



HAL
open science

La claudine 1 : une piste pour sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives à la chimiothérapie

Marine Lemesle

► To cite this version:

Marine Lemesle. La claudine 1 : une piste pour sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives à la chimiothérapie. Cancer. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0061 . tel-03797161

HAL Id: tel-03797161

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03797161v1>

Submitted on 4 Oct 2022

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

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 bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

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 LEMESLE**

La claudine 1 : une piste pour sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives à la chimiothérapie

Mardi 5 avril 2022

Membres du jury :

Président du jury :

M. Marc DIEDERICH

PU, LBMCC, Luxembourg et Université de Séoul, Corée du Sud

Rapporteurs :

Mme. Céline GONGORA
M. Thierry DUBOIS

DR, IRCM, INSERM U1194, Montpellier
DR, Institut Curie, UMR144 CNRS, Paris

Examineurs :

M. Aurélien LAMBERT
Mme. Catherine-laure TOMASETTO
M. Nicolas ETIQUE

MCU, ICL et Université de Lorraine Nancy
DR, IGBMC, CNRS UMR 7104 - Inserm U 1258, Illkirch
MCU, Université de Reims, UMR 7369 CNRS MEDyC, Reims

Directrices de thèse :

Mme. Isabelle GRILLIER-VUISSOZ
Mme. Sandra KUNTZ

MCU, Université de Lorraine, UMR 7039 CNRS CRAN, Nancy
MCU, Université de Lorraine, UMR 7039 CNRS CRAN, Nancy

Membres invités :

M. Bruno CHARPENTIER

PU, Université de Lorraine, UMR 7365 CNRS IMOPA, Nancy

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres de mon jury de thèse les **Dr. Céline GONGORA**, **Catherine-laure TOMASETTO**, **Thierry DUBOIS**, **Aurélien LAMBERT** et **Nicolas ETIQUE** ainsi que les **Pr. Marc DIEDERICH** et **Bruno CHARPENTIER**. Merci d'avoir accepté de participer à ma soutenance malgré la période difficile que nous traversons. Merci à tous pour le temps consacré à ce manuscrit. Soyez certains de ma profonde reconnaissance.

Je tenais aussi à remercier les **Pr Bruno Charpentier** et **Dr Catherine Tomasetto**, membres de mon comité de suivi individuel, pour leurs conseils avisés durant ces 3 années de thèse. Vos remarques lors de nos échanges ont toujours été constructifs et bénéfiques à ce travail de thèse.

Merci à mes directrices de thèses, **Isabelle Grillier-Vuissoz** et **Sandra Kuntz**. Merci de m'avoir fait confiance pour ces 3 années de thèse. Merci pour l'autonomie et la liberté que vous m'avez accordé pour mener à bien ce projet. **Isabelle**, merci d'avoir répondu à mes interrogations aussi bien sur le plan scientifique que concernant mon avenir professionnel. **Sandra**, merci pour votre engagement sans faille tout au long de ces trois années. Merci pour tous vos conseils scientifiques et rédactionnels et le temps que vous avez accordé à la lecture et à la correction de ce manuscrit.

Merci à l'équipe de direction du CRAN et plus particulièrement aux **Pr Didier Wolf** et **Muriel Barberi-Heyob**. Je les remercie sincèrement pour leur soutien et leur accueil au sein du laboratoire. Merci également à **Monique Lemaire** et **Gilles Mourot** pour leur écoute, leur disponibilité et leur bienveillance.

Merci à nos collaborateurs **Hortense Mazon** et **François Talfournier** pour leur aide sur le projet des partenaires de la claudine. Vos précieux conseils nous ont aidé à faire avancer ce projet et j'espère que cette collaboration se poursuivra dans le futur. Merci également

à **Fabien Alpy** et à **Catherine** pour l'accueil qu'ils m'ont réservé au sein de leur laboratoire mais aussi pour leur aide inestimable tout au long de ma thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la **Ligue contre le cancer** et du **CRAN**, qui m'ont permis, grâce à plusieurs allocations de recherches et diverses aides financières, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Un grand merci également aux membres du laboratoire qui m'ont encouragé et prodigué de nombreux conseils : Merci aux docteurs **Hélène Dumond**, **Sabine Mazerbourg**, **Guillaume Harlé**, **Stéphanie Grandemange**, et **Marine Geoffroy**. Merci à la plus compatissante et enjouée des secrétaires, **Catherine**, merci pour tout. Merci à **Vanessa** et **Émilie** pour leurs conseils techniques et leur écoute. Merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer et qui sont devenues de vraies amies : **Marine**, **Laura** merci d'avoir été là, merci pour votre dynamisme, votre joie de vivre et merci pour nos pauses (plus que méritées) qui m'ont permis de relâcher la pression. Merci aussi à **Nathan**, à **Lucille** et à **Océane** pour leur bonne humeur et l'intérêt manifeste qu'ils ont porté à mon projet de thèse.

A **Alexandra** un merci infini pour ta patience, ton soutien, ton écoute, ta bienveillance et ta gentillesse. Jamais je n'aurais pu espérer meilleure collègue. Travailler avec toi a été plus qu'un plaisir. Il a été dur de te voir quitter le laboratoire pour d'autres horizons mais je suis si fière de toi. J'ai de de la chance de pouvoir te compter parmi mes amies.

Julie, on dit souvent que la chance est comme la foudre et qu'elle ne frappe pas deux fois au même endroit et pourtant ... Tu complètes notre équipe avec brio ! Tu as été d'une efficacité, d'une écoute et d'une aide infinie lors de ma dernière année de thèse. Je ne t'en remercierai jamais assez !

Merci au Pr **Marc Diederich** et aux Dr **Franck Morceau** et **Fabrice Teletchea** de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche lors de mes stages de L3 et de M1. Vos conseils et votre pédagogie au cours de ces moments auront su attiser ma curiosité scientifique et faire naître ma passion pour la recherche.

Merci à la famille **Teletchea**. Garder vos enfants durant mes études aura été un réel grand plaisir toujours accompagné de rires, de joie et de bonne humeur.

A tous les amis que cette thèse m'aura apportés : **Armelle, Hiba, Capucine** merci à vous pour toutes nos discussions, votre soutien et nos fous rires. **Reine, Fatouma, Valentine, Mahdia, Charlotte, Stéfania, Laura** et tous les autres d'IMoPA ... merci. J'aurais tant apprécié travailler avec vous pour vous avoir au quotidien autour de moi. **Charlotte**, un merci tout spécial pour toi. Merci d'avoir fait entrer Adrien dans ma vie (même si tu ne veux pas l'admettre). **Reine**, merci à toi aussi, en étant une directrice de thèse aussi géniale avec Adrien, tu as aussi contribué à rendre la mienne bien plus facile.

A **ma famille**, à **mes parents**, à **Aurélien** et à **Noa**, Merci ! La rédaction d'une thèse est l'aboutissement de nombreux défis : les erreurs de parcours, les doutes, la Licence, le Master, la sélection pour l'entrée en Thèse, la recherche et finalement la rédaction du manuscrit. Merci de m'avoir permis de faire des études dans les meilleures conditions possibles. Merci à vous d'avoir été présent, et enfin merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussée toujours plus loin ! Merci pour votre amour !

A **Clemouset** et **Mousette**, merci de m'avoir laissé entrer dans vos vies comme vous l'avez fait. Vous rendez ma vie plus simple et surtout remplie d'amour. Merci pour votre bienveillance. Personne ne trouvera une « belle-famille » aussi exceptionnelle que celle que j'ai trouvée. Je vous l'assure. Vous êtes ma famille.

Isma, Arsène, merci pour les soirées et les vacances que nous avons pu faire ensemble. Merci d'avoir rendu ces moments aussi agréables. A **Jeanne** et **Antoine**, merci d'être vous ! Merci d'être toujours là pour nous, merci de nous faire rire, et merci de votre soutien inconditionnel. Être avec vous est une joie de chaque instant, on vous aime.

A mon **Floflo**, mon collègue, puis mon partenaire de Western Blot, pour finalement devenir un ami si cher à mon cœur. Jamais je ne saurais te dire à quel point je suis fière de toi et à quel point ton soutien et ton écoute ont été d'un réconfort immense pour moi au cours de cette thèse. A **Julen**, merci d'avoir participé à cette semaine DCCE. Merci car nous n'aurions pas gagné sans toi. Plus sérieusement, merci d'être dans ma vie. Ton sarcasme et ta bienveillance auront rendu cette thèse bien plus légère ! Quelques fois la vie est bien

faite et place les bonnes personnes sur ta route. J'ai énormément de chance de vous avoir tous les deux dans la mienne. (Je maintiens, tout de même, ma version de l'Histoire de votre rencontre !)

A **Lisa**, **Nat**, **Laulau**, **Mia** et **Yas**, merci les filles ! Merci d'avoir cru en moi. Merci pour votre soutien inconditionnel. Merci, d'être vous. Sans votre présence quotidienne je ne sais pas dans quel état j'aurais terminé cette thèse ! Merci de m'avoir forcé à lever le nez du boulot quand j'en avais le plus besoin. **Yas**, ma binôme de TP d'amour, merci d'être entrée dans ma vie. Merci d'avoir rendu ces années études aussi joyeuses et pleine d'amour. Je pense que notre minibus finalement ... c'est celui de l'amour. **Laulau**, merci pour ta bienveillance et ton optimisme sans faille. Merci de toujours me faire rire (à tes dépends le plus souvent d'ailleurs). Merci d'avoir toujours pris le temps d'être là pour moi. Et enfin ma Laulau, merci ... merci parce qu'aujourd'hui c'est grâce à toi si nous sommes toutes aussi soudées depuis notre toute première soirée en passant par nos vacances à la ciocio. **Mimi**, merci d'être toujours là et de toujours répondre présente quand j'en ai besoin. Merci d'être toujours partante pour nos aventures festivières. Merci de toujours me faire relativiser sur la vie et me faire prendre du recul. **Nat**, **Lisa**, pas de carte C***** aujourd'hui ! **Nat**, merci infiniment pour nos mardi soirs, nos rigolades, nos traquenards ! Merci de m'avoir laissé vider mon sac aussi souvent que j'en avais besoin. Merci d'être celle que tu es. Tout le monde a besoin d'une Natacha Kozak dans sa vie (et d'un peu de magie évidemment). **Lisa**, merci d'être dans ma vie depuis le quasi-début de nos études. Sans ton soutien quotidien, sans nos vendredi après-midi plus drôles que studieux, sans ma partenaire de révision, sans notre relation de stage à distance, sans toi tout simplement, je ne sais pas si j'y serais arrivée.

Durant toutes ces années d'études, vous avez été mon plus grand soutien, mes plus gros fous rires mais aussi mes plus belles gueules de bois. Si c'était à refaire, je re-signe tout de suite juste pour avoir la chance de vous avoir dans ma vie.

Boubou, Alpha, on sous-estime bien trop l'amour, la joie et le réconfort que des boules de poils peuvent apporter dans une vie.

Adrien, si on m'avait dit ce qu'il m'attendait en signant ce contrat de thèse ... jamais je n'y aurais cru. Sans toi, ces trois dernières années auraient été sans saveur. Merci pour ton soutien, tes encouragements et ta bienveillance. Faire une thèse est une sacrée aventure, n'est-ce pas Dr Fayon ? Et bien saches mon Amour que la plus belle aventure de ma vie aura été de te rencontrer. Merci pour la joie, le bonheur et l'amour que tu mets dans ma vie. J'ai hâte de voir ce que la vie nous réserve et je me languis de traverser chaque étape à tes côtés. Je t'aime au-delà du Gloubi.

A toutes les personnes citées et à toutes celles que j'ai oubliées, merci d'avoir été là.

