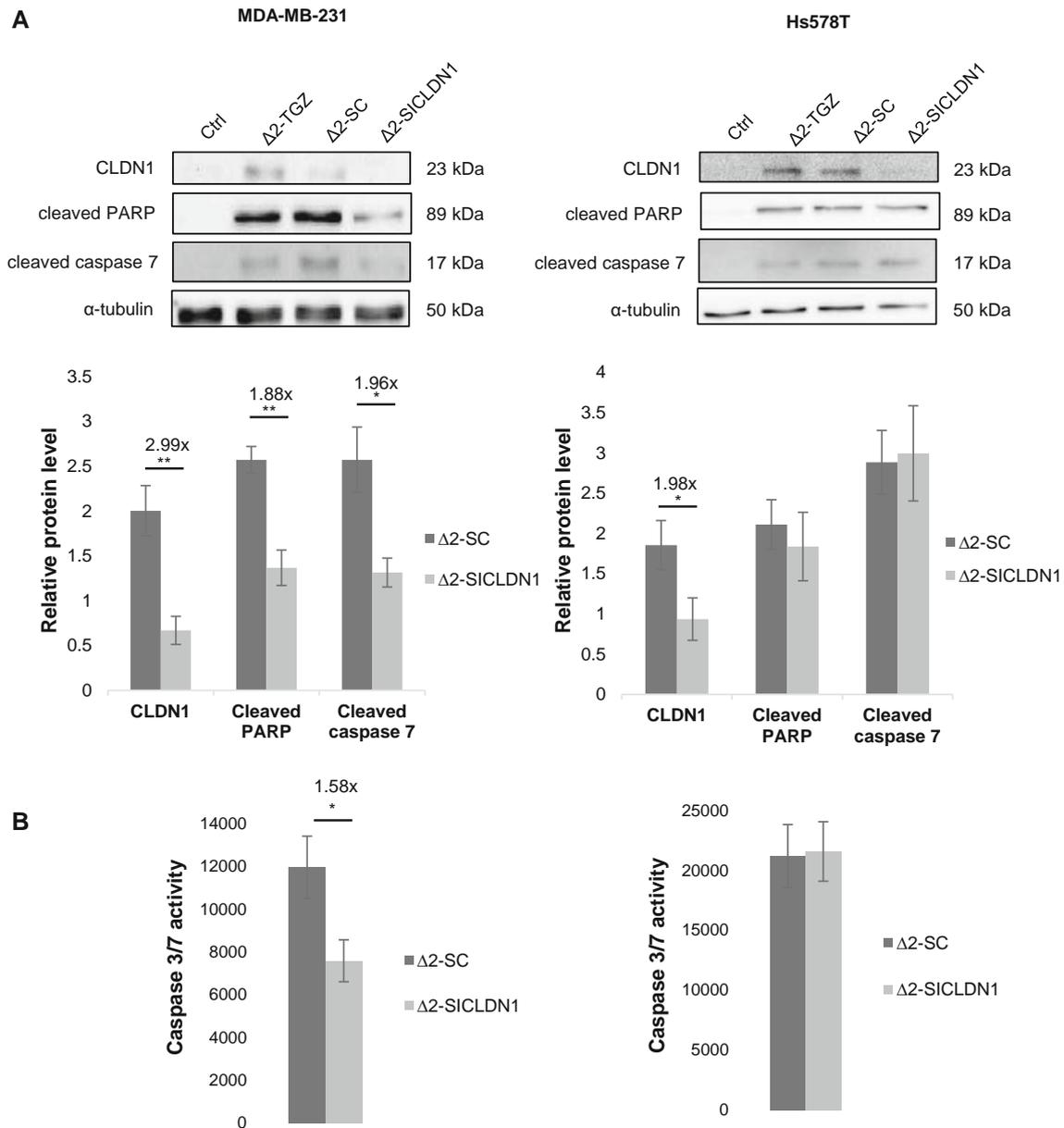


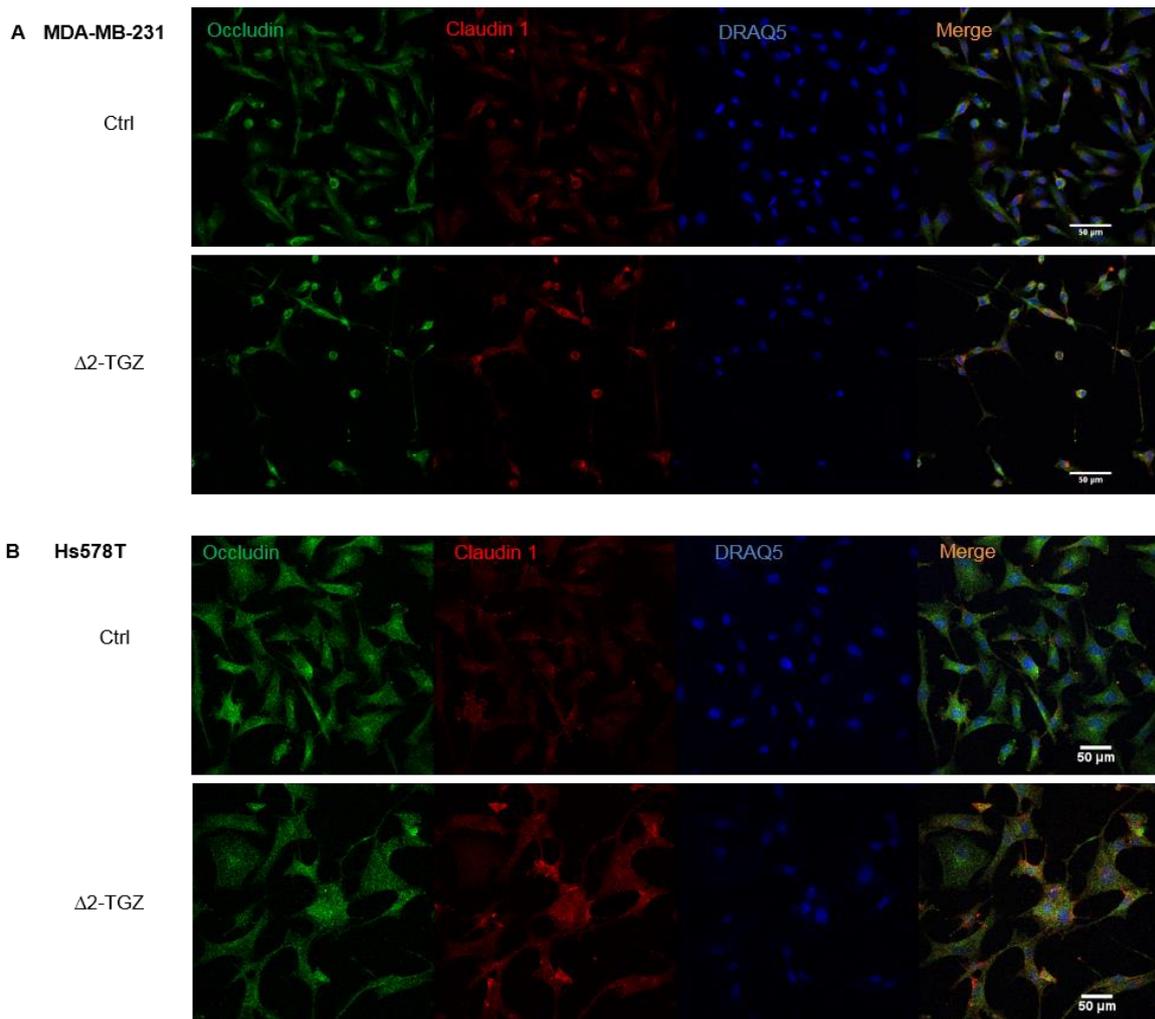
Fig. 5 Claudin-1 knockdown prevents $\Delta 2$ -TGZ pro-apoptotic effect in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 and Hs578T cells were transiently transfected with claudin-1 siRNA (SICLDN1) or a scramble siRNA (SC) and treated with 20 μ M of $\Delta 2$ -TGZ. As control, untransfected cells were treated with DMSO (Ctrl) or $\Delta 2$ -TGZ. After 24 h of treatment, cells were subjected to western blot and caspase 3/7 activity analysis. **a** Western blot analysis was performed with antibodies recognizing claudin-1 (CLDN1), cleaved PARP-1, and cleaved caspase 7. α -tubulin was used as loading control. Relative protein level corresponds to claudin-1, cleaved PARP-1 (PARP) and

cleaved caspase 7 band intensity value adjusted to α -tubulin for $\Delta 2$ -SC and $\Delta 2$ -SICLDN1. The values represent the mean \pm SEM 4–6 different experiments. Student-*t* test was used to determine significant difference from control cells, were * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001. **b** Caspase 3/7 activity was measured for MDA-MB-231 and Hs578T SICLDN1 and SC transfected cells treated to $\Delta 2$ -TGZ. The values represent the mean \pm SEM of 4–6 different experiments. Student-*t* test was used to determine significant difference from control cells, were * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001

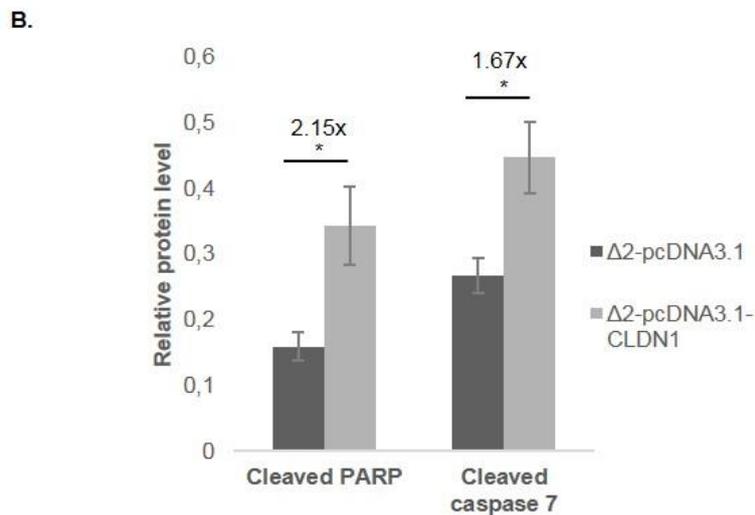
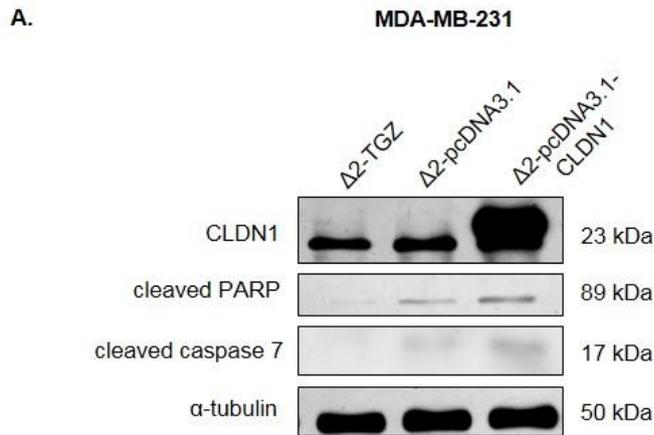
1 protein was detected. In fact, the basal level does not change.

These results have led us to analyze the specific effect of claudin-1 on apoptosis in TNBC. We also found that claudin-1 overexpression stimulated apoptosis in TNBC cells independently of $\Delta 2$ -TGZ treatment. Our data are in

agreement with two studies reporting that claudin-1 induced apoptosis in breast cancer cells [15, 29]. Nevertheless, claudin-1 could also be associated to an anti-apoptotic effect on MCF-7 cells (ER+) [16, 17]. We hypothesized that claudin-1 re-expression could be involved in pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ on TNBC



Supplementary data.2 Claudin 1 and occludin co-localization in response to $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 and Hs578T cells. After treatment for 24 h with DMSO (Ctrl) or 20 μM of $\Delta 2$ -TGZ, immunofluorescence staining for claudin 1 and occludin were performed in MDA-MB-231 and Hs578T cells. DRAQ5 staining was used for visualisation of the nuclei. **a-b** Cells were observed by confocal microscopy with magnification from x400 for Hs578T to x536 for MDA-MB-231 depending of digital confocal zooming combine with x40 objective (NA 0.8). One confocal z section of cell of each condition is presented. Claudin 1 staining is upregulated and punctiform in both cell lines. Occludin staining is upregulated only in MDA-MB-231 cells and colocalized with claudin 1. Bar represents 50 μm



Supplementary data.3 Increase apoptosis in MDA-MB-231 cells overexpressing claudin 1 with $\Delta 2$ -TGZ. MDA-MB-231 cells were transiently transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1 containing a human claudin 1 expression vector (pcDNA3.1-CLDN1) and treated with 20 μ M of $\Delta 2$ -TGZ. After 48 h of transfection and 24 h of treatment, cells were subjected to western blot analysis. **a** Western blot analysis was performed with antibodies recognizing claudin 1 (CLDN1) cleaved PARP-1 and cleaved caspase 7. α -tubulin was used as loading control. **b** Relative protein level corresponds to claudin 1, cleaved PARP-1 (PARP) and cleaved caspase 7 band intensity value adjusted to α -tubulin for $\Delta 2$ pcDNA3.1 and $\Delta 2$ -pcDNA3.1-CLDN1. The values represent the means \pm SEM 5 different experiments. Student-t test was used to determine significance difference from control cells, were * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

cells. For this purpose, we treated the cells with siRNA directed against claudin-1. In MDA-MB-231 cells, we observed a slight but not significant decrease of claudin-1, when the cells were treated with the scramble RNA (data not shown), while a significant effect was observed between SC and SICLDN1 cells. Our results clearly show a correlation in MDA-MB-231 cells since claudin-1 siRNA significantly decreased the apoptotic response to $\Delta 2$ -TGZ. Nevertheless, no significant correlation was observed in Hs578T cells suggesting a different mechanism of action. In order to explain this difference, we can speculate that claudin-1 localization could be different. Indeed, Hoevel et al. have described in the “claudin-1-low” MDA-MB-361 that the membrane relocalization of claudin-1 was associated with apoptosis [15]. By immunofluorescence, we observed an upregulation of claudin-1 staining in response to $\Delta 2$ -TGZ in both cell lines but we could not observe obvious difference in the claudin-1 localization. Then, we characterized claudin-1 co-expression and localization with occludin in both cell lines. Occludin is an important partner of claudin-1 in tight junction. We observed that in MDA-MB-231 both protein were colocalized and upregulated, while in Hs578T no up regulation of occludin was observed (Supplementary data. 2). The evidence do not prove that occludin is directly involved but suggested an important role of partners of claudin-1 in the apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ. In fact, according to the cell line, involvement of claudin-1 in $\Delta 2$ -TGZ apoptotic effect depends probably on claudin-1 localization and its interaction with other membrane co-factors such as occludin. For instance, in normal mammary epithelial cell line EpH4, a treatment with a claudin-disrupting mimetic peptide, DFYNP (aspartic acid-phenylalanine-tyrosine-asparagine-proline), induces apoptosis through caspase 3 activation. Claudin 4 and occludin were mislocalized in non-junctional puncta, and both molecules were found in the death-inducing signaling complex (DISC) [34]. Moreover, Fas receptor recruitment by claudin-1 at the membrane is important for enhancing cisplatin-induced apoptosis by the extrinsic pathway in epithelial cancer cells KLE and HepG2 [35].

Our study suggests that the strategy of claudin-1 re-expression could be a potential therapeutic option for the aggressive TNBC “claudin-1-low” subtype. In order to comfort our hypothesis, this study needs to be extended in vivo by xenograft experiments on mice model. Interestingly, we demonstrated that claudin-1 overexpression potentialize pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 cells (Supplementary data. 3). Moreover, our preliminary data suggest that claudin-1 re-expression restores the sensitivity of resistant TNBC “claudin-1-low” to a classical chemotherapy agent. These perspectives are encouraging and are currently under investigation to be consolidated.

Acknowledgements This work was supported by grants of the “Université de Lorraine,” the “Conseil Régional du Grand Est,” and the “Ligue Contre le Cancer.” Marine Geoffroy was recipient of a PhD grant of the «Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche». We thank Christelle Thibault-Carpentier and Doulaye Dembele from the IGBMC GenomEast platform for the GEO deposit.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2012) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. In: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013
2. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363:1938–1948. doi:10.1056/NEJMra1001389
3. Zardavas D, Tryfonidis K, Goulioti T, Piccart M (2016) Targeted adjuvant therapy in breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* doi:10.1080/14737140.2016.1247698
4. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295:2492–2502. doi:10.1001/jama.295.21.2492
5. Lu S, Singh K, Mangray S, Tavares R, Noble L, Resnick MB, Yakirevich E (2013) Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod Pathol* 26:485–495. doi:10.1038/modpathol.2012.187
6. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 7:R296–R305. doi:10.1186/bcr983
7. Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H (2007) Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med* 20:139–143
8. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka J (2011) Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 28:55–63. doi:10.1007/s10585-010-9357-5
9. Ma F, Ding X, Fan Y, Ying J, Zheng S, Lu N, Xu B (2014) A CLDN1-negative phenotype predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* 9:e112765. doi:10.1371/journal.pone.0112765
10. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391–401
11. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141:397–408
12. Zhou B, Moodie A, Blanchard AA, Leygue E, Myal Y (2015) Claudin 1 in breast cancer: new insights. *J Clin Med* 4:1960–1976. doi:10.3390/jcm4121952

13. Zhang K, Yao HP, Wang MH (2008) Activation of RON differentially regulates claudin expression and localization: role of claudin-1 in RON-mediated epithelial cell motility. *Carcinogenesis* 29:552–559. doi:[10.1093/carcin/bgn003](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn003)
14. Kulawiec M, Safina A, Desouki MM, Still I, Matsui S, Bakin A, Singh KK (2008) Tumorigenic transformation of human breast epithelial cells induced by mitochondrial DNA depletion. *Cancer Biol Ther* 7:1732–1743
15. Hoevel T, Macek R, Swisshelm K, Kubbies M (2004) Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int J Cancer* 108:374–383. doi:[10.1002/ijc.11571](https://doi.org/10.1002/ijc.11571)
16. Akasaka H, Sato F, Morohashi S, Wu Y, Liu Y, Kondo J, Odagiri H, Hakamada K, Kijima H (2010) Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer* 10:548. doi:[10.1186/1471-2407-10-548](https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-548)
17. Liu Y, Wang L, Lin XL, Wang J, Yu JH, Miao Y, Wang EH (2012) Anti-apoptotic effect of claudin-1 on TNF- α -induced apoptosis in human breast cancer MCF-7. *Tumor Biol* 33:2307–2315
18. Zhou B, Blanchard A, Wang N, Ma X, Han J, Schroedter I, Leygue E, Myal Y (2015) Claudin 1 promotes migration and increases sensitivity to tamoxifen and anticancer drugs in luminal-like human breast cancer cells MCF7. *Cancer Invest* 33:429–439. doi:[10.3109/07357907.2015.1060996](https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1060996)
19. Frohlich E, Wahl R (2015) Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. *Biomed Res Int* 2015:845340. doi:[10.1155/2015/845340](https://doi.org/10.1155/2015/845340)
20. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Curtis PS, Gomis R, Hanefeld M, Jones NP, Komajda M, McMurray JJ (2009) Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet* 373:2125–2135. doi:[10.1016/S0140-6736\(09\)60953-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60953-3)
21. Monami M, Lamanna C, Marchionni N, Mannucci E (2008) Rosiglitazone and risk of cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care* 31:1455–1460. doi:[10.2337/dc07-2308](https://doi.org/10.2337/dc07-2308)
22. Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10990–10995. doi:[10.1073/pnas.180329197](https://doi.org/10.1073/pnas.180329197)
23. Prost S, Relouzat F, Spentchian M, Ouzegdough Y, Saliba J, Massonnet G, Beressi JP, Verhoeyen E, Raggueneau V, Maneglier B, Castaigne S, Chomienne C, Chretien S, Rousselot P, Leboulch P (2015) Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR gamma agonists. *Nature*. doi:[10.1038/nature15248](https://doi.org/10.1038/nature15248)
24. Chojkier M (2005) Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology* 41:237–246. doi:[10.1002/hep.20567](https://doi.org/10.1002/hep.20567)
25. Salamone S, Colin C, Grillier-Vuissoz I, Kuntz S, Mazerbourg S, Flament S, Martin H, Richert L, Chapleur Y, Boisbrun M (2012) Synthesis of new troglitazone derivatives: anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur J Med Chem* 51:206–215. doi:[10.1016/j.ejmech.2012.02.044](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.02.044)
26. Lecomte J, Flament S, Salamone S, Boisbrun M, Mazerbourg S, Chapleur Y, Grillier-Vuissoz I (2008) Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 112:437–451. doi:[10.1007/s10549-007-9886-z](https://doi.org/10.1007/s10549-007-9886-z)
27. Colin C, Salamone S, Grillier-Vuissoz I, Boisbrun M, Kuntz S, Lecomte J, Chapleur Y, Flament S (2010) New troglitazone derivatives devoid of PPARgamma agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 124:101–110. doi:[10.1007/s10549-009-0700-y](https://doi.org/10.1007/s10549-009-0700-y)
28. Colin-Cassin C, Yao X, Cerella C, Chbicheb S, Kuntz S, Mazerbourg S, Boisbrun M, Chapleur Y, Diederich M, Flament S, Grillier-Vuissoz I (2015) PPARgamma-inactive Delta2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. *Mol Carcinog* 54:393–404. doi:[10.1002/mc.22109](https://doi.org/10.1002/mc.22109)
29. Di Cello F, Cope L, Li H, Jeschke J, Wang W, Baylin SB, Zahnow CA (2013) Methylation of the claudin 1 promoter is associated with loss of expression in estrogen receptor positive breast cancer. *PLoS ONE* 8:e68630. doi:[10.1371/journal.pone.0068630](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068630)
30. Ogasawara N, Kojima T, Go M, Ohkuni T, Koizumi J, Kamekura R, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Himi T, Sawada N (2010) PPARgamma agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. *Pharmacol Res* 61(6):489–498. doi:[10.1016/j.phrs.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.03.002)
31. Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, Hinley J, Trejdosiewicz LK, Southgate J (2006) PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *J Cell Physiol* 208:407–417. doi:[10.1002/jcp.20676](https://doi.org/10.1002/jcp.20676)
32. Kumei S, Motomura W, Yoshizaki T, Takakusaki K, Okumura T (2009) Troglitazone increases expression of E-cadherin and claudin 4 in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 380:614–619. doi:[10.1016/j.bbrc.2009.01.134](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.134)
33. Okumura T (2010) Mechanisms by which thiazolidinediones induce anti-cancer effects in cancers in digestive organs. *J Gastroenterol* 45:1097–1102. doi:[10.1007/s00535-010-0310-9](https://doi.org/10.1007/s00535-010-0310-9)
34. Beeman N, Webb PG, Baumgartner HK (2012) Occludin is required for apoptosis when claudin-claudin interactions are disrupted. *Cell Death Dis* 3:e273. doi:[10.1038/cddis.2012.14](https://doi.org/10.1038/cddis.2012.14)
35. Fortier AM, Asselin E, Cadrin M (2013) Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem* 288:11555–11571. doi:[10.1074/jbc.M112.428920](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428920)

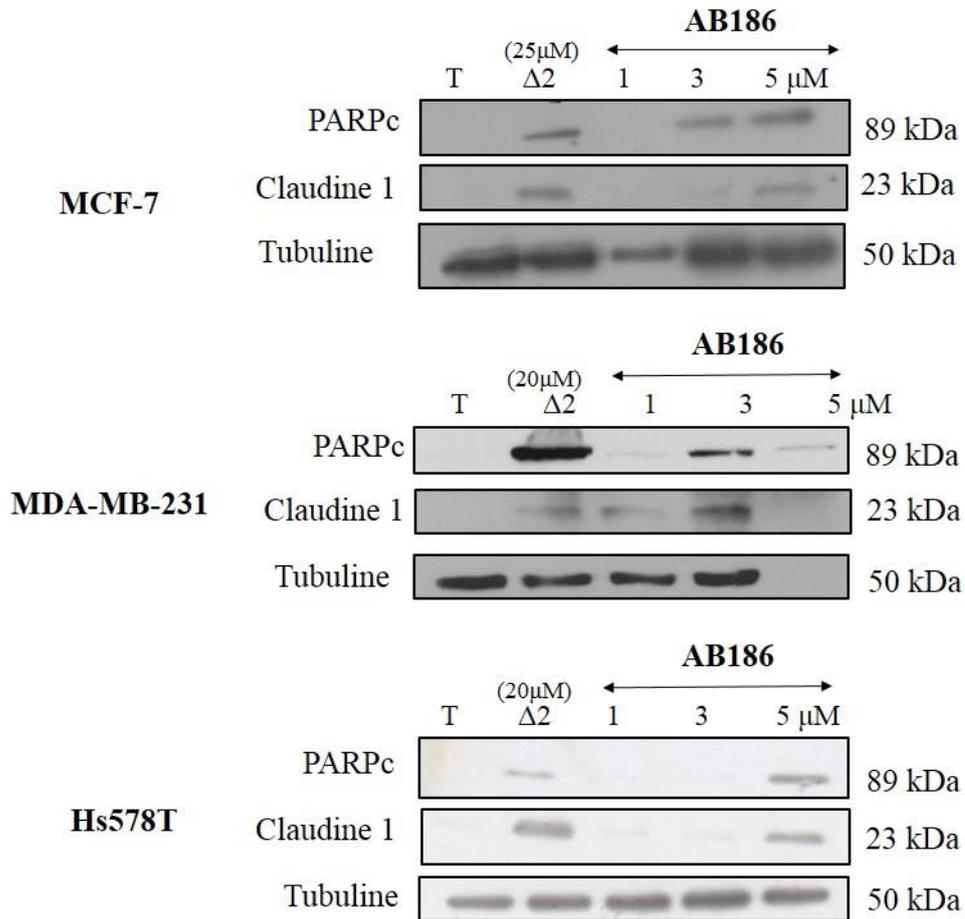


Figure 58 : Effet de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur l'expression de la claudine 1 et le clivage de PARP. Les cellules MCF-7 sont traitées avec 25 μM de $\Delta 2$ -TGZ et les cellules MDA-MB-231 et Hs578T sont traitées avec 20 μM de $\Delta 2$ -TGZ. Toutes les lignées cellulaires sont également traitées avec 1, 3 et 5 μM d'AB186. Après 24 heures de traitement, une analyse par western blot est réalisée. Les taux de protéines claudine 1, PARP clivée (PARPc) et α -tubuline (tubuline) ont été révélés, avec l' α -tubuline utilisée comme référence interne.

II. Effets précoces des dérivés TGZ sur les cellules cancéreuses mammaires « claudin 1-low » : implication de la claudine 1 dans la migration cellulaire (Article 3)

Troglitazone derivatives induce early modifications of the cytoskeleton and inhibition of migration in “claudin 1-low” breast cancer cells: a key role of claudin 1 in cell migration

Geoffroy Marine, Barberi-Heyob Muriel, Kleinclaus Alexandra, Batista Levy, Bastogne Thierry, Boisbrun Michel, Flament Stéphane, Kuntz Sandra, Grillier-Vuissoz Isabelle. *En préparation pour Breast Cancer Research.*

Introduction

Nous avons montré que le composé $\Delta 2$ -TGZ entraîne la mort cellulaire par apoptose des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et Hs578T dès 24 heures de traitement, en corrélation avec une augmentation de l'expression de la claudine 1 (Colin-Cassin *et al.*, 2015; Geoffroy *et al.*, 2017). Le laboratoire a développé et breveté un nouveau dérivé AB186, qui comme la $\Delta 2$ -TGZ inhibe la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Bordessa *et al.*, 2014). Le composé AB186 induit l'apoptose des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et Hs578T en association avec une ré-expression de la claudine 1 (Figure 58). L'apoptose est un phénomène tardif qui est observé après 24 heures de traitement. Cependant, nous ne disposons d'aucune donnée sur les effets précoces et les mécanismes d'action sous-jacents des dérivés TGZ. Dans ce contexte, l'objectif de cette partie est **de caractériser les mécanismes d'action de la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 à des temps précoces dans les cellules « claudin 1-low » MCF-7, MDA-MB-231 et Hs578T**. Nous avons déterminé si la claudine 1 pouvait être impliquée dans les modifications précoces induites par la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186, avant l'induction de l'apoptose.

Principaux résultats

1. **La $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 induisent des modifications très précoces de l'impédance et de la morphologie des cellules MCF-7 et MDA-MB-231.**

Afin d'établir la cinétique des effets dynamiques induits par la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186, des suivis par impédancemétrie ont été réalisés pour d'obtenir en temps réel des données quantitatives sur le nombre de cellules, la force d'adhérence et la morphologie des cellules. Le principe de

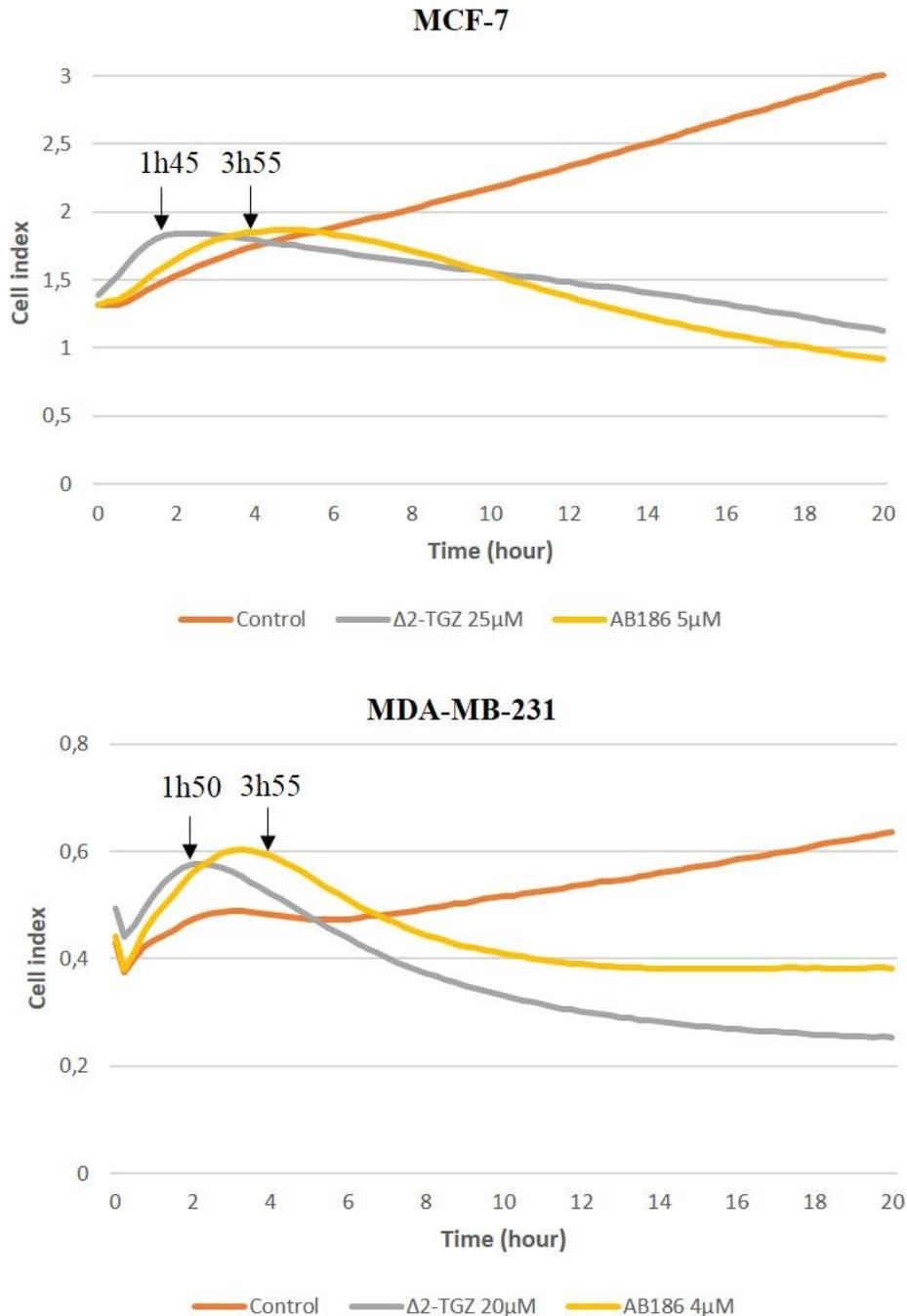


Figure 59 : Effets précoces de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur l'impédance des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 sont traitées avec 25 ou 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ et 5 ou 4 μ M d'AB186 respectivement. Les cellules témoins (Control) sont traitées avec le solvant DMSO. Le cell index (CI) est mesuré toutes les 15 minutes pendant 20 heures après le traitement. Les temps indiqués par des flèches noires correspondent à la différence maximale entre le CI des cellules non traitées et celui des cellules traitées. Les courbes correspondent aux valeurs moyennes de 3 expériences indépendantes.

la mesure repose sur la culture de cellules dans des puits tapissés d'électrodes en or recouvrant 70 à 80% de la surface totale des puits d'une microplaque. Au sein de ce réseau d'électrodes circule un courant alternatif de faible voltage. Le milieu de culture cellulaire ajouté dans les puits de la microplaque joue le rôle d'« électrolyte » en permettant au courant de circuler d'une électrode à une autre. Lorsque des cellules sont déposées dans les puits, elles vont progressivement adhérer au fond du support. La présence de cellules sur les électrodes va avoir pour effet d'affecter localement l'environnement ionique (à l'interface électrodes/solution) en induisant une augmentation de l'impédance. L'impédance électrique mesure l'opposition du système au passage de ce courant. L'unité de mesure est le cell index (CI) qui est proportionnel au nombre, à l'adhérence et à la morphologie cellulaire (voir matériel et méthode).

Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et exposées à la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 pendant 20 heures. Pour les cellules non traitées MCF-7 et MDA-MB-231 (Control), la valeur du CI augmente jusqu'à la fin de l'expérience. Dans les deux lignées cellulaires, les traitements à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 modifient le CI. Dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, nous observons une augmentation précoce du CI comparé aux cellules non traitées, suivie d'une diminution rapide du CI en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 (Figure 59). A l'aide des automaticiens de notre laboratoire, le temps de la différence maximale entre le CI des cellules traitées et le CI des cellules non traitées a été calculé. Dans les cellules MCF-7, le CI atteint une différence maximale à 1 heure 45 min et 3 heures 55 min après une exposition à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 respectivement. De la même manière, la différence maximale entre le CI des cellules MDA-MB-231 non traitées et traitées est de 1 heure 50 min et 3 heures 55 min en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 respectivement. Cette augmentation transitoire et très précoce du CI pourrait être associée à une modification de la morphologie des cellules.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons observé la morphologie des cellules en microscopie à contraste de phase après 8 heures 30 de traitement. Dans les cellules MCF-7, nous observons un changement de morphologie des cellules qui se rétractent et forment des prolongements cellulaires. De plus, les composés induisent une perte de contact des cellules entre elles. Dans les cellules MDA-MB-231, nous observons également un changement de morphologie cellulaire similaire aux cellules MCF-7. Le changement de morphologie observé est beaucoup plus marqué en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ. Ensuite, nous avons révélé la morphologie

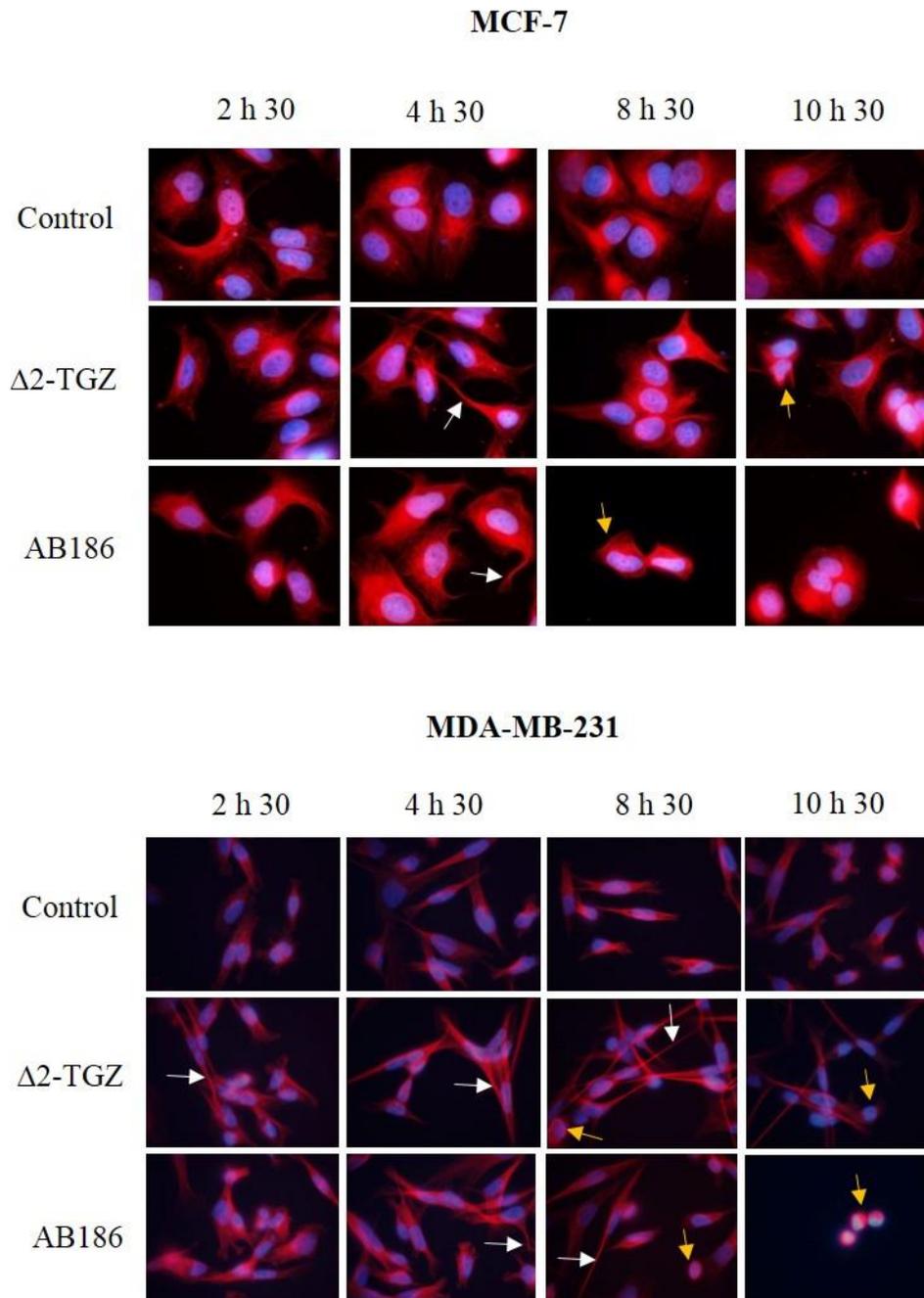


Figure 60 : Effets précoces de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur la morphologie des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 sont traitées avec 25 ou 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ et 5 ou 4 μ M d'AB186 respectivement pendant 2 heures 30, 4 heures 30, 8 heures 30 et 10 heures 30. Les cellules témoins (Control) sont traitées avec le solvant DMSO. Par immunofluorescence, la morphologie des cellules est révélée par l'analyse de l' α -tubuline, un marqueur des microtubules. Le noyau est coloré en bleu par le Hoechst. Les flèches blanches montrent les prolongements cellulaires et les flèches orange correspondent aux cellules arrondies.

cellulaire par immunofluorescence par trois éléments du cytosquelette : les microfilaments d'actine, l' α -tubuline, un marqueur des microtubules, et la vimentine, un marqueur des filaments intermédiaires. Basés sur les différences maximales de CI calculées précédemment, les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été exposées aux deux composés à des temps précoces : 2 heures 30, 4 heures 30, 8 heures 30 et 10 heures 30. En réponse à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186, la morphologie des cellules MCF-7 est altérée par une modification de la forme et de la taille révélée (Figure 60). Vers 4 heures 30 d'exposition à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186, nous observons des cellules plus étirées (flèches blanches). A 8 heures 30 de traitement, nous détectons des cellules arrondies (flèches orange). A 10 heures 30 de traitement, la majorité des cellules sont arrondies. Dans les cellules MDA-MB-231, nous observons aussi une modification de la taille et la forme des cellules en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 (Figure 60). En immunofluorescence, dès 2 heures 30 et 4 heures 30 de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 respectivement, nous détectons des cellules allongées (flèches blanches) révélées par le réseau de microtubules (Figure 60). De plus, les deux composés induisent une désorganisation du réseau d'actine. A partir de 8 heures 30 de traitement, nous observons des cellules arrondies (flèches orange) en réponse aux deux traitements. A 10 heures 30, nous détectons seulement quelques cellules arrondies en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ alors qu'elles sont déjà toutes arrondies en réponse à l'AB186.

L'analyse de la morphologie des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 en réponse aux dérivés de TGZ montre une modification de la forme des cellules en accord avec les variations du CI mesurées par impédancemétrie. En effet, l'augmentation transitoire du CI observée pourrait correspondre à l'étirement des cellules dans le fond du puits.

2. La $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 induisent l'expression de la claudine 1 au niveau membranaire dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231.

Nos précédents résultats montrent que la $\Delta 2$ -TGZ augmente le taux de protéine claudine 1 après 24 heures d'exposition dans les cellules « claudin 1-low » MDA-MB-231 et que la claudine 1 est impliquée dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ (Article 2 : Geoffroy *et al.*, 2017). Nous émettons l'hypothèse que la claudine 1 pourrait également être impliquée dans les modifications de morphologie précoce induites par la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186. Afin de comprendre s'il existe un lien entre ces deux phénomènes, nous avons analysé l'expression de la claudine 1 par qPCR après 3 heures, 6 heures et 9 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ et à

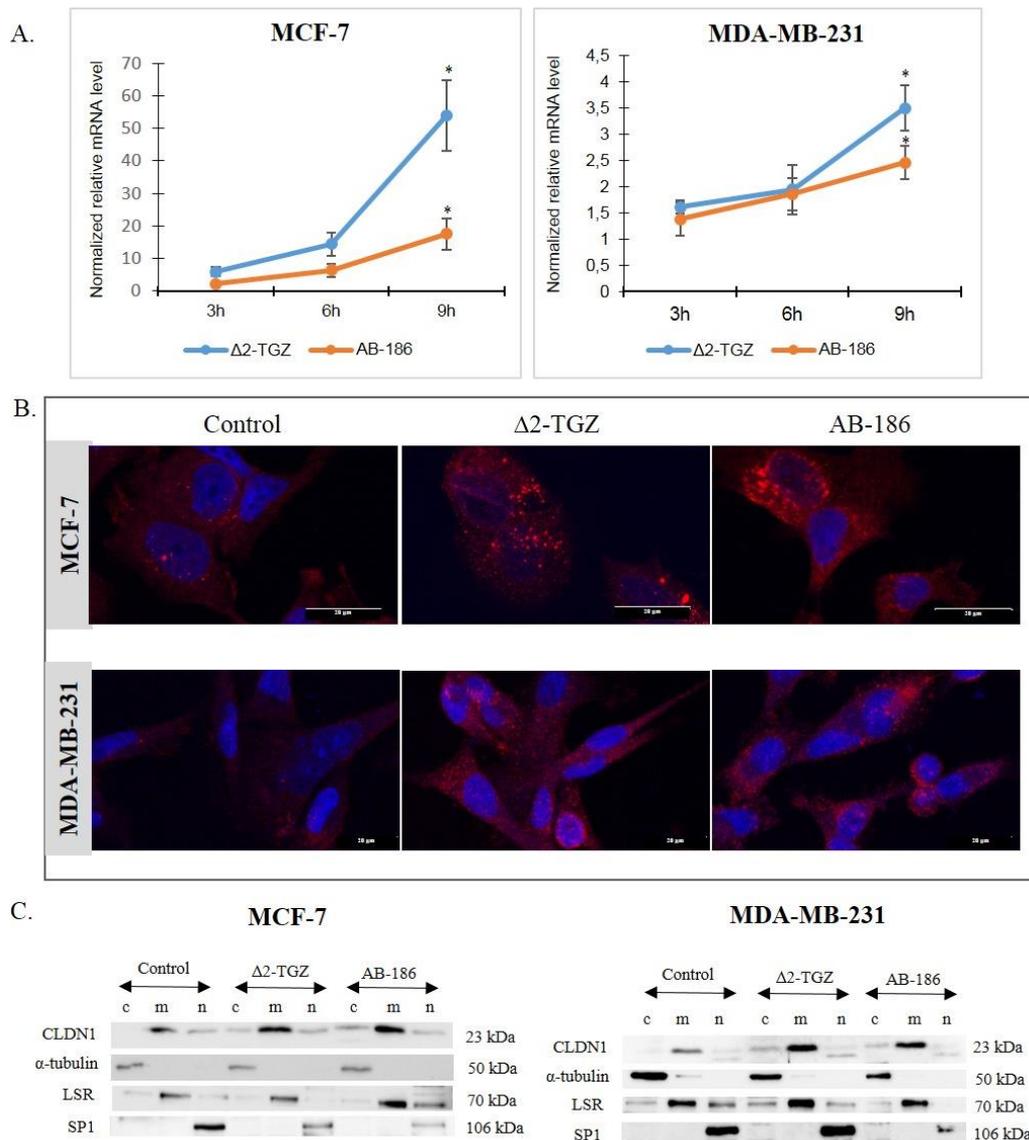


Figure 61 : Effet de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur l'expression et la localisation de la claudine 1 des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 sont traitées avec 25 ou 20 μM de $\Delta 2$ -TGZ et 5 ou 4 μM d'AB186 respectivement. Les cellules témoins (Control) sont traitées avec le solvant DMSO. (A) Les cellules sont traitées pendant 3, 6 et 9 heures puis l'expression de la claudine 1 est analysée par qPCR. L'expression relative du taux d'ARNm normalisée (normalized relative mRNA level) est quantifiée en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ avec RPLP0 comme gène de référence. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 4 à 6 expériences indépendantes. * $p < 0,05$. (B) Après 9 heures de traitement, la localisation de la claudine 1 est révélée par immunofluorescence. Le noyau est coloré en bleu par le DRAQ5. Les cellules sont observées au microscope confocal avec un zoom x1540. Chaque photo représente la superposition de 6 images dans l'axe z. L'échelle représente 20 μm . (C) Après un fractionnement sub-cellulaire, l'expression de la claudine 1 (CLDN1) des fractions cytoplasmique (c), membranaire (m) et nucléaire (n) a été analysée par western blot. Les protéines α -tubuline, LSR et SP1 servent de marqueur cytoplasmique, membranaire et nucléaire respectivement.

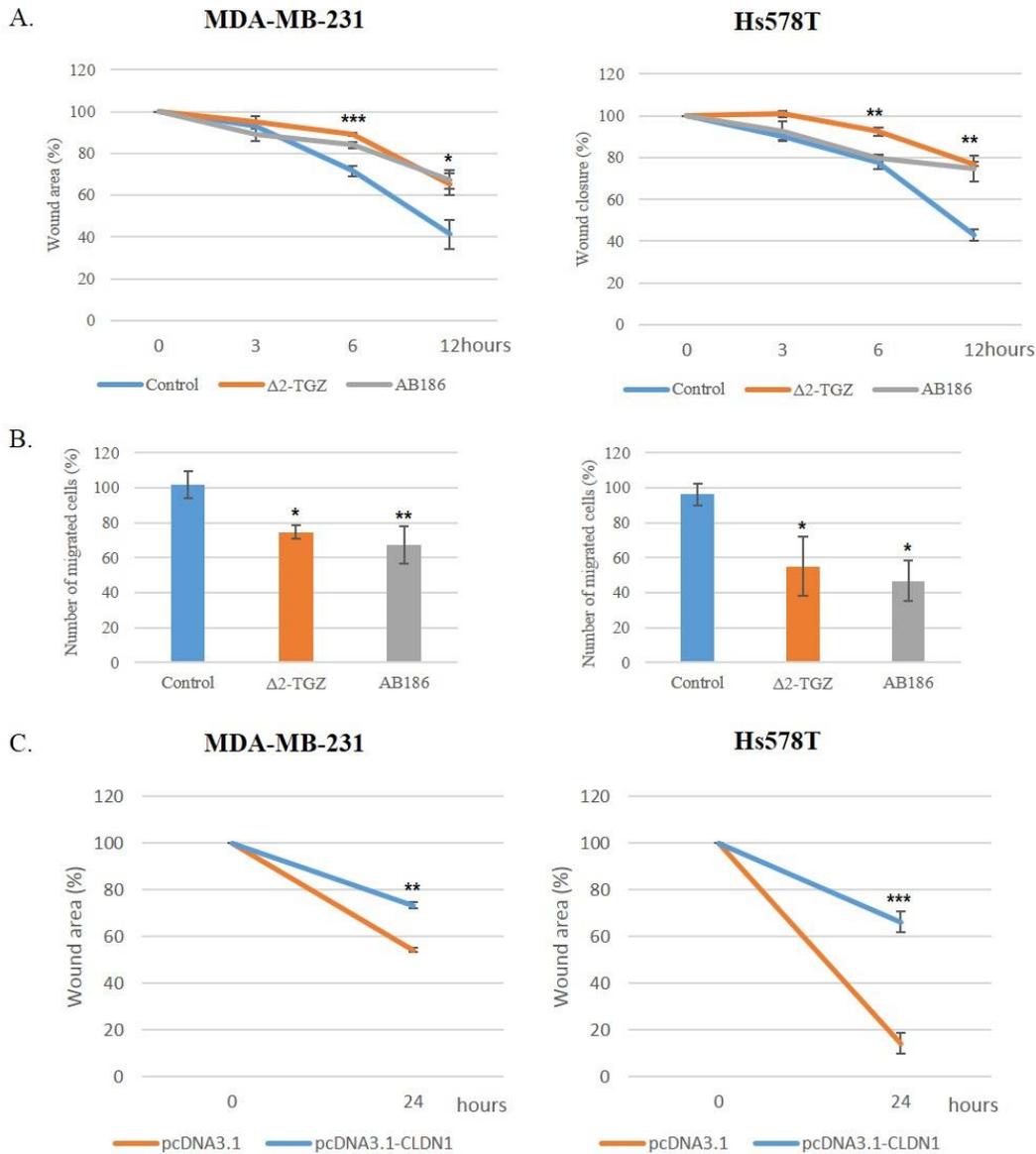


Figure 62: Effet des dérivés de la $\Delta 2$ -TGZ, de l'AB186 et de la surexpression de la claudine 1 sur la migration cellulaire des cellules MDA-MB-231 et Hs578T. (A-B) Les cellules MDA-MB-231 et Hs578T sont traitées avec 20 μ M de $\Delta 2$ -TGZ et 4 μ M d'AB186. Les cellules témoins (Control) sont traitées avec le solvant DMSO. (A) Les cellules sont traitées et une blessure est effectuée dans le tapis cellulaire puis sa largeur est mesurée après 3, 6 et 12 heures de traitement. Le recouvrement de la blessure est exprimé en pourcentage avec un taux de 100% à T0. (B) L'expérience en chambre de boyden est réalisée après 9 heures de traitement à l'aide d'insert qui possède des pores de 8 μ m de diamètre. Le graphique correspond aux pourcentages de cellules qui ont migrés. (C) Les cellules MDA-MB-231 et Hs578T ont été transfectées de manière transitoire avec le plasmide pcDNA3.1 ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (pcDNA3.1-CLDN1). Une blessure est effectuée dans le tapis cellulaire et sa largeur est mesurée 24 heures post-transfection. (A-C) Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 à 6 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

l'AB186 dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (Figure 61A). Nous observons une augmentation significative du taux de transcrits claudine 1 après 9 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 dans les deux lignées cellulaires. Nous avons confirmé ce résultat au niveau protéique par immunofluorescence (Figure 61B). Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été traitées pendant 9 heures avec la $\Delta 2$ -TGZ ou l'AB186. Dans les cellules non traitées, nous observons un niveau basal de claudine 1. Après 9 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ ou à l'AB186, nous observons une augmentation du marquage qui est ponctiforme et diffus. L'analyse protéique de la claudine 1 dans les fractions cytoplasmique, membranaire et nucléaire montre que la claudine 1 est localisée en grande partie dans la fraction membranaire dans les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Figure 61C). Ces résultats montrent que l'augmentation de l'expression de la claudine 1 apparaît plus tardivement que les changements de morphologie dès 2 heures 30 de traitement sous l'effet de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186.

3. La $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 inhibent les capacités migratoires des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.

Les changements de morphologie et la perturbation du réseau d'actine dans les cellules MDA-MB-231 exposées à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 suggèrent que ces composés modifient les capacités migratoires des cellules. Afin de déterminer si la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 modulent la migration des cellules MDA-MB-231, nous avons effectué un test de blessure. Les cellules MDA-MB-231 ont été exposées à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 et la taille de la blessure a été mesurée après 3 heures, 6 heures et 12 heures de traitement. Dans les cellules traitées, nous avons observé une inhibition significative de la fermeture de la blessure à partir de 6 heures d'exposition à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186 respectivement (Figure 62A). Ce résultat a été confirmé dans une autre lignée « claudin 1-low » triple-négative Hs578T qui présente des propriétés migratoires importantes (Figure 62A). Cette inhibition de la migration a été confortée par un test en chambre de Boyden. Après 9 heures de traitement à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186, une diminution significative de la migration de 27,16 % et 34,7 % respectivement est observée dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 62B). Dans les cellules Hs578T, la migration cellulaire est aussi significativement diminuée de 41,11 % et 49,33% en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 respectivement (Figure 62B). Ces résultats montrent une inhibition de la migration après 9 heures de traitement corrélé à une augmentation de l'expression de la

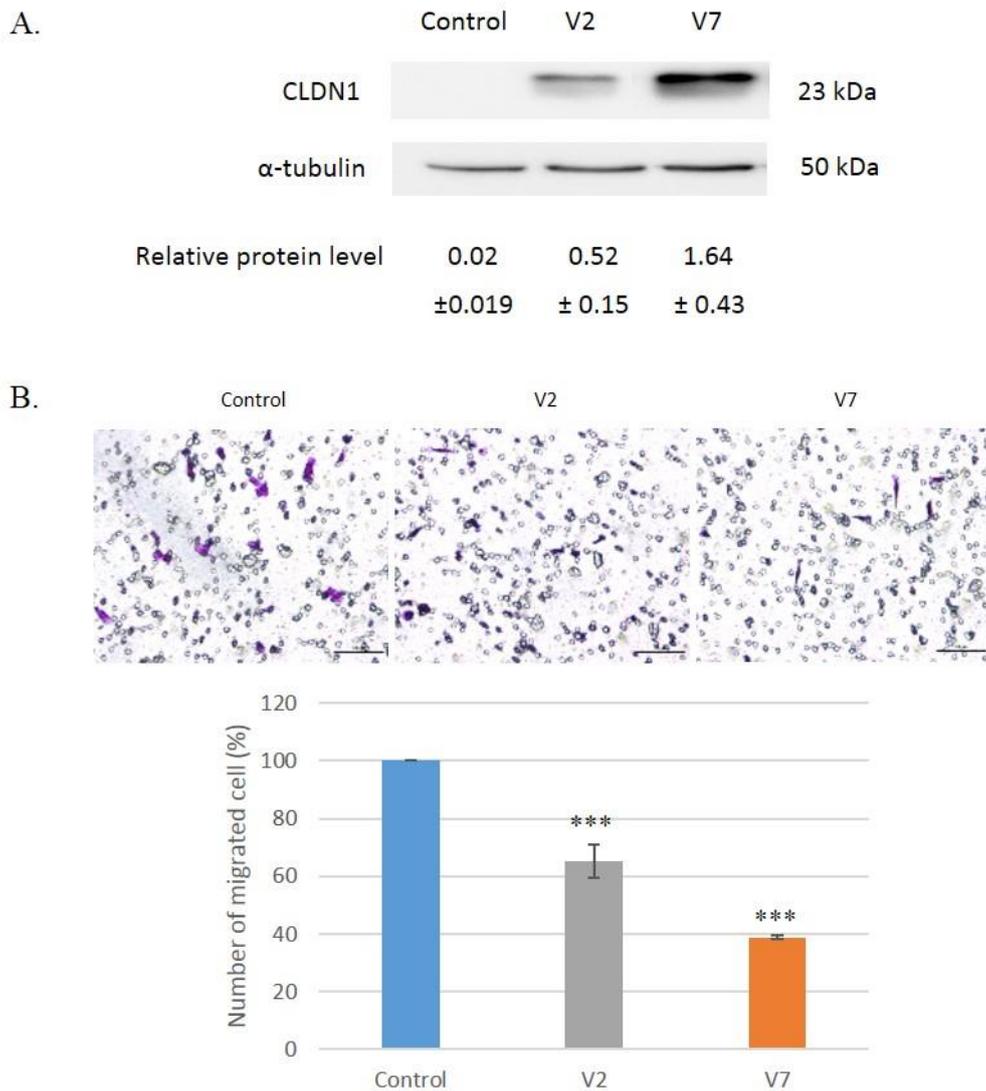


Figure 63 : Expression de la claudine 1 sur la migration des cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière stable avec le plasmide pcDNA3.1 (Control) ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (V2 et V7). (A) Les taux de protéines claudine 1 (CLDN1) et α -tubuline ont été révélés par western blot, avec l' α -tubuline utilisée comme référence interne. Le niveau d'expression relatif a été déterminé par la quantification des bandes CLDN1/tubuline. Les chiffres correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 5 expériences indépendantes. (B) L'expérience en chambre de boyden est réalisée 24 heures post-transfection à l'aide d'insert qui possède des pores de 8 μ m de diamètre. Les photos représentent les cellules contrôle (control) et des différents clones (V2 et V7) qui ont migrés en dessous de l'insert. Le graphique correspond aux pourcentages de cellules qui ont migrés. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

claudine 1. Par conséquent, nous supposons que la claudine 1 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la migration induite par ces composés.

4. La surexpression transitoire de la claudine 1 inhibe les capacités migratoires des cellules MDA-MB-231 et Hs578T.

Nous avons donc étudié le rôle de la claudine 1 dans la migration des deux lignées cellulaires triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T. Pour cela, nous avons surexprimé la claudine 1 de manière transitoire dans les deux lignées cellulaires et nous avons étudié leur capacité migratoire par un test de blessure. Dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant la claudine 1, nous observons un retard significatif de recouvrement de la blessure de 19,08 % et 17,63 % à 24 et 48 heures post-transfection respectivement, comparé aux cellules témoins (Figure 62C). L'effet est plus important dans les cellules Hs578T avec une inhibition de la recolonisation de la blessure de 51,97 % à 24 heures post-transfection comparé aux cellules témoins (Figure 62C).

5. Le niveau d'expression de la claudine 1 est corrélé à l'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231.

Afin de mieux comprendre le rôle de la claudine 1 dans la migration des cellules triple-négatives, nous avons confectionné des transfectants stables MDA-MB-231 surexprimant la claudine 1. Nous avons obtenu deux clones indépendants surexprimant la claudine 1 (V2 et V7). Une analyse par western blot montre une absence de signal de la claudine 1 dans les cellules transfectées avec un vecteur vide (Control) (Figure 63A). Dans les clones 2 (V2) et 7 (V7), nous détectons un signal avec une intensité plus forte dans le clone 7 : avec un signal significatif 3,2 fois plus intense. Ce résultat a été confirmé par immunofluorescence. Dans les cellules MDA-MB-231 témoin, nous n'observons pas de marquage de la claudine 1. En revanche, nous détectons un marquage ponctiforme pour les clones 2 et 7 avec un signal plus intense pour le clone 7. L'analyse protéique de la claudine 1 dans les différentes fractions cytoplasmique, membranaire et nucléaire révèle une localisation principalement membranaire de la claudine 1 pour les clones 2 et 7. Ensuite, nous avons caractérisé les capacités migratoires des transfectants stables en chambre de Boyden (Figure 63B). Nous observons une diminution de la migration des cellules surexprimant la claudine 1 : 65,24% et 38,89 % des cellules des clones 2 et 7 respectivement ont migré par rapport aux cellules du clone

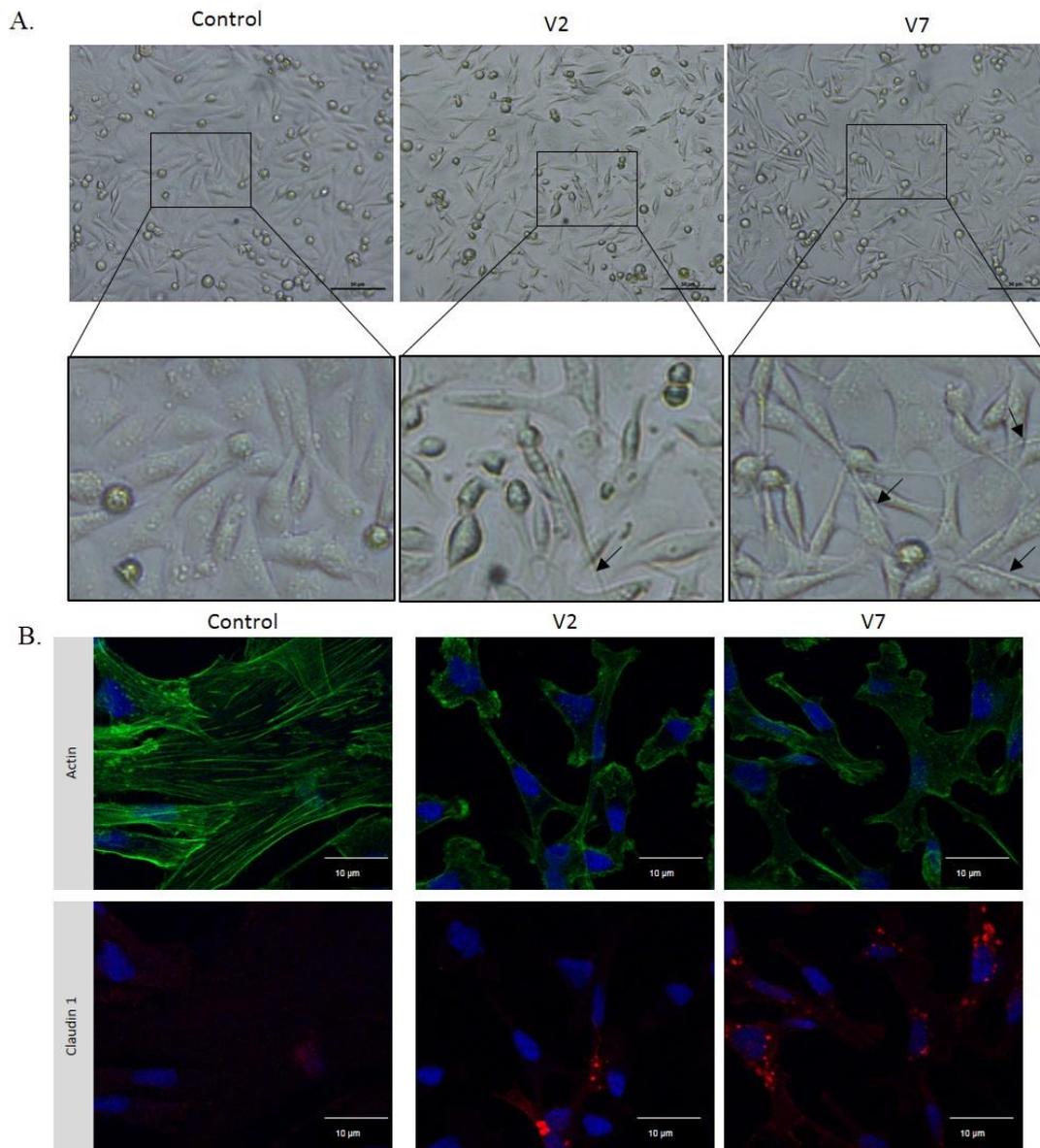


Figure 64 : Effet de la surexpression de la claudine 1 sur la morphologie et le cytosquelette d'actine des cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière stable avec le plasmide pcDNA3.1 (Control) ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (V2 et V7). (A) La morphologie des cellules est révélée en microscopie à contraste de phase. Les flèches désignent les prolongements cellulaires. L'échelle représente 50 μm . (B) Par immunofluorescence, le cytosquelette d'actine des cellules est révélé par l'utilisation de la phalloïdine couplé à l'alex fluor 488 (vert) et la claudine 1 par un anticorps dirigé contre la claudine 1 (rouge). Le noyau est coloré en bleu par le DRAQ5. Les cellules sont observées au microscope confocal avec un zoom x1540. Chaque photo représente la superposition de 6 images dans l'axe z. L'échelle représente 10 μm .

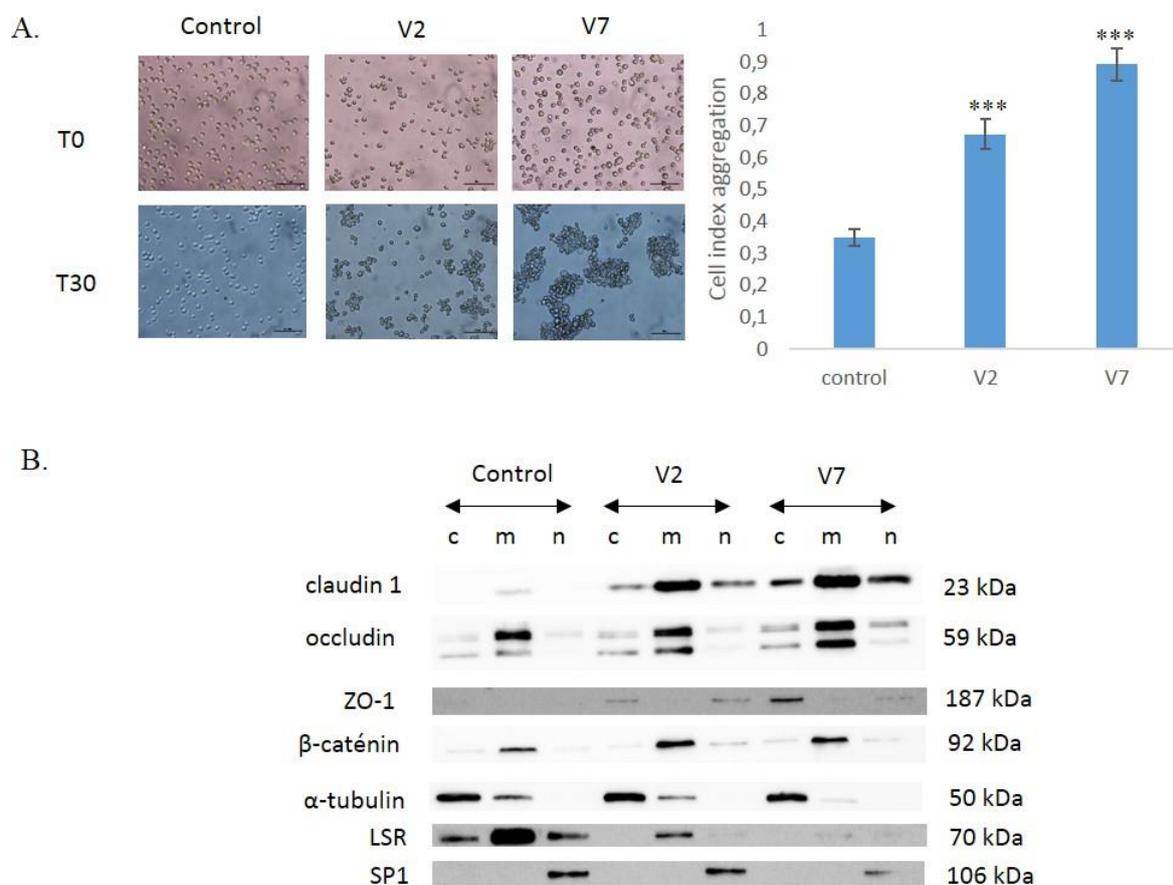


Figure 65 : Effet différentiel du niveau d'expression de la claudine 1 sur l'adhérence intercellulaire des cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière stable avec le plasmide pcDNA3.1 (control) ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (V2 et V7). (A) L'adhérence intercellulaire est évaluée par un test d'aggrégation. Pendant 30 minutes, les cellules sont soumises à une agitation orbitale. Ensuite, les cellules sont photographiées en microscopie à contraste de phase à 0 minutes (T0) et 30 minutes (T30) et les cellules isolées sont comptées pour déterminer l'index d'aggrégation cellulaire. L'échelle représente 50 μ m. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (B) Par fractionnement sub-cellulaires, le taux de protéines claudine 1, occludine, ZO-1, β -caténine, α -tubuline (marqueur cytoplasmique), LSR (marqueur membranaire) et SP1 (marqueur nucléaire) et ont été révélés par western Blot.

témoin (Control). Ce résultat est en accord avec l'inhibition de la migration des cellules MDA-MB-231 et Hs578T surexprimant la claudine 1 de manière transitoire.

6. La surexpression de la claudine 1 conduit à un changement de morphologie associé à une perte des fibres de stress des cellules MDA-MB-231.

La surexpression de la claudine 1 induit un changement de la morphologie des cellules (Figure 64A). Après 4 jours de culture, le clone témoin (Control) forme un tapis cellulaire avec des cellules bien étalées au support, accolées les unes aux autres. Les cellules des clones 2 et 7 sont moins étalées au support et sont de plus petites tailles et ne forment jamais de tapis cellulaire. Certaines cellules forment des prolongements cellulaires.

La claudine 1 est un constituant majeur des jonctions serrées qui lie le cytosquelette d'actine *via* des protéines adaptatrices comme ZO-1. Le cytosquelette d'actine est un acteur majeur dans la régulation de la morphologie des cellules ainsi que dans leur motilité. Nous avons donc étudié le réseau d'actine dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant la claudine 1. Les cellules MDA-MB-231 témoin sont larges et nous pouvons observer la présence de fibres de stress (Figure 64B). La surexpression de la claudine 1 perturbe le réseau d'actine et nous observons une perte des fibres de stress dans les cellules des clones 2 et 7 (Figure 64B).

7. La surexpression de la claudine 1 conduit à l'augmentation de l'adhérence intercellulaire des cellules MDA-MB-231.

La claudine 1 joue également un rôle dans l'adhérence des cellules entre elles. En effet, après 4 jours de culture, les cellules des clones 2 et 7 forment des agrégats cellulaires alors que les cellules témoins se décolent de manière individuelle après un traitement à la trypsine. Afin d'étayer notre hypothèse et de vérifier la fonction d'adhérence des jonctions, nous avons réalisé un test d'agrégation cellulaire (Figure 65A). Après 30 minutes sous agitation, nous observons une augmentation significative de l'agrégation cellulaire des cellules des clones 2 et 7, corrélée au niveau de claudine 1 (0,35 pour le témoin *vs* 0,67 et 0,89 pour les clones V2 et V7). Par des études de fractionnement sub-cellulaire, nous observons une augmentation du taux de claudine 1 ainsi que de deux marqueurs de jonctions, l'occludine et la β -caténine, au niveau membranaire dans les cellules des clones 2 et 7 par rapport aux cellules témoins (Figure 65B). De plus, la protéine adaptatrice ZO-1 est réexprimée dans le cytoplasme des clones 2 et 7 avec un signal plus intense pour le clone suggérant que la réexpression de la

claudine 1 permet la reformation des jonctions cellulaires. Ce résultat a été confirmé par immunofluorescence. Afin de le confirmer cette hypothèse, nous avons travaillé sur un modèle 3D permettant de recréer les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire ainsi que des contraintes physiques qui se rapprochent des conditions *in vivo*. Nous avons observé une augmentation de l'expression des protéines jonctionnelles claudine 1, occludine et β -caténine.