"IL N'Y A PAS DE MAGIE À ACCOMPLIR. IL NE S'AGIT VRAIMENT QUE DE TRAVAIL ACHARNÉ, DE CHOIX ET DE PERSÉVÉRANCE. " MICHELLE OBAMA

LISTE DES FIGURES

Introduction	
Figure 1 : Localisation des différents types de jonctions intercellulaires dans les cellules épithéliales	p2
Figure 2 : Photographie de la morphologie et de la structure des jonctions serrées	p2
Figure 3 : Organisation des jonctions serrées	p3
Figure 4 : Structure et localisation des TAMPs	p3
Figure 5 : Représentation de la structure des claudines	p4
Figure 6 : Représentation de la structure des JAMs	p5
Figure 7 : Représentation schématique des interactions entre les protéines transmembranaires et les protéines de la plaque cytoplasmique	p5
Figure 8 : Organisation des protéines du cytosquelette dans les cellules épithéliales et association aux protéines de la plaque cytoplasmique	p7
Figure 9 : Représentation schématique de la structure du réseau de signalisation de protéines associées aux jonctions serrées	p9
Figure 10 : Les jonctions serrées : rôle de régulation de la perméabilité paracellulaire	p12
Figure 11 : Les jonctions serrées : rôle de barrière de diffusion	p13
Figure 12 : Structure du gène de la claudine 1 chez l'Homme	p14
Figure 13 : L'épissage alternatif de la claudine 1	p14
Figure 14 : Structure protéique de la claudine 1	p15
Figure 15 : Structure protéique 3D de la claudine 1	p15
Figure 16 : La méthylation du gène de la claudine 1	p17
Figure 17 : Le recyclage de la claudine 1	p20
Figure 18 : Les différents types d'interactions de la claudine 1 avec les autres claudines	p21
Figure 19 : Interactome de la claudine 1	p24
Figure 20 : Répartition de l'incidence des principaux cancers chez les femmes en France au cours de l'année 2018	P29
Figure 21 : Incidence et mortalité du cancer du sein en France selon l'année et taux d'incidence et de mortalité selon la classe d'âge en 2018 (standardisés monde)	P29

Figure 22 : Répartition de la mortalité des principaux cancers chez les femmes en France au cours de l'année 2018	p30
Figure 23 : Anatomie et organisation cellulaire de la glande mammaire	p35
Figure 24 : Les différentes étapes du développement de la glande mammaire	p36
Figure 25 : Schéma hypothétique de la hiérarchie des lignages épithéliaux mammaires	p37
Figure 26 : Principales étapes de la carcinogénèse	p38
Figure 27 : Caractéristiques des cellules cancéreuses	P39
Figure 28 : Origine des cellules cancéreuses et de l'hétérogénéité intra-tumorale	p41
Figure 29 : L'angiogénèse tumorale	p42
Figure 30 : Mécanismes d'activation et d'inhibition des LT <i>via</i> les points de contrôles immunitaires	p43
Figure 31 : Processus métastatique dans le cancer du sein	p44
Figure 32 : Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et mésenchymato-épithéliale (TME) dans les cellules cancéreuses mammaires	p45
Figure 33 : Principaux sites métastatiques et taux de récurrence après diagnostic des tumeurs mammaires	p50
Figure 34 : Les sous-types tumoraux mammaires : sous-type, prévalence, lignage et signature moléculaire	p51
Figure 35 : Classification des différents sous-types de TNBC	p52
Figure 36 : Modes d'action des différentes classes d'agents de chimiothérapie et leurs cibles	p55
Figure 37 : Structure et mécanisme d'action du 5-fluorouracile	p56
Figure 38 : Mécanisme d'action de la doxorubicine	p57
Figure 39 : Mécanisme d'action du paclitaxel sur les microtubules	p58
Figure 40 : Liste des agents de chimiothérapie et des combinaisons utilisées pour le traitement des tumeurs mammaires	P59
Figure 41 : Schéma des thérapies ciblées des TNBC	p60
Figure 42 : Les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires	p61
Figure 43 : Courbe de Kaplan-Meier de la survie sans récurrence et de la survie globale et en fonction de l'expression de la claudine 1 dans les tumeurs	p66
Figure 44 : La réexpression de la claudine 1 dans les lignées de cellules MDA-MB-231 et Hs578T inhibent leur migration et induit l'agrégation cellulaire	p68

Figure 45 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose	P69
Figure 46 : La réexpression de la claudine 1 dans les lignées de cellules MDA-MB-231 et Hs578T induit l'apoptose	p70
Figure 47 : Les cellules surexprimant la claudine 1 sont plus sensibles à l'étoposide, au cisplatine et au tamoxifène	p70
Figure 48 : Effet de différents agents de chimiothérapie sur les cellules MDA-MB-231 (a), Hs578T (b) et BT20 (c)	p71
Matériels et méthodes	
Figure 49 : Expression de la claudine 1 dans les lignées cancéreuses mammaires	p75
Figure 50 : Observations en lumière blanche des cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 au microscope optique	p77
Figure 51 : Carte des vecteurs d'expression pcDNA3.1 et pcDNA3.1- <i>myc</i>	p77
Figure 52 : Inhibition de l'expression de la claudine 1 par ARN interférence	p78
Figure 53 : Les différentes constructions de la claudine 1	p83
Figure 54 : Surexpression de la claudine 1 dans la lignée MDA-MB-231	p86
Figure 55 : Principe du test de viabilité cellulaire par mesure de l'ATP	P87
Figure 56 : Mise en place de l'autophagie	P91
Résultats	
Figure 57 : Comparaison de la réponse des cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 exposées aux agents de chimiothérapie : 5-FU, PTX et DOX	p95
Figure 58 : Viabilité cellulaire des lignées MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 traitées à leur EC ₅₀ respectives pour le 5-FU, le PTX et la DOX	p96
Figure 59 : Caractérisation de la réponse pro-apoptotique des lignées MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 en réponse à des doses croissantes de 5-FU, de PTX et de DOX	p97
Figure 60 : Comparaison de la réponse des cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 exposées aux doses EC ₅₀ des différents agents de chimiothérapie	p98
Figure 61 : Caractérisation de la réponse apoptotique des cellules TNBC en réponse au 5-FU, au PTX et à la DOX	P99
Figure 62 : Étude de la réponse pro-apoptotique des cellules MDA-MB-231 traitées au 5-FU et au PTX	p101

Figure 63 : Étude de la réponse pro-apoptotique des cellules Hs578T traitées au 5-FU et au PTX	p101
Figure 64 : Étude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-high » HCC1806 au 5-FU	p104
Figure 65 : Étude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-high » HCC1806 au PTX	p105
Figure 66 : Étude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-high » HCC1806 à la DOX	p106
Figure 67 : Étude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 au 5-FU, au PTX et à la DOX	p107
Figure 68 : Étude de la sensibilité des cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement la claudine 1 au 5-FU (50 µM)	p108
Figure 69 : Étude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 au 5-FU (181 µM)	p109
Figure 70 : Étude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 « claudin-1-low » au PTX	p110
Figure 71 : Étude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 au PTX (5 nM)	p111
Figure 72 : Étude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 « claudin-1-low » à la DOX	p112
Figure 73 : Étude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 à la DOX	p113
Figure 74 : Transfection transitoire des mutants de la claudine 1	p114
Figure 75 : Rôle du motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1 dans la sensibilité au 5-FU dans la lignée MDA-MB-231	p115
Figure 76 : Étude de la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU	p117
Figure 77 : Étude de la sensibilité à l'autophagie des cellules Hs578T en réponse au 5-FU	p117
Figure 78 : Implication de l'expression de la claudine 1 de la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU	p117
Figure 79 : Effet du 5-FU sur le cycle cellulaire dans la lignée MDA-MB-231	p118
Figure 80 : Étude de la localisation de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231	p119

Figure 81 : Étude de la localisation de la claudine 1 dans les lignées stables Hs578T	p119
Figure 82 : Vérification de la localisation membranaire de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T	p120
Figure 83 : Étude de la localisation membranaire de la claudine 1 dans la lignée HCC1806 traitée aux agents de chimiothérapie	p121
Figure 84 : Étude de la localisation membranaire de la claudine 1 dans la lignée MDA-MB-231 traitée aux agents de chimiothérapie	p122
Figure 85 : Étude de la localisation cytoplasmique de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T	p123
Figure 86 : Méthodologie d'identification des partenaires protéiques de la claudine 1	p124
Figure 87 : Structure du DTME	p125
Figure 88 : Structure de la claudine 1 et localisation des cystéines	p125
Figure 89 : Protocole de mise au point du crosslink <i>in vivo</i>	p126
Figure 90 : Révélation des membranes immunomarquées par l'anticorps dirigé contre la claudine 1	p127
Figure 91 : Étude de la colocalisation de la claudine 1 et de FADD dans cellules MDA-MB-231	p128
Figure 92 : Analyse de l'expression de l'ARNm de la claudine 1 par qPCR en réponse au 5-FU, au PTX et à la DOX dans la lignée MDA-MB-231	p129
Figure 93 : Analyse de l'expression de l'ARNm de la claudine 1 par qPCR en réponse au 5-FU, au PTX et à la DOX dans la lignée Hs578T	p130
Figure 94 : Analyse de l'épissage alternatif de la claudine 1 en réponse aux agents de chimiothérapie dans la lignée MDA-MB-231	p131
Figure 95 : Analyse de l'activité du promoteur de 1000 pb de la claudine 1 en réponse au PTX et à la DOX	p132
Discussion	
Figure 96 : L'autophagie régule l'arrêt du cycle cellulaire dans le traitement du cancer	p144
Figure 97 : Liste des facteurs de transcription du promoteur de 1000 pb de la claudine 1	p147

LISTE DES TABLEAUX

Introduction	
Tableau 1 : Les interactions des protéines de la plaque cytoplasmique	p6
Tableau 2 : Liaison des protéines du cytosquelette avec les protéines de la plaque cytoplasmique	p7
Tableau 3 : Liste des principales protéines de signalisation cellulaire associées aux jonctions serrées	p8
Tableau 4 : Liste des facteurs de transcription répresseur de l'expression de la claudine 1	p16
Tableau 5 : Liste des facteurs de transcription activateurs de l'expression de la claudine 1	p16
Tableau 6 : Liste des autres facteurs qui régulent l'expression de la claudine 1	p17
Tableau 7 : Liste des microARN et des protéines se liant à l'ARN de la claudine 1 et régulation son expression	p18
Tableau 8 : Les modifications post-traductionnelles de la claudine 1	p18
Tableau 9 : Interactions de la claudine 1 avec les autres claudines	p21
Tableau 10 : Les partenaires de la claudine 1 et leur rôle	p22, p23
Tableau 11 : Liste des gènes fréquemment mutés dans le cancer du sein à prédisposition génétique	p31
Tableau 12 : Liste des gènes les plus fréquemment mutés à l'origine des tumeurs mammaires	p40
Tableau 13 : Liste des variants de gènes héréditaires des tumeurs mammaires	p40
Tableau 14 : Les grades du cancer du sein	p47
Tableau 15 : Histopronostique d'Elston-Ellis	p47
Tableau 16 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires utilisée en clinique	p48
Tableau 17 : Répartition des tumeurs « claudin-1-low » et « claudin-1-high » dans les différents sous-types moléculaires	p66
Tableau 18 : Rôle de suppresseur de tumeur de la claudine 1 dans les différentes lignées tumorales mammaires	p68

Matériels et méthodes	
Tableau 19 : Liste des agents de chimiothérapie utilisés pour le traitement des cellules	p77
Tableau 20 : Concentration des agents de chimiothérapie utilisées lors des expériences	p77
Tableau 21 : Liste des couples d'amorces utilisés pour les PCR quantitative et semi quantitatives	P79
Tableau 22 : Composition des gels de polyacrylamide à 5 et 12%	p81
Tableau 23 : Liste des différents anticorps utilisés en Western Blot	p82
Tableau 24 : Liste des couples d'amorces utilisés pour les PCR quantitative et semi quantitatives	p83
Tableau 25 : Liste des différents anticorps utilisés en immunofluorescence	p86
Résultats	
Tableau 26 : Bilan de la caractérisation de la réponse des cellules TNBC en réponse aux différents agents de chimiothérapie	p102

LISTE DES ABREVIATION

A

5-Aza : 5-Azacytidine
ACR : American College of Radiology
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFF2 : AF4/FMR2 Family Member 2
AJCC : American Joint Committee on Cancer
AKT : serine-threonine protein kinase
ALDH1 : aldehyde dehydrogenase isoform 1
ALF4 : Aberrant Lateral root Formation 4
AMM : autorisation de mise sur le marché
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARE : AU-rich element
ARF6 : ADP-ribosylation factor 6
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATCC : American Type Culture Collection
ATG : Adenine Thymine Guanine
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B

bHLH : basic Helix-Loop-Helix
BL : basal-like
BRCA 1 et 2 : BReast CAncer 1 and 2
BRD4 : Bromodomain-containing protein 4
BRIP1 : BRCA1 Interacting Protein 1
BRM : Protein brahma homolog
BSA : Bovine Serum Albumine

C

C : cysteine
C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein
CAR : coxsackie and adenovirus receptor
CBFB : Core-Binding Factor Beta
CCND3 : Cyclin D3
CD : Cluster of Differentiation
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog
CDH1 : CaDHerin-1
CDKN1 : Cyclin-Dependent Kinase 1
Cdx : Caudal Homeobox
CHEK2 : CHEKpoint Kinase 2
CLDN1 : CLauDiNe 1
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II
ConA : Concanavaline A CF488® Dye Conjugates
CPA : Cellules présentatrice d'antigènes
CpG : Cytosine phosphate Guanine
CSC : Cellules Souches Cancéreuses
CSMa : Cellules Souches Mammaires
CTC : Cellules Tumorales Circulantes
CTCFL : CCCTC-Binding Factor Like
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Ctrl : contrôle
CYP : Cytochrome