Conclusion

En conclusion, les dérivés TGZ, la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186, agissent de manière précoce en modifiant la **morphologie** des cellules suivie d'une réexpression de la **claudine 1 membranaire** avant même la mort cellulaire par apoptose. De plus, ces composés inhibent la **migration** des cellules cancéreuses mammaires. Parallèlement, la claudine 1 membranaire modifie la **morphologie** des cellules et inhibe la **migration cellulaire**. Ces phénomènes sont associés à la perte des **fibres de stress** et la formation des **jonctions intercellulaires**. De manière intéressante, l'intensité de ces effets sur la migration cellulaire et l'adhérence intercellulaire est corrélée au niveau d'expression de la claudine 1. **L'ensemble de ces données confirme l'intérêt de la réexpression de la claudine 1 comme piste de traitement des tumeurs mammaires, en particulier les tumeurs triple-négatives, pour lesquelles il existe peu de ressources thérapeutiques.**

Troglitazone derivatives induce early modifications of the cytoskeleton and inhibition of migration in “claudin 1-low” breast cancer cells: a key role of claudin 1 in cell migration

Geoffroy Marine^{1,2}, Barberi-Heyob Muriel^{1,2}, Kleinclauss Alexandra^{1,2}, Batista Levy^{1,2}, Bastogne Thierry^{1,2}, Boisbrun Michel^{3,4}, Flament Stéphane^{1,2}, Kuntz Sandra^{1,2}, Grillier-Vuissoz Isabelle^{1,2}

Corresponding author : Grillier-Vuissoz Isabelle

Tél : +33 (0)3 72 74 51 84

Fax : 011 33(0) 3 83 68 40 01

E-mail: isabelle.grillier-vuissoz@univ-lorraine.fr

¹ Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

² CNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

³ Université de Lorraine, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

⁴ CNRS, SRSMC, UMR 7565, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

Abstract

Background: Triple-negative breast cancer constitute a major challenge in cancerology. In most these tumor claudin 1, a backbone of tight junctions, is absent or strongly diminished. This protein is involved in cell-cell adhesion and may be a tumor suppressor gene in breast cancer migration process. We developed derivatives thazolidinediones compounds, which increase claudin 1 expression.

Methods: We investigated the kinetic of event leading to anticancer effect of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 by real-time cell analysis system (RTCA). Then, we characterized the rapid modifications of cells morphology by immune-localization. These events are followed by claudin 1 re-expression and the inhibition of cell migration investigated by wound healing and transwell assay. Stable transfectant overexpressing claudin 1 allowed to build a link between inhibition of cell migration, loss of stress fiber and expression of intercellular junction proteins.

Results: In MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines, $\Delta 2$ -TGZ and AB186 lead to early action through a modification of cell morphology with elongated shape around 2 and 4 hours respectively and shrunken shape around 10 hours. This process is followed by an expression of claudin 1 at transcriptional and translational level with membrane localization at 9 hours. It is associated to an inhibition of cell migration before the apoptosis process in MDA-MB-231 and Hs578T cell lines. In addition, level of claudin 1 expression is associated to the inhibition of cell migration in stable

transfectants MDA-MB-231 cell line. Morphological studies demonstrated a modification of cell shape with loss of actin stress fibers. Claudin 1 also increases expression of intercellular junction proteins, occludin, ZO-1 and β -catenin at the membrane localization. Then, level of claudin 1 is correlated to enhancing the aggregation cells suggesting to restore adhesion junction.

Conclusion: Claudin 1 plays a key role in cell migration and could prevent the dissociation of breast cancer cells during metastasis process. TGZ derivatives is a good/potential/promising actors for the treatment of breast tumors which don't express claudin 1 anymore.

Key words: Breast cancer, Troglitazone, Claudin 1, Migration, Cytoskeleton, Cell-cell adhesion

Introduction

Tight junctions (TJs), also known *zonula occludens*, are the most apical intercellular junction. In normal epithelia, they are essential for maintaining the cell-cell adhesion with adherens junctions (AJs) and desmosomes [1]. In cancer, one of first steps of cell migration is the dissociation of cells by the disruption of TJs. Claudins are transmembrane protein that constitute the main component of TJs. They contain a PSD95, DlgA, ZO1 homology (PDZ) binding domain within the intracellular C-terminal tail, which interacts with cytosolic proteins as zonula occludens (ZO) scaffolding proteins. These proteins ZO form the interface between claudin membrane protein and the actin cytoskeleton [2]. This dynamic actin cytoskeleton is essential to organize and maintain polarization, cell shape and to contribute in cell migration [3]. In breast cancer, the loss of claudin 1 expression, the backbone of the tight junction, is correlated with increased malignant potential and invasiveness associated with recurrence of disease in invasive breast carcinoma patients [4-6]. However, *in vitro* and *in vivo* studies show controversial role of claudin 1 in cell migration [7].

Recently, our team has demonstrated that claudin 1 is upregulated by $\Delta 2$ -TGZ, a troglitazone (TGZ) derivative, in MDA-MB-231 and Hs578T breast cancer cells [8]. TGZ is a synthetic compounds of thiazolidinedione (TZDs) family like rosiglitazone (RGZ) and pioglitazone (PGZ) which are well known antidiabetic agents. TZDs also display anti-tumoral activity not only *in vitro* but also *in vivo* [9]. Despite promising *in vitro* data and pre-clinical studies highlighting the strong potential of TZDs in breast cancer treatment, clinical trials did not display clear beneficial effects on patients. Their anticancer proprieties were recently renewed interest by a phase II trial on chronic myeloid leukaemia (CML). These studies provided evidence that a combination with imatinib and PGZ improved the erosion of cancer stem cells pool in CML patients [10]. Unfortunately, the majority of TZDs was withdrawn from the market because of their side effects, especially severe hepatic toxicity for TGZ [11].

In this context, our team focuses on the development of new TGZ derivatives that are more selective and less toxic. So, we synthesized $\Delta 2$ -TGZ, derivative almost known, and AB186 which has been patented [12,13]. We have demonstrated that $\Delta 2$ -TGZ and AB186 exhibit lower toxicity towards human non-malignant hepatocytes in primary culture than TGZ and an improved anti-proliferative activity compared to TGZ on breast cancer cell lines [12,13]. We showed that $\Delta 2$ -TGZ induced apoptosis in

luminal MCF-7 and triple-negative MDA-MB-231 cells [14]. In MDA-MB-231 and Hs578T “claudin 1-low” triple-negative cells, claudin 1 overexpression leads also apoptosis and we demonstrated that claudin 1 is involved in the pro-apoptotic effect of Δ 2-TGZ after 24h of treatment [8]. Nevertheless, the early molecular mechanisms involved in Δ 2-TGZ and AB186 remain to be elucidated. In order to better understand TGZ derivatives mechanism of action, we analyzed the dynamic response to Δ 2-TGZ and AB186 with a real-time cell analysis (RTCA) system on two breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231, which express a low basal level of claudin 1. The latest highlights rapid modification of impedance, suggesting an early morphological modification event. Moreover, both compounds induce a rapid claudin 1 re-expression at the membrane associated to an inhibition of cell migration. We reported for the first time the key role of claudin 1 in the inhibition of the cell migration process by an action on the cytoskeleton and intercellular junctions in “claudin 1-low” breast cancer cells.

Materials and methods

Materials

The experimental procedures for the synthesis of Δ 2-TGZ and AB186 were performed as described previously [12-13]. The human breast cancer cell lines MDA-MB-231, Hs578T and MCF-7 were purchased from the American Type Culture Collection. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), RPMI Medium 1640 (RPMI), Trypsin-EDTA and PBS were purchased from Life technologies. ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma and Dispase I for Matrigel based cell culture, Ethanol (EtOH), dimethylsulfoxide (DMSO), fetal calf serum (FCS), L-glutamine, bovine insulin were purchased from Sigma-Aldrich. The plasmid pcDNA3.1/Zeo and Zeocin were purchased from ThermoFisher Scientific.

Methods

Cell culture and treatment

The human breast cancer cell lines were cultured at 37°C under 5% CO₂. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were cultured in phenol red DMEM and RPMI respectively, supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Hs578T cells were grown in DMEM medium containing phenol red supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine and 10 µg/mL bovine insulin. Cells were treated with 0.01% DMSO (vehicle) or various concentrations of Δ 2-TGZ and AB186 in 1% FCS containing medium. All these compounds were dissolved at 50 mM in sterile DMSO and were stored at -20°C.

Transient plasmid transfection assay

MDA-MB-231 (4.10⁵ cells/well) and Hs578T (16.10⁴ cells/well) cells were seeded in 6-well plates and transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1 containing a human claudin 1 expression vector (2.5 µg/well). Transfections were performed using TransIT-LT1 (Euromedex) according to the manufacturer's protocol.

Primers used for quantitative PCR			
	Foward	Reverse	Size
q-claudin-1 (NM_021101.4)	5'-CCCTATGACCCCAGTCAATG-3'	5'-ACCTCCCAGAAGGCAGAGA-3'	87 bp
q-RPLPO (NM_053275)	5'-GGCGACCGTGAAGTCCAAC-3'	5'-CCATCAGCACCCACAGCCTTC-3'	149 bp

Table 1. Sequence of primers and length of PCR products for genes used for quantitative PCR.

Generation of stable MDA-MB-231 cell line overexpressing claudin 1

MDA-MB-231 (4.10^5 cells/well) cells were seeded in 6-well plates and stably transfected with empty vector pcDNA3.1 or the pcDNA3.1 containing a human claudin 1 expression vector as for transient plasmid transfection. Individual clones were isolated after initial selection in Zeocin (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for two weeks, followed by dilution cloning to single cells into 96-well plates. Stable clone were expanded and characterized by western immunoblotting and immunofluorescence.

Real-time impedance-based cell analysis

MCF-7 and MDA-MB-231 cells attachment, proliferation and size variations were monitored in real-time and measured as impedance using 96-well E-PlatesTM and the xCELLigence system (Real Time Cell Analyzer Single Plate (RTCA SPH) system) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) [15]. MCF-7 (8.10^3 cells/well) and MDA-MB-231 (4.10^3 cells/well) cells were seeded into 96-wells microelectronic standard plates (E-plate). The cells were grown during 29 h before to be exposed to $\Delta 2$ -TGZ or AB186. Cell index (CI) is an arbitrary unit representing the result of the impedance induced by adherent cells to the electron flow. Change in cellular impedance was correlated with cell number, morphology and cell adhesion. CI is calculated as follows: $CI = (\text{impedance at time point } n - \text{impedance in the absence of cells}) / \text{nominal impedance value}$. For measurements, background impedance of the E-Plate was first determined before seeding the cells by the addition of 50 μL culture medium to each well and subtracted automatically by the RTCA software following the equation: $CI = (Z_i - Z_0) / 15$ with Z_i as the impedance at any given time point and Z_0 as the background signal. Subsequently, 150 μL of cell suspension containing MDA-MB-231 or MCF-7 cells was seeded in each well, and allowed to settle at the bottom of wells for 20 min before starting impedance measurement in 15 min intervals.

qPCR

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded overnight in 6-well plates at a density of 4.10^5 cells/well and were exposed to $\Delta 2$ -TGZ or AB186 for 3 h, 6 h or 9 h. Total RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Life technologies) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed as previously described [14]. Then, cDNA was subjected to quantitative Real-Time PCR (DNA Engine Opticon 2 System, Bio-Rad Laboratories). The specific primers are shown in Table 1. For that, 50 ng or 400 ng of ADNc for RPLP0 and claudin 1 amplification respectively, were added to a 96-well plate for PCR (Bio-Rad Laboratories) with 12 μL of a reaction mix consisting of 7.5 μL SYBR Green Supermix (1725125, Bio-Rad Laboratories), 1.5 μL with 375 nM of forward and reverse primers and 1.5 μL nuclease-free water. Amplification was carried out under the following conditions: (1) initial denaturation 95°C for 5 min; (2) 40 cycles of 95°C for 15 sec, 58°C for 30 sec or 45 sec for RPLP0 and claudin-1 respectively and 95°C for 30 sec. Relative expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with RPLP0 used as endogenous reference.

Subcellular fraction assay

MCF-7 ($2 \cdot 10^5$ cells/well), MDA-MB-231 ($4 \cdot 10^5$ cells/well), MDA-MB-231 stable transfectants ($4 \cdot 10^5$ cells/well) were seeded in 6-well plates. After 9 h of treatment for MCF-7 and MDA-MB-231 wild type cells or 48 h of seeding for stable transfectants, culture medium containing non-adherent cells was collected. Adherent cells were then trypsinised and pooled with non-adherent cells. After several centrifugation (1,200 rpm), membranous, cytosol and nuclear fractions were isolated by subcellular fraction kit according to the manufacturer's instructions (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, Thermofisher). Each proteins fractions were then subjected to western blot analysis.

Western immunoblotting

Western blot experiment was performed as described previously [8]. The antibodies against occludin (13409-1-AP, Proteintech), ZO-1 (GTX108587S, GeneTex) were diluted at 1:1000. LSR (#AP22065B, Abgent) and SP1 (Sc-59, Santa Cruz) were diluted at 1/500. Claudin 1 (C538-02C, US Biological) and β -catenin (E247 Epitomics, #1247-S) were diluted at 1:800 and 1:1500 respectively. The antibody α -tubulin (GTX102079 GeneTex) was dilute at 1:4000. Membranes were probed with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (SC-2005 for mouse antibody and SC-2004 for rabbit antibody, Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. The immunostaining was observed using a GelDoc 2000 imaging system (Bio-Rad Laboratories). Quantification of band intensity was performed using Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories).

Immunofluorescence

MCF-7 ($4 \cdot 10^4$ cells/well), MDA-MB-231 ($8 \cdot 10^4$ cells/well) and MDA-MB-231 stable transfectants ($8 \cdot 10^4$ cells/well) were seeded in 24-well plates on coverslips. MCF-7 and MDA-MB-231 were treated with $\Delta 2$ -TGZ or AB186 for 2h30, 4h30, 8h30, 9h, 10h30 and stable transfectants were grown during 48 h. Then, immunofluorescence experiment was performed as described previously [8]. Polymeric F-actin filaments were labelled with Phalloïdin conjugated to Alexa Fluor 488 (A12379, Thermofisher Scientific) diluted to 1:30. Microtubules and intermediate filaments were labelled with α -tubulin (GTX102079 GeneTex) and vimentin (MAB1633, Chemicon) respectively diluted to 1:250. Claudin 1 (CB1046, Calbiochem) antibody was diluted to 1:200. Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG antibody (A-21422, Invitrogen) was used diluted 1:1000 and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (A-11008, Invitrogen) was used diluted 1:500. For cytoskeletal analysis, nuclei were stained with Hoechst dye (33342, AAT Bioquest). Fluorescence labeling was observed under an Eclipse 80i microscope and images were collected using NIS-Elements Basic Research software (Nikon, Champigny sur Marne, France). The morphology of stable transfectants were observed in confocal microscopy LEICA TCS SPX AOBs CLSM. Nuclei of these cells were labelled with DRAQ 5 (#4084, Cell signaling). Images at a 0.282 micrometer side length square pixel size were obtained for each case in 1024 x 1024 matrices at x63 or x100 magnification (numerical aperture = 1.2 or 1.4 respectively) of the CLSM. Fluorescence emissions were recorded

within an Airy disk confocal pinhole setting (Airy 1). Each channel was acquired sequentially. The first channel detection (F-actin) was set from 502 to 545 nm with a 486 nm excitation laser lines. The second channel detection (claudin 1) was set from 565 to 640 nm with a 555 nm excitation laser line. The third channel detection (DRAQ 5, Cell signaling, #4084) was set from 683 to 730 nm with a 650 nm excitation laser line. Confocal 3D Acquisitions (xyz) were performed by a z-axis projection maximum intensity mode on 3, 6 or 10 micron thick of each condition.

Wound healing assay

MDA-MB-231 (6.10^5 cells/well) and Hs578T (2.10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates for 24 h until 90% of confluence. A scratch was made with a 200 μ L pipett tips throught the cell monolayer and cells were treated with Δ 2-TGZ or AB186 for 0, 3, 6 or 12 h. For transient transfectants, scratch was made 6 h post-transfection. Wound closure was observed and photographed under an Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Wound closure was determined by measuring the area free of cells using NIS-Elements Basic Research software (Nikon, Champigny sur Marne, France). Each wound closure corresponds to the mean of three different areas.

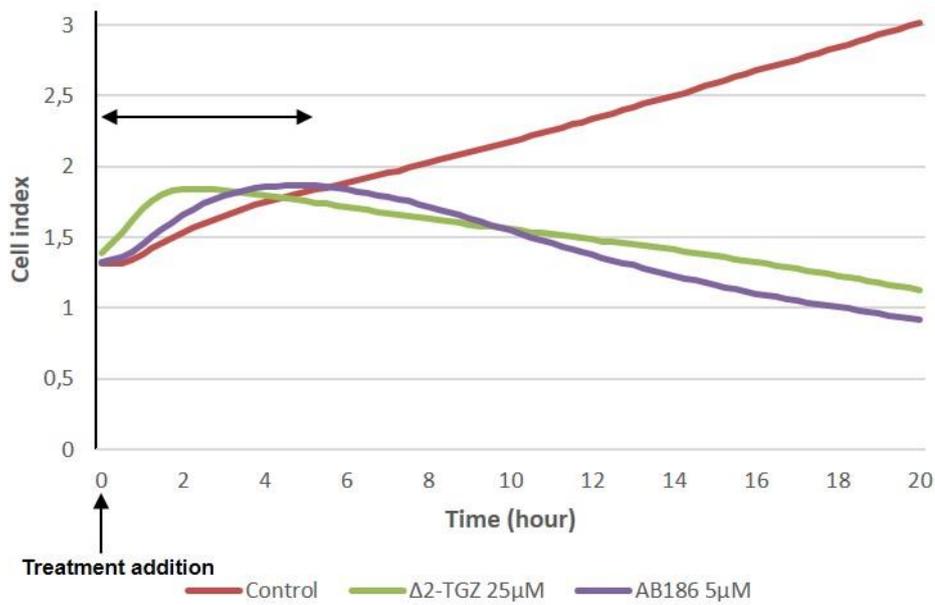
Migration assay

MDA-MB-231 (13750 cells/well) and Hs578T (13750 cells/well) were seeded in the upper chamber of Transwell membranes (6.5 mm Transwell® 8.0 μ m pore Polyester Membrane Insert, #3464, Corning) and treated with Δ 2-TGZ or AB186 in medium supplemented with 1% FCS. Stable MDA-MB-231 transfectants (13750 cells/well) were seeded in the upper chamber in medium supplemented with 10% FCS. The upper chamber of insert containing cells was placed into the lower chamber supplemented with 10% FCS for treatment or 20% for transfectants as chemoattractant. After 9 h of treatment or 24 h for stable transfectants, inserts were washed twice in PBS 1X, fixed 30 min with paraformaldehyde 4% and stained with Crystal purple 2% for 30 min. The non-migrating cancer cells remaining on the upper side of the filter were scraped off. Then, acid acetic was added to the lower chamber for 10 min and the migrated cells on the lower chamber were counted by absorbance measurement using spectrophotometer (Perkin Elmer).

Tumorsphere culture

MDA-MB-231 (12.10^4 cells/well) were suspended in 200 μ L of Matrigel at 6 mg/mL (ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma, Sigma) on ice. Then, cells were seeded in a 6-well cell culture plate that was coated with 80 μ L of Matrigel. After 45 min at 37°C, 300 μ L of medium containing 10% of FCS were added. Then, cells were cultured at 37°C for 10 days and medium culture was replaced every two-three days. Tumorspheres were dissociated to Matrigel in presence of Dispase I (1.4U/well, Sigma) at 37°C for 5 min. After centrifugation (115g, 5 min), tumorspheres were spread over slider and subjected to immunofluorescence staining.

(A) MCF-7



(B) MDA-MB-231

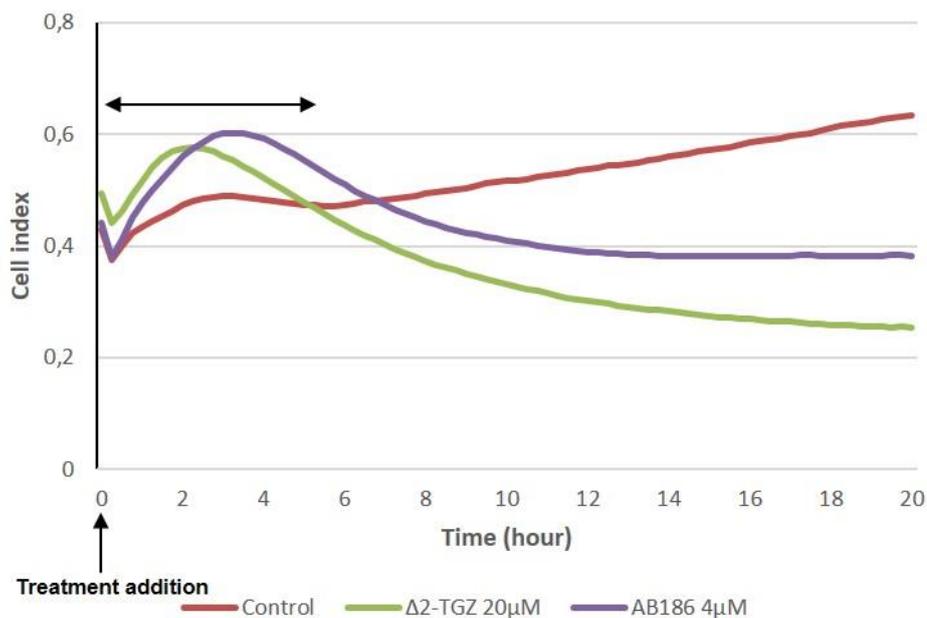


Fig 1. Kinetics of TGZ derivatives effects on MDA-MB-231 and MCF-7 cells according to real-time impedance analysis. MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells were grown during 29 h before exposure to the 25 or 20 μ M of $\Delta 2$ -TGZ or 5 or 4 μ M of AB186 respectively (treatment addition). Control cells were treated with DMSO. Cell index was monitored during 20 h after TGZ derivatives exposure. Reported data are the means of three experiments.

		$\Delta 2$ -TGZ/Control	AB186/Control
MCF-7 Maximal difference	1	2h	2h30
	2	1h45	4h
	3	1h30	5h15
	Mean	1h45\pm8min	3h55\pm47min
MDA-MB-231 Maximal difference	1	1h45	3h30
	2	1h45	4h
	3	2h	4h15
	Mean	1h50\pm5min	3h55\pm13min

Table 2. Maximal difference of cell index between control condition and treated condition, $\Delta 2$ -TGZ/Control and AB186/Control, was determined for three independent experiments. The mean of maximal difference of CI for each treatment was determined in MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

Aggregation assay

MDA-MB-231 and Hs578T cells were trypsinised, counted and 250,000 cells were added in a microtube under orbital agitation for 30 min. Aggregates were photographed on time 0 (T0) and 30 min (T30) under an Eclipse 80i microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France). Five images were performed for each condition. Aggregation index was calculated following the equation: $1 - (\text{number of isolated cells at T30} / \text{number of isolated cells at T0})$. Cells in duplicates were counted as isolated cells.

Statistical analysis

The results of each experiment were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of three to six different experiments. Bars represent mean \pm SEM. Statistical differences in western blotting, migration assay, aggregation assay and qPCR were determined using Student's *t* test or ANOVA test with Bonferroni post-hoc. Differences in which P was less than 0.05 were statistically significant (SPSS v11.0 Computer Software).

Results

1. TGZ derivatives induce early variations of impedance into MCF-7 and MDA-MB-231 cells

In order to investigate the kinetic of event leading to anticancer effect of $\Delta 2$ -TGZ and AB186, we analyze the profiles obtained from the real-time cell analysis system (RTCA). This system measured impedance-based signals and provides dynamic information. Impedance readout is modified by cell adhesion, cell number and cell morphology and provide useful information on the kinetic of event. The cellular response was continually monitored for 20h after treatment. The cell index (CI) is the result of the impedance induced by adherent cells to the electron flow and is calculated as described in materials and methods. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were exposed to $\Delta 2$ -TGZ (25 μ M and 20 μ M respectively) or AB186 (5 μ M and 4 μ M respectively), doses that were just above the cell viability IC₅₀ value. In both control cells, the value of CI increases until the end of experiment. In both cell lines, CI kinetics were rapidly modified after $\Delta 2$ -TGZ and AB186 exposure compared to the control cells (**Figure 1**). In MCF-7 cells, we observed a rapid increase of CI compared to untreated cells followed by a decrease in response to $\Delta 2$ -TGZ or AB186 (**Figure 1A**). In MDA-MB-231 cells, we observed the same curve profile (**Figure 1B**). In order to better correlate the impedance modification to a biological effect, we determined the time of maximal difference of CI between untreated and treated cells (**Table 2**). The maximal differences between untreated and treated MCF-7 cells were observed at 1 h 45 min and 3 h 55 min in response to $\Delta 2$ -TGZ or AB186 respectively. In MDA-MB-231 cells, the CI reached a maximal difference at 1 h 50 min and 3 h 55 min after $\Delta 2$ -TGZ or AB186 exposure respectively. Unexpectedly, these maximal differences of CI were observed at very early time in both cell lines, before cell proliferation event could affect the impedance. These results suggested an early morphology or adhesion modifications.

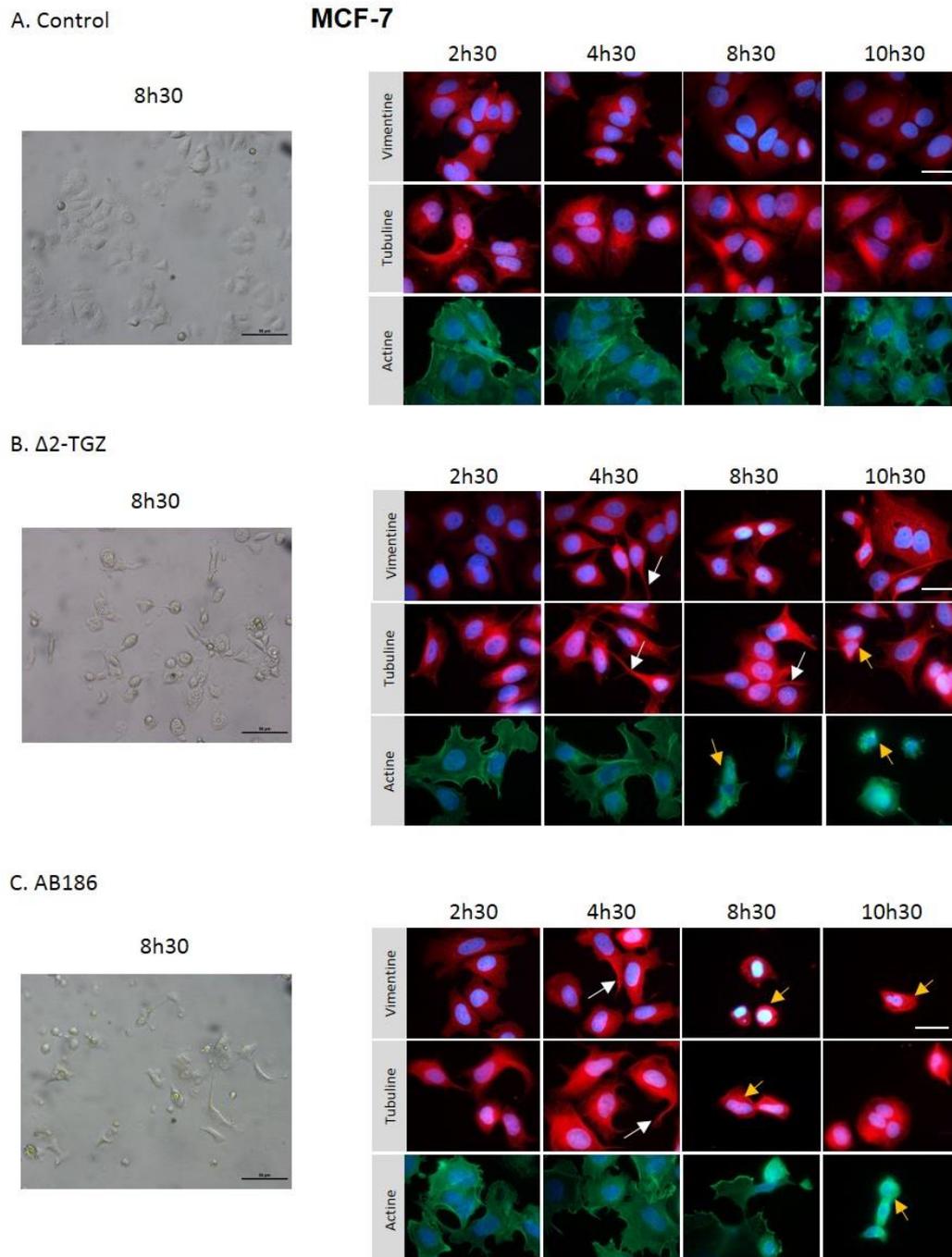


Fig 2. TGZ derivatives alter MCF-7 morphology. MCF-7 cells were treated with 25 μ M of $\Delta 2$ -TGZ or 5 μ M of AB186 compound during 2h30; 4h30; 8h30 and 10h30. Control cells were exposed to DMSO, the solvent of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 compound. At 8h30 of treatment, cell shape were photographed in phase contrast microscopy under an Eclipse 80i microscope (left pictures). Then, cells were subjected to immunofluorescence analysis and stained with vimentin, α -tubulin and actin antibodies (right pictures). Cell nuclei were labelled with Hoechst. $\Delta 2$ -TGZ and AB186 lead to disruption of cell-cell contact compared to untreated cells. We observed elongated cells (white arrow) and some shrunken cells (yellow arrow). Fluorescence labeling was observed an Eclipse 80i microscope with magnification 1000x. Bar represents 50 μ m.

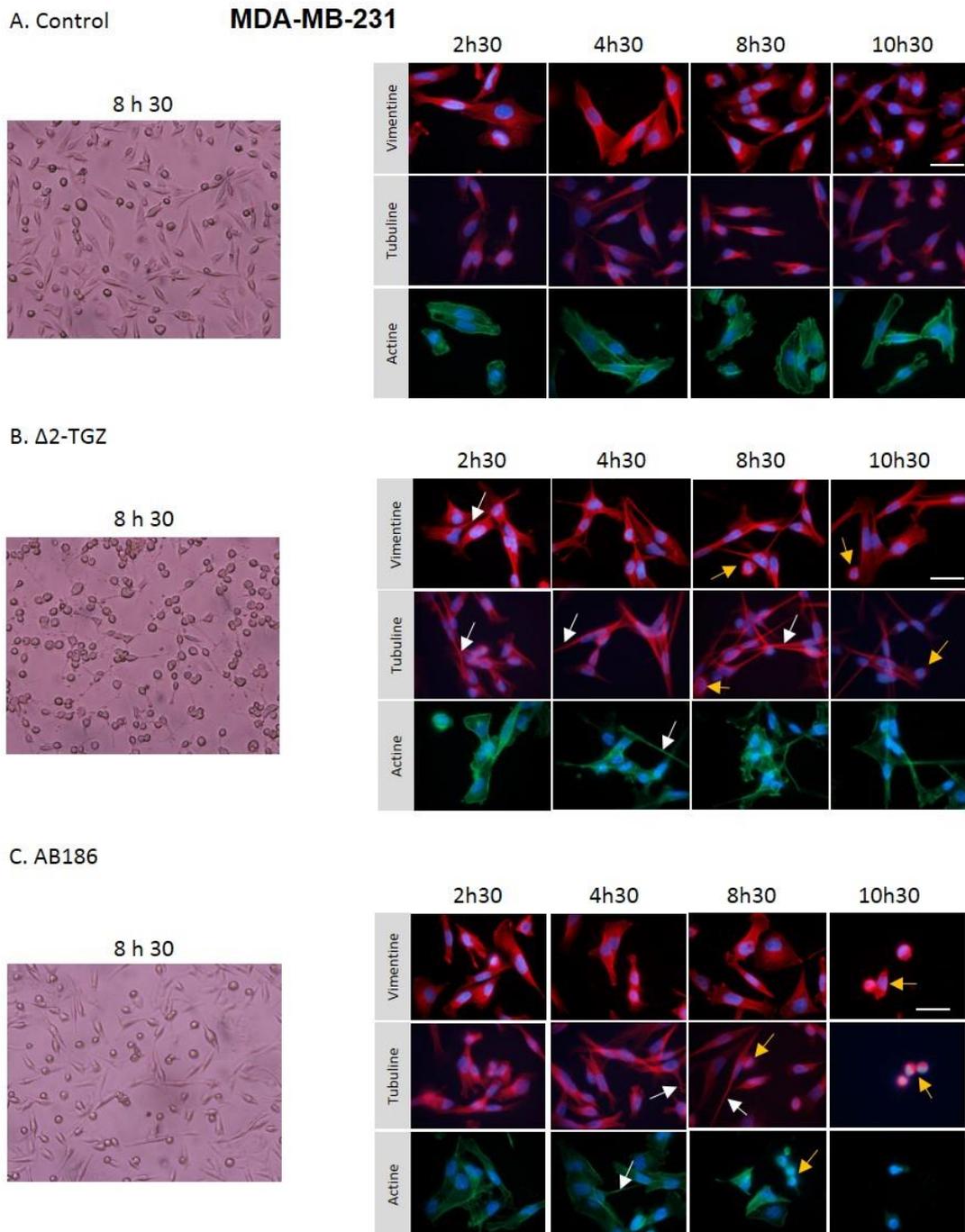
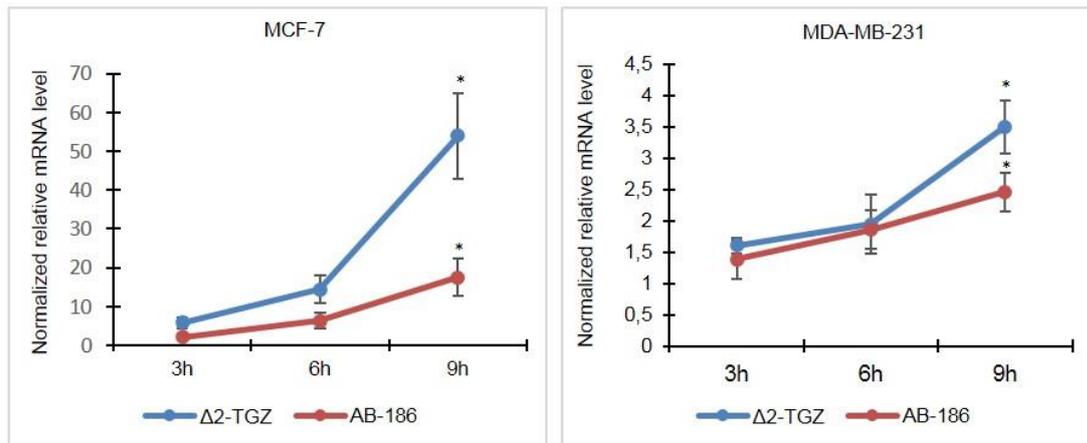
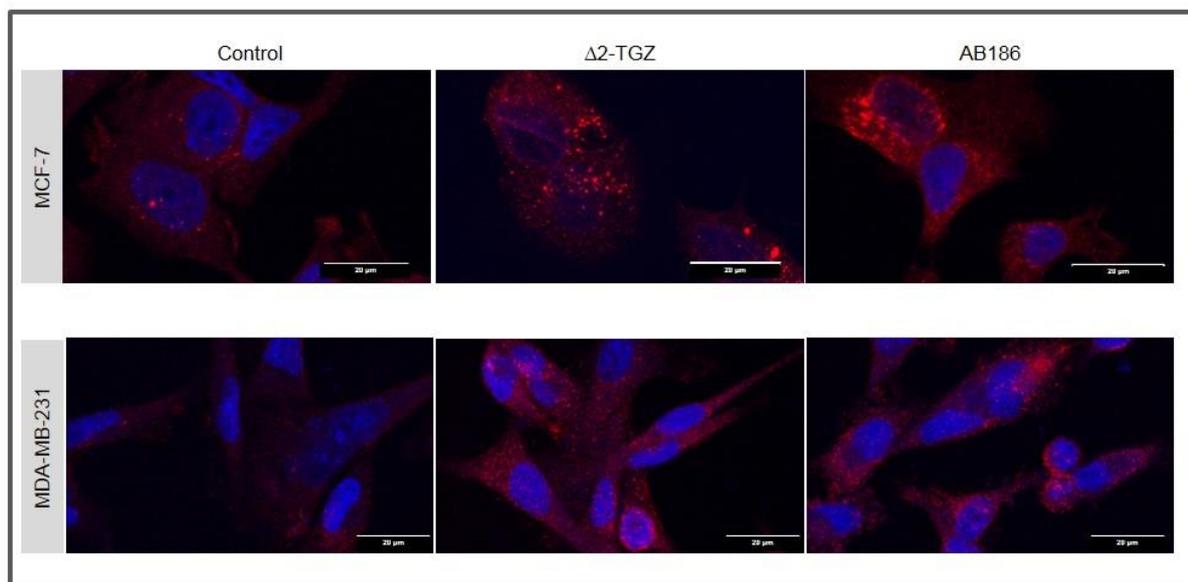


Fig 3. TGZ derivatives alter MDA-MB-231 morphology. MDA-MB-231 cells were treated with 20 μ M of Δ 2-TGZ or 4 μ M of AB186 compound during 2h30; 4h30; 8h30 and 10h30. Control cells were exposed to DMSO, the solvent of Δ 2-TGZ and AB186 compound. At 8h30 of treatment, cell shape were photographed in phase contrast microscopy under an Eclipse 80i microscope (left pictures). Then, cells were subjected to immunofluorescence analysis and stained with vimentin, α -tubulin and actin antibodies (right pictures). Cell nuclei were labelled with Hoechst. We observed elongated cells (white arrow) and some shrunken cells (yellow arrow). Fluorescence labeling was observed an Eclipse 80i microscope with magnification 1000x. Bar represents 50 μ m.

(A)



(B)



(C)

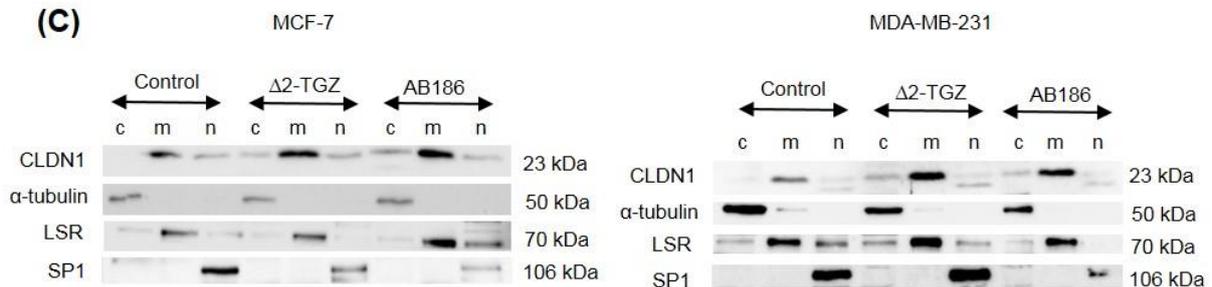


Fig 4. TGZ derivatives increase claudin 1 protein and transcript level in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. (A) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 25 or 20 μ M of Δ 2-TGZ respectively, 5 or 4 μ M of AB186 respectively or DMSO for 3h, 6h and 9h. At the indicated time points, cells were lysed for RNA analysis. Claudin 1 expression was studied by quantitative PCR. Graph represents relative expression determined by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant difference from control cells, where $*p < 0.05$. (B) After 9h of treatment with

DMSO (Control), $\Delta 2$ -TGZ or AB186, immunofluorescence staining for claudin 1 was performed in both cell lines. DRAQ 5 staining was used for visualisation of the nuclei. Cells were observed by confocal microscopy with magnification from x1540 depending of digital confocal zooming combine with x100 objective (NA 1.4). The z-axis projection on 3 or 6 micron thick of MCF-7 or MDA-MB-231 respectively are presented. Bar represents 20 μ m. (C) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with $\Delta 2$ -TGZ, AB186 or DMSO (Control) for 9h. Then, membranous (m), cytosol (c) and nuclear (n) fractions of each cell were isolated by subcellular fraction kit and subjected to claudin 1 (CLDN1) protein analysis by western blot. Antibodies recognizing, α -tubulin, LSR and SP1 were used as cytosolic, membrane and nuclear protein specific fraction.

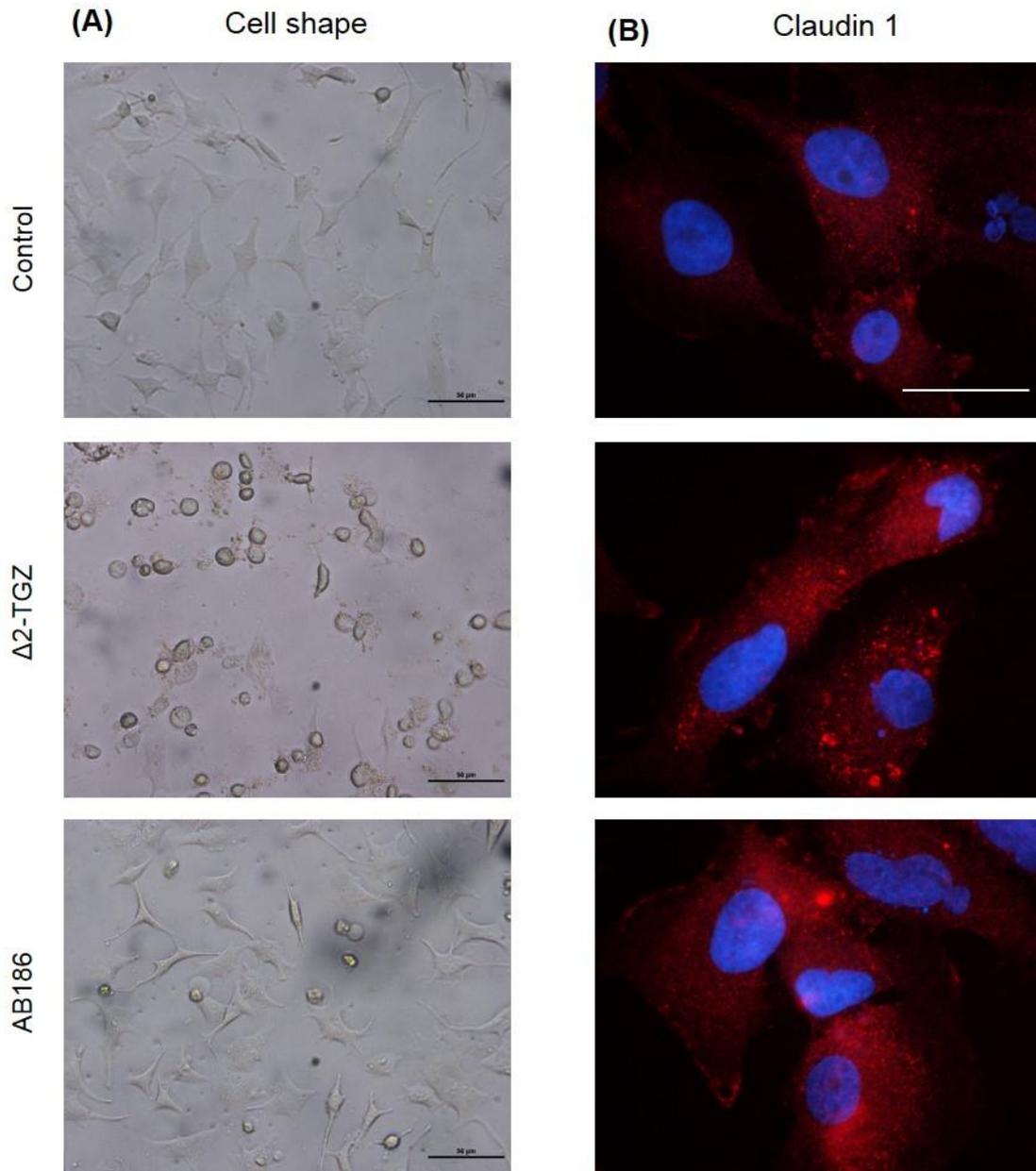
2. TGZ derivatives induce early morphological change into MCF-7 and MDA-MB-231 cells

To test the hypothesis of early morphology modification induced by TGZ derivatives, we observed the cell shape in phase contrast microscopy after 8 h 30 of treatment. In MCF-7 cells, $\Delta 2$ -TGZ and AB186 lead to disruption of cell-cell contact compared to untreated cells. We observed elongated cells and some shrunken cells (**Figure 2**). In MDA-MB-231 cells, we observed also elongated cells and some shrunken cells after exposure of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 (**Figure 3**). Many cells formed cell protrusions to maintain contact with neighboring cells with $\Delta 2$ -TGZ exposition (**Figure 3B**). Then, we analyzed cell morphology using three characteristic cytoskeletal constituents by immunofluorescence on MCF-7 and MDA-MB-231 cells: actin microfilament, α -tubulin, a microtubule marker and vimentin, an intermediate filament marker. On the basis of the maximal difference of CI obtained by impedance analysis (**Table 2**), we exposed MCF-7 and MDA-MB-231 cells to TGZ derivatives during 2 h 30, 4 h 30, 8 h 30 or 10 h 30. In vehicle control MCF7-cells, the staining with specific antibodies for vimentin, α -tubulin and actin revealed the characteristic morphology of adherent growing cells (**Figure 2A**). In response to $\Delta 2$ -TGZ or AB186, MCF-7 cells morphology was altered by changes in cell shape and size. Around 4 h 30 exposition to $\Delta 2$ -TGZ and AB186, we observed some elongated cells. At 8 h 30 treatment, we detected some shrunken cells in response to $\Delta 2$ -TGZ and AB186 with intensely staining and condensed chromatin. At 10 h 30 of treatment, almost all cells are shrunken (**Figure 2B and 2C**). In **Figure 3A**, we observed normal morphology of adherent growing MDA-MB-231 cells stained with vimentin, α -tubulin and actin antibodies. In response to $\Delta 2$ -TGZ and AB186, MDA-MB-231 cells morphology was also altered by changes in the cell shape and size. After 2 h 30 and 4 h 30 of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment respectively, we detected elongated cells with unorganized actin network (**Figure 3B and 3C**). From 8 h 30 of treatment, we observed some shrunken cells in response to $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment (**Figure 3B and 3C**). We detected only some shrunken cells after 10 h 30 to $\Delta 2$ -TGZ exposition while all cells are shrunken in response to AB186 (**Figure 3B**). This morphology analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells by TGZ derivatives showed a modification of cell shape in according to early cell index variation measured by impedance.

3. TGZ derivatives increase transcript and protein level of claudin 1 in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

In a previously study, we showed that $\Delta 2$ -TGZ induced claudin 1 protein expression at 24 h exposition in “claudin 1-low” MDA-MB-231 breast cancer cells and that claudin 1 is involved in the pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ [8]. We hypothesized that claudin 1 could also be involved in variations of impedance induced by both TGZ derivatives. Therefore, we first analyzed claudin 1 expression by qPCR after 3 h, 6 h and 9 h of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 exposition in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (**Figure 4A**). We observed a significant up-regulation of claudin 1 transcripts after 9 h of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment in both cell lines: 53.93-fold and 17.52-fold respectively in MCF-7 cells and 3.50-fold and 2.46-fold respectively in MDA-MB-231 cells. Then, we confirmed these data at protein level by immunofluorescence at 9 h of treatment (**Figure 4B**). In both untreated cells, we observed a low basal level of claudin 1 according to molecular profile of “claudin 1-low” subtype. At 9 h, we observed a slightly

Hs578T



Supplementary data.1. TGZ derivatives induce morphological change and increase claudin 1 protein level in Hs578T cells. Hs578T cells were treated with 20 μM of $\Delta 2$ -TGZ or 4 μM of AB186 compound. Control cells were exposed to DMSO, the solvent of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 compound. (A) At 9h of treatment, cell shape were photographed in phase contrast microscopy under an Eclipse 80i microscope. (B) Cells were subjected to immunofluorescence analysis and stained with claudin 1 antibody. Cell nuclei were labelled with Hoechst. Fluorescence labeling was observed under an Eclipse 80i microscope with magnification 1000x. Bar represents 50 μm .

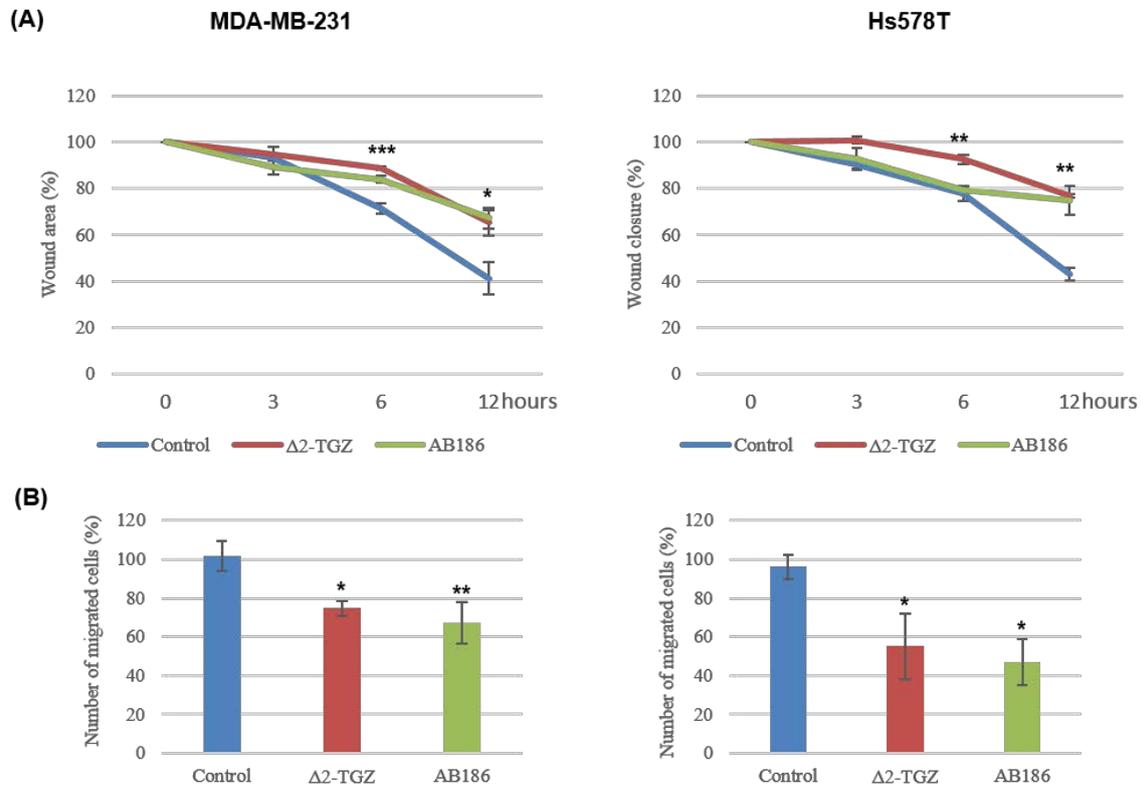


Fig 5. TGZ derivatives alter migration properties of MDA-MB-231 and Hs578T cells. MDA-MB-231 cells and Hs578T cells were exposed to 20 μ M of $\Delta 2$ -TGZ or 4 μ M of AB186 or DMSO (Control) and subjected to wound healing (A) or Transwell assay (B). (A) Cell free area was measured after 3h, 6h and 12h of TGZ derivatives exposition. (B) Cells were seeded in the upper chamber of Transwell membranes and treated with $\Delta 2$ -TGZ or AB186 for 9h. Graph represent the average of migrated cells on the lower chamber. Reported data are the means of three or six experiments. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant difference of migration from control cells, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

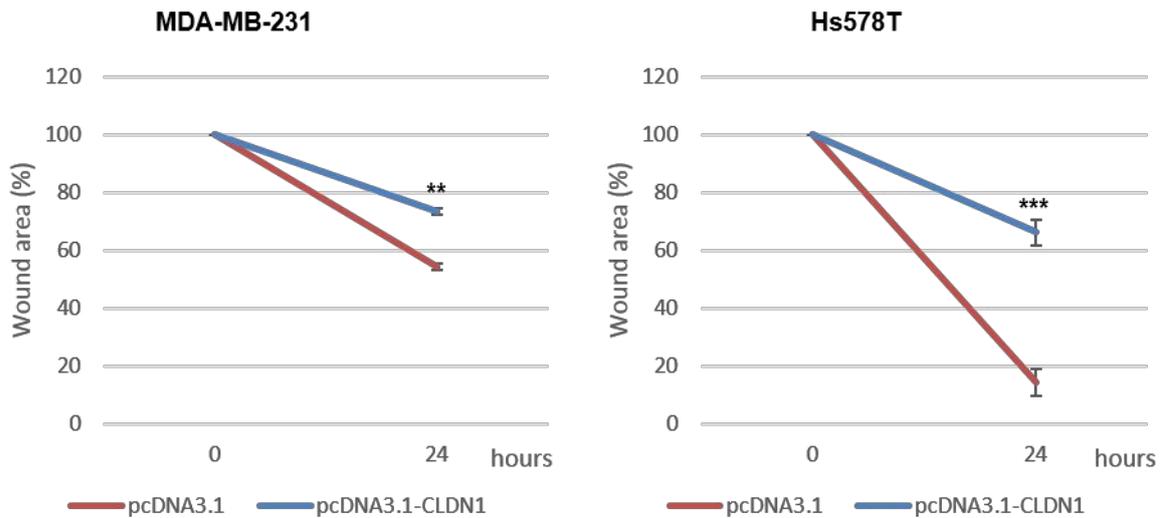


Fig 6. Claudin 1 overexpression inhibits MDA-MB-231 and Hs578T cells migration. MDA-MB-231 cells and Hs578T cells were transiently transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1 containing a human claudin 1 expression vector (pcDNA3.1-CLDN1). After 24h, cells were subjected to wound healing assay. Cell free area was measured 24h after the transfection of MDA-MB-231 cells and Hs578T cells. Reported data are the means of three or six experiments. Student-t test was used to determine significance difference from control cells, were ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

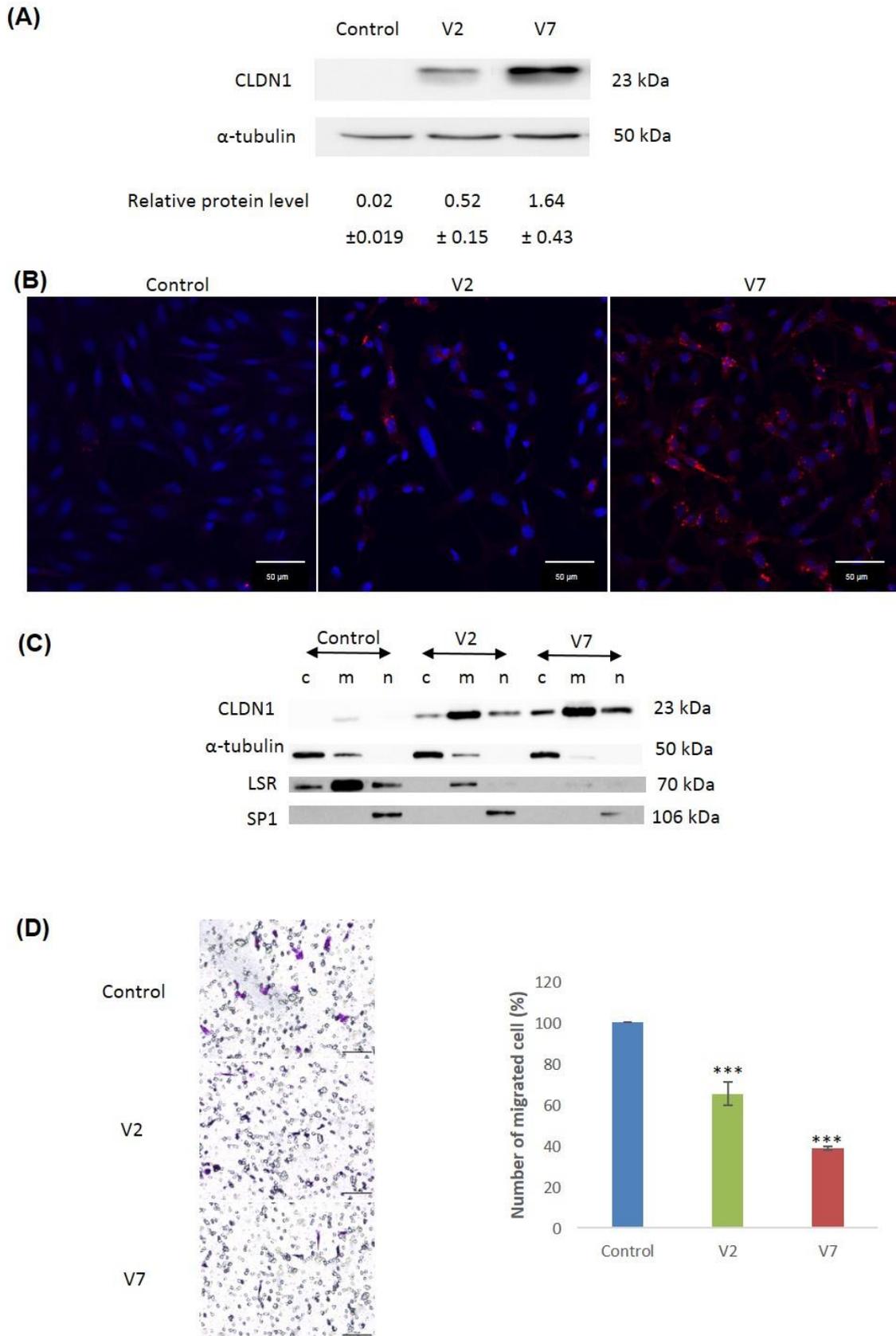


Fig.7 Claudin 1 level is correlated to inhibition of migration in MDA-MB-231 cells. (A) Claudin 1 stable MDA-MB-231 overexpressing cells (V2 and V7) and control cells containing corresponding empty vector (Control) were characterized by western blot analysis (A), immunofluorescence staining

(B), protein subcellular fraction (C) and Transwell assay (D). (A) Western blot analysis was performed with antibodies recognizing claudin 1 (CLDN1) and α -tubulin was used as loading control. Relative protein level corresponds to claudin 1 band intensity value adjusted to α -tubulin. The values represent the means \pm SEM of five different experiments. (B) Immunofluorescence staining for claudin 1 was performed in stable MDA-MB-231 overexpressing cells. DRAQ5 staining was used for visualization of the nuclei. Cells were observed by confocal microscopy with magnification from x1540 depending of digital confocal zooming combine with x100 objective (NA 1.4). The z-axis projection on 6 micron thick of each condition are presented. Bar represents 50 μ m. (C) Subcellular fraction assay was performed in order to isolate membranous (m), cytosol (c) and nuclear (n) fractions of stable MDA-MB-231 overexpressing cells. Then, each fraction was subjected to claudin 1 (CLDN1) protein analysis by Western blot. Antibodies recognizing, α -tubulin, LSR and SP1 were used as cytosolic, membrane and nuclear protein specific. (D) Claudin 1 stable MDA-MB-231 overexpressing cells (V2 and V7) and control cells containing corresponding empty vector (Control) were seeded in the upper chamber of Transwell membranes for 24h. Cells staining with purple crystal were observed under an Eclipse 80i microscope (left picture). Graph represent the average of migrated cells on the lower chamber. Reported data are the means of five experiments. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant difference of migration from control cells, where $*p<0.05$, $**p<0.01$ and $***p<0.001$.

increase of claudin 1 signal in $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treated cells which displayed a punctiform labeling in accord to transcriptional analysis (**Figure 4B**). Cells were fractionated to document further the claudin 1 localization. Subcellular fractionation revealed that claudin 1 is mainly present at the membrane in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after 9 h of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 exposure (**Figure 4C**).

4. TGZ derivatives inhibit migration proprieties of two highly metastatic TNBC cells lines: MDA-MB-231 and Hs578T cells

The modifications of cell shape and the disruption of cytoskeleton induced by $\Delta 2$ -TGZ and AB186 suggest that these compounds are involved in cell migration change. It is well described that cytoskeleton modifications can influence cell migration properties. To determine whether $\Delta 2$ -TGZ and AB186 can affect cell migration, we performed a wound-healing assay on MDA-MB-231 and Hs578T, two cell lines “claudin 1-low” subtype. We chose to work with the cell line Hs578T because of its highly metastatic properties. Moreover, we observed also cell morphology modification and claudin 1 expression mediated by $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment in this cell line (**Sup.data1**). MDA-MB-231 cells were exposed to TGZ derivatives and cell free area were measured after 3 h, 6 h and 12 h of treatment (**Figure 5A**). We observed a significant wound closure inhibition at 6 h of exposition of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treated cells compared to control cells. In Hs578T cells, we observed an inhibition of wound healing closure significantly at 6 h and 12 h of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment respectively (**Figure 5A**). We confirmed this results by use the Transwell assay after 9 h exposure. In MDA-MB-231 cells, the number of migrated cells were decreased significantly for 27.16% and 34.7% by $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment respectively compared to untreated cells (**Figure 5B**). In the same way, $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment reduce significantly the migration by 41.11% and 49.33% respectively in Hs578T cells compared to untreated cells (**Figure 5B**).

5. Claudin 1 overexpression inhibit MDA-MB-231 and Hs578T cells migration

Claudin 1 is an important actor of the intercellular adhesion. On this basis, we hypothesized that reduced claudin 1 expression could be enhances tumor cell motility and invasion. So, we examine the role of claudin 1 in migration proprieties of MDA-MB-231 and Hs578T cell lines. Thus, we overexpressed claudin 1 in both cell lines by transient transfection and studied migration by wound healing assay. In presence of claudin 1, the wound closure were significantly decrease for 19.1 % and 52 % in MDA-MB-231 and Hs578T respectively, compared to “claudin 1-low” cells after 24 h of transfection (**Figure 6**).

6. Claudin 1 level is correlated to inhibition of migration in MDA-MB-231 cells

In order to examine specifically claudin 1 involvement in these processes, we developed stable transfectant of MDA-MB-231 that overexpressed claudin 1. The overexpression was confirmed by western blot and ICC analyses (**Figure 7 A and B**). As observed by western blot, the clones V2 and V7 displayed a significant induction of claudin 1 compared to the control transfected with empty corresponding vector: clone V7 expressed 3.2 fold increase compared to clone V2 (**Figure 7 A**). ICC analyses revealed that both clones displayed a punctiform labeling for claudin 1 with as expected a

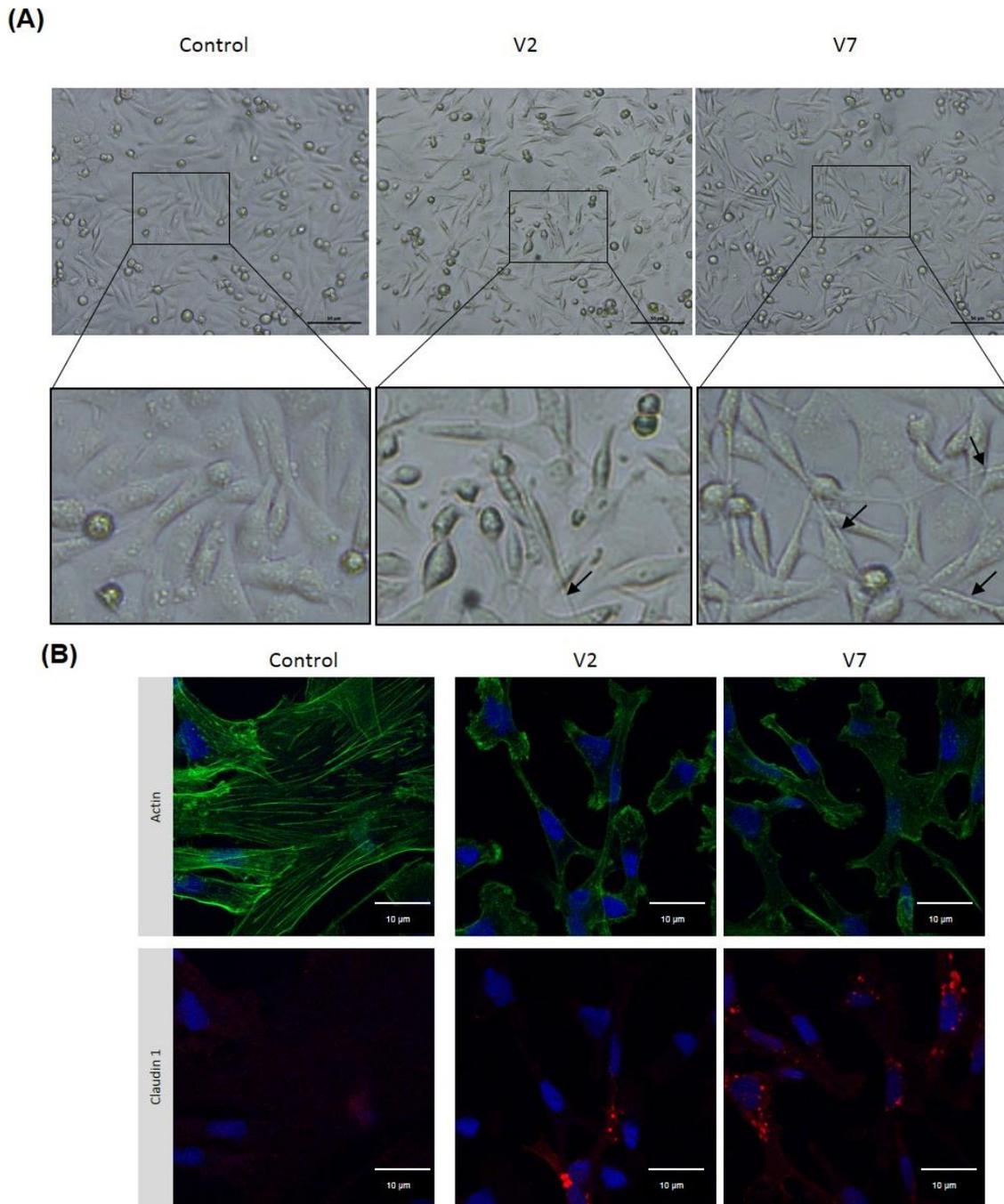


Fig 8. Claudin 1 brings morphological changes through the disappearance of stress fibers in MDA-MB-231. (A) Shape of claudin 1 stable MDA-MB-231 overexpressing cells (V2 and V7) and control cells (Control) were photographed in phase contrast microscopy under an Eclipse 80i microscope. At high magnification, we observed elongated cells (black arrow). (B) These cells were also subjected to immunofluorescence analysis and were stained with claudin 1 and actin antibodies. Cell nuclei were labelled with DRAQ5. Cells were observed by confocal microscopy with magnification from x1540 depending of digital confocal zooming combine with x100 objective (NA 1.4). The z-axis projection on 6 micron thick of each condition are presented. Bar represents 10 μ m.

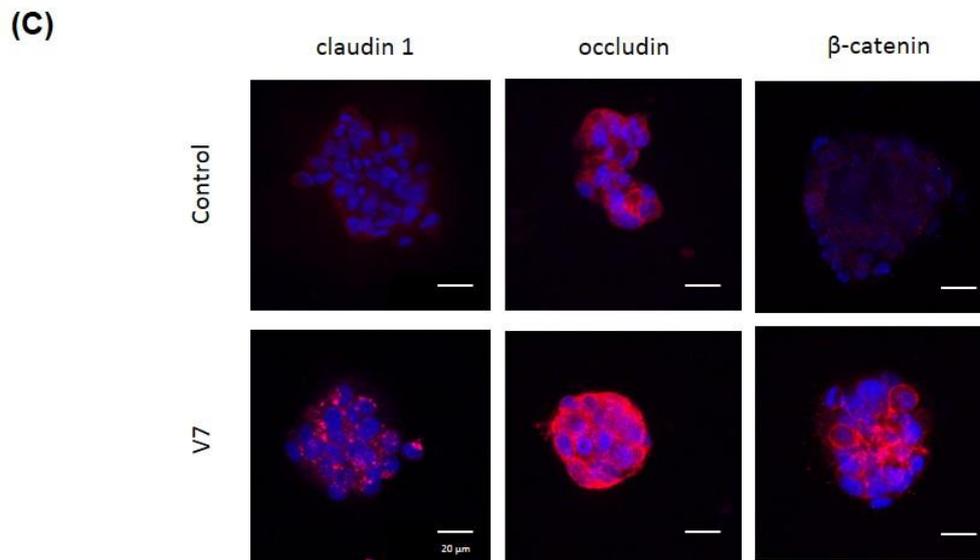
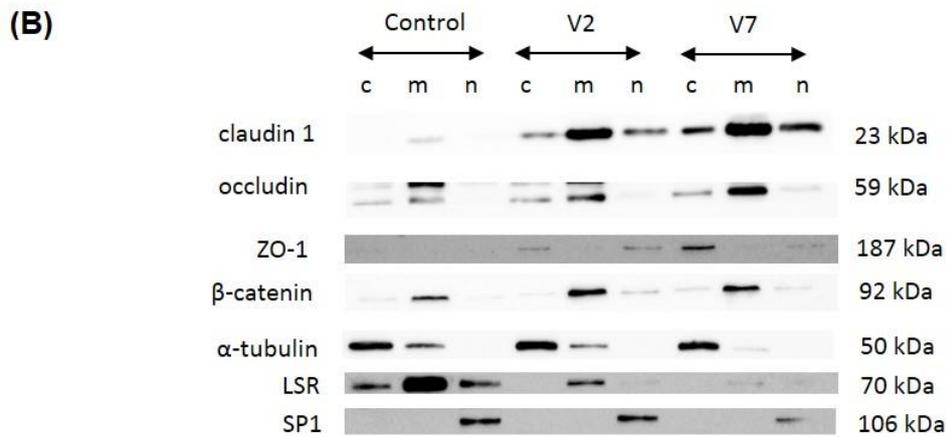
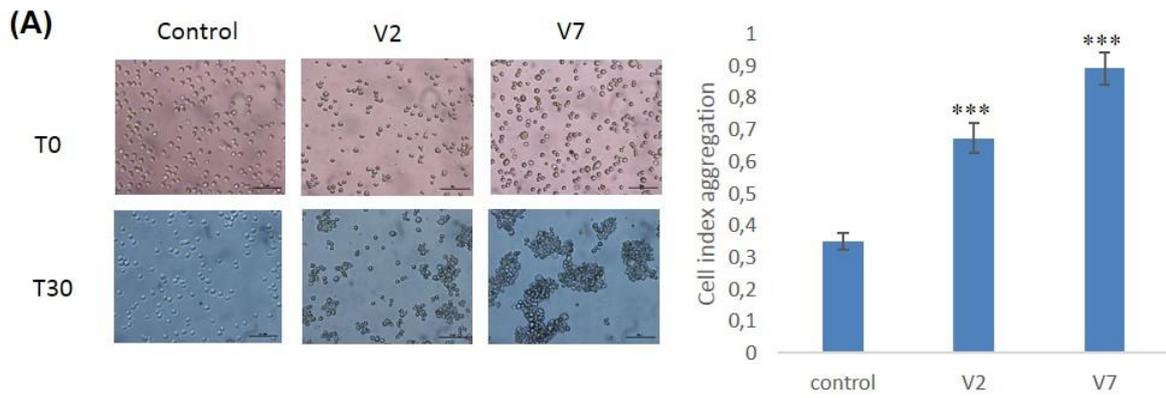
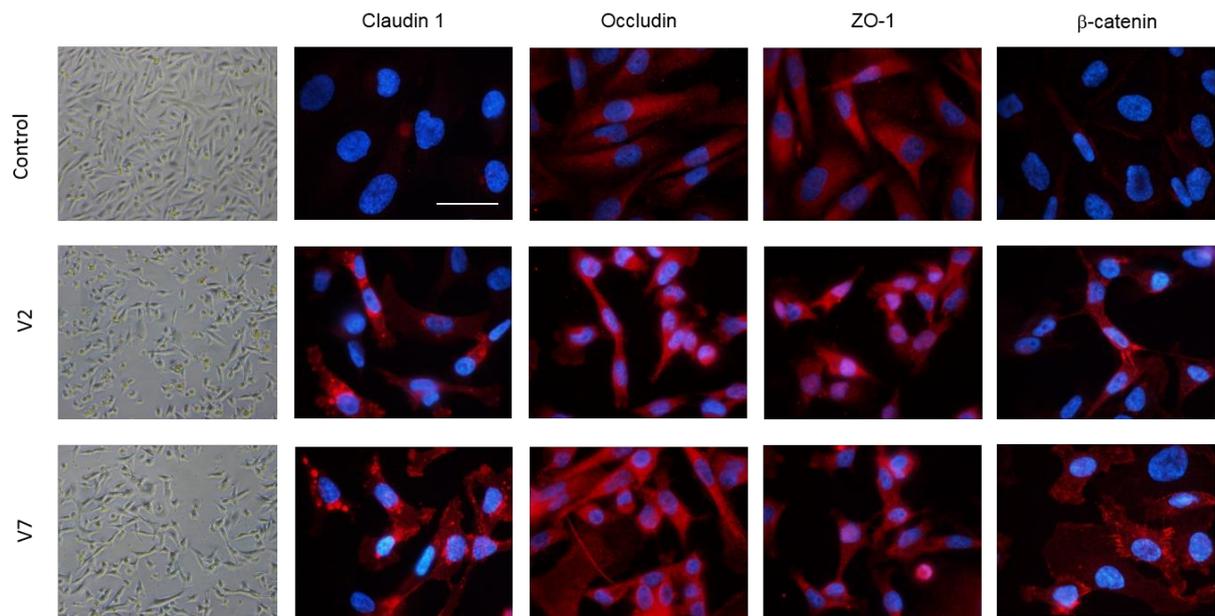


Fig 9. Claudin 1 overexpression creates neo-formation of junctions of MDA-MB-231 cells. (A) Claudin 1 stable MDA-MB-231 overexpressing cells (V2 and V7) and control cells (Control) were subjected to aggregation assay. Cells were observed after 0 (T0) and 30 min (T30) and photographed in phase contrast microscopy under an Eclipse 80i microscope (left picture). Graph represents aggregation

index calculated following the equation: $1 - (\text{number of isolated cells at T30} / \text{number of isolated cells at T0})$. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant difference of aggregation index from control cells, where $***p < 0.001$ (B) Subcellular fraction assay was performed in order to isolate membranous (m), cytosol (c) and nuclear (n) fractions of stable MDA-MB-231 overexpressing cells. Then, each fraction was subjected to Western blot analysis. Intercellular junctions were studied with tight junction occludin, ZO-1 and claudin 1 antibodies and adherent junction β -catenin antibody. Antibodies recognizing, α -tubulin, LSR and SP1 were used as cytosolic, membrane and nuclear protein specific. (C) Tumorspheres of claudin 1 stable MDA-MB-231 overexpressing cells (V7) and control cells containing corresponding empty vector (Control) were subjected to immunofluorescence analysis and were stained with claudin 1, occludin and β -catenin antibodies. Cell nuclei were labelled with DRAQ5. Cells were observed by confocal microscopy with magnification from x630 depending of digital confocal zooming combine with x63 objective (NA 1.2). The z-axis projection on 10 micron thick of each condition are presented. Bar represents 20 μm .