D

DEC1 : Differentiated Embryo-Chondrocytes expressed gene 1

DES : DiEthylstilbestrol
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DNMT : DNA MethylTransférase
dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate
DOX : Doxorubicine
DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DRG1 : developmentally regulated GTP binding protein 1
DSS : Disuccinimidyl suberate
DTME : dithiobismaleimidoethan
DTT : Dithiothréitol
dTTP : désoxyThymidine TriPhosphate
dUTP : Deoxyuridine triphosphate

E

EC₅₀ : Concentration efficace 50 %
EDTA : EthyleneDiamine TetrAcid
EEA1 : Early Endosome Antigen 1
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Récepteur au facteur de croissance épidermique
EL : Boucle extracellulaire
EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER : Récepteur des œstrogènes
ESAM : Endothelial cell adhesion molecule
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Ets1 : Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1

F

5-FU : 5-FluoroUracile

FADD : Fas-associated protein with death domain
FasR : First apoptosis signal Receptor
FDA : Food and Drug Administration
FdUMP : FluorodeoxyUridine MonoPhosphate
FdUTP : fluorodeoxyuridine triphosphate
FGF : facteurs de croissance des fibroblastes
sFLIP : FLICE-like inhibitory protein s
FNDC9 : Fibronectin type III domain containing 9
FOXA1 : FORkhead boX A1
FUMP : Fluorouridine monophosphate

G

G : glycine
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA : GATA binding protein
GDP : Guanosine DiPhosphate
GEF-H1 : Guanine nucleotide exchange factor-H1
G α -i0 : Gi protein alpha subunit
Grhl2 : Grainyhead Like Transcription Factor 2
GTP : Guanosine TriPhosphate
GUK : GUanylate Kinase

H

HAS : Haute Autorité de Santé
HER2 : Récepteur au facteur de croissance épidermiques humains 2
HES1 : Hairy and Enhancer of Split-1
HFN-4 α : hepatocyte nuclear factor-4□

HIF : Hypoxia Inducible Factor
HMEC : cellules épithéliales humaines
mammaires
HPRD : Human Protein Reference Database
HRAS : Harvey Rat sarcoma virus
HRP : HorseRadish Peroxidase
huASH1 : protein product of human ASH1
HuR : human antigen R

I

I2D : interologous interaction database
IFN : Interferon
Ig : ImmunoGlobuline
IGBMC : Institut de génétique et de biologie
moléculaire et cellulaire
IGF1 : Insulin-Growth Factor-1
IHC : immunohistochimie
IL : Boucle intracellulaire
IL- : Interleukine-
IM : Immunomodulatory
INCA : Institut national du cancer
IP : iodure de propidium
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

J

JAM : Junctional Adhesion Molecule
JNK : c-Jun N-terminal kinase

K

Klf4 : Kruppel-like factor 4
KO : Knock-out
KRAS : Kirsten rat sarcoma virus
KRT: cytoKératine

L

L : Leucine
LAMP : Lysosomal-associated membrane
protein
LAMTOR1 : late endosomal/lysosomal
adaptor, MAPK and MTOR activator 1
LAR : Luminal Androgen Receptor
LB : Lysogeny Broth
LC3 I : Microtubule-associated protein
1A/1B-light chain 3
LKB1 : Liver Kinase B1
LNx1p80 : Ligand-of-Numb protein X
LT : Lymphocytes T

M

M : Mesenchymal
MAGI : membrane-associated guanylate
kinase inverted
MAP3K: Mitogen-Activated Protein Kinase
Kinase Kinase 1 et 13
MAPK : Mitogen-Activated protein kinases
MARVEL : Myelin And lymphocyte and
Related protein for VEicle trafficking and
membrane Link
MDCK : Madin-Darby Canine Kidney
MEC : Matrice ExtraCellulaire
Meis1 : Myeloid Ecotropic Viral Integration
Site 1 Homolog
MINT : Molecular INTeraction database
miR : microARN
MLL3 : Mixed-Lineage Leukemia protein 3
MMP : MétaloProtéinase Matricielles
MPDZ : Multiple PDZ domain protein
MS4A3 : membrane-spanning 4-domains
subfamily A member 3
MSL : Mesenchymal Stem-Like

MUC1 : Mucin-1

N

NBN : NiBriN

NF1 : NeuroFi bromatose 1

NFκBp65 : Nuclear Factor-kappa B sous-unité p65

NR3C1 : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member

O

Oct4 : Octamer-binding transcription factor 4

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Opti-MEM : Optimal Mimimal Essential Medium

P

PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2

Pals1 : Protein Associated with Lin-1

PAR : PARTitioning Defective protein

PARP : Poly(ADP-ribose) Polymérase

PATJ : Pals1 Associated Tight Junction

Pb : paire de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PBT : PBS triton

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PD-L1 : Programmed death-ligand 1

PDZ : PSD-95, Dlg, ZO-1

PECAM : platelet and endothelial cell adhesion molecule

PERP : p53 apoptosis effector related to PMP22

PIRK : Phosphoinositide 3-kinase

PIK3CA : sous unité alpha de la phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate kinase

PIK3R :

PK : Protein kinase

PP2A : protéine Ser/Thr phosphatase 2A

PR : Progesteron Receptor

PTEN : Phosphatase and TENsin

PTPN22 : Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22

PTPRD : Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta

PTX : Paclitaxel

R

R : arginine

Rab : Ras-related protein

RAD51C : DNA repair protein RAD51 paralog C

RB1 : RetinoBlastoma protein 1

Rho : Ras homolog family member

RNA : RiboNucleic Acid

RON : Récepteur d'Origine Nantais

ROS : Reactive Oxygen Species

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

RPTP β : RecePtor Tyrosine Phosphatase β

RUNX : Runt-Related Transcription Factor

S

SAF-B : Scaffold attachment factor B

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEM : erreur standard à la moyenne

SF3B1 : Splicing Factor 3b subunit 1

SH3 : Src homologie 3

Sox : SRY-box

SP-1 : Specificity Protein 1

Src : sarcome

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

SVF : Foetal bovin serum

T

TAMPs : Tight junction-Associated Marvel domain-containing Proteins

TBX3 : T-Box Transcription Factor 3

TCF : T-cell Factor

TCR : récepteur des cellules LT

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TFAP2 α : Transcription factor AP-2-alpha

TGF- β : Transforming growth factor beta

TGZ : troglitazone

TIL : lymphocytes T infiltrants la tumeur

TME : Transition Mésenchymato-Épithéliale

TMEM : Transmembrane protein

TNBC : Triple Negative Breast Cancer

TNF α : Tumor Necrosis Factors

TNM : Tumor Nodes, Metastasis

TNT : Tris NaCL Tween

TP53 : Tumor Protein 53

Trop2 : TROPhoblast cell surface antigen 2

TS : Thymidilate synthase

TSS : site d'initiation de la transcription

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

TZD : thiazolidinediones

U

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

UTR : UnTranslated Region

V

V : valine

VDLD : Virus de la dengue

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VHC : Virus de l'hépatite C

W

W : tryptophane

WNK4 : protein kinase with no lysine 4

Y

T : tyrosine

Z

ZAK : ZO-1 associated kinase

Zeb : Zinc-finger E-box-Binding

ZOs : Zonula Occludens

ZONAB : ZO-1-associated nucleic acid binding protein

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : LA CLAUDINE 1 DANS LES JONCTIONS SERREES	2
I. LES JONCTIONS SERREES.....	2
1) La structure des jonctions serrées.....	2
2) Composition protéique des jonctions serrées	3
a) Les protéines transmembranaires	3
i) Les TAMPs	3
ii) Les claudines.....	4
iii) Les JAMs.....	5
b) Les protéines de la plaque cytoplasmique	5
c) Les protéines du cytosquelette.....	7
d) Les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire.....	8
i) Les protéines impliquées dans l'assemblage des jonctions serrées	8
ii) Les protéines impliquées dans la polarisation et l'adhérence des cellules	8
iii) Les protéines impliquées dans la prolifération cellulaire.....	8
iv) Les protéines impliquées dans la survie cellulaire.....	9
v) Les protéines dont le rôle aux jonctions n'est pas déterminé	9
3) Formation et fonctions des jonctions serrées	10
a) La formation des jonctions serrées	10
b) Adhérence intercellulaire.....	11
c) Perméabilité paracellulaire	12
d) Barrière de diffusion.....	13
II. LA CLAUDINE 1.....	14
1) Le gène de la claudine 1	14
2) La protéine	15
3) Régulation de l'expression de la claudine 1	15
a) Les facteurs de transcriptions	16
b) Les facteurs de croissance.....	16
c) Les cytokines.....	16
d) La régulation épigénétique de l'expression du gène de la claudine 1	17
e) La régulation post-transcriptionnelle	17
4) Localisation, recyclage et dégradation de la claudine 1	18
a) Les modifications post-traductionnelles	18
b) Le recyclage et la dégradation de la claudine 1	19
c) La dégradation de la claudine 1	20
5) L'interactome de la claudine 1 et les différents rôles de ses partenaires	21
a) Interaction de la claudine 1 avec les protéines des jonctions serrées	21
b) Les autres partenaires de la claudine 1	22
i) Partenaires impliqués dans l'architecture des jonctions serrées	22

ii)	Partenaires impliqués dans le transport vésiculaire	23
iii)	Partenaires impliqués dans l'adhérence cellulaire	24
iv)	Partenaires impliqués dans la migration cellulaire.....	24
v)	Partenaire impliqué dans la prolifération cellulaire	24
vi)	Partenaires impliqués dans l'apoptose.....	25
vii)	Partenaires impliqués dans la progression tumorale.....	25
viii)	Partenaires impliqués dans la signalisation immunitaire.....	26
ix)	Interactions entre la claudine 1 et les virus.....	26
6)	Rôle physiologique et pathologique de la claudine 1	27

CHAPITRE 2 : LE CANCER DU SEIN 29

I.	EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN	29
1)	Les chiffres du cancer du sein	29
a)	L'incidence	29
b)	La mortalité.....	30
2)	Facteurs de risques.....	30
a)	Principaux facteurs de risque	30
b)	Autres facteurs de risque	31
II.	DEPISTAGE, DIAGNOSTIC ET SUIVI	33
1)	Dépistage du cancer du sein	33
2)	Diagnostic du cancer du sein	33
3)	Suivi des patients atteints de cancer du sein	34
III.	STRUCTURE DE LA GLANDE MAMMAIRE	35
1)	Anatomie de la glande mammaire	35
2)	Développement de la glande mammaire.....	36
3)	Composition et organisation cellulaire	36
a)	Le compartiment épithélial	36
b)	Le compartiment conjonctif.....	37
IV.	CARCINOGENESE MAMMAIRE.....	38
1)	Origines moléculaires de la carcinogénèse.....	38
2)	Origine cellulaire des tumeurs mammaires	40
3)	Le microenvironnement tumoral	41
a)	Le stroma mammaire	41
b)	L'angiogénèse tumorale.....	42
c)	Le système immunitaire et l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire	42
4)	Processus métastatique	44
a)	L'invasion	44
b)	L'intravasation	45
c)	L'extravasation	45
d)	La colonisation.....	45
V.	CLASSIFICATION DES TUMEURS MAMMAIRES.....	46

1)	Classification histologique	46
2)	Les stades du cancer	46
3)	Le grade des tumeurs mammaires	47
4)	Classification moléculaire utilisée en clinique	48
a)	Le sous-type luminal A	48
b)	Le sous-type luminal B	48
c)	Le sous-type HER2	49
d)	Le sous-type triple-négatif	49
VI.	LES CARACTERISTIQUES DES TNBC	50
1)	Les tumeurs claudin-low et basal-like	51
2)	Sous classification des TNBC par Lehmann	51

CHAPITRE 3 : LE TRAITEMENT DES TNBC UN DEFIS MAJEUR EN CANCEROLOGIE

.....	54	
I.	LE TRAITEMENT DES TNBC	54
1)	La chirurgie	54
2)	La radiothérapie	54
3)	La chimiothérapie	55
a)	Les antimétabolites	55
b)	Les inhibiteurs de la topoisomérase II	56
c)	Les agents alkylants	57
d)	Les poisons du fuseau mitotique	58
e)	Les combinaisons d'agents de chimiothérapie	59
4)	Les thérapies ciblées	59
a)	Les thérapies actuellement disponibles	59
i)	Les anti-VEGF :	59
ii)	Les inhibiteurs de PARP	60
iii)	Anticorps drogue-conjugué anti-TROP2	60
iv)	L'immuno-oncologie	61
b)	Les thérapies en essais cliniques	61
i)	L'immuno-oncologie	61
ii)	Anti-androgène	62
iii)	Inhibiteurs de PI3K/AKT	62
II.	LES LIMITES ET RESISTANCES AUX TRAITEMENTS	63
1)	Résistance des cellules cancéreuses aux traitements	63
a)	Le développement de mécanismes de résistance	63
b)	L'hétérogénéité intra-tumorale	64
2)	Le manque de cibles thérapeutiques	65
III.	LES TNBC « CLAUDIN-1-LOW »	66
IV.	LA CLAUDINE 1, UN SUPPRESSEUR DE TUMEUR DANS LE CANCER DU SEIN ?	67

1)	Le rôle de la claudine 1 dans le cancer.....	67
2)	Le rôle de suppresseur de tumeur de la claudine 1 dans le cancer du sein.....	68
a)	Rôle de la claudine 1 dans l'inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire.....	68
b)	Rôle de la claudine 1 dans l'apoptose.....	69
c)	Rôle de la claudine 1 dans la sensibilité aux agents anticancéreux.....	70
V.	RESULTATS PRELIMINAIRES	71
HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL.....		73
MATERIELS ET METHODES.....		75
I.	CULTURE CELLULAIRE	75
1)	Lignées cellulaires	75
2)	Entretien des cellules.....	76
3)	Traitements des cellules	77
4)	Transfections transitoires.....	77
a)	Transfection de vecteurs d'expression.....	77
b)	Transfection d'ARN interférents.....	77
II.	ANALYSE DES TRANSCRITS.....	78
1)	Extraction des ARN	78
2)	RT-PCR semi-quantitative	79
a)	Rétrotranscription (RT).....	79
b)	PCR semi-quantitative.....	79
3)	RT-PCR quantitative	80
a)	Transcription inverse.....	80
b)	qPCR.....	80
III.	ANALYSE PROTEIQUE	81
1)	Extraction protéique	81
2)	Dosage protéique.....	81
3)	Western blot.....	81
IV.	CLONAGE.....	82
1)	Amplification de l'insert.....	83
2)	Élution insert.....	83
3)	Double digestion	84
4)	Purification	84
5)	Ligation	84
6)	Transformation	85
7)	Vérifications du clonage	85
a)	PCR sur colonies	85
b)	Miniprep	85
V.	IMMUNOCYTOFLUORESCENCE	86

VI.	TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE	87
1)	Test ATP	87
2)	Coloration au crystal violet	88
VII.	CYTOMETRIE EN FLUX	88
1)	Étude de l'apoptose par marquage des cellules à l'Annexine V/IP	89
2)	Analyse du cycle cellulaire par marquage iodure de propidium	89
VIII.	TUNEL ASSAY	90
IX.	AUTOPHAGIE	91
X.	PROTOCOLE POUR LA RECHERCHE DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1	92
1)	Crosslink <i>in vivo</i>	92
2)	Lyse des cellules	92
3)	Préparation des échantillons protéiques	92
4)	Western blot.....	93
XI.	STATISTIQUES	93
	RESULTATS	94
	CHAPITRE 1 : L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1 PERMET-ELLE DE SENSIBILISER LES CELLULES TNBC À LA CHIMIOThERAPIE ?	95
I.	CARACTERISATION DE LA REPOSE APOPTOTIQUE DES CELLULES TNBC AUX AGENTS DE CHIMIOThERAPIE95	
1)	Comparaison de la viabilité des cellules TNBC exposées aux agents de chimiothérapie : 5-FU, PTX et DOX	95
2)	Caractérisation de la réponse apoptotique des cellules TNBC sous l'effet des agents de chimiothérapie	97
a)	Étude de l'apoptose par western blot.....	97
b)	Étude de l'apoptose par marquage des cellules à l'annexine V – IP et cytométrie en flux	99
c)	Étude de l'apoptose par la technique de TUNEL	101
II.	IMPLICATION DE LA CLAUDINE 1 DANS L'INDUCTION DE L'APOPTOSE EN REPOSE AUX DIFFERENTS AGENTS DE CHIMIOThERAPIE DANS LES LIGNEES TNBC	103
1)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité de la lignée HCC1806 « claudin-1-high »	104
a)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au 5-FU	104
b)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au PTX	105
c)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité à la DOX.....	106
2)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité des lignées « claudin-1-low »	107
a)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au 5-FU	108
b)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au PTX	110
c)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité à la DOX.....	112
III.	IMPORTANCE DU MOTIF DE LIAISON AU DOMAINE PDZ DE LA CLAUDINE 1 DANS LA SENSIBILITÉ DES CELLULES MDA-MB-231 AU 5-FU	114
IV.	CARACTERISATION DE LA REPOSE AUTOPHAGIQUE DES CELLULES TNBC « CLAUDIN-1-LOW ».....	116

1)	Étude de la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU.....	117
2)	Étude de la sensibilité à l'autophagie des cellules Hs578T en réponse au 5-FU.....	117
3)	Implication de la claudine 1 dans la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU.....	117
V.	EFFETS DU 5-FU SUR LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES TNBC « CLAUDIN-1-LOW » MDA-MB-231	118
VI.	LOCALISATION DE LA CLAUDINE 1 DANS LES CELLULES	119
1)	Caractérisation de la localisation de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T stables	119
2)	Étude de la localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules TNBC	120
a)	Localisation membranaire de la claudine 1 dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T exprimant stablement la claudine 1	120
b)	Localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules TNBC traitées aux agents de chimiothérapie.....	120
i)	Localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules HCC1806 traitées aux agents de chimiothérapie.....	121
ii)	Localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 traitées aux agents de chimiothérapie.....	122
3)	Localisation cytoplasmique de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T	123

CHAPITRE 2 : LES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1 IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE DES CELLULES TNBC A LA CHIMIOETHERAPIE. 124

I.	MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1 ..	124
II.	COLOCALISATION DE LA CLAUDINE 1 AVEC FADD	128

CHAPITRE 3 : QUELS SONT LES FACTEURS CLES QUI STIMULENT L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1 ?..... 129

I.	ÉTUDE DU TRANSCRITS DE LA CLAUDINE 1 SOUS L'EFFET DES AGENTS DE CHIMIOETHERAPIE	129
1)	Lignée MDA-MB-231	129
2)	Lignée Hs578T.....	130
3)	Épissage alternatif	131
II.	ÉTUDE DE L'ACTIVITE DU PROMOTEUR DE 1000 PB DE LA CLAUDINE 1	132
III.	ANALYSE BIOINFORMATIQUE DES SITES POTENTIELS SUR LE PROMOTEUR DE 1000 PB DE LA CLAUDINE 1	132

DISCUSSION

I.	L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1 PERMET DE SENSIBILISER LES CELLULES TNBC A LA CHIMIOETHERAPIE .	136
II.	LES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1 IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE DES CELLULES TNBC A LA CHIMIOETHERAPIE.	139

III. INDUCTION D'AUTRES MECANISMES CELLULAIRES EN REPONSE AU 5-FU DANS LES LIGNEES MDA-MB-231 ET Hs578T « CLAUDIN-1-LOW »	142
IV. LOCALISATION DE LA CLAUDINE 1	145
V. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1	145
VI. CONCLUSION.....	149
RESULTATS ANNEXES ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	150
I. RESULTATS ANNEXES	150
1) Introduction.....	150
2) Principaux résultats	150
3) Conclusions	151
II. ARTICLE SCIENTIFIQUE BASE SUR MES RESULTATS	152
BIBLIOGRAPHIE.....	153

INTRODUCTION

*Cet avant-propos a pour but de faciliter la lecture de ce manuscrit. Le contexte scientifique sera abordé en trois parties. Dans le **premier chapitre**, nous replacerons la claudine 1 dans son contexte physiologique : les jonctions serrées. L'enjeu majeur du cancer du sein triple-négatif sera abordé dans le **chapitre 2**. Finalement, le **chapitre 3** introduira le rôle de suppresseur de tumeur de la claudine 1 dans les tumeurs mammaires triple-négatives.*

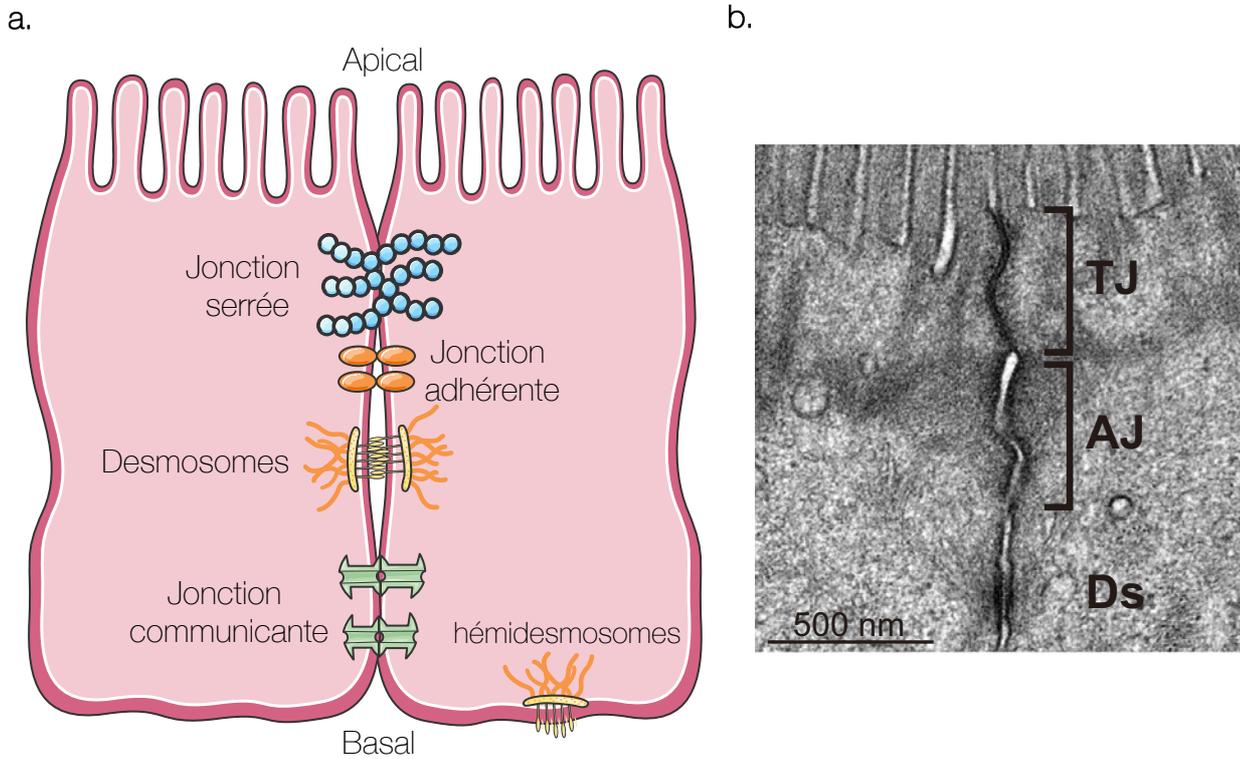


Figure 1 : Localisation des différents types de jonctions intercellulaires dans les cellules épithéliales
 a. Les jonctions serrées (en bleu) sont localisées au pôle apico-latéral des cellules épithéliales. Les jonctions adhérentes et les desmosomes (en orange et jaune) sont situées en dessous des jonctions serrées. Les jonctions communicantes (en vert) et les hémidesmosomes (en jaune) sont situées au niveau du pôle basal des cellules épithéliales. b. Morphologie des jonctions serrées observées par microscopie électronique sur des coupes ultrafines de tissu épithélial. Les jonctions serrées (TJ) se trouvent dans la région la plus apicale du complexe jonctionnel où les deux membranes plasmiques voisines sont les plus étroitement apposées. Les jonctions adhérentes (AJ) se trouve juste en dessous des jonctions serrées suivi des desmosomes (Ds). *D'après Otani and Furuse, 2020*

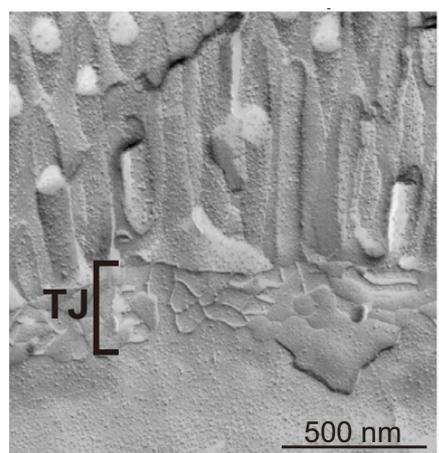


Figure 2 : Photographie de la morphologie et de la structure des jonctions serrées
 En microscopie électronique à transmission après cryofracture la structure des jonctions serrées apparait sous la forme d'un réseau protéique de brins intercellulaires. *D'après Otani and Furuse, 2020*

CHAPITRE 1 : LA CLAUDINE 1 DANS LES JONCTIONS SERREES

I. LES JONCTIONS SERREES

1) La structure des jonctions serrées

Dans les tissus animaux, les cellules voisines sont accolées les unes aux autres par l'intermédiaire des jonctions intercellulaires qui assurent la cohérence de l'ensemble du tissu. Il existe différentes sortes de jonctions intercellulaires (**Figure 1**) :

Les **jonctions communicantes** forment des pores grâce aux connexines qui permettent l'échange en ions et en molécules entre des cellules voisines. Ces jonctions sont localisées au pôle basal des cellules.