Supplementary data.2. Claudin 1 overexpression induces tight and adherent junction proteins in MDA-MB-231 cells. Shape of claudin 1 stable MDA-MB-231 overexpressing cells (V2 and V7) and control cells (Control) were photographed in phase contrast microscopy under an Eclipse 80i microscope (left picture). These cells were also subjected to immunofluorescence analysis and were stained with tight junction occludin, ZO-1 and claudin 1 antibodies and adherens junction β -catenin antibody. Cell nuclei were labelled with Hoechst. Fluorescence labeling was observed under an Eclipse 80i microscope with magnification 1000x. Bar represents 50 μ m.

higher signal in clone V7 (**Figure 7 B**). As claudin 1 localization is crucial for its role, we dissociated cytoplasmic, nuclear and membrane fraction. As shown in **Figure 7C**, in both clones, claudin 1 is mainly expressed in membrane fraction with low level in cytoplasmic and nuclear fraction. The stable transfected cells allowed us to test if the level of claudin 1 could directly affect the migration. We analyzed the migration through Boyden chamber assay. We observed 100% of cell expressing empty vector (control) migrated through the chamber while only 65.2% cells from the clone V2 and 38.9% cells from clone V7 migration. (**Figure 7D**).

7. Claudin 1 brings morphological changes through the disappearance of stress fibers in MDA-MB-231 cells

It is well established that migration is preceded by cytoskeleton and morphological events. Interestingly we observed that the morphology and cell-cell contacts for both clones are modified compared to the control (**Figure 8A**). For the same concentration seed, after 4 days, control vector cells are confluent while clone V2 and V7 are under confluent. We never could reach the confluence with clone V2 and V7. Clone V2 and V7 were less spread out than control empty vector. Interestingly, we detected elongated cells as previously described in MDA-MB-231 cells treated by $\Delta 2$ -TGZ and AB186 (**Figure 8A**). This morphological change could be the results of the modification of actin cytoskeleton structures. Among them, stress fibers have a central role in cell shape, adhesion and migration [15]. We knew that claudin 1 is linked to actin network by adaptator cytoplasmic proteins [2]. In order to study, if expression of claudin 1 could induce morphological change by an action on the actin from the cytoskeleton, we labeled actin by phalloidin containing fluorescent tags. Phalloidin-labelled mainly stains polymeric F-actin. As shown **Figure 8B**, claudin 1 re-expression induces the reorganization of cytoskeletal actin by the disappearance of stress fibers (**Figure 8B**). Taken together, these data suggest that claudin 1 could lead to a decrease formation of stress fiber, which further decrease breast cancer “claudin 1-low” cell migration.

8. Claudin 1 overexpression creates neo-formation of junctions of MDA-MB-231 cells

As claudin 1 plays a key role in cell-cell adhesion, we hypothesized that inhibition of cell migration is also the result of cell aggregation formed by claudin 1. We use a functional test to confirm our hypothesis: cell aggregation assay. As depict in **Figure 9A**, we observe a significant increase of cell aggregation index, correlated with claudin 1 expression level (0.35 for control vs 0.67 and 0.89 for clone V2 and V7 respectively). Then, we analyses the effect of claudin 1 overexpression on the expression and the localization of several major junction components (**Figure 9B**). Subcellular fractionation revealed that claudin 1 overexpression induces occludin (tight junction) and β -catenin (adherens junction) expression in clone V2 and V7 and are mainly localized at membrane. Moreover, the adaptator protein between cytoskeleton compartment and tight junction, ZO-1, is expressed in the cytoplasm of clone 2 and 7 accordingly to the level of claudin 1. This result was confirmed by immunofluorescence (**Sup.data2**). Then, we use a tridimensional culture in order to be closer of the physiological context of tight junctions. Confocal studies on 3D-culture, clone V7 confirmed that the re-expression of claudin 1

is positively correlated with the two major junctional protein expression, occludin and β -catenin (**Figure 9C**).

Discussion

Currently, there are no targeted treatment options for patients with triple-negative breast cancer especially those that do not express claudin 1, a particularly aggressive type of breast cancer. In this context, we study two TGZ derivatives, $\Delta 2$ -TGZ and AB186, that we have previously shown to inhibit cell growth and induce cell death [13,14]. We also demonstrated previously that $\Delta 2$ -TGZ increased claudin 1 expression in “claudin 1-low” TNBC cells. Moreover, this effect is linked to the apoptosis induced. This effect could constitute a new therapeutic perspective for this type of tumor. The aim of this study is to better understand 1) the mechanism of action of these two derivatives 2) the role of claudin 1 in their anti-cancerous action. We used impedanceometry in order to investigate the kinetics of events leading to the anti-cancerous effect of $\Delta 2$ -TGZ and AB186. The profiles obtained from the real-time cell analysis system (RTCA) suggest rapid modification of the cell morphology between 2 and 4 hours in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Accordingly to this result, the cell morphology appeared modified in MCF-7 and more pronouncedly in MDA-MB-231 within the same kinetics. Cells stretch and form cytoplasmic extensions, then after 10h30 cells started to become round suggesting cell death. The results are in line with three previous studies based on TGZ, the parent molecule, on pancreatic, ovarian and breast cancer cells [16-18].

We also found that the modification of the morphology is followed by migration inhibition in TNBC cell lines (MDA-MB-231 and Hs578T) as soon as 9 h of treatment by $\Delta 2$ -TGZ or AB186. In general, TZDs inhibit cancer cell motility *in vitro* and *in vivo* [19]. Moreover, several studies have shown that TGZ inhibits cell migration associated with a modification of cell morphology [16-18]. In K562 and HL-60 leukemic cells, TGZ diminishes the cell-MEC adhesion and also the invasion by reducing the MMP-2 and MMP-9 activity [20]. In the same way, TGZ inhibits osteosarcoma cells LM8 migration through the decrease of MMP-2 [21]. Concomitantly with the cell migration inhibition, our work reveals an up-regulation of claudin 1. These latest results suggest a link between claudin 1 re-expression and cell inhibition of migration. Indeed, in several cancers, the involvement of claudin 1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) and in cell inhibition of migration has been well-documented [7]. In order to confirm this hypothesis, it would be fruitful to test an inhibitor of the claudin 1 membrane localization such as YM201636 [22].

What is the role of claudin 1 in TNBC “claudin 1-low” inhibition of cell migration? We have shown that transitory claudin 1 overexpression allows an inhibition of cell migration in MDA-MB-231 and Hs-578T cells. In order to better understand the role of claudin 1, we developed stable transfectants of MDA-MB-231 cells overexpressing claudin 1. The clones display higher claudin 1 located at the membrane and morphology different from the empty vector control cells. These changes are in line with those observed with $\Delta 2$ -TGZ or AB186. We also showed that overexpressing claudin 1 leads to the disappearance of actin stress fibers that could explain the inhibition of migration observed in those clones. Moreover, claudin 1 also induces an increase of the main junction markers at the membrane, suggesting that

claudin 1 leads to reconstitute cell junctions. In colorectal cancer cells T 84, claudin 1 expression induces a cell aggregation and restores paracellular permeability [23]. Such event induces also the inhibition of migration in TNBC “claudin 1-low” cells. For instance, the decrease of claudin 1 is correlated with a higher metastatic potential in several breast cancer cell lines [24], while, the TEM suppression is correlated with claudin 1 re-expression in various breast cancer cell lines [25,26]. These data are supported by clinical study on breast cancer tumors: loss of claudin 1 is correlated with a higher metastatic potential and relapse level [4-6]. Nevertheless, the role of claudin 1 remain controversial as the stanniocalcin 2 inhibits metastasis of breast cancer cells *in vivo* through the inhibition of PKC/claudin-1 signaling [27]. Then, claudin 1 overexpression induces the epithelial-mesenchymal transition (EMT) through decrease epithelial hallmarks in MDA-MB-231 cell line [28]. In MCF-7 cell line, claudin 1 promotes cell motility and migration with no change in gene expression for key EMT related gene such as β -catenin, E-cadherin, slug or snail [29]. Such contradictory studies could be explained by a different claudin 1 localization. An inhibitor of claudin 1 membran localization would be usefull to clarify this point.

Conclusion:

In conclusion, the two TGZ derivatives, $\Delta 2$ -TGZ and AB186 induced a rapid modification of cells morphology, followed by claudin 1 re-expression and the inhibition of cell migration. In parallel, claudin 1 overexpression induced similar morphological changes and also inhibition of cell migration. These processes are associated with loss of stress fibers and re-expression of the main marker of tight and adherens junctions. Interestingly, the intensity of the migration and adhesion effect are directly correlated with claudin 1 level. All together, these data confirm claudin 1 re-expression is a promising therapeutic strategy for the treatment of TNBC “claudin 1-low” tumors, for which the therapeutic options are very limited. The use of such TGZ derivatives could open a new perspective for targeted therapy.

Acknowledgments This work was supported by grants of the “Université de Lorraine”, the “Conseil Régional du Grand Est” and the “Ligue Contre le Cancer”. Marine Geoffroy was recipient of a PhD grant of the « Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche ».

Compliance with ethical standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M.S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 564–580.
2. Van Itallie, C.M., Tietgens, A.J., and Anderson, J.M. (2017). Visualizing the dynamic coupling of claudin strands to the actin cytoskeleton through ZO-1. *Mol. Biol. Cell* 28, 524–534.
3. Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C.M. (2010). Mechanical integration

of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315–333.

4. Morohashi, S., Kusumi, T., Sato, F., Odagiri, H., Chiba, H., Yoshihara, S., Hakamada, K., Sasaki, M., and Kijima, H. (2007). Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 20, 139–143.

5. Szasz, A.M., Tokes, A.M., Micsinai, M., Krenacs, T., Jakab, C., Lukacs, L., Nemeth, Z., Baranyai, Z., Dede, K., Madaras, L., et al. (2011). Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 55–63.

6. Ma, F., Ding, X., Fan, Y., Ying, J., Zheng, S., Lu, N., and Xu, B. (2014). A CLDN1-negative phenotype predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* 9, e112765.

7. Zhou, B., Moodie, A., Blanchard, A.A.A., Leygue, E., and Myal, Y. (2015). Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights. *J Clin Med* 4, 1960–1976.

8. Geoffroy, M., Kleinclaus, A., Grandemange, S., Hupont, S., Boisbrun, M., Flament, S., Grillier-Vuissoz, I., and Kuntz, S. (2017). Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in “claudin-1-low” triple-negative breast cancer cells: involvement of claudin-1. *Breast Cancer Res. Treat.* 165, 517–527.

9. Fröhlich, E., and Wahl, R. (2015). Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. *Biomed Res Int* 2015, 845340.

10. Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J.-P., Verhoeyen, E., Raggiueau, V., Maneglier, B., et al. (2015). Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature* 525, 380–383.

11. Chojkier, M. (2005). Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology* 41, 237–246.

12. Salamone, S., Colin, C., Grillier-Vuissoz, I., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Flament, S., Martin, H., Richert, L., Chapleur, Y., and Boisbrun, M. (2012). Synthesis of new troglitazone derivatives: anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur J Med Chem* 51, 206–215.

13. Bordessa, A., Colin-Cassin, C., Grillier-Vuissoz, I., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Husson, G., Vo, M., Flament, S., Martin, H., Chapleur, Y., et al. (2014). Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: towards more active and less toxic compounds. *Eur J Med Chem* 83, 129–140.

14. Colin-Cassin, C., Yao, X., Cerella, C., Chbicheb, S., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Boisbrun, M., Chapleur, Y., Diederich, M., Flament, S., et al. (2015). PPAR γ -inactive $\Delta 2$ -troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 54, 393–404.

15. Lehtimäki, J., Hakala, M., and Lappalainen, P. (2017). Actin Filament Structures in Migrating Cells. *Handb Exp Pharmacol* 235, 123–152.

16. Motomura, W., Nagamine, M., Tanno, S., Sawamukai, M., Takahashi, N., Kohgo, Y., and Okumura, T. (2004a). Inhibition of cell invasion and morphological change by troglitazone in human pancreatic cancer cells. *J. Gastroenterol.* 39, 461–468.
17. Yang, Y.-C., Ho, T.-C., Chen, S.-L., Lai, H.-Y., Wu, J.-Y., and Tsao, Y.-P. (2007). Inhibition of cell motility by troglitazone in human ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer* 7, 216.
18. Wang, P.-S., Chou, F.-S., Porchia, L., Saji, M., and Pinzone, J.J. (2008). Troglitazone inhibits cell migration, adhesion, and spreading by modulating cytoskeletal rearrangement in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 47, 905–915.
19. Blanquicett, C., Roman, J., and Hart, C.M. (2008). Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 6, 25–34.
20. Liu, J., Lu, H., Huang, R., Lin, D., Wu, X., Lin, Q., Wu, X., Zheng, J., Pan, X., Peng, J., et al. (2005). Peroxisome proliferator activated receptor- γ ligands induced cell growth inhibition and its influence on matrix metalloproteinase activity in human myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 56, 400–408.
21. Aizawa, J., Sakayama, K., Kamei, S., Kidani, T., Yamamoto, H., Norimatsu, Y., and Masuno, H. (2010). Effect of troglitazone on tumor growth and pulmonary metastasis development of the mouse osteosarcoma cell line LM8. *BMC Cancer* 10, 51.
22. Dukes, J.D., Whitley, P., and Chalmers, A.D. (2012). The PIKfyve inhibitor YM201636 blocks the continuous recycling of the tight junction proteins claudin-1 and claudin-2 in MDCK cells. *PLoS ONE* 7, e28659.
23. Huo, Q., Kinugasa, T., Wang, L., Huang, J., Zhao, J., Shibaguchi, H., Kuroki, M., Tanaka, T., Yamashita, Y., Nabeshima, K., et al. (2009). Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 29, 851–857.
24. Swisshelm, K., Machl, A., Planitzer, S., Robertson, R., Kubbies, M., and Hosier, S. (1999). SEMP1, a senescence-associated cDNA isolated from human mammary epithelial cells, is a member of an epithelial membrane protein superfamily. *Gene* 226, 285–295.
25. Li, X.-M., Liu, W.-L., Chen, X., Wang, Y.-W., Shi, D.-B., Zhang, H., Ma, R.-R., Liu, H.-T., Guo, X.-Y., Hou, F., et al. (2017). Overexpression of TMPRSS4 promotes tumor proliferation and aggressiveness in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 39, 927–935.
26. Basu, M., Sengupta, I., Khan, M.W., Srivastava, D.K., Chakrabarti, P., Roy, S., and Das, C. (2017). Dual histone reader ZMYND8 inhibits cancer cell invasion by positively regulating epithelial genes. *Biochem. J.* 474, 1919–1934.
27. Hou, J., Wang, Z., Xu, H., Yang, L., Yu, X., Yang, Z., Deng, Y., Meng, J., Feng, Y., Guo, X., et al.

(2015). Stanniocalcin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/claudin-1-mediated signaling. *PLoS ONE* 10, e0122179.

28. Majer, A., Blanchard, A.A., Medina, S., Booth, S.A., and Myal, Y. (2016). Claudin 1 Expression Levels Affect miRNA Dynamics in Human Basal-Like Breast Cancer Cells. *DNA Cell Biol.* 35, 328–339.

29. Zhou, B., Blanchard, A., Wang, N., Ma, X., Han, J., Schroedter, I., Leygue, E., and Myal, Y. (2015). Claudin 1 promotes migration and increases sensitivity to tamoxifen and anticancer drugs in luminal-like human breast cancer cells MCF7. *Cancer Invest.* 33, 429–439.

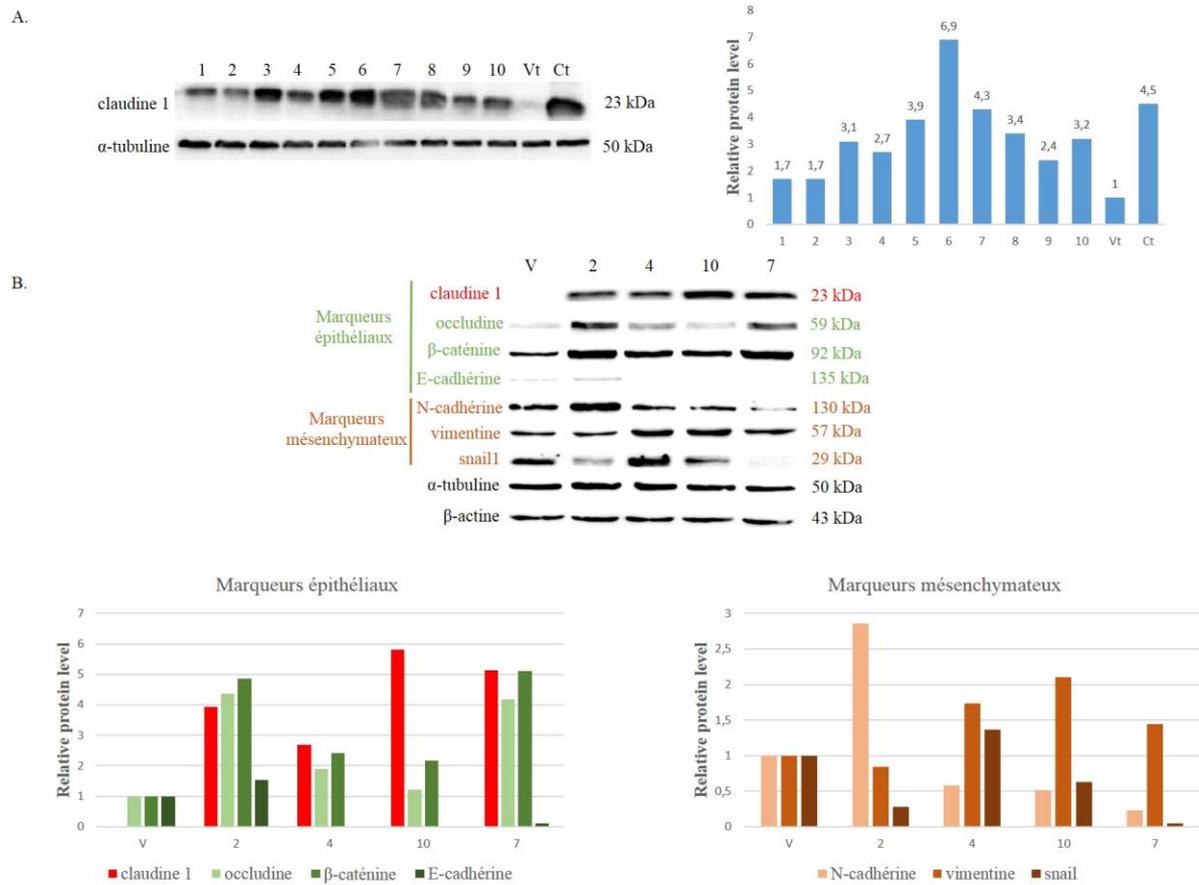


Figure 66 : Caractérisation du niveau d'expression de la claudine 1, de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux sur les transfectants stables MDA-MB-231 surexprimant la claudine 1. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière stable avec le plasmide pcDNA3.1 (V) ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (1 à 10). (A) En parallèle, nous avons comparé le taux de claudine 1 des clones stables avec celui des cellules MDA-MB-231 transfectées transitoirement avec un plasmide contenant l'ADNc codant la claudine 1 (Ct) ou un plasmide vide (Vt). Les taux de protéines claudine 1 et α -tubuline ont été révélés par western blot, avec l' α -tubuline utilisée comme référence interne. Le graphique représente la quantification des bandes CLDN1/tubuline. Ils correspondent aux valeurs de 2 expériences indépendantes. (B) Les taux de marqueurs épithéliaux (claudine 1, occludine, β -caténine et E-cadhérine), de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine, snail 1) et de l' α -tubuline ont été révélés par western blot, avec l' α -tubuline utilisée comme référence interne. Les graphiques représentent la quantification des protéines d'intérêt/tubuline. Ils correspondent aux valeurs de 2 expériences indépendantes.

8. Résultats complémentaires sur les transfectants stables MDA-MB-231

Afin de déterminer le rôle de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires, nous avons établis des clones MDA-MB-231 surexprimant la claudine 1. Pour cela, nous avons transfecté les cellules par un plasmide contenant l'ADNc codant la claudine 1. Nous avons construit le témoin de référence en transfectant les cellules MDA-MB-231 avec le plasmide vide (V). La conception de la lignée Hs578T surexprimant la claudine 1 n'a pas pu être réalisée puisque ces cellules présentaient une résistance naturelle à notre agent de sélection, la zéocine. Nous avons testé plusieurs concentrations de zéocine (0 à 1500 µg/mL) et plusieurs conditions de culture afin de sensibiliser les cellules (privation de sérum, incubation 30 minutes à 4°C). Malheureusement, une minorité de cellules ne fut peu affectée par le traitement.

A l'issue de la transfection des cellules MDA-MB-231, 10 clones différents ont été isolés par une sélection à la zéocine (1 à 10). Nous avons étudié leur niveau d'expression protéique de la claudine 1 par western blot. Dans les cellules transfectées transitoirement avec un vecteur claudine 1 (Ct), le taux de claudine 1 est augmenté de 4,5 fois comparé au témoin transfecté avec un vecteur vide (Vt). Pour les différents clones transfectés stablement, nous observons une expression différentielle de la claudine 1. Les clones exprimant le plus faiblement la claudine 1 sont les clones 1, 2, 4 et 9 avec une augmentation de l'expression allant de 1,7 à 2,7 fois (Figure 66A). Les clones 3, 5, 7, 8 et 10 expriment plus fortement la claudine 1 avec un niveau d'expression 3,1 à 4,3 fois plus que les cellules témoins. Le taux de claudine 1 dans le clone 6 est le plus élevé de 6,9 fois.

Quatre clones ont été sélectionnés selon leur niveau d'expression de la claudine 1: les clones 2 et 4 exprimant faiblement la claudine 1 et les clones 7 et 10 exprimant fortement la claudine 1. Nous avons caractérisé ces clones pour l'expression de **marqueurs épithéliaux** (claudine 1, occludine, β -caténine, E-cadhérine) et de **marqueurs mésenchymateux** (N-cadhérine, vimentine, snail 1). Nous observons une augmentation de l'expression des **marqueurs épithéliaux**. En effet, le témoin (V) n'exprime pas la claudine 1 et exprime faiblement l'occludine, la β -caténine et l'E-cadhérine. Dans les quatre clones surexprimant la claudine 1, on observe une augmentation de l'expression de l'occludine et de la β -caténine (Figure 66B). Le signal est plus intense dans les clones 2 et 7 comparé aux clones 4 et 10. L'E-cadhérine est très faiblement exprimée dans le clone 2 et n'est pas détectée dans les

clones 4, 7 et 10. En revanche, aucune corrélation n'est observée entre le niveau d'expression de la claudine 1 et les **marqueurs mésenchymateux**. En effet, le témoin (V) exprime la N-cadhérine, la vimentine et snail 1. La N-cadhérine est induite pour le clone 2 et diminue pour les clones 4, 7 et 10. L'expression de la vimentine est augmentée dans les clones 4, 7 et 10 alors que le facteur de transcription snail 1 diminue dans les clones 2 et 10 et augmente dans les clones 4 et 7.

Conclusion

Cette caractérisation montre que les clones 2 et 7 ont un profil moléculaire assez proche avec un taux de claudine 1 différent. Nous avons donc choisis de travailler avec le **clone 2** qui exprime faiblement la claudine 1 et le **clone 7** qui exprime fortement la claudine 1.

MDA-MB-231

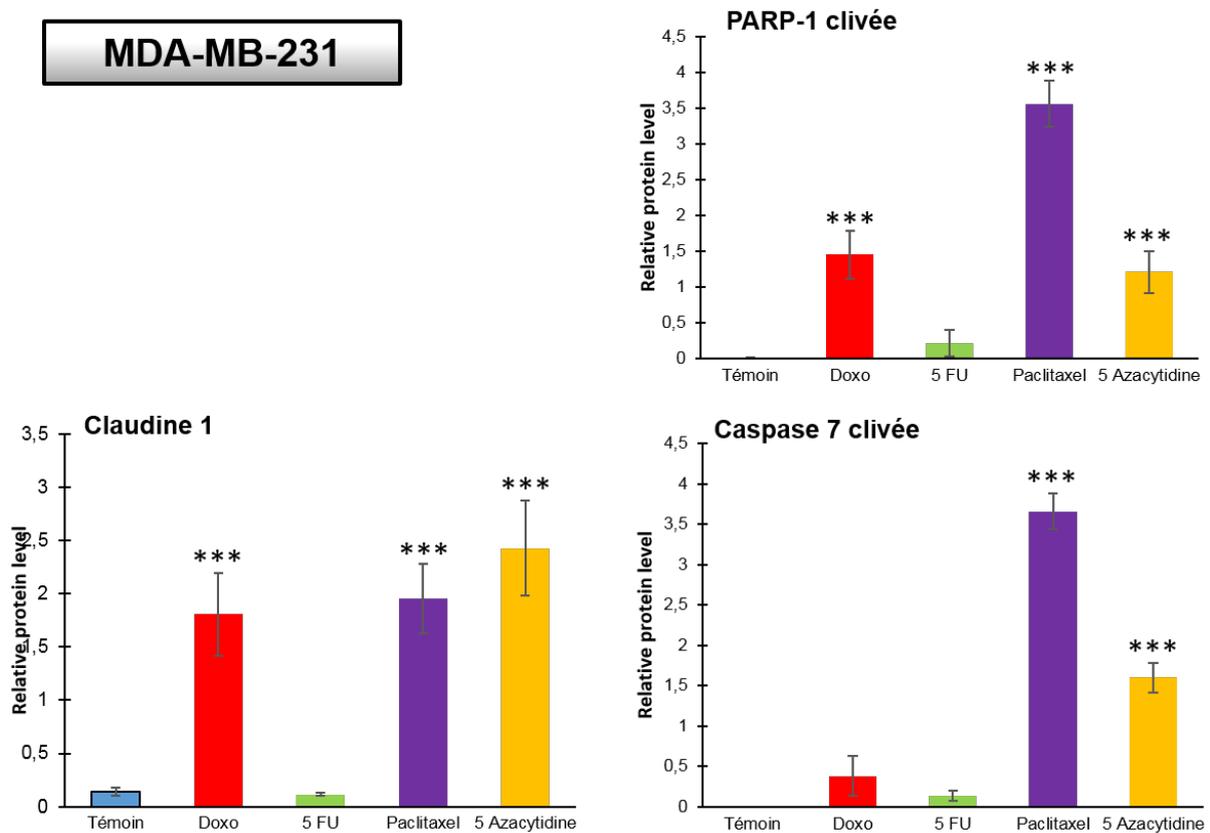


Figure 67 : Expression de la claudine 1 et de deux marqueurs pro-apoptotiques en réponse à différents agents de chimiothérapie dans les cellules MDA-MB-231. Analyse de l'expression de la claudine 1, de PARP-1 clivée et de la caspase 7 clivée par western blot dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules ont été traitées pendant 72 heures avec 50 ng/mL de Doxorubicine, 50 μ M de 5-fluorouracile (5 FU), 5 nM de Paclitaxel, 5 μ M de 5-azacytidine et les témoins avec le solvant DMSO (Témoin). Les taux protéiques de la claudine 1, de PARP-1 clivée, de la caspase 7 clivée et de l' α -tubuline, utilisée comme référence interne, ont été révélés par western blot et quantifiés. Les graphiques représentent les ratios claudine 1/ α -tubuline, PARP-1 clivée/ α -tubuline et caspase 7 clivée/ α -tubuline et correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 à 6 expériences indépendantes. *** $p < 0,001$.

Hs578T

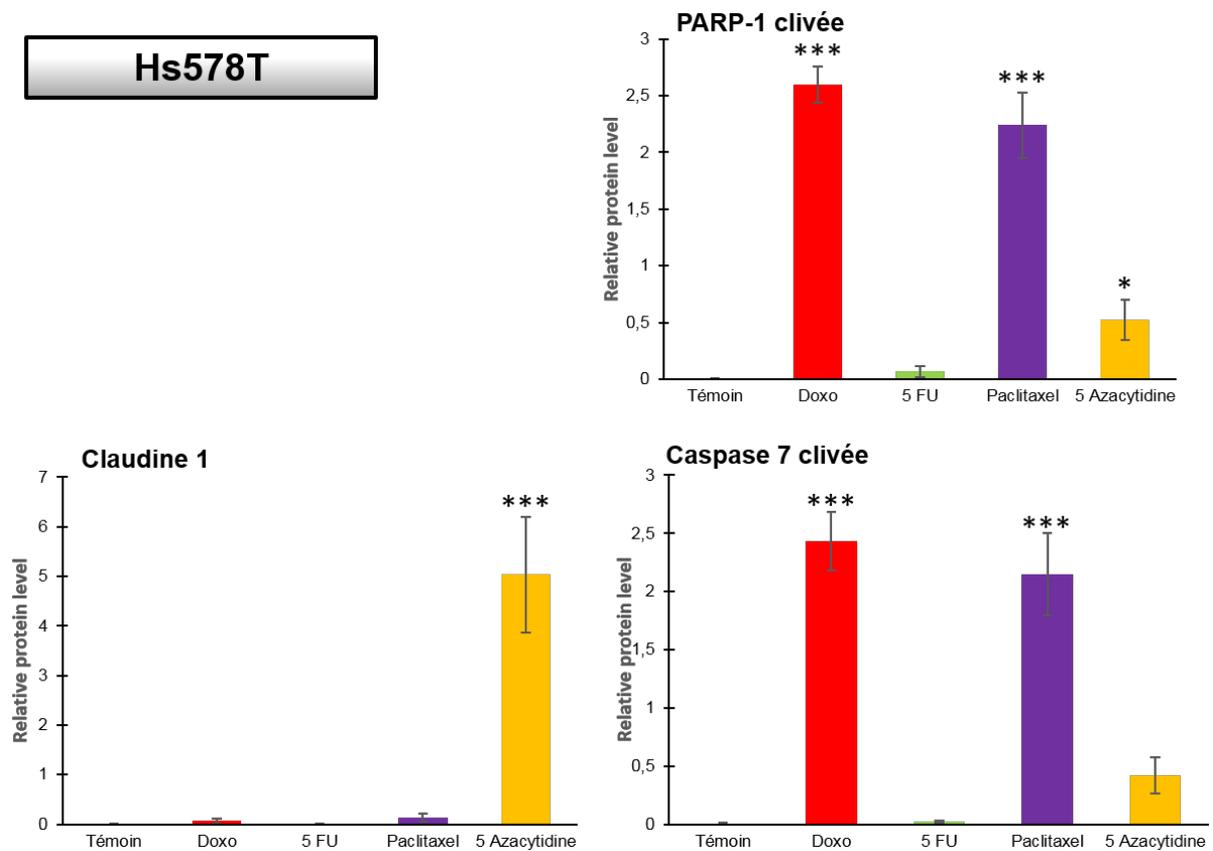


Figure 68 : Expression de la claudine 1 et de deux marqueurs pro-apoptotiques en réponse à différents agents de chimiothérapie dans les cellules Hs578T. Analyse de l'expression de la claudine 1, de PARP-1 clivée et de la caspase 7 clivée par western blot dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules ont été traitées pendant 72 heures avec 50 ng/mL de Doxorubicine, 50 μ M de 5-Fluoro-uracile (5 FU), 5 nM de Paclitaxel, 5 μ M de 5-azacytidine et les témoins avec le solvant DMSO (Témoin). Les taux protéiques de la claudine 1, de PARP-1 clivée, de la caspase 7 clivée et de l' α -tubuline, utilisée comme référence interne, ont été révélés par western blot et quantifiés. Les graphiques représentent les ratios claudine 1/ α -tubuline, PARP-1 clivée/ α -tubuline et caspase 7 clivée/ α -tubuline et correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 à 6 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

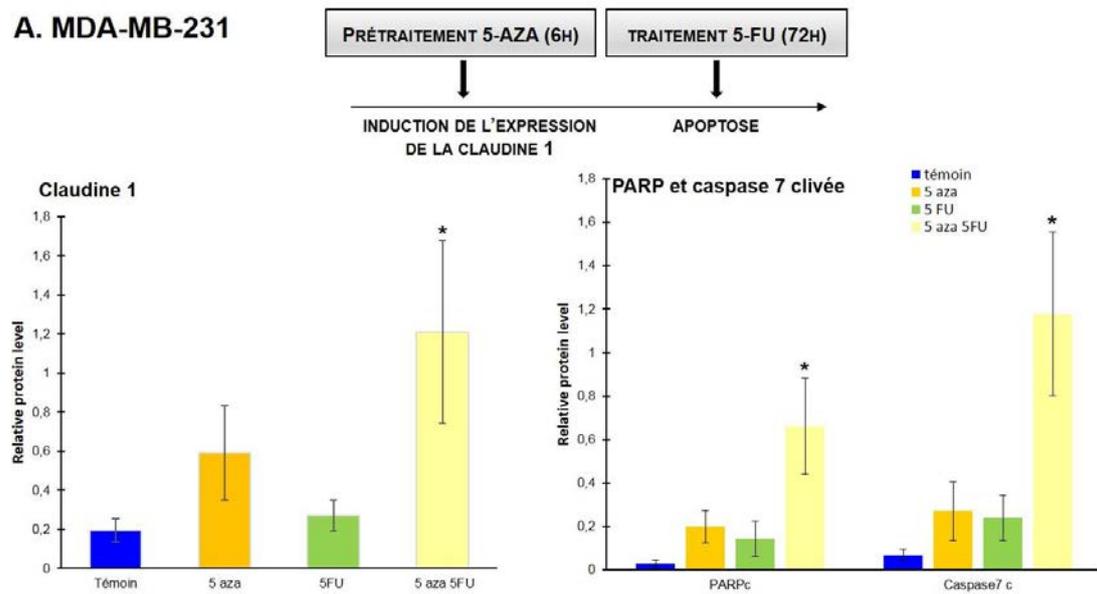
III. La claudine 1, un marqueur prédictif de sensibilité aux agents de chimiothérapie ?

Les données récentes de la littérature suggèrent que la claudine 1 pourrait être un marqueur prédictif de réponse aux traitements anticancéreux (revue Zhou *et al.*, 2015). En effet, les auteurs ont montré que les cellules cancéreuses mammaires lumineales MCF-7 surexprimant la claudine 1 présentent une sensibilité accrue à trois agents anticancéreux : le cisplatine, l'étoposide et le tamoxifène (Zhou *et al.*, 2015). Aucune étude similaire n'est actuellement décrite sur les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives. Nos travaux sur les cellules triple-négatives MDA-MB-231 montrent également que la surexpression de la claudine 1 potentialise l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ (Geoffroy *et al.*, 2017). L'objectif de cette partie est de déterminer **si la réexpression de la claudine 1 peut sensibiliser des cellules cancéreuses mammaires triple-négatives en réponse aux agents de chimiothérapie.**

1. Effet de différents agents de chimiothérapie sur l'expression de la claudine 1 et de marqueurs apoptotiques dans les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et Hs578T

Nous souhaitons déterminer s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la claudine 1 et la réponse apoptotique des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T induite par différents agents anticancéreux. Pour cela, nous avons étudié l'expression protéique de la claudine 1, PARP-1 clivée et caspase 7 clivée en réponse à différents agents de chimiothérapie conventionnels après 72 heures de traitement. Les agents anticancéreux qui ont été utilisés sont la doxorubicine de la classe des antracyclines à 50 ng/mL, le 5-fluorouracile (5-FU) de la classe des antimétabolites à 50 μ M et le paclitaxel de la classe des taxanes à 5 nM. Nous avons aussi utilisé la 5-azacytidine (5-aza) à 5 μ M, un agent déméthylant décrit pour augmenter l'expression protéique de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-453 (Dicello *et al.*, 2013). Nos études sur les cellules triple-négatives « claudin 1-low » Hs578T et MDA-MB-231 établissent que la 5-aza permet la réexpression significative de la claudine 1 (Figure 67 et 68). Ce résultat confirme les données obtenues par Di Cello *et al.*, qui montre que la réexpression de la claudine 1 est liée à la déméthylation de son promoteur (Di Cello *et al.*, 2013). De plus, avec un traitement à la 5-aza, on observe un clivage de PARP-1 ainsi que de la caspase 7 qui témoigne d'une mort cellulaire significative dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 67). Dans les cellules Hs578T, nous n'observons

A. MDA-MB-231



B. Hs578T

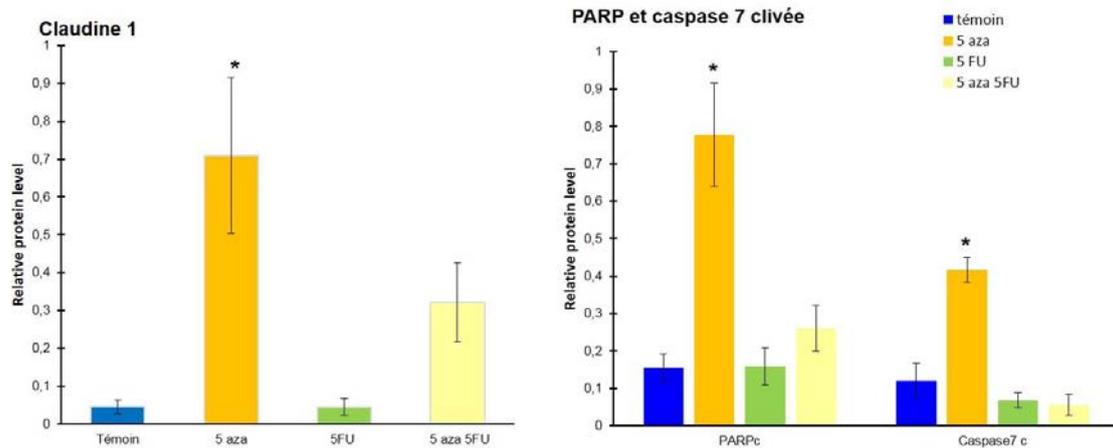


Figure 69 : Effet de la ré-expression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 (A) et Hs578T (B). Les cellules ont été prétraitées avec 5 μ M de 5-azacytidine (5-aza) pendant 6 heures puis rincées et traitées avec 50 μ M de 5-FU pendant 72 heures. Les cellules témoin ont été exposées au solvant. Les taux protéiques de la claudine 1, de PARP-1 clivée, de la caspase 7 clivée et de l' α -tubuline, utilisée comme référence interne, ont été révélés par western blot et quantifiés. Les graphiques représentent les ratios claudine 1/ α -tubuline, PARP-1 clivée/ α -tubuline et caspase 7 clivée/ α -tubuline et correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 à 6 expériences indépendantes. * $p < 0,05$.

qu'une augmentation significative de PARP-1 clivée (Figure 68). Dans les cellules MDA-MB-231, nous avons observé qu'un traitement à la doxorubicine ou au paclitaxel induit une augmentation significative de l'expression de la claudine 1 en corrélation avec une augmentation de la réponse apoptotique, observée par le clivage des marqueurs PARP et caspase 7. Dans les cellules Hs578T, la doxorubicine et le paclitaxel induisent le clivage des deux marqueurs apoptotiques mais aucune augmentation de la claudine 1 n'est détectée. Pour les deux lignées cellulaires, seul le 5-FU ne présente aucun effet, il n'augmente ni l'expression de la claudine 1, ni le clivage des marqueurs apoptotiques PARP-1 et caspase 7 (Figure 67 et 68).

2. La claudine 1 induite par la 5-azacytidine sensibilise-t-elle les cellules triple-négatives au 5-FU ?

Comme le 5-FU n'induit ni l'expression de la claudine 1, ni l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et Hs578T, nous avons ensuite déterminé si la réexpression de la claudine 1 pouvait sensibiliser ces cellules à cet agent anticancéreux. Nous avons choisi d'induire l'expression de la claudine 1 par un pré-traitement à la 5-aza de 10 μ M des cellules MDA-MB-231 et Hs578T. Ce pré-traitement de 6 heures est le temps minimum nécessaire pour permettre l'expression de la claudine 1. Nous avons ensuite traité les cellules avec le 5-FU pendant 72 heures et nous avons déterminé si la réexpression de la claudine 1 stimule l'apoptose par une analyse du clivage de PARP-1 et de la caspase 7 par western blot (Figure 69). Dans les cellules MDA-MB-231, le traitement combiné (5-aza/5-FU) augmente significativement l'expression de la claudine 1 comparé aux cellules témoins. De manière très intéressante, la réexpression de la claudine 1 induite par un pré-traitement de 6 heures à la 5-aza permet de restaurer la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au 5-FU et d'induire une réponse apoptotique. En effet, nous observons une augmentation significative du clivage des marqueurs PARP-1 et caspase 7 lors du traitement combiné (5-aza/5-FU) comparé aux traitements simples 5-aza ou 5-FU (Figure 69A). Dans les cellules Hs578T, seul le traitement à la 5-aza induit significativement l'expression de la claudine 1. Cette induction est corrélée avec la réponse apoptotique observée par une augmentation significative du clivage des marqueurs PARP-1 et caspase 7. L'expression de ces marqueurs est significativement diminuée lors d'un traitement 5-FU seul ou d'un traitement combiné (5-aza/5-FU) en corrélation avec un niveau plus faible de claudine 1 (Figure 69B). Ces résultats montrent aussi une corrélation entre l'expression de la claudine 1 et les marqueurs pro-apoptotiques pour les

MDA-MB-231

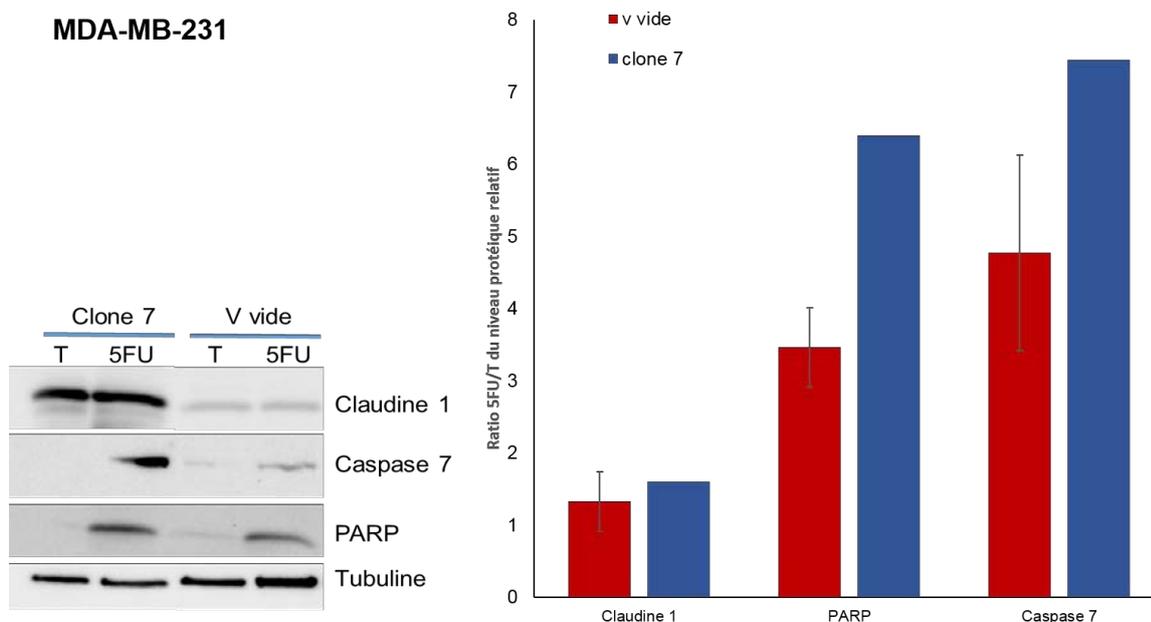


Figure 70 : Effet de la ré-expression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière stable avec le plasmide pcDNA3.1 (v vide) ou le plasmide pcDNA3.1 contenant la séquence codant la protéine claudine 1 (clone 7). Les cellules ont été traitées pendant 72 heures avec le solvant (T) soit avec 50 μ M de 5-FU (5FU). Les taux protéiques de la claudine 1, de PARP-1 clivée, de la caspase 7 clivée et de l' α -tubuline, utilisée comme référence interne, ont été révélés par western blot et quantifiés. Le graphique représente le ratio cellules traitées au 5-FU/ cellules non traitées pour le vecteur vide (n=5) et le clone 7 (n=1).

traitements 5-aza, 5-FU et 5-aza/5-FU dans les cellules Hs578T. Néanmoins, ces données révèlent aussi que la réponse à la combinaison de traitement est différente entre les deux lignées cellulaires ce qui suppose un mécanisme d'action différent de la claudine 1 sous l'effet des traitements.

3. Effet du 5-FU sur les lignées stables MDA-MB-231 sur la voie apoptotique

Ensuite, nous avons étudié la sensibilisation au 5-FU sur nos lignées MDA-MB-231 exprimant stablement la claudine 1. Une analyse par western blot montre un marquage faible de la claudine 1 dans les cellules transfectées avec un vecteur vide alors que nous détectons un signal avec une intensité plus forte pour le clone 7 (Figure 70). Le traitement au 5-FU ne modifie pas l'expression de la claudine 1 ni pour le vecteur vide, ni pour le clone 7. Par contre, le 5-FU augmente le clivage des marqueurs apoptotiques à la fois pour le vecteur vide et pour le clone 7. Néanmoins, l'augmentation est plus importante pour le clone 7 comparé au vecteur vide (Figure 70). Ce résultat préliminaire reste à confirmer.

Conclusion

A l'issue de ce travail, nous avons observé que la réexpression de la claudine 1 induite par la 5-aza ou exprimée stablement sensibilise les cellules MDA-MB-231 au 5-FU. Pour les cellules Hs578T, nous avons également observé une corrélation entre le niveau d'expression de la claudine 1 et l'apoptose en réponse à la 5-aza et au traitement combiné 5-aza/5-FU. **Cette étude préliminaire est à approfondir et suggère que la claudine 1 pourrait constituer un marqueur prédictif de sensibilité à la chimiothérapie.**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

- I. **Quel est le mécanisme d'action des dérivés TGZ, la Δ^2 -TGZ et l'AB186, sur les cellules cancéreuses mammaires ? 121**

- II. **Quel est le rôle de la claudine 1 dans la migration des cellules cancéreuses triple-négatives « claudin 1-low » ?..... 126**

- III. **La claudine 1 permet-t-elle de sensibiliser les cellules cancéreuses triple-négatives « claudin 1-low » à divers agents de chimiothérapie 128**

Le taux de survie des patientes à un cancer mammaire est élevé, environ 80%. Cependant, il reste un des cancers les plus meurtriers du fait d'un grand nombre de cas, en constante augmentation. Certaines tumeurs, en particulier les tumeurs triple-négatives, présentent des résistances innées aux traitements conventionnels et un taux de récurrence très important 5 ans post-traitement (revue O'Reilly *et al.*, 2015). D'autres tumeurs vont développer des mécanismes de résistance acquise aux traitements conventionnels. Environ 25 à 30 % des patientes ayant une tumeur hormono-dépendante présentent une récurrence dans les 5 ans suivant un traitement au tamoxifène (Howell *et al.*, 2005). Pour les patientes ayant une tumeur HER2+ à un stade métastatique, 66 à 88% d'entre elles récidivent dans l'année qui suit un traitement au trastuzumab (revue Chung *et al.*, 2013). Le développement de nouveaux traitements représente une priorité pour des milliers de patientes qui ne bénéficient d'aucun traitement adapté. Dans ce cadre, la TGZ et ses dérivés sont une piste potentielle que le laboratoire explore. Leur travaux ont mis en exergue une activité anti-proliférative et pro-apoptotique des composés $\Delta 2$ -TGZ et AB186 après 24 heures de traitement sur des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 de sous-type luminal A et triple-négatif respectivement (Bordessa *et al.*, 2013 ; Colin-Cassin *et al.*, 2015). De manière intéressante, notre équipe a observé que le dérivé $\Delta 2$ -TGZ augmente l'expression d'une protéine des jonctions serrées, la **claudine 1**. Au cours de ma thèse, je me suis concentrée sur **l'implication de la claudine 1 dans les effets anti-cancéreux de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 dans les cellules cancéreuses mammaires.**

I. Quel est le mécanisme d'action des dérivés TGZ, la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186, sur les cellules cancéreuses mammaires ?

Mes travaux de thèse ont permis d'identifier que nos composés $\Delta 2$ -TGZ et AB186 présentaient des effets précoces et tardifs. Grâce à la technique d'impédancemétrie, nous avons pu établir une cinétique de temps des effets des dérivés $\Delta 2$ -TGZ et AB186. Nous avons successivement observé une modification de la **morphologie cellulaire** suivie d'une inhibition de la **migration cellulaire** puis d'une induction de l'**apoptose** des cellules cancéreuses mammaires.

Les composés $\Delta 2$ -TGZ et AB186 induisent un **changement de la morphologie** des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. En effet, la taille et la forme des cellules sont altérées dans les cellules MCF-7. Cet effet est encore plus prononcé dans les

cellules MDA-MB-231. Entre **2 et 4 heures d'exposition**, les cellules s'étirent et forment des prolongements cytoplasmiques. Vers 10 heures 30, de nombreuses cellules sont arrondies suggérant que la $\Delta 2$ -TGZ et AB186 induisent la mort cellulaire. Nos données sont similaires à trois études montrant que le composé parent, la TGZ, entraîne les mêmes changements de morphologie précoces des cellules cancéreuses pancréatiques, ovariennes et mammaires (Motomura *et al.*, 2004 n°2 ; Yang *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008). Dans les cellules cancéreuses du pancréas, la TGZ provoque un changement morphologique après 1 heure de traitement avec une diminution de la surface d'étalement des cellules traitées, une perte de contact avec les cellules voisines et une extension des protrusions membranaires (Yang *et al.*, 2007). Ce phénomène est accompagné d'une diminution du nombre de contacts focaux et de fibres de stress après 4 heures de traitement. Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, la TGZ induit aussi des modifications de morphologie associées à une diminution de la surface d'étalement des cellules après 1 heure de traitement (Wang *et al.*, 2008).

Nous avons également montré que ce changement de morphologie est suivi d'une **inhibition de la migration** des cellules MDA-MB-231 et Hs578T après **9 heures de traitement** à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186. Les équipes de Motomura, Yang et Wang ont également montré qu'une inhibition de la migration cellulaire est associée à des modifications de la morphologie des cellules traitées à la TGZ (Motomura *et al.*, 2004 n°2 ; Yang *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008). De manière générale, il est bien décrit que les TZDs inhibent la motilité des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (revue Blanquicett *et al.*, 2008). Dans les cellules leucémiques K562 et HL-60, la TGZ diminue l'adhérence cellule-MEC ainsi que l'invasion en diminuant l'activité des MMP-2 et MMP-9 (Liu *et al.*, 2005). De la même manière, la TGZ inhibe l'invasion des cellules d'ostéosarcomes LM8 *in vitro* et *in vivo* par une diminution de l'activité de la MMP-2 (Aizawa *et al.*, 2010). Il serait intéressant de vérifier si les dérivés de TGZ modifient l'expression et l'activité des MMP.

En parallèle de l'inhibition de la migration cellulaire, nous avons observé une augmentation du taux de **claudine 1** au niveau membranaire après **9 heures de traitement** à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186. Ce résultat suggère un lien entre l'expression de la claudine 1 et l'inhibition de la migration cellulaire. En effet, de nombreuses études montrent que la claudine 1 joue un rôle dans la migration et la TEM (revue Zhou *et al.*, 2015). Afin de vérifier si la claudine 1 est impliquée dans l'effet anti-migratoire induit par la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186, nous envisageons d'inhiber l'expression de la claudine 1 par ARN interférence.

Enfin, nous avons montré qu'après 24 heures de traitement, la $\Delta 2$ -TGZ entraîne l'**apoptose** des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et Hs578T en corrélation avec une augmentation de l'expression de la **claudine 1**. Nous avons montré que la claudine 1 joue un rôle dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ des cellules MDA-MB-231 mais pas des cellules Hs578T. Ces données suggèrent un mécanisme d'action différent de la claudine 1 en fonction de la lignée cellulaire. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la claudine 1 est dépendante de différents partenaires protéiques, dont l'expression est modulée différemment par la $\Delta 2$ -TGZ en fonction des lignées cellulaires. L'**occludine** pourrait être un partenaire important de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ. En effet, nous avons montré que la $\Delta 2$ -TGZ augmente l'expression de la claudine 1 et de l'occludine et que ces protéines sont colocalisées dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, l'expression de l'occludine n'est pas modifiée par la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules Hs578T. L'interaction de la claudine 4 et de l'occludine a été montrée dans la littérature. Ces protéines sont colocalisées avec des protéines du complexe de mort cellulaire **DISC** et entraînent l'apoptose des cellules épithéliales mammaires EpH4 induite par le peptide mimétique DFYNP (aspartic acid-phenylalanine-tyrosine-asparagine-proline) (Beeman *et al.*, 2012). Un autre partenaire de la claudine 1 pourrait avoir un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose : le récepteur de mort **FasR**. Dans des cellules cancéreuses de foie HepG2 déficientes pour les kératines 8/18, une inhibition de la claudine 1 entraîne une diminution de FasR à la membrane (Fortier *et al.*, 2013). Les auteurs suggèrent que la claudine 1 membranaire recrute les récepteurs de mort à la membrane et augmente l'apoptose *via* la voie extrinsèque. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ, il serait intéressant d'étudier la colocalisation de la claudine 1 avec le récepteur FasR et avec les protéines du complexe DISC. Nous souhaitons également étudier le clivage des caspases initiatrices spécifiques de la voie extrinsèque, les caspases 8 et 10. Enfin, nous déterminerons l'importance de la localisation membranaire de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ par un co-traitement avec un inhibiteur de la localisation membranaire de la claudine 1, YM201636 (Dukes *et al.*, 2012).

Ce travail de thèse a soulevé la question suivante : **quel phénomène permet de déclencher le changement de morphologie et la mort cellulaire par apoptose ?** Les résultats précédents du laboratoire m'ont permis d'émettre l'hypothèse qu'une **augmentation du Ca^{2+} intracellulaire** pourrait être à l'origine de cette cascade d'effets biologiques. En effet, une équipe de notre laboratoire a montré que la TGZ et la $\Delta 2$ -TGZ augmentent le taux

de Ca^{2+} intracellulaire dès 2 minutes d'exposition des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Chbicheb *et al.*, 2011). Une corrélation entre le niveau de Ca^{2+} intracellulaire et l'impédance cellulaire a été observée dans des cellules de carcinomes adrénocorticales H295R. Par l'utilisation de deux agonistes des canaux calciques, BayK8644 et FLP64176, les auteurs montrent des oscillations du Ca^{2+} intracellulaire associées à des variations de l'impédance cellulaire (Denelavas *et al.*, 2011). De manière intéressante, dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2, la thapsigargine produit un profil de courbe d'impédance cellulaire identique à celui observé avec nos composés $\Delta 2$ -TGZ et AB186 (ACEA Biosciences). La thapsigargine est un inhibiteur des Ca^{2+} /ATPases du réticulum sarco-endoplasmique (SERCA) et permet l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Le Ca^{2+} contrôle de nombreuses voies de signalisations et de processus cellulaires dont la morphologie cellulaire. Une étude montre par une mesure de l'impédance cellulaire qu'une modification du Ca^{2+} intracellulaire induit un changement de morphologie (Meshki *et al.*, 2009). De même, dans les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires A549, l'apoptose induite par la thapsigargine est contrôlée par une modification du cytosquelette d'actine (Wang *et al.*, 2014). La thapsigargine induit aussi la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-468 (Jackisch *et al.*, 2000). De manière similaire, nous avons montré que la $\Delta 2$ -TGZ induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par un relargage des réserves intracellulaires suivie d'une modification de la morphologie et de l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires (Chbicheb *et al.*, 2011 ; Colin-Cassin *et al.*, 2015). A partir de ces données, nous pouvons suggérer que l'action anti-cancéreuse des dérivés de TGZ est dépendante du Ca^{2+} intracellulaire.

L'augmentation quasiment instantanée du Ca^{2+} intracellulaire suggère que nos molécules ciblent directement ou indirectement les **réserves intracellulaires calciques**, c'est-à-dire la mitochondrie et/ou le réticulum endoplasmique. Les études du laboratoire nous laissent penser que le Ca^{2+} proviendrait du réticulum endoplasmique. En effet, nous avons montré que la $\Delta 2$ -TGZ entraîne un stress du réticulum endoplasmique des cellules MCF-7 à partir d'1 heure 30 d'exposition (Colin-Cassin *et al.*, 2015). Une étude protéomique a été initiée pour **identifier les cibles de notre molécule la plus prometteuse : l'AB186**. Les résultats préliminaires montrent qu'une grande partie des protéines cytoplasmiques que fixeraient l'AB186 sont des protéines en lien avec les processus de traduction et de transcription (facteurs d'initiation de la traduction, protéines ribosomales, ribonucléoprotéines et protéines nucléaires) mais aussi des protéines en lien avec le **cytosquelette**. Cette dernière

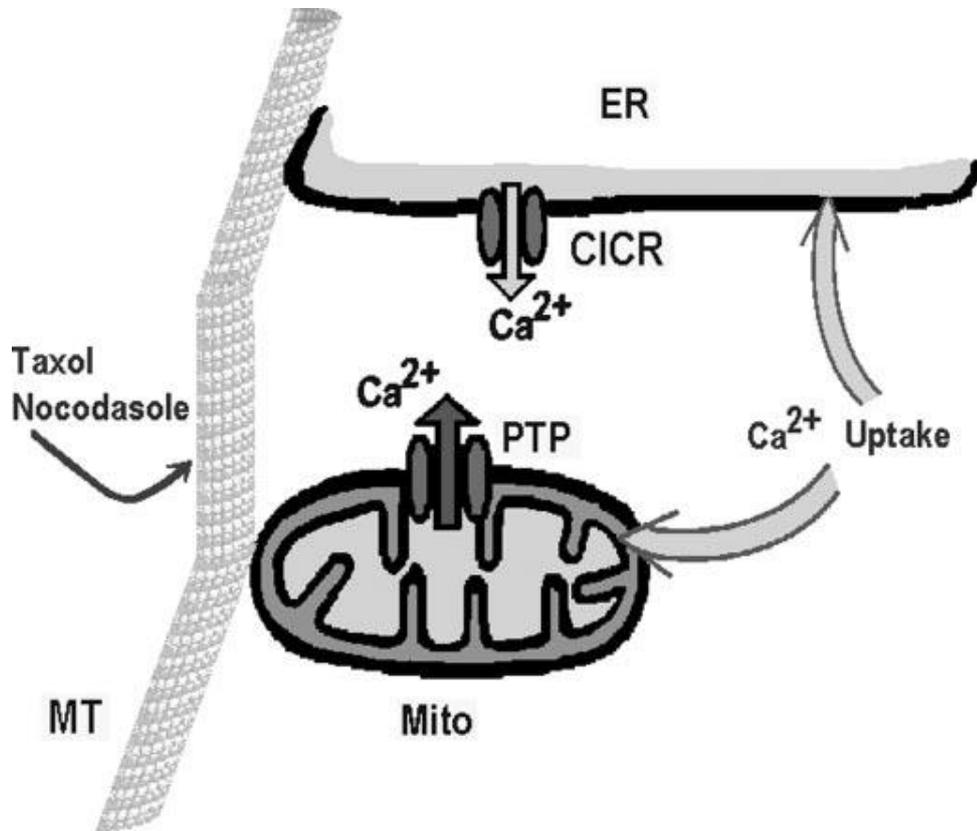


Figure 71 : Interaction entre le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et les microtubules. Le réticulum endoplasmique et la mitochondrie sont les réserves calciques du cytoplasme et pourrait augmenter le Ca^{2+} intracellulaire *via* le canal CICR (Ca^{2+} Induced Ca^{2+} Release) du réticulum endoplasmique et *via* le canal PTP (Permeability Transition Pore) de la mitochondrie. Les microtubules liant les mitochondries sont stabilisés par le Taxol et dépolymérisés par le nocodazole. Tous changements au niveau de la structure des microtubules ouvrent les canaux PTP de la mitochondrie. Le Ca^{2+} intracellulaire relâché par la mitochondrie permet d'activer les canaux CICR du réticulum endoplasmique du fait d'un contact proche des deux organites, ce qui augmente spontanément le taux de Ca^{2+} intracellulaire. Ce phénomène se produit uniquement avec le Taxol, et non avec le nocodazole, parce que la dépolymérisation des microtubules empêche le contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (d'après Mironov *et al.*, 2004).

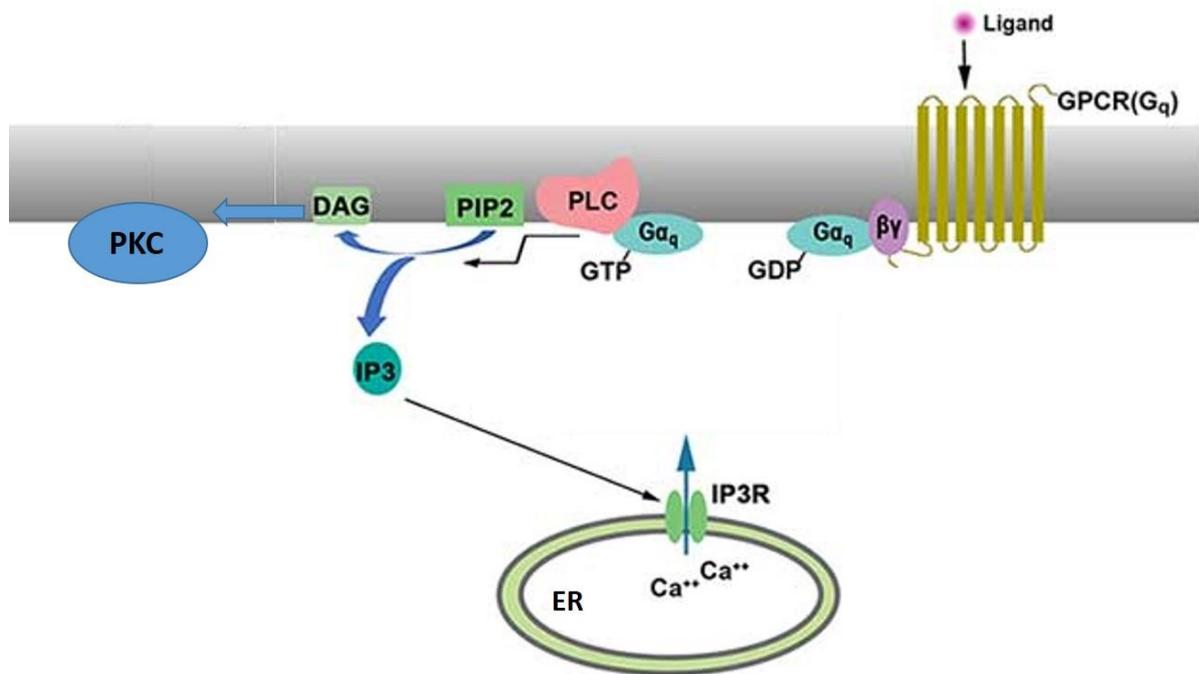


Figure 72 : Voies de signalisation activées par le récepteur GPCR couplé aux protéines G de classe G α_q . Lorsqu'un ligand se fixe sur le récepteur couplé aux protéines G (GPCR), ce dernier va activer le complexe de protéines G $\alpha\beta\gamma$. La fixation du GTP permet de dissocier les sous-unités $\beta\gamma$ et α -GTP qui est la forme active et qui va stimuler un effecteur, la phospholipase C (PLC). Cette dernière va moduler à son tour des messagers secondaires en catalysant la réaction du PIP₂ (Phosphatidyl Inositol bis-Phosphate) en IP₃ (Inositol-3-Phosphate) et en DAG (DiAcylGycérols). Le DAG va activer la protéine kinase C (PKC) alors que l'IP₃ va se fixer sur son récepteur IP₃R au niveau du réticulum endoplasmique et permettre le relargage du Ca²⁺ dans le cytosol (d'après e.Enzyme®).

donnée nous semble particulièrement intéressante puisqu'une revue dans *medical hypotheses* prône les TZDs comme des inhibiteurs de l'assemblage des microtubules et/ou de l'actine (revue Russu *et al.*, 2006). L'auteur montre des similitudes entre les effets anti-cancéreux des TZDs et les molécules interagissant avec le cytosquelette. Il montre également des similitudes au niveau de leur structure chimique. Effectivement, de nombreuses molécules interagissant avec l'actine ou les microtubules possèdent un hétérocycle à 5 atomes avec 2 hétéroatomes, similaire au cycle TZD. La fixation potentielle de nos molécules sur le cytosquelette ou des protéines associées pourrait expliquer le relargage très précoce du Ca^{2+} . En effet, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie sont interconnectés avec le cytosquelette d'actine et de microtubules (revue Gurel *et al.*, 2014 ; revue Babich *et al.*, 2013). Dans des cultures primaires de neurones de l'hippocampe, le relargage du Ca^{2+} intracellulaire *via* le réticulum endoplasmique est modulé par la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine (Wang *et al.*, 2002). Le Taxol, qui stabilise les microtubules, entraîne un relargage du Ca^{2+} de la mitochondrie *via* le canal PTP (Permeability Transition Pore) puis du réticulum endoplasmique *via* le canal CICR (Ca^{2+} Induced Ca^{2+} Release) (Figure 71) (Mironov *et al.*, 2004). Une autre piste à explorer sont les **récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)**, qui sont la cible d'environ 30% des médicaments utilisés dans le cadre de nombreuses pathologies (revue Hauser *et al.*, 2017). Les GPCR peuvent être divisés en quatre groupes en fonction de la classe de la sous-unité alpha de leur protéine G: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$. Les protéines G de classe $G\alpha_q$ sont capables d'augmenter le Ca^{2+} intracellulaire *via* le récepteur IP3R du réticulum endoplasmique (Figure 72). Ce récepteur est activé par IP₃ (Inositol-3-Phosphate), lui-même produit par la phospholipase C. Les TZDs, incluant la TGZ, sont connues pour se fixer sur le récepteur **GPR40** (G Protein Coupled Receptor 40) qui est un GPCR couplés aux protéines G de classe $G\alpha_q$ (revue Ichimura *et al.*, 2009).

Les dérivés TGZ pourraient libérer le Ca^{2+} intracellulaire en agissant **directement** sur le réticulum endoplasmique *via* l'IP3R et/ou **indirectement** par le biais du cytosquelette ou des récepteurs GPCR. Afin de répondre à cette question, nous analyserons les effets anti-cancéreux de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 en association avec des inhibiteurs de ces différents acteurs. On envisage de cibler le récepteur calcique principal du réticulum endoplasmique, IP3R, par la Xestospongin, les canaux PTP et CICR par le nocodazole et le récepteur GPR40 par ARN interférence. Il serait ensuite intéressant d'étudier l'influence du Ca^{2+} intracellulaire sur la morphologie et l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186.

II. Quel est le rôle de la claudine 1 dans la migration des cellules cancéreuses triple-négatives « claudin 1-low » ?

Nous avons montré que la surexpression transitoire de la claudine 1 dans les cellules « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T permet de **diminuer la migration** des cellules. Nous avons aussi observé une diminution de la migration des transfectants stable MDA-MB-231 corrélée avec le niveau d'expression de la claudine 1. De plus, nous avons mis en évidence que la surexpression de la claudine 1 entraîne une modification de la **morphologie cellulaire** avec la formation de prolongements cellulaires et une perte des **fibres de stress** d'actine, en lien avec la diminution des capacités migratoires des cellules. Une étude de la littérature montre un lien entre les fibres de stress et la perte d'expression de la claudine 18. Dans des cellules épithéliales alvéolaires de souris KO pour la claudine 18, on observe une augmentation de l'intensité de l'actine corticale et l'apparition de fibres de stress radiales connectées à la membrane plasmique (Li *et al.*, 2014). De plus, nous avons montré que la morphologie des transfectants stables est associée à une claudine 1 principalement localisée à la **membrane**. Afin de vérifier si la claudine 1 membranaire joue un rôle sur la formation des prolongements cellulaires et la disparition des fibres de stress, nous utiliserons un inhibiteur de localisation membranaire de la claudine 1, YM201636. Il est décrit que les fibres de stress permettent aux cellules d'adhérer au support par les contacts focaux. Nous supposons que la perte des fibres de stress provoquée par la surexpression de la claudine 1 conduit à une diminution de l'adhérence cellule-MEC. Pour le vérifier, nous envisageons de développer un test d'adhérence sur différents supports : verre, plastique, fibronectine, laminine, collagène. Nous pourrions par la suite analyser les acteurs principaux des contacts focaux par immunofluorescence et western blot comme les intégrines, FAK phosphorylée et l' α -actinine.

Nous avons également observé une augmentation de **l'adhérence intercellulaire** dans les cellules surexprimant la claudine 1. La réexpression de la claudine 1 induit l'expression de principaux marqueurs de jonctions au niveau membranaire : occludine, ZO-1 et β -caténine, ce qui suggère que la claudine 1 permet de restituer les jonctions adhérentes et serrées dans les cellules cancéreuses mammaires pour inhiber la migration mésenchymateuse. Dans de nombreux modèles cellulaires, plusieurs études montrent que la claudine 1 est une protéine clé dans la **reformation des jonctions serrées**. Dans des fibroblastes de souris dépourvus de jonctions serrées, la réexpression de la claudine 1 est suffisante pour reformer des structures semblables à celles des jonctions serrées (Furuse *et al.*, 1998b). Dans des modèles *in vitro* et

in vivo d'adénocarcinome du poumon, une surexpression de la claudine 1 membranaire entraînent une diminution de la migration cellulaire associée à une inhibition de la dissociation cellulaire et à une induction de l'expression de ZO-1 et de l'occludine (Chao *et al.*, 2009). Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de l'équipe de Hoevel qui montrent qu'une surexpression de la claudine 1 permet de reformer des jonctions dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-361 (Hoevel *et al.*, 2002). Dans des cellules cancéreuses colorectales T84, la surexpression de la claudine 1 induit l'agrégation des cellules entre elles et restaure la fonction de perméabilité paracellulaire des jonctions serrées (Huo *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'aller vérifier si la reformation des jonctions induite par la réexpression de la claudine 1 restaure la fonctionnalité des jonctions serrées. Pour cela, nous étudierons la perméabilité paracellulaire à l'aide du marqueur FITC-dextran.