Les **jonctions adhérentes**, les **desmosomes** et les **hémidesmosomes** sont des jonctions d'ancrage qui assurent l'adhérence intercellulaire et le maintien de la forme des cellules. Elles sont entre autres composées des cadhérines, des caténines, et des desmoplakines. Les jonctions adhérentes sont localisées au pôle apical des cellules en dessous des jonctions serrées.

Les **jonctions serrées** sont situées dans la région la plus apicale des cellules. Elles ont été décrites en 1963 par Farquhar et Palade (Farquhar & Palade, 1963). Elles régulent le flux paracellulaire en ions et macromolécules et forment une barrière de diffusion entre le pôle apical et le pôle basal de la cellule pour les molécules membranaires.

Sur des coupes ultrafines de tissus épithélial observées par microscopie électronique, les jonctions serrées apparaissent dans la région où les membranes plasmiques des cellules adjacentes sont le plus étroitement apposées (**Figure 1b**). **La structuration des jonctions serrées semble être la conséquence de l'interaction entre les lipides et les protéines membranaires.** Les lipides membranaires, tels que le cholestérol et les céramides, jouent un rôle important dans la biogenèse des jonctions serrées notamment *via* la fusion des membranes plasmiques des cellules adjacentes. L'implication des **protéines membranaires** dans la structure des jonctions serrées est mise en évidence par microscopie électronique *via* l'observation de leur organisation en un réseau de **brins intercellulaires** (**Figure 2**) (Otani & Furuse, 2020). De plus, de nombreuses protéines membranaires des jonctions serrées sont palmitoylées suggérant que l'interaction entre

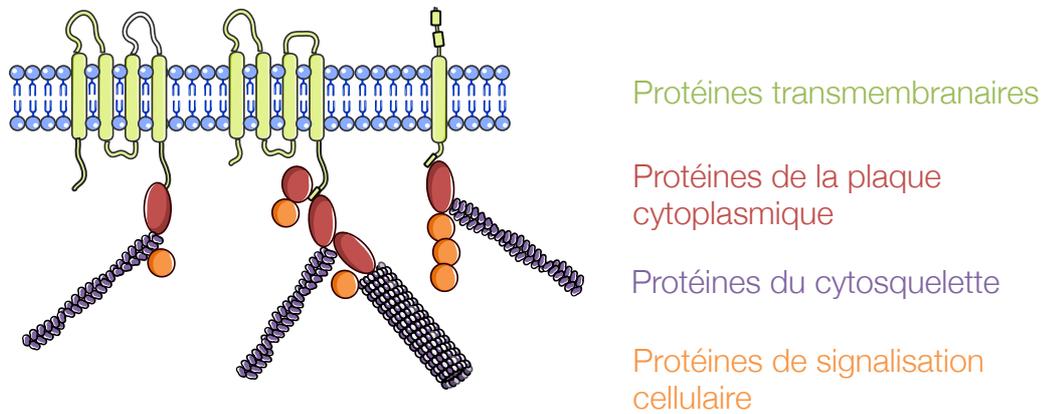


Figure 3 : Organisation des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires (en vert) qui interagissent avec les protéines de la plaque cytoplasmique (en rouge) qui sont reliées aux protéines du cytosquelette (en violet). Au sein de ce réseau moléculaire complexe, on peut également retrouver des protéines de signalisation cellulaire (en orange) (Van Itallie and Anderson, 2014).

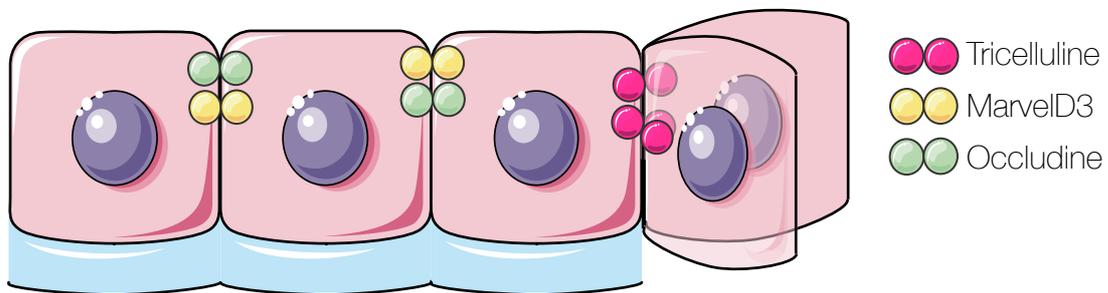
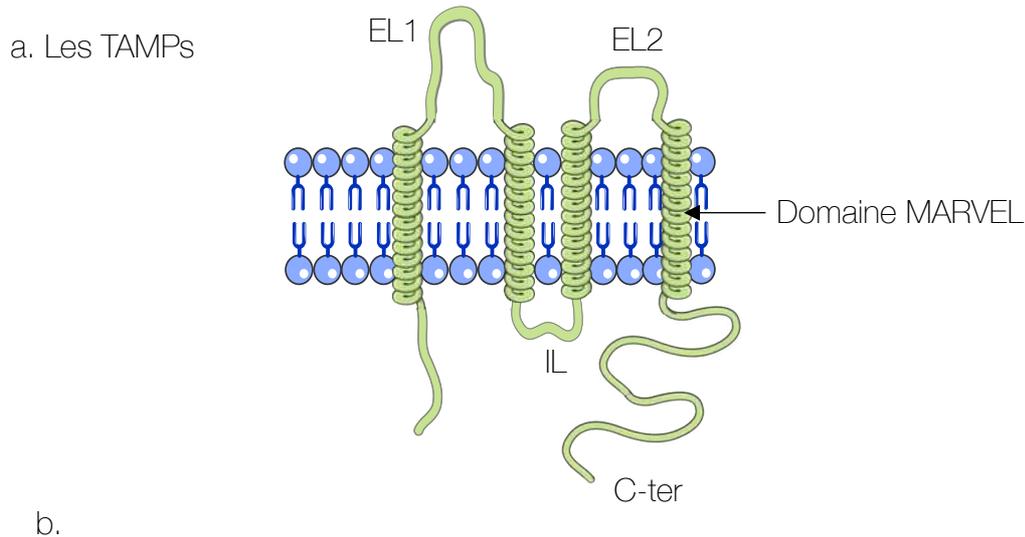


Figure 4 : Structure et localisation des TAMPs

a. Les TAMPs sont composées de deux boucles extracellulaires EL1 et EL2, de quatre domaines transmembranaires (domaine MARVEL), d'une boucle intracellulaire (IL), d'une queue N-terminale (N-ter) et d'une queue C-terminale intracytoplasmique (C-ter). b. Dans les épithéliums, l'occludine et MarvelD3 sont principalement localisés au niveau des jonctions serrées bicellulaires alors que la tricelluline est principalement recrutée au niveau des jonctions tricellulaires. *Adapté de Raleigh et al., 2010*

lipides et protéines membranaires structurerait les jonctions serrées (Otani & Furuse, 2020).

2) Composition protéique des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont composées d'un très grand nombre de protéines. Les **protéines transmembranaires** interagissent avec les **protéines de la plaque cytoplasmique**. Ces dernières sont reliées aux **protéines du cytosquelette** et au sein de ce réseau moléculaire complexe, on peut également retrouver des **protéines de signalisation cellulaire** (Figure 3) (Van Itallie & Anderson, 2014).

a) Les protéines transmembranaires

i) Les TAMPs

Les **TAMPs** (Tight junction-Associated Marvel domain-containing Proteins) sont une des principales familles de protéines qui constituent les jonctions serrées. Les TAMPs comportent l'**occludine**, la **tricelluline** et **MarvelD3**. Ce sont des protéines qui comportent quatre domaines ou hélices transmembranaires appelés domaine **MARVEL** (Myelin And lymphocyte and Related protein for VEsicle trafficking and membrane Link). Elles sont également constituées de deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2) et d'une boucle intracellulaire (IL). Les domaines N et C-terminaux sont intracytoplasmiques (Figure 4a).

L'**occludine** est la plus connue des TAMPs. Elle a été la première protéine transmembranaire identifiée comme faisant partie des jonctions serrées en 1993. L'occludine est composée des boucles extracellulaires EL1 et EL2 de 52 et 44 acides aminés respectivement, d'une queue N-terminale cytoplasmique de 61 acides aminés et d'une queue C-terminale de 259 acides aminés. EL2 permet l'interaction des occludines entre-elles et avec les autres protéines transmembranaires des jonctions serrées (Nusrat et al., 2005). Son domaine C-terminal se lie spécifiquement aux protéines de la plaque cytoplasmique *via* le domaine GUK (GUanylate Kinase) (Figure 4a).

La **tricelluline** est majoritairement localisée au niveau des jonctions tricellulaires tandis que **MarvelD3** est exprimé au niveau des jonctions bicellulaires avec l'occludine (Figure 4b) (Raleigh et al., 2010; Van Itallie & Anderson, 2014).

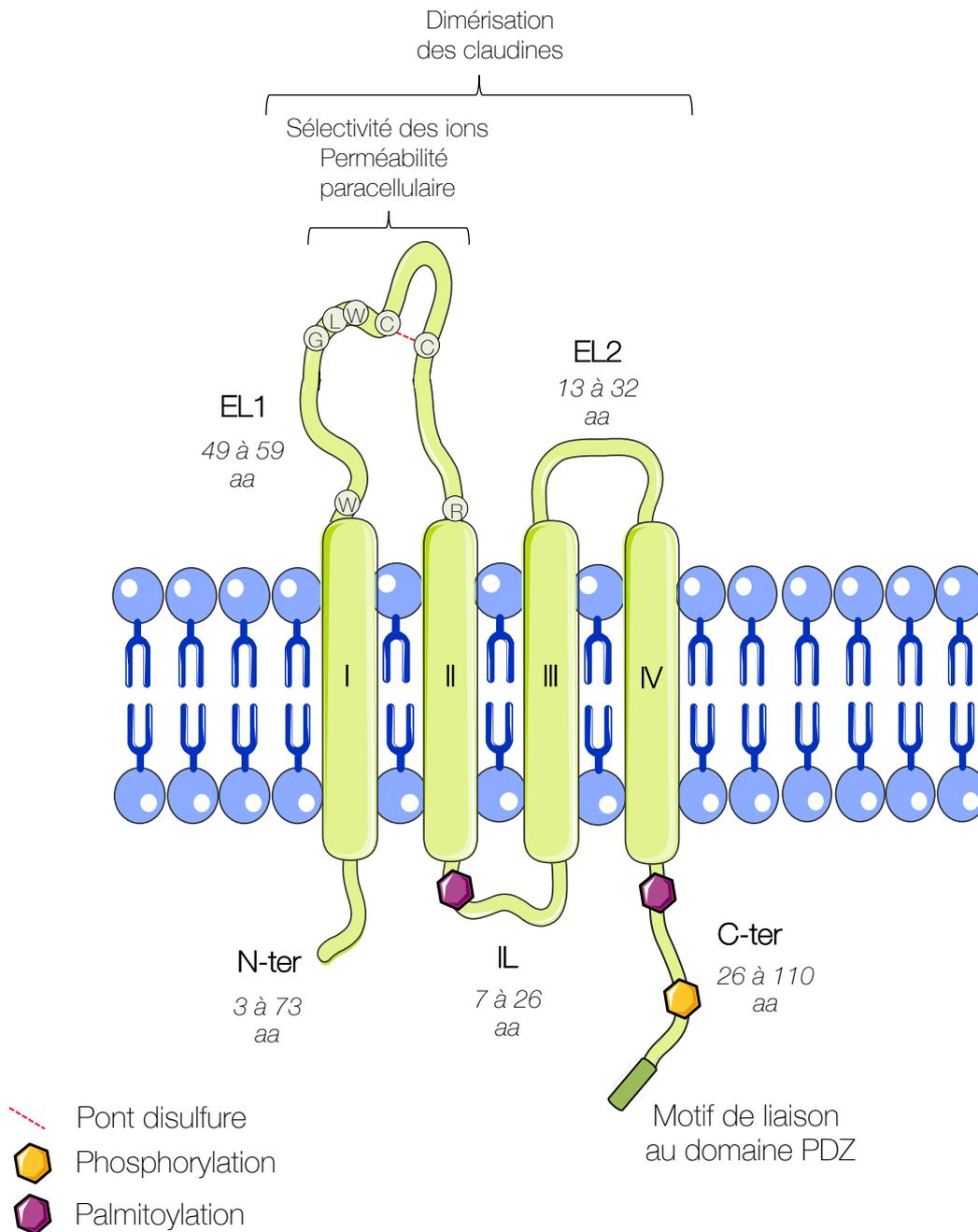


Figure 5 : Représentation de la structure des claudines

Les claudines sont des protéines transmembranaires présentes dans toutes les cellules épithéliales. Les claudines sont constituées de quatre domaines transmembranaires (I, II, III et IV). EL1 et EL2 représentent les boucles extracellulaires des claudines. La boucle EL1 (49 à 59 acides aminés) possède un motif conservé W-GLW-C-C-R. Les deux cystéines de ce motif forment un pont disulfure qui donne une boucle d'acides aminés aromatiques chargés suivit d'un site de fixation aux ions. La boucle EL2 est composée de 13 à 32 acides aminés et est impliquée dans la dimérisation des claudines. Au niveau cytoplasmique, les claudines possèdent une courte boucle IL avec un site de palmitoylation et une queue C-terminale comprenant 26 à 110 acides aminés comportant le motif de liaison au domaine PDZ ainsi que des sites de phosphorylation et de palmitoylation. *Adapté de Lal-Nag and Morin., 2009*