Nos résultats ci-dessus montrent une action **anti-migratoire** de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T. Ces données sont en accord avec la littérature qui suggère que la claudine 1 est un **marqueur épithélial de la TEM**. Dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives MDA-MB-231 et MDA-MB-468, une inhibition de l'expression de TMPRSS4 (TransMembrane PRotease, Serine 2) supprime la TEM en augmentant l'expression de l'E-cadhérine et de la claudine 1 et en diminuant celle de la vimentine et de Slug (Li *et al.*, 2017). De même, la surexpression de ZMYND8 inhibe l'invasion cellulaire en diminuant l'expression des marqueurs mésenchymateux Snail, Zeb et vimentine et en augmentant l'expression des marqueurs épithéliaux claudine 1 et E-cadhérine dans les cellules MCF-7 (Basu *et al.*, 2017). Cependant, les études *in vitro* et *in vivo* sur le rôle de la claudine 1 dans la migration restent controversées dans le cancer du sein. Plusieurs études montrent un lien direct entre l'expression de la claudine 1 et son effet **pro-migratoire** dans les cellules MDA-MB-231. En effet, la stanniocalcin 2 inhibe la migration des cellules cancéreuses en bloquant la voie PKC/claudine 1 (Hou *et al.*, 2015). Récemment, une étude a montré que la surexpression de la claudine 1 modifie l'expression de plusieurs miRNAs et conduit à l'induction de la TEM dans les cellules MDA-MB-231 (Majer *et al.*, 2016). De même, le facteur de coagulation VIIa conduit à l'accumulation de la β -caténine nucléaire qui à son tour active des gènes cibles dont la claudine 1, MMP-7 et MMP-14, en corrélation avec une augmentation de la migration des cellules MDA-MB-231 (Roy *et al.*, 2017). L'effet pro-migratoire de la claudine 1 est observé dans d'autres types cellulaires et pourrait s'expliquer par **l'activation des MMP à la membrane**. En effet, la claudine 1 se colocalise et interagit avec MT1-MMP (Membrane Type-MMP) et MMP-2 au niveau membranaire dans les cellules

de reins embryonnaires humaines 293T (Miyamori *et al.*, 2001). Une mutagenèse dirigée contre la claudine 1 a permis de montrer que sa première boucle extracellulaire est importante pour l'activation de la pro-MMP-2 en MMP-2 induit par MT1-MMP. Le même résultat est observé dans des cellules cancéreuses épidermoïdes orales OSC-4 (Oku *et al.*, 2006). Ces études contradictoires suggèrent que la claudine 1 joue un rôle différent en fonction de sa **localisation** et de **son interaction avec différents partenaires protéiques**. En effet, la claudine 1 semblerait restituer le rôle physiologique des jonctions serrées lorsqu'elle est colocalisée avec d'autres protéines des jonctions serrées. En revanche, la claudine 1 pourrait contribuer à dégrader la MEC lorsqu'elle forme un complexe avec les MMP. Afin de mieux comprendre le rôle de la claudine 1 dans la migration des cellules « claudin 1-low », nous commencerons par caractériser l'expression de différents marqueurs épithéliaux et mésenchymateux de la TEM dans les transfectants stables MDA-MB-231. Nous envisageons ensuite d'analyser la localisation de la claudine 1 avec celle des MMP dans ces cellules et d'étudier l'activité des MMP par zymographie. *In fine*, nous devons vérifier si le rôle anti-migratoire de la claudine 1 est un phénomène commun aux cellules cancéreuses mammaires triple-négatives « claudin 1-low ». Pour cela, nous envisageons d'établir différentes lignées stables surexprimant la claudine 1.

III. La claudine 1 permet-elle de sensibiliser les cellules cancéreuses triple-négatives « claudin 1-low » à divers agents de chimiothérapie ?

Nous avons montré que la surexpression de la claudine 1 induit l'entrée en apoptose des cellules MDA-MB-231 et Hs578T. De la même manière, la surexpression de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-361 induit une relocalisation de cette protéine au niveau membranaire, parallèlement à une augmentation de l'entrée en apoptose de ces cellules (Hoevel *et al.*, 2004). Nous avons également montré que la surexpression de la claudine 1 permet de sensibiliser les cellules MDA-MB-231 à la $\Delta 2$ -TGZ. De plus, nous avons montré que le niveau d'expression de la claudine 1 est corrélé avec une augmentation de la réponse apoptotique des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T en réponse à différents agents de chimiothérapie. De manière intéressante, la ré-expression de la claudine 1 induite par la 5-aza ou par transfection permet de restaurer la sensibilité des cellules MDA-MB-231 à l'agent de chimiothérapie 5-FU, qui seul n'a aucun effet. Ces résultats préliminaires sont en accord avec ceux de l'équipe de Zhou qui montrent

que la claudine 1 membranaire augmente la sensibilité des cellules MCF-7 au tamoxifène, à l'étoposide et au cisplatine (Zhou *et al.*, 2015).

Les résultats préliminaires encourageants suggèrent que **la claudine 1 pourrait constituer un marqueur prédictif de sensibilité à la chimiothérapie**. Afin de le confirmer, nous envisageons de surexprimer la claudine 1 ou d'inhiber son expression par ARN interférence en réponse au 5-FU. Si notre hypothèse se confirme avec le 5-FU, nous souhaitons étendre le protocole à des combinaisons de traitement utilisé en chimiothérapie classique. Au vu du potentiel prometteur de la claudine 1, nous souhaitons prospecter si sa réexpression pourrait permettre de resensibiliser les différents types de tumeurs triple-négatives « claudin 1-low » au traitement de chimiothérapie. Pour cela, nous étudierons trois grands sous-types de tumeurs triple-négatives : les lignées « basal-like » HCC70 et HCC1806, les lignées « mesenchymal » MDA-MB-231 et Hs578T et la lignée « LAR » HCC1395. Nous déterminerons s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la claudine 1 et la mort cellulaire en réponse à différents agents de chimiothérapie ou de combinaisons de traitement. Nous souhaitons également suivre l'expression de marqueurs de cellules souches qui sont le plus souvent corrélés avec une faible expression de la claudine 1 (Gerhard *et al.*, 2012). Nous évaluerons par western blot l'expression des marqueurs Oct4, Sox2 et Nanog. En effet, une étude sur 36 tumeurs mammaires a montré une augmentation de la signature CD44⁺/CD24⁻, ainsi qu'un profil mésenchymateux typique du profil « claudin-low » après une chimiothérapie conventionnelle, signe de chimiorésistance (Creighton *et al.*, 2009).

Une étude clinique a été initiée en collaboration avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine de Nancy afin de déterminer s'il existe une corrélation entre le niveau de claudine 1 et la réponse au traitement de chimiothérapie. Pour cela, nous disposerons de prélèvements de tumeurs triple-négatives avant et après traitement de chimiothérapie. Nous analyserons le niveau protéique de la claudine 1 par immunohistochimie. Nous établirons un lien entre l'expression de la claudine 1 et le devenir clinique des patients. Nous suggérons que la perte d'expression de la claudine 1 pourrait être un facteur clé dans les mécanismes de résistance aux traitements. La réexpression de la claudine 1 pourrait donc représenter un intérêt clinique futur dans le cadre d'une combinaison de traitements. Toutefois, le rôle controversé de la claudine 1 dans les tumeurs mammaires reste à élucider par une meilleure compréhension de sa localisation et de ses partenaires protéiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

ACEA Biosciences : <https://www.aceabio.com/applications/compound-mediated-cytotoxicity/>

Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* *19*, 557–566.

Ahn, S.G., Kim, S.J., Kim, C., and Jeong, J. (2016). Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer* *19*, 223–230.

Aizawa, J., Sakayama, K., Kamei, S., Kidani, T., Yamamoto, H., Norimatsu, Y., and Masuno, H. (2010). Effect of troglitazone on tumor growth and pulmonary metastasis development of the mouse osteosarcoma cell line LM8. *BMC Cancer* *10*, 51.

Akasaka, H., Sato, F., Morohashi, S., Wu, Y., Liu, Y., Kondo, J., Odagiri, H., Hakamada, K., and Kijima, H. (2010). Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer* *10*, 548.

Akasaki, Y., Liu, G., Matundan, H.H., Ng, H., Yuan, X., Zeng, Z., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, troglitazone, facilitates caspase-8 and -9 activities by increasing the enzymatic activity of protein-tyrosine phosphatase-1B on human glioma cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 6165–6174.

Akinyeke, T.O., and Stewart, L.V. (2011). Troglitazone suppresses c-Myc levels in human prostate cancer cells via a PPAR γ -independent mechanism. *Cancer Biol. Ther.* *11*, 1046–1058.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 3983–3988.

Amasheh, M., Fromm, A., Krug, S.M., Amasheh, S., Andres, S., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2010). TNF α -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NF κ B signaling. *J. Cell. Sci.* *123*, 4145–4155.

American Cancer Society ; <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention/breast-cancer-risk-factors-you-cannot-change.html>).

Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2009). Physiology and Function of the Tight Junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*.

Angadi Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview.

Associate Degree Nursing Physiology Review : <http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Reproductive.html>

Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., and Ahmed, A.U. (2014). Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ.* *21*, 1119–1131.

B

Babich, A., and Burkhardt, J.K. (2013). Coordinate Control of Cytoskeletal Remodeling and Calcium Mobilization during T-cell Activation. *Immunol Rev* *256*.

Baker, O.J., Camden, J.M., Redman, R.S., Jones, J.E., Seye, C.I., Erb, L., and Weisman, G.A. (2008). Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ alter tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *295*, C1191-1201.

Basu, M., Sengupta, I., Khan, M.W., Srivastava, D.K., Chakrabarti, P., Roy, S., and Das, C. (2017). Dual histone reader ZMYND8 inhibits cancer cell invasion by positively regulating epithelial genes. *Biochem. J.* *474*, 1919–1934.

Baumgartner, H.K., Rudolph, M.C., Ramanathan, P., Burns, V., Webb, P., Bitler, B.G., Stein, T., Kobayashi, K., and Neville, M.C. (2017). Developmental Expression of Claudins in the Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *22*, 141–157.

Beeman, N., Webb, P.G., and Baumgartner, H.K. (2012). Occludin is required for apoptosis when claudin-claudin interactions are disrupted. *Cell Death Dis* *3*, e273.

Benachour, H., Bastogne, T., Toussaint, M., Chemli, Y., Sève, A., Frochet, C., Lux, F., Tillement, O., Vanderesse, R., and Barberi-Heyob, M. (2012). Real-Time Monitoring of Photocytotoxicity in Nanoparticles-Based Photodynamic Therapy: A Model-Based Approach. *PLOS ONE* *7*, e48617.

- Bentzel, C.J., Hainau, B., Ho, S., Hui, S.W., Edelman, A., Anagnostopoulos, T., and Benedetti, E.L. (1980). Cytoplasmic regulation of tight-junction permeability: effect of plant cytokinins. *Am. J. Physiol.* *239*, C75-89.
- Berger, J., Bailey, P., Biswas, C., Cullinan, C.A., Doebber, T.W., Hayes, N.S., Saperstein, R., Smith, R.G., and Leibowitz, M.D. (1996). Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology* *137*, 4189–4195.
- Bhat, A.A., Sharma, A., Pope, J., Krishnan, M., Washington, M.K., Singh, A.B., and Dhawan, P. (2012). Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells. *PLoS ONE* *7*, e37174.
- Bhat, A.A., Ahmad, R., Uppada, S.B., Singh, A.B., and Dhawan, P. (2016). Claudin-1 promotes TNF- α -induced epithelial-mesenchymal transition and migration in colorectal adenocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* *349*, 119–127.
- Blanchard, A.A., Skliris, G.P., Watson, P.H., Murphy, L.C., Penner, C., Tomes, L., Young, T.L., Leygue, E., and Myal, Y. (2009). Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch.* *454*, 647–656.
- Blanchard, A.A., Ma, X., Dueck, K.J., Penner, C., Cooper, S.C., Mulhall, D., Murphy, L.C., Leygue, E., and Myal, Y. (2013). Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age. *BMC Cancer* *13*, 268.
- Blanquicett, C., Roman, J., and Hart, C.M. (2008). Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* *6*, 25–34.
- Boisbrun, M., Chapleur, Y., Bordessa, A., Flament, S., Grillier-Vuissoz, I., Kuntz, S. (2013). Dérivés de thiazolidinedione, leur préparation et leur utilisation dans le traitement des cancers. Brevet Université de Lorraine/CNRS (2013) FR 2 986 231 A1, PCT WO 2013/110796 A1
- Bordessa, A., Colin-Cassin, C., Grillier-Vuissoz, I., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Husson, G., Vo M., Flament, S., Martin, H., Chapleur, Y., et al. (2014). Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: towards more active and less toxic compounds. *Eur J Med Chem* *83*, 129–140.
- Brooks, M.D., Burness, M.L., and Wicha, M.S. (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* *17*, 260–271.
- Burstein, H.J., Demetri, G.D., Mueller, E., Sarraf, P., Spiegelman, B.M., and Winer, E.P. (2003). Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res. Treat.* *79*, 391–397.
- Butt, A.M., Khan, I.B., Hussain, M., Idress, M., Lu, J., and Tong, Y. (2012). Role of post translational modifications and novel crosstalk between phosphorylation and O-beta-GlcNAc modifications in human claudin-1, -3 and -4. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 1359–1369.

C

- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., and Reeves, WJ. Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* *53*, 661-674.
- Campbell, H.K., Maiers, J.L., and DeMali, K.A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp. Cell Res.* *358*, 39–44.
- Capaldo, C.T., and Nusrat, A. (2015). Claudin switching: Physiological plasticity of the Tight Junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* *42*, 22–29.
- Cerejido, M., Meza, I., and Martínez-Palomo, A. (1981). Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. *Am. J. Physiol.* *240*, C96-102.
- Chang, T.L., Ito, K., Ko, T.K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yeoh, K.G., Fukamachi, H., and Ito, Y. (2010). Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* *138*, 255-265.e1-3.
- Chao, Y.-C., Pan, S.-H., Yang, S.-C., Yu, S.-L., Che, T.-F., Lin, C.-W., Tsai, M.-S., Chang, G.-C., Wu, C.-H., Wu, Y.-Y., et al. (2009). Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *179*, 123–133.
- Chbicheb, S., Yao, X., Rodeau, J.-L., Salamone, S., Boisbrun, M., Thiel, G., Spohn, D., Grillier-Vuissoz, I., Chapleur, Y., Flament, S., et al. (2011). EGR1 expression: a calcium and ERK1/2 mediated PPAR γ -independent

event involved in the antiproliferative effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *81*, 1087–1097.

Chen, S., and Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J. Clin. Oncol.* *25*, 1329–1333.

Chen, Y.-J., You, M.-L., Chong, Q.-Y., Pandey, V., Zhuang, Q.-S., Liu, D.-X., Ma, L., Zhu, T., and Lobie, P.E. (2017). Autocrine Human Growth Hormone Promotes Invasive and Cancer Stem Cell-Like Behavior of Hepatocellular Carcinoma Cells by STAT3 Dependent Inhibition of CLAUDIN-1 Expression. *Int J Mol Sci* *18*.

Chi, Q., Yin, T., Gregersen, H., Deng, X., Fan, Y., Zhao, J., Liao, D., and Wang, G. (2014). Rear actomyosin contractility-driven directional cell migration in three-dimensional matrices: a mechano-chemical coupling mechanism. *J R Soc Interface* *11*, 20131072.

Chojkier, M. (2005). Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology* *41*, 237–246.

Chou, C.-H., Chang, N.-W., Shrestha, S., Hsu, S.-D., Lin, Y.-L., Lee, W.-H., Yang, C.-D., Hong, H.-C., Wei, T.-Y., Tu, S.-J., et al. (2016). miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* *44*, D239-247.

Chung, A., Cui, X., Audeh, W., and Giuliano, A. (2013). Current status of anti-human epidermal growth factor receptor 2 therapies: predicting and overcoming herceptin resistance. *Clin. Breast Cancer* *13*, 223–232.

Citi, S., Sabanay, H., Jakes, R., Geiger, B., and Kendrick-Jones, J. (1988). Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* *333*, 272–276.

Citi, S., Sabanay, H., Kendrick-Jones, J., and Geiger, B. (1989). Cingulin: characterization and localization. *J. Cell. Sci.* *93 (Pt 1)*, 107–122.

Colegio, O.R., Van Itallie, C., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *284*, C1346-1354.

Colin, C., Salamone, S., Grillier-Vuissoz, I., Boisbrun, M., Kuntz, S., Lecomte, J., Chapleur, Y., and Flament, S. (2010). New troglitazone derivatives devoid of PPAR γ agonist activity display an increased antiproliferative effect in both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* *124*, 101–110.

Colin-Cassin, C., Yao, X., Cerella, C., Chbicheb, S., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Boisbrun, M., Chapleur, Y., Diederich, M., Flament, S., et al. (2015). PPAR γ -inactive Δ 2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* *54*, 393–404.

Collignon, J., Lousberg, L., Schroeder, H., and Jerusalem, G. (2016). Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer (Dove Med Press)* *8*, 93–107.

Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., et al. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 13820–13825.

Cuda, C.M., Pope, R.M., and Perlman, H. (2016). The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* *12*, 543–558.

D

Dahan, P., Martinez Gala, J., Delmas, C., Monferran, S., Malric, L., Zentkowski, D., Lubrano, V., Toulas, C., Cohen-Jonathan Moyal, E., and Lemarie, A. (2014). Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis* *5*, e1543.

Dawood, S., Broglio, K., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N., and Giordano, S.H. (2010). Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J. Clin. Oncol.* *28*, 92–98.

Day, C. (1999). Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet. Med.* *16*, 179–192.

Debrock, G., Vanhentenrijk, V., Sciot, R., Debiec-Rychter, M., Oyen, R., and Van Oosterom, A. (2003). A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br. J. Cancer* *89*, 1409–1412.

Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M., and Singer,

- S. (1999). Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 3951–3956.
- Denelavas, A., Weibel, F., Prummer, M., Imbach, A., Clerc, R.G., Apfel, C.M., and Hertel, C. (2011). Real-time cellular impedance measurements detect Ca(2+) channel-dependent oscillations of morphology in human H295R adenoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 754–762.
- Dent, R., Hanna, W.M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *115*, 423–428.
- Dhawan, P., Singh, A.B., Deane, N.G., No, Y., Shiou, S.-R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M.K., and Beauchamp, R.D. (2005). Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* *115*, 1765–1776.
- Di Cello, F., Cope, L., Li, H., Jeschke, J., Wang, W., Baylin, S.B., and Zahnow, C.A. (2013). Methylation of the claudin 1 promoter is associated with loss of expression in estrogen receptor positive breast cancer. *PLoS ONE* *8*, e68630.
- Di Modica, M., Tagliabue, E., and Triulzi, T. (2017). Predicting the Efficacy of HER2-Targeted Therapies: A Look at the Host. *Dis. Markers* *2017*, 7849108.
- Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., Cao, J., and Chen, Y.-H. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology* *142*, 305–315.
- Duffy, H.S., John, G.R., Lee, S.C., Brosnan, C.F., and Spray, D.C. (2000). Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J. Neurosci.* *20*, RC114.
- Dufresne, J., and Cyr, D.G. (2007). Activation of an SP binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells. *Biol. Reprod.* *76*, 825–832.
- Dukes, J.D., Whitley, P., and Chalmers, A.D. (2012). The PIKfyve inhibitor YM201636 blocks the continuous recycling of the tight junction proteins claudin-1 and claudin-2 in MDCK cells. *PLoS ONE* *7*, e28659.
- Duncan, J.E., and Goldstein, L.S.B. (2006). The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genet.* *2*, e124.

E

e.Enzyme® : <http://www.eenzyme.com/GPCR-PDE-Assays.aspx>

F

- Fan, Y.-H., Chen, H., Natarajan, A., Guo, Y., Harbinski, F., Iyasere, J., Christ, W., Aktas, H., and Halperin, J.A. (2004). Structure-activity requirements for the antiproliferative effect of troglitazone derivatives mediated by depletion of intracellular calcium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *14*, 2547–2550.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., and Anderson, J.M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* *273*, 29745–29753.
- Fanning, A.S., Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2012). Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol. Biol. Cell* *23*, 577–590.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* *17*, 375–412.
- Filipova, E., Uzunova, K., Kalinov, K., and Vekov, T. (2017). Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetes Ther* *8*, 705–726.
- Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* *463*, 485–492.
- Fortier, A.-M., Asselin, E., and Cadrin, M. (2013). Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J. Biol. Chem.* *288*, 11555–11571.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E., and Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1938–1948.
- French, A.D., Fiori, J.L., Camilli, T.C., Leotlela, P.D., O’Connell, M.P., Frank, B.P., Subaran, S., Indig, F.E., Taub, D.D., and Weeraratna, A.T. (2009). PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of

claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* 6, 93–101.

Fröhlich, E., and Wahl, R. (2015). Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. *Biomed Res Int* 2015, 845340.

Fujibe, M., Chiba, H., Kojima, T., Soma, T., Wada, T., Yamashita, T., and Sawada, N. (2004). Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp. Cell Res.* 295, 36–47.

Fujita, M., Yagami, T., Fujio, M., Tohji, C., Takase, K., Yamamoto, Y., Sawada, K., Yamamori, M., and Okamura, N. (2011). Cytotoxicity of troglitazone through PPAR γ -independent pathway and p38 MAPK pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 312, 219–227.

Fujita, T., Sugiyama, Y., Taketomi, S., Sohda, T., Kawamatsu, Y., Iwatsuka, H., and Suzuoki, Z. (1983). Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes* 32, 804–810.

Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002907.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539–1550.

Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998b). A Single Gene Product, Claudin-1 or -2, Reconstitutes Tight Junction Strands and Recruits Occludin in Fibroblasts. *J Cell Biol* 143, 391–401.

G

Gan, Z., Ding, L., Burckhardt, C.J., Lowery, J., Zaritsky, A., Sitterley, K., Mota, A., Costigliola, N., Starker, C.G., Voytas, D.F., et al. (2016). Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Syst* 3, 252–263.e8.

Galli, A., Ceni, E., Crabb, D.W., Mello, T., Salzano, R., Grappone, C., Milani, S., Surrenti, E., Surrenti, C., and Casini, A. (2004). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPAR γ independent mechanisms. *Gut* 53, 1688–1697.

Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C.M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315–333.

Geoffroy, M., Kleinclauss, A., Grandemange, S., Hupont, S., Boisbrun, M., Flament, S., Grillier-Vuissoz, I., and Kuntz, S. (2017). Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in “claudin-1-low” triple-negative breast cancer cells: involvement of claudin-1. *Breast Cancer Res. Treat.* 165, 517–527.

Gerhard, R., Ricardo, S., Albergaria, A., Gomes, M., Silva, A.R., Logullo, Â.F., Cameselle-Teijeiro, J.F., Paredes, J., and Schmitt, F. (2012). Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *Breast* 21, 354–360.

Giepmans, B.N.G., and van Ijzendoorn, S.C.D. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 820–831.

Ginestier, C., Korkaya, H., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M.S., and Charafe-Jauffret, E. (2007). [The cancer stem cell: the breast cancer driver]. *Med Sci (Paris)* 23, 1133–1139.

Globocan 2012 : <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Glotfelty, L.G., Zahs, A., Iancu, C., Shen, L., and Hecht, G.A. (2014). Microtubules are required for efficient epithelial tight junction homeostasis and restoration. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 307, C245-254.

González-Mariscal, L., Lechuga, S., and Garay, E. (2007). Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem* 42, 1–57.

González-Mariscal, L., Tapia, R., and Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 729–756.

Grände, M., Franzen, A., Karlsson, J.-O., Ericson, L.E., Heldin, N.-E., and Nilsson, M. (2002). Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J. Cell. Sci.* 115, 4227–4236.

Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.

Green, C.R., and Bergquist, P.R. (1982). Phylogenetic Relationships within Theinvertebrata in Relation to Thestructure of Septate Junctions and the development of ‘Occluding’ Junctional Types. *Journal of Cell Science* 53, 279–305.

Grillier-Vuissoz, I., Mazerbourg, S., Boisbrun, M., S, Kuntz, R., Chapleur, Y., and Flament, S. (2012). PPAR α -independent Activity of Thiazolidinediones: A Promising Mechanism of Action for New Anticancer Drugs? *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* 0.

Grommes, C., Landreth, G.E., Sastre, M., Beck, M., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Schlegel, U., and Heneka, M.T. (2006). Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. *Mol. Pharmacol.* 70, 1524–1533.

Grosse, B., Cassio, D., Yousef, N., Bernardo, C., Jacquemin, E., and Gonzales, E. (2012). Claudin-1 involved in neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome regulates hepatic paracellular permeability. *Hepatology* 55, 1249–1259.

Günzel, D., and Fromm, M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2, 1819–1852.

Günzel, D., and Yu, A.S.L. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* 93, 525–569.

Gurel, P.S., Hatch, A.L., and Higgs, H.N. (2014). Connectingthe puzzle pieces between cytoskeleton andsecretory pathway. *Curr Biol* 24, R660–R672.

H

Hackett, A.J., Smith, H.S., Springer, E.L., Owens, R.B., Nelson-Rees, W.A., Riggs, J.L., and Gardner, M.B. (1977). Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1795–1806.

Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M., et al. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 127, 1386–1390.

Hagen, S.J. (2017). Non-canonical functions of claudin proteins: Beyond the regulation of cell-cell adhesions. *Tissue Barriers* 5, e1327839.

Halford, S., Spencer, P., Greenwood, J., Winton, H., Hunt, D.M., and Adamson, P. (2000). Assignment of claudin-1 (CLDN1) to human chromosome 3q28-->q29 with somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* 88, 217.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hassiotou, F., Beltran, A., Chetwynd, E., Stuebe, A.M., Twigger, A.-J., Metzger, P., Trengove, N., Lai, C.T., Filgueira, L., Blancafort, P., et al. (2012). Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells* 30, 2164–2174.

Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829–842.

Hennessy, B.T., Gonzalez-Angulo, A.-M., Stemke-Hale, K., Gilcrease, M.Z., Krishnamurthy, S., Lee, J.-S., Fridlyand, J., Sahin, A., Agarwal, R., Joy, C., et al. (2009). Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 69, 4116–4124.

Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009). Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J. Clin. Invest.* 119, 1772–1783.

Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.

Higashi, Y., Suzuki, S., Sakaguchi, T., Nakamura, T., Baba, S., Reinecker, H.-C., Nakamura, S., and Konno, H. (2007). Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Res.* 139, 68–76.

Hoewel, T., Macek, R., Mundigl, O., Swisshelm, K., and Kubbies, M. (2002). Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J. Cell. Physiol.* 191, 60–68.

Hoewel, T., Macek, R., Swisshelm, K., and Kubbies, M. (2004). Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int. J. Cancer* 108, 374–383.

Hou, J., Wang, Z., Xu, H., Yang, L., Yu, X., Yang, Z., Deng, Y., Meng, J., Feng, Y., Guo, X., et al. (2015). Stanniocalcin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/claudin-1-mediated signaling. *PLoS ONE* 10, e0122179.

Howe, K.L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D.M. (2005). Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced increased permeability. *Am. J. Pathol.* 167, 1587–1597.

Howell, A., and Wardley, A.M. (2005). Overview of the impact of conventional systemic therapies on breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 12 Suppl 1, S9–S16.

Huang, J.-W., Shiau, C.-W., Yang, Y.-T., Kulp, S.K., Chen, K.-F., Brueggemeier, R.W., Shapiro, C.L., and Chen, C.-S. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 67, 1342–1348.

Huo, Q., Kinugasa, T., Wang, L., Huang, J., Zhao, J., Shibaguchi, H., Kuroki, M., Tanaka, T., Yamashita, Y., Nabeshima, K., et al. (2009). Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 29, 851–857.

I

Ichimura, A., Hirasawa, A., Hara, T., and Tsujimoto, G. (2009). Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, 82–88.

Ikari, A., Atomi, K., Takiguchi, A., Yamazaki, Y., Miwa, M., and Sugatani, J. (2009). Epidermal growth factor increases claudin-4 expression mediated by Sp1 elevation in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 306–310.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 171, 939–945.

Inai, T., Kobayashi, J., and Shibata, Y. (1999). Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 849–855.

Institut National du Cancer : <http://www.e-cancer.fr/> ; http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=66; http://www.e-cancer.fr/content/download/161178/2059222/file/Les-therapies-ciblees-dans-le-traitement-du-cancer-en-2015_2016

J

Jackisch, C., Hahm, H.A., Tombal, B., McCloskey, D., Butash, K., Davidson, N.E., and Denmeade, S.R. (2000). Delayed micromolar elevation in intracellular calcium precedes induction of apoptosis in thapsigargin-treated breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 6, 2844–2850.

Jain, K., and Basu, A. (2014). Protein Kinase C-ε Promotes EMT in Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 8, 61–67.

Jan, H.-J., Lee, C.-C., Lin, Y.-M., Lai, J.-H., Wei, H.-W., and Lee, H.-M. (2009). Rosiglitazone reduces cell invasiveness by inducing MKP-1 in human U87MG glioma cells. *Cancer Lett.* 277, 141–148.

Jensen, E.V., and Jordan, V.C. (2003). The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin. Cancer Res.* 9, 1980–1989.

Johnston, S.R.D., and Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat. Rev. Cancer* 3, 821–831.

Jon Lieff website : <http://jonlieffmd.com/blog/yet-another-new-type-of-neuroplasticity-with-myosin-motors>

Joshi, H., Pal, T., and Ramaa, C.S. (2014). A new dawn for the use of thiazolidinediones in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 23, 501–510.

Jung, J.H., Jung, C.K., Choi, H.J., Jun, K.H., Yoo, J., Kang, S.J., and Lee, K.Y. (2009). Diagnostic utility of expression of claudins in non-small cell lung cancer: different expression profiles in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Pathol. Res. Pract.* 205, 409–416.

K

- Kebebew, E., Peng, M., Reiff, E., Treseler, P., Woeber, K.A., Clark, O.H., Greenspan, F.S., Lindsay, S., Duh, Q.-Y., and Morita, E. (2006). A phase II trial of rosiglitazone in patients with thyroglobulin-positive and radioiodine-negative differentiated thyroid cancer. *Surgery* *140*, 960-966; discussion 966-967.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239-257.
- Khoury, H., Naujokas, M.A., Zuo, D., Sangwan, V., Frigault, M.M., Petkiewicz, S., Dankort, D.L., Muller, W.J., and Park, M. (2005). HGF converts ErbB2/Neu epithelial morphogenesis to cell invasion. *Mol. Biol. Cell* *16*, 550-561.
- Kim, Y.H., Jung, E.M., Lee, T.-J., Kim, S.H., Choi, Y.H., Park, J.W., Park, J.-W., Choi, K.S., and Kwon, T.K. (2008). Rosiglitazone promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptor 5 and down-regulation of c-FLIP. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1055-1068.
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H.C. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* *118*, 1001-1011.
- Kinugasa, T., Huo, Q., Higashi, D., Shibaguchi, H., Kuroki, M., Tanaka, T., Futami, K., Yamashita, Y., Hachimine, K., Maekawa, S., et al. (2007). Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res.* *27*, 3729-3734.
- Kobayashi, K., Tsugami, Y., Matsunaga, K., Oyama, S., Kuki, C., and Kumura, H. (2016). Prolactin and glucocorticoid signaling induces lactation-specific tight junctions concurrent with β -casein expression in mammary epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 2006-2016.
- Kojima, T., Takano, K., Yamamoto, T., Murata, M., Son, S., Imamura, M., Yamaguchi, H., Osanai, M., Chiba, H., Himi, T., et al. (2008). Transforming growth factor-beta induces epithelial to mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes. *Liver Int.* *28*, 534-545.
- Komatsu, Y., Yoshino, T., Yamazaki, K., Yuki, S., Machida, N., Sasaki, T., Hyodo, I., Yachi, Y., Onuma, H., and Ohtsu, A. (2014). Phase 1 study of efatuzone, a novel oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, in combination with FOLFIRI as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs* *32*, 473-480.
- Kondo, J., Sato, F., Kusumi, T., Liu, Y., Motonari, O., Sato, T., and Kijima, H. (2008). Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor-alpha in human pancreatic cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* *22*, 645-649.
- Koyama, M., Sowa, Y., Horinaka, M., Goda, A.E., Fujiwara, J., and Sakai, T. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand troglitazone and TRAIL synergistically induce apoptosis. *Oncol. Rep.* *31*, 947-954.
- Krakhmal, N.V., Zavyalova, M.V., Denisov, E.V., Vtorushin, S.V., and Perelmuter, V.M. (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae* *7*, 17-28.
- Krämer, F., White, K., Kubbies, M., Swisshelm, K., and Weber, B.H. (2000). Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum. Genet.* *107*, 249-256.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., and Blasig, I.E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 631-645.
- Krause, G., Protze, J., and Piontek, J. (2015). Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin. Cell Dev. Biol.* *42*, 3-12.
- Krishnan, M., Singh, A.B., Smith, J.J., Sharma, A., Chen, X., Eschrich, S., Yeatman, T.J., Beauchamp, R.D., and Dhawan, P. (2010). HDAC inhibitors regulate claudin-1 expression in colon cancer cells through modulation of mRNA stability. *Oncogene* *29*, 305-312.
- Kulawiec, M., Safina, A., Desouki, M.M., Still, I., Matsui, S.-I., Bakin, A., and Singh, K.K. (2008). Tumorigenic transformation of human breast epithelial cells induced by mitochondrial DNA depletion. *Cancer Biol. Ther.* *7*, 1732-1743.
- Kulke, M.H., Demetri, G.D., Sharpless, N.E., Ryan, D.P., Shivdasani, R., Clark, J.S., Spiegelman, B.M., Kim, H., Mayer, R.J., and Fuchs, C.S. (2002). A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J* *8*, 395-399.

L

- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat.*

Rev. Mol. Cell Biol. 15, 178–196.

Lane, N.J., Dallai, R., Martinucci, G.B., and Burighel, P. (1987). Cell junctions in amphioxus (Cephalochordata): a thin section and freeze-fracture study. *Tissue Cell* 19, 399–411.

Langedijk, J., Mantel-Teeuwisse, A.K., Slijkerman, D.S., and Schutjens, M.-H.D.B. (2015). Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov. Today* 20, 1027–1034.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.

Lasfargues, E.Y., and Ozello, L. (1958). Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 21, 1131–1147.

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359–369.

Lebret, T., and Méjean, A. (2008). [Metastases from urologic malignancies: history, definitions and strategies]. *Prog. Urol.* 18 Suppl 7, S143–146.

Lecomte, J., Flament, S., Salamone, S., Boisbrun, M., Mazerbourg, S., Chapleur, Y., and Grillier-Vuissoz, I. (2008). Disruption of ERalpha signalling pathway by PPARgamma agonists: evidences of PPARgamma-independent events in two hormone-dependent breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 112, 437–451.

Le cytosquelette website : http://ressources.unisciel.fr/biocell/chap4/co/module_Chap4_16.html

Leduc, C., and Etienne-Manneville, S. (2015). Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects. *Curr. Opin. Cell Biol.* 32, 102–112.

Lee, D.B.N., Jamgotchian, N., Allen, S.G., Abeles, M.B., and Ward, H.J. (2008). A lipid-protein hybrid model for tight junction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 295, F1601–1612.

Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 121, 2750–2767.

Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270, 12953–12956.

Lehtimäki, J., Hakala, M., and Lappalainen, P. (2017). Actin Filament Structures in Migrating Cells. *Handb Exp Pharmacol* 235, 123–152.

Leotlela, P.D., Wade, M.S., Duray, P.H., Rhode, M.J., Brown, H.F., Rosenthal, D.T., Dissanayake, S.K., Earley, R., Indig, F.E., Nickoloff, B.J., et al. (2007). Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* 26, 3846–3856.

Letort, G., Ennomani, H., Gressin, L., Théry, M., and Blanchoin, L. (2015). Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. *F1000Res* 4.

Li, J., Zhuo, M., Pei, L., and Yu, A.S.L. (2013). Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b. *J. Biol. Chem.* 288, 22790–22797.

Li, G., Flodby, P., Luo, J., Kage, H., Sipos, A., Gao, D., Ji, Y., Beard, LL., Marconett, CN., DeMaio, L., Kim, YH., Kim, KJ., Laird-Offringa, IA., Minoo, P., Liebler, JM., Zhou, B., Crandall, ED., Borok, Z. (2014). Knockout mice reveal key roles for claudin 18 in alveolar barrier properties and fluid homeostasis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 51, 210–22.

Li, X.-M., Liu, W.-L., Chen, X., Wang, Y.-W., Shi, D.-B., Zhang, H., Ma, R.-R., Liu, H.-T., Guo, X.-Y., Hou, F., et al. (2017). Overexpression of TMPRSS4 promotes tumor proliferation and aggressiveness in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 39, 927–935.

Li, Y., Zhang, D.-W., Lin, D.-Q., and Cao, L.-Q. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor-γ inhibits pancreatic cancer cell invasion and metastasis via regulating MMP-2 expression through PTEN. *Mol Med Rep* 12, 6255–6260.

Liu, F., Koval, M., Ranganathan, S., Fanayan, S., Hancock, W.S., Lundberg, E.K., Beavis, R.C., Lane, L., Duek, P., McQuade, L., et al. (2016). Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J.*

Proteome Res. 15, 339–359.

Liu, H., Zang, C., Fenner, M.H., Possinger, K., and Elstner, E. (2003). PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* 79, 63–74.

Liu, H., Zang, C., Fenner, M.H., Liu, D., Possinger, K., Koeffler, H.P., and Elstner, E. (2006). Growth inhibition and apoptosis in human Philadelphia chromosome-positive lymphoblastic leukemia cell lines by treatment with the dual PPARalpha/gamma ligand TZD18. *Blood* 107, 3683–3692.

Liu, J., Lu, H., Huang, R., Lin, D., Wu, X., Lin, Q., Wu, X., Zheng, J., Pan, X., Peng, J., et al. (2005). Peroxisome proliferator activated receptor- γ ligands induced cell growth inhibition and its influence on matrix metalloproteinase activity in human myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 56, 400–408.

Liu, Y., Wang, L., Lin, X.-Y., Wang, J., Yu, J.-H., Miao, Y., and Wang, E.-H. (2012). Anti-apoptotic effect of claudin-1 on TNF- α -induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *Tumour Biol.* 33, 2307–2315.

Liu, Y., Miao, Y., Wang, J., Lin, X., Wang, L., Xu, H.-T., and Wang, E.-H. (2013). DEC1 is positively associated with the malignant phenotype of invasive breast cancers and negatively correlated with the expression of claudin-1. *Int. J. Mol. Med.* 31, 855–860.

Lopardo, T., Lo Iacono, N., Marinari, B., Giustizieri, M.L., Cyr, D.G., Merlo, G., Crosti, F., Costanzo, A., and Guerrini, L. (2008). Claudin-1 is a p63 target gene with a crucial role in epithelial development. *PLoS ONE* 3, e2715.

Lopez-Ramirez, M.A., Wu, D., Pryce, G., Simpson, J.E., Reijerkerk, A., King-Robson, J., Kay, O., de Vries, H.E., Hirst, M.C., Sharrack, B., et al. (2014). MicroRNA-155 negatively affects blood-brain barrier function during neuroinflammation. *FASEB J.* 28, 2551–2565.

Lu, S., Singh, K., Mangray, S., Tavares, R., Noble, L., Resnick, M.B., and Yakirevich, E. (2013). Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod. Pathol.* 26, 485–495.

Lynch, R.D., Francis, S.A., McCarthy, K.M., Casas, E., Thiele, C., and Schneeberger, E.E. (2007). Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. *Exp. Cell Res.* 313, 2597–2610.

M

Ma, L., and Weinberg, R.A. (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet.* 24, 448–456.

Ma, D., Jiang, Y.-Z., Liu, X.-Y., Liu, Y.-R., and Shao, Z.-M. (2017). Clinical and molecular relevance of mutant-allele tumor heterogeneity in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 162, 39–48.

Ma, F., Ding, X., Fan, Y., Ying, J., Zheng, S., Lu, N., and Xu, B. (2014). A CLDN1-negative phenotype predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* 9, e112765.

Madara, J.L., and Pappenheimer, J.R. (1987). Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J. Membr. Biol.* 100, 149–164.

Madara, J.L., Barenberg, D., and Carlson, S. (1986). Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J. Cell Biol.* 102, 2125–2136.

Madara, J.L., Stafford, J., Barenberg, D., and Carlson, S. (1988). Functional coupling of tight junctions and microfilaments in T84 monolayers. *Am. J. Physiol.* 254, G416–423.

Magenta, G., Borenstein, X., Rolando, R., and Jasnis, M.A. (2008). Rosiglitazone inhibits metastasis development of a murine mammary tumor cell line LMM3. *BMC Cancer* 8, 47.

Mahati, S., Xiao, L., Yang, Y., Mao, R., and Bao, Y. (2017). miR-29a suppresses growth and migration of hepatocellular carcinoma by regulating CLDN1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 732–737.

Majer, A., Blanchard, A.A., Medina, S., Booth, S.A., and Myal, Y. (2016). Claudin 1 Expression Levels Affect miRNA Dynamics in Human Basal-Like Breast Cancer Cells. *DNA Cell Biol.* 35, 328–339.

Mangan, A.J., Sietsema, D.V., Li, D., Moore, J.K., Citi, S., and Prekeris, R. (2016). Cingulin and actin mediate midbody-dependent apical lumen formation during polarization of epithelial cells. *Nat Commun* 7, 12426.

Martin, T.A., Mansel, R.E., and Jiang, W.G. (2002). Antagonistic effect of NK4 on HGF/SF induced changes in

the transendothelial resistance (TER) and paracellular permeability of human vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* *192*, 268–275.

Martin, T.A., Watkins, G., Mansel, R.E., and Jiang, W.G. (2004). Hepatocyte growth factor disrupts tight junctions in human breast cancer cells. *Cell Biol. Int.* *28*, 361–371.

Martínez-Estrada, O.M., Cullerés, A., Soriano, F.X., Peinado, H., Bolós, V., Martínez, F.O., Reina, M., Cano, A., Fabre, M., and Vilaró, S. (2006). The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem. J.* *394*, 449–457.

Masubuchi, Y. (2006). Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *21*, 347–356.

Mazerbourg, S., Kuntz, S., Grillier-Vuissoz, I., Berthe, A., Geoffroy, M., Flament, S., Bordessa, A., and Boisbrun, M. (2016). Reprofilng of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment? *Curr Top Med Chem* *16*, 2115–2124.

McCarthy, K.M., Francis, S.A., McCormack, J.M., Lai, J., Rogers, R.A., Skare, I.B., Lynch, R.D., and Schneeberger, E.E. (2000). Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J. Cell. Sci.* *113 Pt 19*, 3387–3398.

Mego, M., Mani, S.A., and Cristofanilli, M. (2010). Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* *7*, 693–701.

Meshki, J., Douglas, S.D., Lai, J.-P., Schwartz, L., Kilpatrick, L.E., and Tuluc, F. (2009). Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* *284*, 9280–9289.

Meza, I., Ibarra, G., Sabanero, M., Martínez-Palomo, A., and Cerejido, M. (1980). Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.* *87*, 746–754.

Miles, D.W., Chan, A., Dirix, L.Y., Cortés, J., Pivot, X., Tomczak, P., Delozier, T., Sohn, J.H., Provencher, L., Puglisi, F., et al. (2010). Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*, 3239–3247.

Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N.E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *357*, 2666–2676.

Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., et al. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* *585*, 606–612.

Mironov, S.L., Ivannikov, M.V., and Johansson, M. (2005). [Ca²⁺]_i signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules. From mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* *280*, 715–721.

Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2001). Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol. Res.* *12*, 469–476.

Miyamori, H., Takino, T., Kobayashi, Y., Tokai, H., Itoh, Y., Seiki, M., and Sato, H. (2001). Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* *276*, 28204–28211.

Monami, M., Dicembrini, I., and Mannucci, E. (2014). Thiazolidinediones and cancer: results of a meta-analysis of randomized clinical trials. *Acta Diabetol* *51*, 91–101.

Morin, P.J. (2005). Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* *65*, 9603–9606.

Morohashi, S., Kusumi, T., Sato, F., Odagiri, H., Chiba, H., Yoshihara, S., Hakamada, K., Sasaki, M., and Kijima, H. (2007). Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* *20*, 139–143.

Motomura, W., Nagamine, M., Tanno, S., Sawamukai, M., Takahashi, N., Kohgo, Y., and Okumura, T. (2004a). Inhibition of cell invasion and morphological change by troglitazone in human pancreatic cancer cells. *J. Gastroenterol.* *39*, 461–468.

Motomura, W., Takahashi, N., Nagamine, M., Sawamukai, M., Tanno, S., Kohgo, Y., and Okumura, T. (2004b). Growth arrest by troglitazone is mediated by p27Kip1 accumulation, which results from dual inhibition of proteasome activity and Skp2 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer* *108*, 41–46.

Mueller, E., Smith, M., Sarraf, P., Kroll, T., Aiyer, A., Kaufman, D.S., Oh, W., Demetri, G., Figg, W.D., Zhou, X.P., et al. (2000). Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 10990–10995.

Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 413–426.

N

Nadarajan, K., Balaram, P., and Khoo, B.Y. (2016). MK886 inhibits the pioglitazone-induced anti-invasion of MDA-MB-231 cells is associated with PPAR α/γ , FGF4 and 5LOX. *Cytotechnology* *68*, 1771–1787.

Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., and Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int J Cell Biol* *2012*, 310616.

Nath, S., and Devi, G.R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* *163*, 94–108.

National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/>

Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* *166*, 21–45.

Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L.B., Martin, S., Wedge, D.C., et al. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* *534*, 47–54.

Ninomiya, I., Yamazaki, K., Oyama, K., Hayashi, H., Tajima, H., Kitagawa, H., Fushida, S., Fujimura, T., and Ohta, T. (2014). Pioglitazone inhibits the proliferation and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Oncol Lett* *8*, 2709–2714.

Nita-Lazar, M., Rebusini, I., Walker, J., and Kukuruzinska, M.A. (2010). Hypoglycosylated E-cadherin promotes the assembly of tight junctions through the recruitment of PP2A to adherens junctions. *Exp. Cell Res.* *316*, 1871–1884.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23–28.

Nunbhakdi-Craig, V., Machleidt, T., Ogris, E., Bellotto, D., White, C.L., and Sontag, E. (2002). Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J. Cell Biol.* *158*, 967–978.

O

Ogasawara, N., Kojima, T., Go, M., Ohkuni, T., Koizumi, J., Kamekura, R., Masaki, T., Murata, M., Tanaka, S., Fuchimoto, J., et al. (2010). PPARgamma agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. *Pharmacol. Res.* *61*, 489–498.

Oku, N., Sasabe, E., Ueta, E., Yamamoto, T., and Osaki, T. (2006). Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res.* *66*, 5251–5257.

O'Reilly, E.A., Gubbins, L., Sharma, S., Tully, R., Guang, M.H.Z., Weiner-Gorzal, K., McCaffrey, J., Harrison, M., Furlong, F., Kell, M., et al. (2015). The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin* *3*, 257–275.

Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M., and Sawada, N. (2017). Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch.* *469*, 55–67.

P

Palakurthi, S.S., Aktas, H., Grubisich, L.M., Mortensen, R.M., and Halperin, J.A. (2001). Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res.* *61*, 6213–6218.

Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* *7*, 415–428.

- Perou, C.M. (2010). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 15 Suppl 5, 39–48.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
- Pinto da Silva, P., and Kachar, B. (1982). On tight-junction structure. *Cell* 28, 441–450.
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S.L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G., and Blasig, I.E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22, 146–158.
- Pishvaian, M.J., Marshall, J.L., Wagner, A.J., Hwang, J.J., Malik, S., Cotarla, I., Deeken, J.F., He, A.R., Daniel, H., Halim, A.-B., et al. (2012). A phase 1 study of efatutazone, an oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, administered to patients with advanced malignancies. *Cancer* 118, 5403–5413.
- Plissonnier, M.L., Fauconnet, S., Bittard, H., and Lascombe, I. (2010). Insights on distinct pathways of thiazolidinediones (PPARgamma ligand)-promoted apoptosis in TRAIL-sensitive or -resistant malignant urothelial cells. *Int. J. Cancer* 127, 1769–1784.
- Plissonnier, M.-L., Fauconnet, S., Bittard, H., and Lascombe, I. (2011). The antidiabetic drug ciglitazone induces high grade bladder cancer cells apoptosis through the up-regulation of TRAIL. *PLoS ONE* 6, e28354.
- Poritz, L.S., Harris, L.R., Kelly, A.A., and Koltun, W.A. (2011). Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig. Dis. Sci.* 56, 2802–2809.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R68.
- Price, M.G., Davis, C.F., Deng, F., and Burgess, D.L. (2005). The alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor trafficking regulator “stargazin” is related to the claudin family of proteins by its ability to mediate cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 280, 19711–19720.
- Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J.-P., Verhoeyen, E., Ragueneau, V., Maneglier, B., et al. (2015). Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARγ agonists. *Nature* 525, 380–383.

Q

- Qin, W., Ren, Q., Liu, T., Huang, Y., and Wang, J. (2013). MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer-initiating cells that targets CLDN1. *FEBS Lett.* 587, 1434–1439.

R

- Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., and Turner, J.R. (2010). Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell* 21, 1200–1213.
- Rassat, J., Robenek, H., and Themann, H. (1982a). Alterations of tight and gap junctions in mouse hepatocytes following administration of colchicine. *Cell Tissue Res.* 223, 187–200.
- Rassat, J., Robenek, H., and Themann, H. (1982b). Cytochalasin B affects the gap and tight junctions of mouse hepatocytes in vivo. *J. Submicrosc. Cytol.* 14, 427–439.
- Robert, N.J., Diéras, V., Glaspy, J., Brufsky, A.M., Bondarenko, I., Lipatov, O.N., Perez, E.A., Yardley, D.A., Chan, S.Y.T., Zhou, X., et al. (2011). RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1252–1260.
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S.M., Masuda, N., Delalogue, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., et al. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* 377, 523–533.
- Rodgers, L.S., Beam, M.T., Anderson, J.M., and Fanning, A.S. (2013). Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. *J. Cell. Sci.* 126, 1565–1575.
- Roy, A., Ansari, S.A., Das, K., Prasad, R., Bhattacharya, A., Mallik, S., Mukherjee, A., and Sen, P. (2017). Coagulation factor VIIa-mediated protease-activated receptor 2 activation leads to β-catenin accumulation via the AKT/GSK3β pathway and contributes to breast cancer progression. *J. Biol. Chem.* 292, 13688–13701.

Russu, W.A. (2007). Thiazolidinedione anti-cancer activity: Is inhibition of microtubule assembly implicated? *Med. Hypotheses* 68, 343–346.

S

Saeedi, B.J., Kao, D.J., Kitzenberg, D.A., Dobrinskikh, E., Schwisow, K.D., Masterson, J.C., Kendrick, A.A., Kelly, C.J., Bayless, A.J., Kominsky, D.J., et al. (2015). HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity. *Mol. Biol. Cell* 26, 2252–2262.

Saha, S., New, L.S., Ho, H.K., Chui, W.K., and Chan, E.C.Y. (2010). Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 192, 141–149.

Salamone, S., Colin, C., Grillier-Vuissoz, I., Kuntz, S., Mazerbourg, S., Flament, S., Martin, H., Richert, L., Chapleur, Y., and Boisbrun, M. (2012). Synthesis of new troglitazone derivatives: anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur J Med Chem* 51, 206–215.

Seth, A., Sheth, P., Elias, B.C., and Rao, R. (2007). Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. *J. Biol. Chem.* 282, 11487–11498.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84–88.

Sharma, A., Bhat, A.A., Krishnan, M., Singh, A.B., and Dhawan, P. (2013). Trichostatin-A modulates claudin-1 mRNA stability through the modulation of Hu antigen R and tristetrarolin in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 34, 2610–2621.

Shiau, C.-W., Yang, C.-C., Kulp, S.K., Chen, K.-F., Chen, C.-S., Huang, J.-W., and Chen, C.-S. (2005). Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res.* 65, 1561–1569.

Shiou, S.-R., Singh, A.B., Moorthy, K., Datta, P.K., Washington, M.K., Beauchamp, R.D., and Dhawan, P. (2007). Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1571–1579.

Shlush, L.I., and Hershkovitz, D. (2015). Clonal evolution models of tumor heterogeneity. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* e662-665.

Singh, A.B., and Harris, R.C. (2004). Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 279, 3543–3552.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.

Sluysmans, S., Vasileva, E., Spadaro, D., Shah, J., Rouaud, F., and Citi, S. (2017). The role of apical cell-cell junctions and associated cytoskeleton in mechanotransduction. *Biol. Cell* 109, 139–161.

Smith, G.H. (2005). Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* 132, 681–687.

Sobel, G., Németh, J., Kiss, A., Lotz, G., Szabó, I., Udvarhelyi, N., Schaff, Z., and Páska, C. (2006). Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* 103, 591–598.

Sohda, T., Mizuno, K., Imamiya, E., Sugiyama, Y., Fujita, T., and Kawamatsu, Y. (1982). Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 30, 3580–3600.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51, 1409-1416.

Soule, HD., Maloney, TM., Wolman, SR., Peterson, WD. Jr., Brenz, R., McGrath, CM., Russo, J., Pauley, RJ., Jones, RF., and Brooks, SC. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* *50*, 6075–6086.

Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 10869–10874.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 8418–8423.

Spadaro, D., Tapia, R., Jond, L., Sudol, M., Fanning, A.S., and Citi, S. (2014). ZO proteins redundantly regulate the transcription factor DbpA/ZONAB. *J. Biol. Chem.* *289*, 22500–22511.

Staehein, L.A. (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell. Sci.* *13*, 763–786.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* *103*, 755–766.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* *439*, 993–997.

Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., Tsukita, S., Nureki, O., and Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* *344*, 304–307.

Swisshelm, K., Machl, A., Planitzer, S., Robertson, R., Kubbies, M., and Hosier, S. (1999). SEMP1, a senescence-associated cDNA isolated from human mammary epithelial cells, is a member of an epithelial membrane protein superfamily. *Gene* *226*, 285–295.

Swissmodel : <https://swissmodel.expasy.org/>

Szasz, A.M., Tokes, A.M., Micsinai, M., Krenacs, T., Jakab, C., Lukacs, L., Nemeth, Z., Baranyai, Z., Dede, K., Madaras, L., et al. (2011). Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* *28*, 55–63.

T

Takahashi, S., Iwamoto, N., Sasaki, H., Ohashi, M., Oda, Y., Tsukita, S., and Furuse, M. (2009). The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *J. Cell. Sci.* *122*, 985–994.

Tang, D.D., and Gerlach, B.D. (2017). The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir. Res.* *18*, 54.

Tedelind, S., Ericson, L.E., Karlsson, J.O., and Nilsson, M. (2003). Interferon-gamma down-regulates claudin-1 and impairs the epithelial barrier function in primary cultured human thyrocytes. *Eur. J. Endocrinol.* *149*, 215–221.

Tokés, A.-M., Kulka, J., Paku, S., Szik, A., Páska, C., Novák, P.K., Szilák, L., Kiss, A., Bögi, K., and Schaff, Z. (2005). Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* *7*, R296-305.

Tokuda, S., Higashi, T., and Furuse, M. (2014). ZO-1 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape. *PLoS ONE* *9*, e104994.

Tokumasu, R., Tamura, A., and Tsukita, S. (2017). Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: Lessons from claudin-1 in skin. *Tissue Barriers* *5*, e1336194.

Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B.M., Sarraf, P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., Brun, R.P., Mueller, E., Altiock, S., Oppenheim, H., et al. (1997). Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 237–241.

Toss, A., Venturelli, M., Peterle, C., Piacentini, F., Cascinu, S., and Cortesi, L. (2017). Molecular Biomarkers

for Prediction of Targeted Therapy Response in Metastatic Breast Cancer: Trick or Treat? *Int J Mol Sci* 18.

Tuccori, M., Filion, K.B., Yin, H., Yu, O.H., Platt, R.W., and Azoulay, L. (2016). Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study. *BMJ* 352, i1541.

V

Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 157–165.

Van Itallie, C.M., Tietgens, A.J., and Anderson, J.M. (2017). Visualizing the dynamic coupling of claudin strands to the actin cytoskeleton through ZO-1. *Mol. Biol. Cell* 28, 524–534.

Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., Bridges, A., and Anderson, J.M. (2009). ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 20, 3930–3940.

Varley, C.L., Garthwaite, M.A.E., Cross, W., Hinley, J., Trejdosiewicz, L.K., and Southgate, J. (2006). PPAR γ -regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *J. Cell. Physiol.* 208, 407–417.

Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28, 1143–1158.

W

Wang, F., Liu, D., Xu, H., Li, Y., Wang, W., Liu, B., and Zhang, L. (2014). Thapsigargin induces apoptosis by impairing cytoskeleton dynamics in human lung adenocarcinoma cells. *ScientificWorldJournal* 2014, 619050.

Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., and Liu, Y.-C. (2012). Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig. Dis. Sci.* 57, 3126–3135.

Wang, P.-S., Chou, F.-S., Porchia, L., Saji, M., and Pinzone, J.J. (2008). Troglitazone inhibits cell migration, adhesion, and spreading by modulating cytoskeletal rearrangement in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 47, 905–915.

Wang, Y., Mattson, M.P., and Furukawa, K. (2002). Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J. Neurochem.* 82, 945–952.

Watson, C.J., Hoare, C.J., Garrod, D.R., Carlson, G.L., and Warhurst, G. (2005). Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *J. Cell. Sci.* 118, 5221–5230.

Wei, S., Lin, L.-F., Yang, C.-C., Wang, Y.-C., Chang, G.-D., Chen, H., and Chen, C.-S. (2007). Thiazolidinediones modulate the expression of beta-catenin and other cell-cycle regulatory proteins by targeting the F-box proteins of Skp1-Cul1-F-box protein E3 ubiquitin ligase independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Pharmacol.* 72, 725–733.

Wei, X., Jia, Z.-S., Lian, J.-Q., Zhang, Y., Li, J., Ma, L., Ye, L., Wang, J.-P., Pan, L., Wang, P.-Z., et al. (2009). Inhibition of hepatitis C virus infection by interferon-gamma through downregulating claudin-1. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 171–178.

Weigelt, B., Ng, C.K.Y., Shen, R., Popova, T., Schizas, M., Natrajan, R., Mariani, O., Stern, M.-H., Norton, L., Vincent-Salomon, A., et al. (2015). Corrigendum: metastatic breast carcinomas display genomic and transcriptomic heterogeneity. *Mod. Pathol.* 28, 607.

Wen, H., Watry, D.D., Marcondes, M.C.G., and Fox, H.S. (2004). Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8408–8417.

Wu, X., Chen, H., Parker, B., Rubin, E., Zhu, T., Lee, J.S., Argani, P., and Sukumar, S. (2006). HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66, 9527–9534.

Y

Yamada, K.M., and Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J. Cell. Sci.* 114, 2375–2382.

Yang, Y., Zhao, L.-H., Huang, B., Wang, R.-Y., Yuan, S.-X., Tao, Q.-F., Xu, Y., Sun, H.-Y., Lin, C., and Zhou, W.-P. (2015). Pioglitazone, a PPAR γ agonist, inhibits growth and invasion of human hepatocellular carcinoma via blockade of the rage signaling. *Mol. Carcinog.* 54, 1584–1595.

Yang, Y.-C., Ho, T.-C., Chen, S.-L., Lai, H.-Y., Wu, J.-Y., and Tsao, Y.-P. (2007). Inhibition of cell motility by troglitazone in human ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer* 7, 216.

Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., and Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J. Cell Biol.* 203, 605–614.

Yates, A., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Billis, K., Carvalho-Silva, D., Cummins, C., Clapham, P., Fitzgerald, S., Gil, L., et al. (2016). Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 44, D710-716.

Yee, L.D., Williams, N., Wen, P., Young, D.C., Lester, J., Johnson, M.V., Farrar, W.B., Walker, M.J., Povoski, S.P., Suster, S., et al. (2007). Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. *Clin. Cancer Res.* 13, 246–252.

Yoda, S., Soejima, K., Hamamoto, J., Yasuda, H., Nakayama, S., Satomi, R., Terai, H., Ikemura, S., Sato, T., Naoki, K., et al. (2014). Claudin-1 is a novel target of miR-375 in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 85, 366–372.

Z

Zhang, K., Yao, H.-P., and Wang, M.-H. (2008). Activation of RON differentially regulates claudin expression and localization: role of claudin-1 in RON-mediated epithelial cell motility. *Carcinogenesis* 29, 552–559.

Zhang, W., Wu, N., Li, Z., Wang, L., Jin, J., and Zha, X.-L. (2006). PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via upregulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1008–1014.

Zhao, X., Zou, Y., Gu, Q., Zhao, G., Gray, H., Pfeffer, L.M., and Yue, J. (2015). Lentiviral Vector Mediated Claudin1 Silencing Inhibits Epithelial to Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *Viruses* 7, 2965–2979.

Zheng, G., Victor Fon, G., Meixner, W., Creekmore, A., Zong, Y., K Dame, M., Colacino, J., Dedhia, P.H., Hong, S., and Wiley, J.W. (2017). Chronic stress and intestinal barrier dysfunction: Glucocorticoid receptor and transcription repressor HES1 regulate tight junction protein Claudin-1 promoter. *Sci Rep* 7, 4502.

Zhou, B., Blanchard, A., Wang, N., Ma, X., Han, J., Schroedter, I., Leygue, E., and Myal, Y. (2015a). Claudin 1 promotes migration and increases sensitivity to tamoxifen and anticancer drugs in luminal-like human breast cancer cells MCF7. *Cancer Invest.* 33, 429–439.

Zhou, B., Moodie, A., Blanchard, A.A.A., Leygue, E., and Myal, Y. (2015b). Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights. *J Clin Med* 4, 1960–1976.

Zhou, Q., Costinean, S., Croce, C.M., Brasier, A.R., Merwat, S., Larson, S.A., Basra, S., and Verne, G.N. (2015c). MicroRNA 29 targets nuclear factor- κ B-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability. *Gastroenterology* 148, 158–169.e8.

Zhu, J., Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, W., Fan, L., Wang, L., Liu, Y., Liu, S., Guo, Y., Wang, Y., et al. (2016). MicroRNA-142-5p contributes to Hashimoto's thyroiditis by targeting CLDN1. *J Transl Med* 14, 166.

Zhu, Y., Wang, W., Yuan, T., Fu, L., Zhou, L., Lin, G., Zhao, S., Zhou, H., Wu, G., and Wang, J. (2017). MicroRNA-29a mediates the impairment of intestinal epithelial integrity induced by intrauterine growth restriction in pig. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G434–G442.

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M.S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 564–580.

Zou, W., Liu, X., Yue, P., Khuri, F.R., and Sun, S.-Y. (2007). PPARgamma ligands enhance TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and c-FLIP downregulation in human lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 6, 99–106.

Zwanziger, D., Badziong, J., Ting, S., Moeller, L.C., Schmid, K.W., Siebolts, U., Wickenhauser, C., Dralle, H., and Fuehrer, D. (2015). The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness. *Endocr. Relat. Cancer* 22, 819–830.

ANNEXES

LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

1. Mazerbourg S., Kuntz S., Grillier-Vuissoz I., Berthe A., Geoffroy M., Flament S., Bordessa A., Boisbrun M (2016). Reprofiling of Troglitazone towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(19), 2016; 16(19):2115–24. DOI: 10.2174/1568026616666160216153036
2. Geoffroy M., Kleinclauss A, Grandemange S, Hupont S, Boisbrun M, Flament S, Grillier-Vuissoz I, Kuntz S. Pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in “claudin 1-low” triple negative breast cancer cells: involvement of claudin 1. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017 Oct;165(3) :517-527. DOI: 10.1007/s10549-017-4378-2.

Communications orales à des congrès nationaux

1. Geoffroy M.*, Husson G., Kleinclauss A., Boisbrun M., Flament S., Grillier-Vuissoz I., Kuntz S. Les dérivés de TZD: une piste prometteuse pour le traitement des tumeurs triple-négatives "claudine 1 low" ? Journée d'Echanges sur la Recherche en Cancérologie en Lorraine. La personnalisation du diagnostic et des traitements, Institut de Cancérologie de Lorraine à Vandoeuvre les Nancy, **26 septembre 2014**.
2. Geoffroy M.*, Husson G., Kleinclauss A., Boisbrun M., Flament S., Kuntz S., Grillier-Vuissoz I. Modulation de l'expression de la claudine 1 par les thiazolidinediones dans les cellules cancéreuses mammaires. 8ème forum du Cancéropole Grand-Est à Strasbourg, **20 et 21 novembre 2014**.
3. Geoffroy M.*, Husson G., Kleinclauss A., Boisbrun M., Flament S., Grillier-Vuissoz I., Kuntz S. Les dérivés de TZD: une piste prometteuse pour le traitement des tumeurs triple-négatives "claudine 1 low" ? Journée d'échanges sur la recherche en cancérologie en Lorraine. La personnalisation du diagnostic et des traitements. Institut de Cancérologie de Lorraine à Vandoeuvre les Nancy, **26 septembre 2015**.
4. Grillier-Vuissoz I., Kuntz S., Mazerbourg S., Colin-Cassin C., Geoffroy M., Berthe A., Bordessa A., Boisbrun M., Flament S.* Le repositionnement de la Troglitazone, une stratégie intéressante pour le traitement des tumeurs mammaires triple-négatives? 3^{ème} Journée

d'échanges sur la recherche en cancérologie en Lorraine à Vandoeuvre les Nancy, **14 octobre 2016.**

5. Geoffroy M.*, Kleinclauss A., Batista L., Boisbrun M., Barberi-Heyob M., Bastogne T., Flament S., Grillier-Vuissoz I., Kuntz S. Effets précoces et tardifs des dérivés de troglitazone dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives claudin 1-low. 10^{ème} forum du Cancéropôle Grand-Est à Nancy **le 24 et 25 novembre 2016.**

* orateur

Communications par affiche à des congrès nationaux

1. Geoffroy M., Husson G., Kleinclauss A., Boisbrun M., Flament S., Grillier-Vuissoz I., Kuntz S. Thiazolidinediones derivatives: a promising compounds for the treatment of claudin-1 low breast cancer cells. 9^{ème} forum du cancéropole Grand-Est à Strasbourg, **12 et 13 novembre 2015.**

Communications par affiche à des congrès internationaux

1. Geoffroy M., Husson G., Kleinclauss A., Boisbrun M., Flament S., Grillier-Vuissoz I., Kuntz S. Modulation of claudin-1 expression by thiazolidinediones in breast cancer cells. 2nd International Cancer Research Center of Lyon Symposium 2015 Lyon, France. **21-23 September 2015.**

2. Geoffroy M., Kleinclauss A., Boisbrun M., Flament S., Kuntz S., Grillier-Vuissoz I. Modulation of claudin 1 expression by $\Delta 2$ -TGZ in triple negative breast cancer cells is correlated to apoptosis. 2nd EACR-OECI Conference - Making it Personal: Cancer Precision Medicine, Amsterdam, Netherlands. **13-16 Mars 2017.**

Prix

1. **Prix de la meilleure communication orale :** Geoffroy M., Kleinclauss A., Kuntz S., Grillier-Vuissoz I. Rôle de la claudine 1 dans les effets anti-cancéreux des thiazolidinediones dans les cellules cancéreuses mammaires. Journée de l'Ecole Doctorale BioSE, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, **11 décembre 2015.**

RESUME

Un défi majeur en cancérologie est le traitement des tumeurs mammaires dites triple-négatives (ER-, PR-, HER2-). Elles sont le plus souvent résistantes aux traitements conventionnels et présentent un haut risque de récurrence. De plus, l'absence de cibles thérapeutiques ne permet pas le développement de thérapie spécifique. 78% de ces tumeurs expriment faiblement la claudine 1 et sont de très mauvais pronostic. Cette protéine est impliquée dans l'adhérence des cellules entre elles et pourrait jouer un rôle suppresseur de tumeur dans les cancers mammaires. Dans ce contexte, nous étudions si sa réexpression pourrait être une piste de traitement. Au laboratoire, nous avons développé des dérivés de la famille des thiazolidinediones (TZD) qui stimulent l'expression de la claudine 1 et induisent l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires. Les objectifs de ma thèse ont consisté 1) à déterminer l'implication de la claudine 1 dans l'effet pro-apoptotique de ces composés 2) à l'étude de leurs mécanismes d'action 3) évaluer si l'expression de la claudine 1 pourrait sensibiliser les cellules cancéreuses triple-négatives aux agents de chimiothérapie.

Au cours de cette thèse, nous avons montré que la surexpression de la claudine 1 et le composé $\Delta 2$ -TGZ induisent l'apoptose des cellules triple-négatives « claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T. De plus, la claudine 1 est impliquée dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MDA-MB-231. Par ailleurs, nous avons démontré que les dérivés TGZ, la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186, agissent de manière précoce en modifiant la morphologie des cellules suivie d'une réexpression de la claudine 1 membranaire et d'une inhibition de la migration cellulaire avant même d'induire la mort cellulaire par apoptose. De plus, la surexpression de la claudine 1 inhibe la migration cellulaire associée à la perte des fibres de stress et la formation des jonctions intercellulaires. Nous avons également montré que la réexpression de la claudine 1 sensibilise les cellules MDA-MB-231 à l'agent de chimiothérapie, le 5-FU. L'ensemble des résultats de thèse a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de la $\Delta 2$ -TGZ et de l'AB186 sur les cellules cancéreuses mammaires mais aussi d'identifier la claudine 1 comme cible potentielle prometteuse dans les cellules triple-négatives « claudin 1-low ».

Mots clés : Cancer du sein, Thiazolidinediones, Claudine 1, Apoptose, Jonctions cellulaires, Cytosquelette

ABSTRACT

A major challenge in oncology is the treatment of triple-negative breast cancer (ER-, PR-, HER2-) as no targeted therapy are available. These tumors present often a chemotherapy resistance and a higher relapse incidence. 78% of them do not express claudin 1 and display a poor prognosis. Claudin 1 is involved in cell-cell adhesion and may be a tumor suppressor gene in breast cancer. In this context, we study if claudin 1 re-expression could be a possible approach. In the laboratory, we developed derivatives thiazolidinediones (TZD) compounds, which increase claudin 1 expression and lead to apoptosis of breast cancer cells. The goals of my thesis is 1) to characterize the involvement of claudin 1 in their pro-apoptotic effect 2) to study their mechanism of action 3) to determine if claudin 1 could sensitize the TNBC cells to the chemotherapy agents.

During my thesis, we showed that claudin 1 overexpression and the compound $\Delta 2$ -TGZ induce apoptosis of TNBC « claudin 1-low » MDA-MB-231 and Hs578T cells. Claudin 1 is involved in the pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 cells. Then, we demonstrated that $\Delta 2$ -TGZ and AB186 lead to early action through a modification of cell morphology followed an expression of claudin 1 at the membrane and an inhibition of cell migration before the apoptosis process. In addition, claudin 1 overexpression decreases the cell migration through the loss of stress fibers and the formation of cell junctions. We showed that claudin 1 overexpression potentialize the pro-apoptotic effect of $\Delta 2$ -TGZ in MDA-MB-231 cells. Finally, we observed that claudin 1 sensitize the MDA-MB-231 cells to 5-FU. *In fine*, our data allowed a better understanding of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 mechanism of action and identification of claudin 1 as a promising target in TNBC « claudin 1-low ».

Key words: Breast cancer, Thiazolidinedione, Claudin 1, Apoptosis, Cell junction, Cytoskeleton