ii) Les claudines

La famille des **claudines** a été découverte pour la première fois en 1998 (Furuse, Fujita, et al., 1998). Elle est composée de 27 membres dont 21 sont retrouvés chez l'Homme et leur poids moléculaire varie de 20 à 34 kDa (Bhat et al., 2020; Van Itallie & Anderson, 2014). Dans les épithéliums et les endothélium l'expression des claudines est variable et tissu-spécifique (González-Mariscal et al., 2008).

Les claudines sont des protéines composées d'une queue N-terminale de 3 à 73 acides aminés, d'une queue C-terminale de 26 à 110 acides aminés, d'une boucle intracellulaire (IL) de 7 à 26 acides aminés, de quatre domaines transmembranaires (I-IV) de 19 à 24 acides aminés et de deux boucles extracellulaires, EL1 et EL2 de 49 à 59 et de 13 à 32 acides aminés respectivement (**Figure 5**) (Uniprot, 2021).

- Les **quatre domaines transmembranaires (I-IV)** sont fortement conservés et permettent aux claudines de s'intégrer dans la membrane plasmique des cellules.
- **IL** porte un site de palmitoylation.
- La **boucle EL1** est la plus longue des deux boucles extracellulaires et contient un motif conservé W₋₁₈-GLW₋₂-C₋₉-C_{-x}-R (Tryptophane-₁₈ acides aminés -Glycine-Leucine-Tryptophane-₂ acides aminés -Cystéine-₉ acides aminés -Cystéine- nombre variable d'acides aminés -Arginine) (Günzel and Yu, 2013a, Uniprot, 2021). Les deux cystéines de ce motif forment un pont disulfure qui génère une boucle portant des acides aminés aromatiques chargés (Colegio et al., 2003; J. Li et al., 2013; Wen et al., 2004) suivi d'un site de fixation aux ions (Günzel & Yu, 2013a).
- **EL2** et **EL1** sont impliquées dans l'interaction des claudines « head-by-head » de type homophile et hétérophile (Furuse et al., 1999).
- La **queue C-terminale** des claudines est la partie la plus variable des claudines. Elle est nécessaire pour la localisation des claudines à la membrane et porte un site de palmitoylation et un site de phosphorylation. Toutes les claudines exceptées les claudines 11, 12, 16, 19, 22 et 23 possèdent un **motif de liaison au domaine PDZ** (PSD-95, Dlg, ZO-1) (YV, tyrosine-valine) au niveau de l'extrémité C-terminale. Ce motif de liaison au domaine PDZ permet le recrutement des protéines de la plaque cytoplasmique (Balda & Matter, 2000; Günzel & Yu, 2013a).

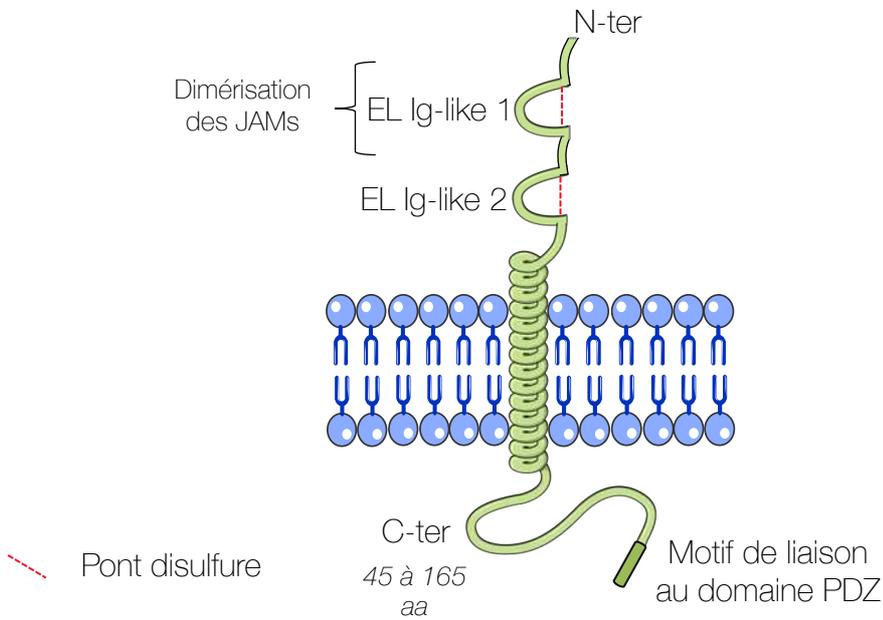


Figure 6 : Représentation de la structure des JAMs

Les protéines JAMs sont composées de deux boucles extracellulaires de type immunoglobuline (EL Ig-like 1 et 2) en N-terminal, d'une région transmembranaire et d'une queue C-terminale cytoplasmique contenant un motif de liaison au domaine PDZ. *Adapté de González-Mariscal et al., 2007*

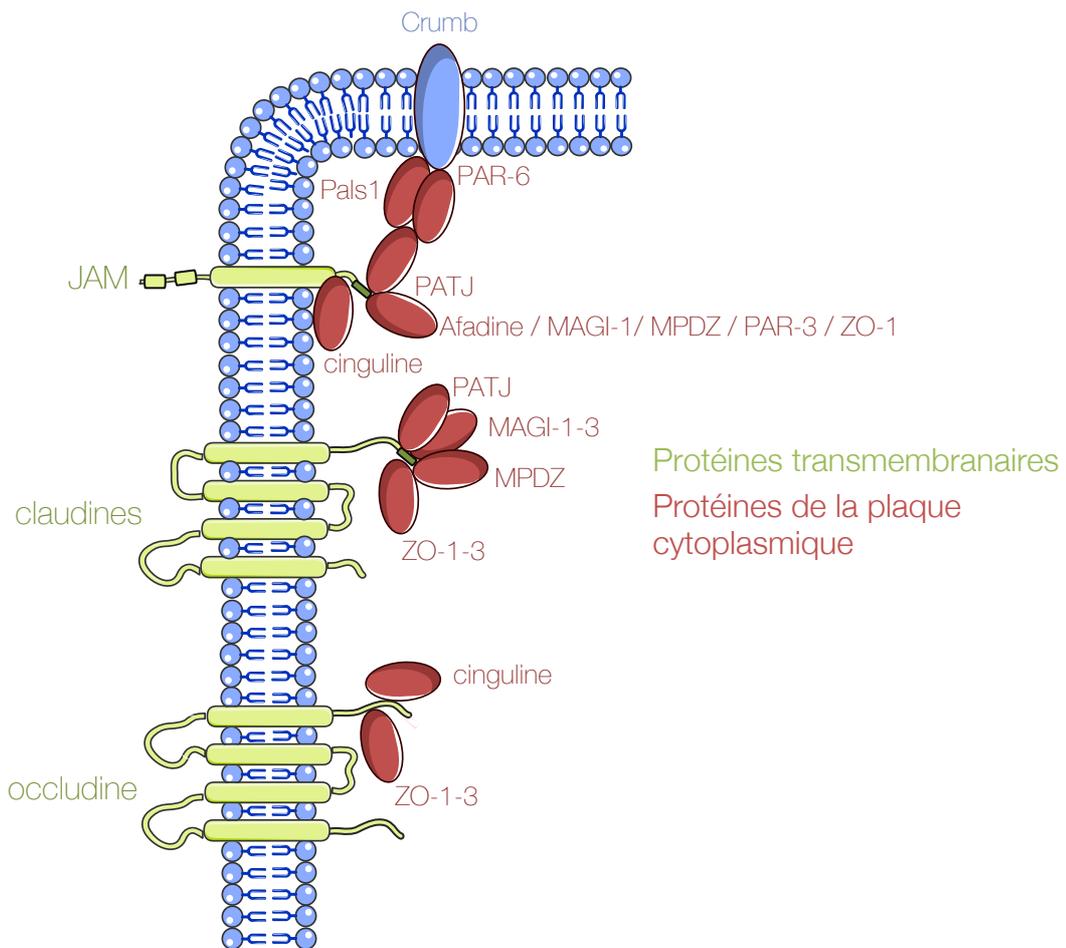


Figure 7 : Représentation schématique des interactions entre les protéines transmembranaires et les protéines de la plaque cytoplasmique

Les différentes protéines de la plaque cytoplasmique (en rouge) interagissent avec les protéines transmembranaires (en vert) et avec la protéine Crumb. *Adapté de Guillemot et al., 2008, et Zihni et al., 2016.*

iii) Les JAMs

Les **JAMs** (junctional Adhesion Molecules) font partie de la superfamille des immunoglobulines. Elles sont regroupées en fonction de la longueur de la queue C-terminale : le premier groupe comporte les JAM- A, B, et C et leur queue C-terminale comporte 45 à 50 acides aminés ; le second groupe contient les JAM- 4 et L et CAR (coxsackie and adenovirus receptor) et leur queues C-terminales sont composées de 105 à 165 acides aminés. Les JAMs sont exprimées dans de nombreux types de cellules épithéliales et endothéliales (Balda & Matter, 2000). Elles contiennent deux boucles extracellulaires de type immunoglobuline-like (EL Ig-like 1 et 2), une seule hélice transmembranaire et un domaine cytoplasmique se terminant par un motif de liaison au domaine PDZ (**Figure 6**). EL Ig-like 1 permet l'homodimérisation des JAMs sur la même cellule et pourrait également être responsable des interactions trans des JAMs. Le motif de liaison au domaine PDZ des JAMs interagit avec les protéines de la plaque cytoplasmique (Van Itallie & Anderson, 2014).

b) Les protéines de la plaque cytoplasmique

La région du cytoplasme sous-jacente aux jonctions serrées contient plusieurs complexes de protéines appelées **protéines de la plaque cytoplasmique** dont la plupart présentent un domaine PDZ (**Figure 7**). Ce domaine permet la liaison de ces dernières entre elles, ainsi qu'avec les **protéines transmembranaires** (hors occludine) (**Tableau 1**) (Guillemot et al., 2008).

MPDZ (Multiple PDZ domain protein, ou MUPP-1) contient 13 domaines PDZ et interagit avec les claudines et JAMs. MPDZ interagit aussi avec d'autres protéines de la plaque cytoplasmique comme ZO-3 (Zonula Occludens 3), PAR-6 (PARTitioning defective protein) et Pals1 (Protein Associated with Lin-1) (Guillemot et al., 2008; Van Itallie & Anderson, 2014).

L'**afadine** est une protéine contenant un domaine PDZ lui permettant de se lier aux JAMs. Elle est également capable d'interactions avec différentes protéines de la plaque cytoplasmique comme ZO-1, la cinguline et PAR-6 (Van Itallie & Anderson, 2014).

Tableau 1 : Les interactions des protéines de la plaque cytoplasmique

Le tableau reprend les principales protéines de la plaque cytoplasmique et leurs interactions avec les protéines transmembranaires ou avec les autres protéines de la plaque cytoplasmique. Ces interactions sont principalement dû à la fixation entre les motifs de liaison au domaine PDZ des protéines transmembranaires et les domaines PDZ des protéines de la plaque cytoplasmique. Les interactions impliquants d'autres domaines que le PDZ sont soulignées. Selon Guillemot et al., 2008, Van Itallie and Anderson, 2014, Schneeberger and Lynch, 2004 et González-Mariscal et al., 2003

Protéine de la plaque cytoplasmique	Nombre de domaines PDZ	Protéines transmembranaires	Interactions avec les autres protéines de la plaque cytoplasmique
MPDZ	13	Claudines, JAMs	ZO-3, Pals1, PAR-6
Afadine	1	JAMs	ZO-1, Cinguline, PAR-6
MAGI-1	5	Claudines, JAMs	/
MAGI-2-3	5	Claudines	/
ZO-2	3	Claudines, JAMs, <u>occludine</u>	ZO-1, cinguline, afadine
ZO-3	3	Claudines, JAMs, <u>occludine</u>	ZO-1, cinguline, afadine, PATJ
PATJ	1	Claudines, JAMs	ZO-3, PAR-6, PALS-1
Pals1	10	Crumb	PATJ, MPDZ, PAR-6
PAR-3	3	JAMs	JAMs, PAR-6, PAR-3
PAR-6	1	Crumb	Pals1, PAR-3, PATJ, afadine
Cinguline	0	<u>JAMs, occludine</u>	ZO-1-3, afadine
Symlépine	0	/	ZO-1
Antigène 7H6	0	/	ZO-1

MAGI-1, -2 et -3 (membrane-associated guanylate kinase inverted) sont des protéines à cinq domaines PDZ. Les MAGIs interagissent avec les claudines (Günzel & Yu, 2013a) et MAGI-1 interagit aussi avec les JAMs (Guillemot et al., 2008; Van Itallie & Anderson, 2014).

ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont des protéines multidomaines de la famille des Zonula Occludens avec chacune trois domaines PDZ N-terminaux, un domaine central SH3 (Src homologie 3) et un domaine homologue à GUK. Le premier domaine PDZ des ZOs leur permet de se lier aux claudines et leur domaine GUK de se lier à l'occludine. Les ZOs se lient à d'autres protéines de la plaque cytoplasmique comme la cinguline et l'afadine. ZO-1 interagit également avec les JAMs, s'homodimérise et se lie à ZO-2 et ZO-3 (González-Mariscal et al., 2008; Guillemot et al., 2008; Van Itallie & Anderson, 2014). ZO-3 interagit aussi avec PATJ (Pals1 Associated Tight Junction) (González-Mariscal et al., 2003).

Le complexe **Crumb/PATJ/Pals1** fait également partie des jonctions serrées. Bien que la protéine transmembranaire **Crumb** soit exprimée à la membrane apicale des cellules épithéliales, elle est indirectement liée aux jonctions serrées *via* la protéine **Pals1** qui se lie à **PATJ**. **Pals1** possède 10 domaines PDZ et se lie à PATJ, Crumb, MPDZ et PAR-6. **PATJ** possède un unique domaine PDZ et se lie aux claudines, aux JAMs, à ZO-3 et à PAR-6 (Schneeberger & Lynch, 2004). **PAR-3** possède trois domaines PDZ et se lie aux JAMs, à PAR-6 et s'homodimérise. **PAR-6** possède un domaine PDZ et se lie à Crumb, à Pals1 et à PAR-3 (Schneeberger & Lynch, 2004).

D'autres protéines de la plaque cytoplasmique ne possédant pas de domaine PDZ telles que la cinguline, l'antigène 7H6 et la symplekine ont également été identifiées (Furuse, Sasaki, et al., 1998). La **cinguline** est une protéine qui se lie directement aux protéines transmembranaires JAMs et occludine, mais également aux protéines de la plaque cytoplasmique ZOs et à l'afadine. Elle est spécifiquement exprimée dans les tissus épithéliaux (González-Mariscal et al., 2003; Guillemot et al., 2008). La **symplekine** s'associe avec ZO-1 aux jonctions serrées des cellules épithéliales polarisées (Kavanagh et al., 2006). L'**antigène 7H6** est fortement associé aux jonctions serrées et interagit avec ZO-1 (González-Mariscal et al., 2003).

Tableau 2 : Liaison des protéines du cytosquelette avec les protéines de la plaque cytoplasmique
 Le tableau reprend les principales interactions entre les protéines de la plaque cytoplasmique et les protéines du cytosquelette. Selon Guillemot et al., 2008, Van Itallie and Anderson, 2014, Schneeberger and Lynch, 2004 et González-Mariscal et al., 2003

Protéines du cytosquelette	Interactions avec les protéines de la plaque cytoplasmique
Actine	ZO-1-3, afadine, cinguline, MAGI-1
Myosines non musculaires	Afadine, cinguline
Microtubules	PAR-3, cinguline

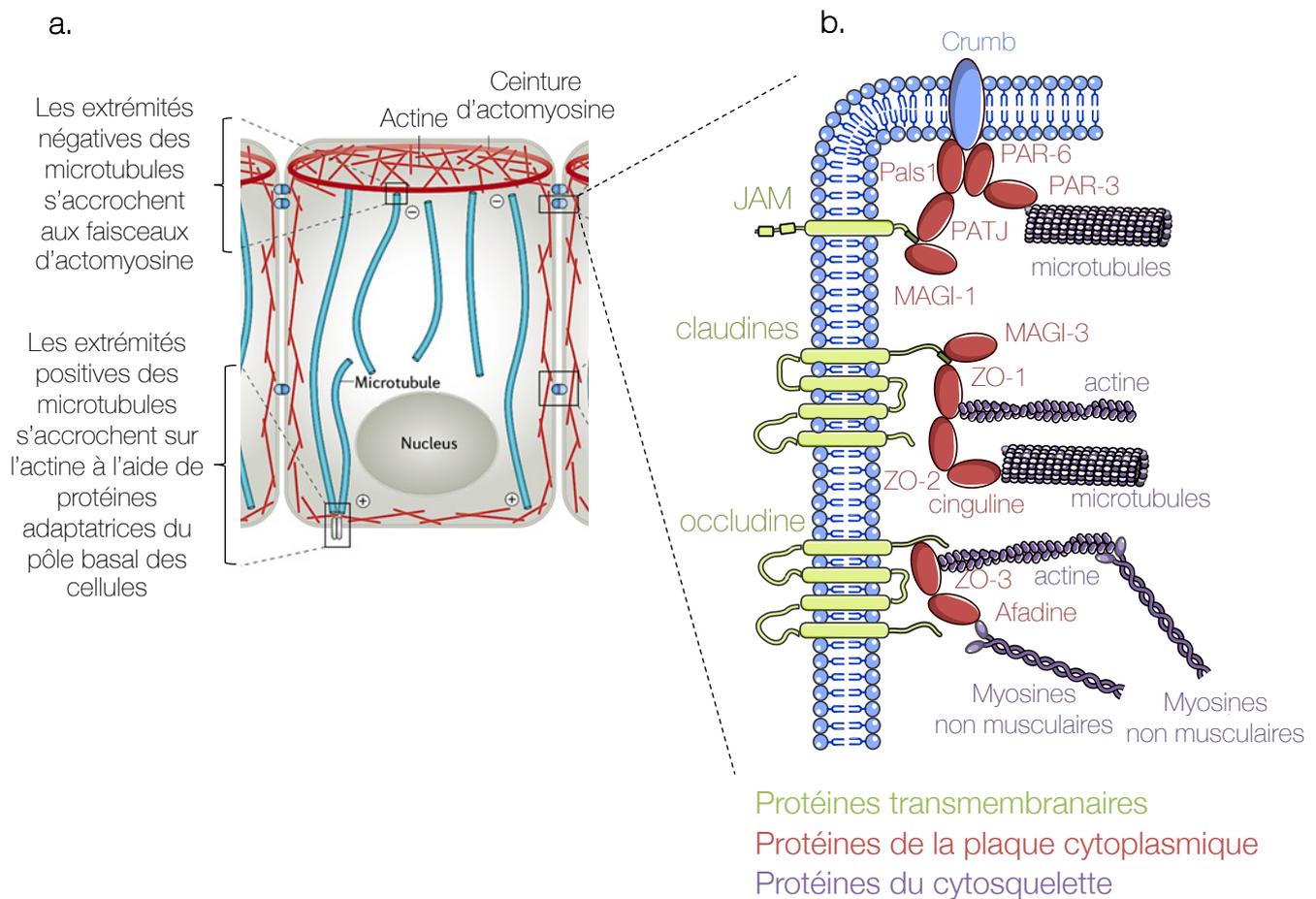


Figure 8 : Organisation des protéines du cytosquelette dans les cellules épithéliales et association aux protéines de la plaque cytoplasmique

a. Les trois constituants du cytosquelette sont associés aux jonctions serrées. L'actine est localisée en périphérie sous la membrane plasmique. Les myosines non musculaires sont organisées avec l'actine en ceinture d'actomyosine pour maintenir la forme et la polarisation des cellules épithéliales. Les microtubules sont organisés en réseaux parallèles le long de l'axe apico-basal des cellules épithéliales avec les extrémités négatives tournées vers le pôle apical et les extrémités positives tournées vers le pôle basal. **b.** Les protéines de la plaque cytoplasmique (en rouge) interagissent avec les protéines cytosquelette (en violet). D'après Van Itallie and Anderson, 2014, Vicente-Manzanares et al., 2009, Dogterom and Koenderink, 2019, Guillemot et al., 2008, et Zihni et al., 2016

c) Les protéines du cytosquelette

Les protéines de la plaque cytoplasmique interagissent directement avec **les protéines du cytosquelette** (Figure 8 ; Tableau 2) (Van Itallie & Anderson, 2014) :

- L'**actine** se lie aux ZO, à MAGI-1, à l'afadine et à la cinguline.
- Les **myosines non musculaires** (2A, 2B et 2C) se fixent à la cinguline et à l'afadine.
- **Les microtubules** se lient à la cinguline et à PAR-3

Les **protéines du cytosquelette** jouent un rôle important pour stabiliser l'architecture des jonctions serrées (Figure 8a).

L'**actine** forme des filaments qui vont s'organiser le long de la membrane plasmique et constituer une ceinture au pôle apical des cellules. Elle joue un rôle crucial dans le maintien de la polarisation des cellules épithéliales (Chifflet & Hernández, 2012).

Les **myosines non musculaires** sont organisées en ceinture au pôle apical des cellules. Elles maintiennent la forme et la polarisation des cellules épithéliales. L'actine et les myosines non musculaires vont s'organiser en ceinture de fibres d'actomyosine associées aux jonctions serrées et adhérentes (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Les **microtubules** sont organisés en réseaux parallèles le long de l'axe apico-basal des cellules épithéliales. Les extrémités négatives des microtubules sont associées à l'actomyosine au pôle apical des cellules, tant dis que leurs extrémités positives sont associées à des protéines membranaires au pôle basal. Les microtubules favorisent la formation des jonctions en facilitant le recrutement des différents composants des jonctions (Figure 8b) (Dogterom & Koenderink, 2019).

Tableau 3 : Liste des principales protéines de signalisation cellulaire associées aux jonctions serrées

Le tableau reprend les principales protéines de signalisation cellulaire ainsi que les protéines des jonctions serrées sur lesquelles elles se fixent. Les protéines de signalisation sont regroupées en fonction de leur rôle dans les jonctions serrées. Selon, Shi et al., 2018, Zihni et al., 2016, Yao et al., 2004, González-Mariscal et al., 2003 et 2008, Adamsky et al., 2003, Guillemot et al., 2008

Protéine de signalisation	Liaison avec les protéines de jonctions serrées	Rôle dans la signalisation	
PKC α	PAR-6, ZO-2, PAR-3, JAMs, Pals1, PATJ, ZO-3	Assemblage des jonctions serrées	Formation des jonctions serrées
PP2A	Occludine, claudine-1, ZO-1		
ALF4	ZO-1		
G α -i0 / G α -i2	ZO-1		
Rab13	ZO-1		
Cdc42	PAR-6, PAR-3, ZO-1, tricelluline		
Ras	Afadine, MAGI-1		
Frizzled-4/Wnt	MAGI-3	Polarisation et adhérence des cellules	
RPTP β	MAGI-3		
ZAK	ZO-1		
AMPK	cinguline		
ZONAB	ZO-1, symplekine	Prolifération cellulaire	
c-Myc	ZO-2		
RhoA	MAGI-1, afadine, ZO-1, cinguline, PATJ		
GEF-H1	Cinguline, MAGI-1		
Fos, Jun, C/EBP	ZO-2		
PTEN	MAGI-2-3, PAR-3	Survie cellulaire	
huASH1	Crumb	Non déterminé	
SAF-B	ZO-2		

d) Les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire

Les jonctions serrées sont d'importants régulateurs de la transduction du signal, qui modulent l'**assemblage des protéines** des jonctions serrées, ainsi que la **polarisation et l'adhérence** des cellules épithéliales, la **prolifération** et la **survie cellulaire** (Shi et al., 2018). Ces différents signaux sont induits suite à l'interaction des protéines transmembranaires et de la plaque cytoplasmique avec de nombreuses **protéines de signalisation cellulaire** (Tableau 3 ; Figure 9).

i) Les protéines impliquées dans l'assemblage des jonctions serrées

L'**assemblage des jonctions serrées** est la résultante de nombreuses interactions entre les protéines des jonctions serrées et les protéines de la signalisation cellulaire tels que **PKC α** (Protein kinase C α) (Schneeberger & Lynch, 2004; Van Itallie & Anderson, 2014), **PP2A** (protéine Ser/Thr phosphatase 2A) (González-Mariscal et al., 2008), **Rab13** (Ras-related protein 13) (González-Mariscal et al., 2008), **Cdc42** (Cell division control protein 42 homolog) et les protéines de la famille de **Ras** (Guillemot et al., 2008; Van Itallie & Anderson, 2014; Zahraoui, 2004). Les **protéines G** en font également partie et sont des protéines de liaison au GTP qui alternent entre un état actif (lié au GTP) et un état inactif (lié au GDP). Parmi elles on retrouve **ALF4** (Aberrant Lateral root Formation 4) et **G α -i0** (Gi protein alpha subunit) (González-Mariscal et al., 2003).

ii) Les protéines impliquées dans la polarisation et l'adhérence des cellules

D'autres protéines de la signalisation sont impliquées dans la **polarisation et l'adhérence des cellules** comme le récepteur membranaire **Frizzled 4**, **JNK** (c-Jun N-terminal kinase) (Guillemot et al., 2008; Van Itallie & Anderson, 2014; Yao et al., 2004), **RPTP β** (Receptor Tyrosine Phosphatase β) (Adamsky et al., 2003), la serine kinase **ZAK** (ZO-1 associated kinase) (Bauer et al., 2011) et **AMPK** (AMP-activated protein kinase) (González-Mariscal et al., 2003; Guillemot et al., 2008; Yano et al., 2013).

iii) Les protéines impliquées dans la prolifération cellulaire

De nombreuses interactions entre les protéines de signalisation et les protéines de la plaque cytoplasmique inhibent la **prolifération cellulaire** lorsque les cellules épithéliales sont confluentes (Spadaro et al., 2014).

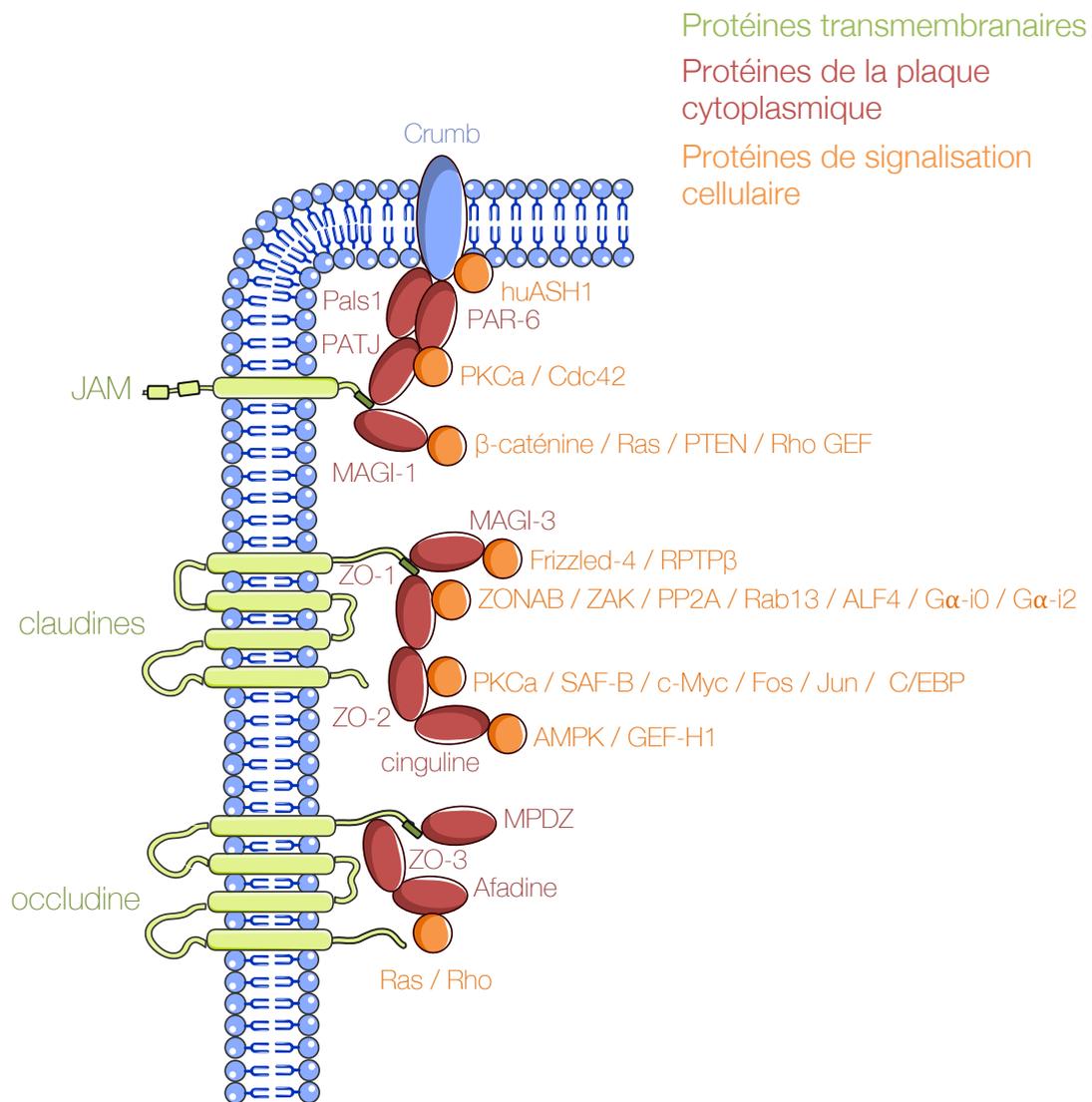


Figure 9 : Représentation schématique de la structure du réseau de protéines de signalisation associées aux jonctions serrées

Les protéines de la plaque cytoplasmique (en rouge) font le liens avec les protéines de la signalisation (en orange). *Adapté de Guillemot et al., 2008, et Zihni et al., 2016.*

- L'exemple le plus décrit dans la littérature est celui du facteur de transcription **ZONAB** (ZO-1-associated nucleic acid binding protein). Ce dernier active la prolifération cellulaire lorsqu'il est localisé dans le noyau. La protéine ZO-1 est capable de séquestrer ZONAB à la membrane ce qui bloque sa translocation nucléaire et inhibe la prolifération cellulaire (Spadaro et al., 2014). La symplektine se fixe également au facteur de transcription ZONAB, lorsque les cellules sont confluentes ce qui régule la prolifération cellulaire (Kavanagh et al., 2006).
- Le facteur de transcription **c-Myc** se fixe à ZO-2 ce qui inhibe la transcription de la cycline D1 dans les jonctions serrées (Huerta et al., 2007).
- Les protéines de la famille de **Rho** (Ras homolog family member) se lient aux protéines de la plaque cytoplasmiques et contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Ainsi, l'expression de **RhoA** diminue lorsque les cellules épithéliales atteignent la confluence, ce qui entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire (Aijaz et al., 2005).
- La liaison de **GEF-H1** (Guanine nucleotide exchange factor-H1) aux protéines de la plaque cytoplasmique inhibe également la prolifération cellulaire (Aijaz et al., 2005; González-Mariscal et al., 2003; Guillemot et al., 2008; Van Itallie & Anderson, 2014).
- Les facteurs de transcription **Fos**, **Jun** et **C/EBP** (CCAAT/enhancer binding protein) se lie à ZO-2 et régulent aussi la prolifération cellulaire (Betanzos et al., 2004).

iv) Les protéines impliquées dans la survie cellulaire

MAGI-3 et PAR-3 permettent la localisation de **PTEN** (Phosphatase and TENsin) à la membrane et il est suggéré que cette dernière serait alors impliquée dans la survie cellulaire. En effet, PTEN déphosphoryle PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) ce qui active la kinase AKT (serine-threonine protein kinase 1) impliquée dans l'inhibition de l'apoptose. PTEN est une phosphatase qui est mutée dans de nombreuses tumeurs humaines. (Y. Wu et al., 2000).

v) Les protéines dont le rôle aux jonctions n'est pas déterminé

Bien que certaines interactions entre les protéines des jonctions serrées et les protéines de signalisation cellulaire soient démontrées, leurs conséquences sont encore inconnues ou non démontrées. C'est le cas du facteur de transcription **huASH1** (protein product of human ASH1). huASH1 se fixe à Crumb et dans les cellules épithéliales, il est à la fois intranucléaire et localisé au niveau des jonctions serrées. Cette double localisation suggère qu'il pourrait être impliqué dans la signalisation cellulaire initiée par les mécanismes d'adhérence cellulaire (González-Mariscal et al., 2003). Le facteur de transcription **SAF-B** (Scaffold attachment factor B) se colocalise avec ZO-2 mais son rôle n'est pas encore connu (Traweger et al., 2003).

3) Formation et fonctions des jonctions serrées

Les jonctions serrées maintiennent la polarité et l'adhérence des cellules épithéliales. Elles permettent le transport paracellulaire sélectif de solutés et d'ions, et forment une barrière de diffusion qui limite le mélange des composants de la membrane plasmique apicale et basolatérale (Balda & Matter, 2000).

a) La formation des jonctions serrées

Lors de la genèse des épithéliums, des **jonctions primaires** se forment entre les cellules voisines. Ces jonctions primaires contiennent des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées comme l'**afadine** et **ZO-1** mais également d'autres protéines impliquées dans l'adhérence intercellulaire comme la E-cadhérine et la nectine. Par la suite, les cellules épithéliales se polarisent et les protéines des jonctions serrées comme les claudines, les JAMs et l'occludine s'accumulent au niveau de ces jonctions primaires pour former les jonctions serrées (González-Mariscal et al., 2003). L'établissement de ces **contacts cellule-cellule** induit la mise en place d'un complexe moléculaire jonctionnel prenant la forme de brins intercellulaires (Zahraoui, 2004; Zihni et al., 2016).

Les **claudines** sont directement impliquées dans la formation des **brins intercellulaires** qui forment les jonctions serrées. En effet, dans les fibroblastes l'expression d'au moins un membre de la famille des claudines est nécessaire à la formation de ces brins intercellulaires (Balda & Matter, 2000; Shi et al., 2018). De plus, la variation d'expression

des claudines peut altérer l'assemblage des jonctions serrées dans l'épithélium (Shi et al., 2018). L'interaction des claudines avec les protéines **ZOs** permet leur recrutement aux jonctions, ainsi que la formation et l'organisation des jonctions serrées (**Figure 7**) (Ruffer, 2004; Van Itallie & Anderson, 2014). L'interaction entre les domaines PDZ de **ZO-1** et **ZO-2** et les claudines joue un rôle fondamental dans l'assemblage des brins intercellulaires aux jonctions serrées (Guillemot et al., 2008; Ruffer, 2004; Van Itallie & Anderson, 2014). Bien que l'expression des **JAMs** et de l'**occludine** soit capables d'induire l'agrégation cellulaire, ces protéines ne sont pas responsables de la formation des jonctions serrées mais contribuent à leur soutien et leur organisation. Les **JAMs** induisent l'adhérence cellulaire dans les fibroblastes mais pas l'établissement des jonctions (Balda & Matter, 2000). Par ailleurs, la morphologie des jonctions serrées n'est pas altérée dans les souris KO (knock-out) pour l'**occludine** (Furuse, Sasaki, et al., 1998). Ainsi, ces protéines ne semblent pas jouer un rôle critique pour la formation des jonctions bien qu'elles contribuent à l'adhérence cellulaire (Van Itallie & Anderson, 2014). Les protéines de structure **ZO-1 et 2** sont également primordiales pour le recrutement à la membrane de l'**occludine** notamment dans les épithéliums des glandes mammaires de souris. Les **JAMs** sont recrutées à la membrane par interaction avec l'**afadine** présente dans les jonctions primaires. La protéine **Crumb** permet également le recrutement des **JAMs** au pôle apical des cellules par interaction entre les protéines **Crumb, Pals1, PATJ, PAR-6** (**Figure 7**). L'établissement de ce complexe protéique joue également un rôle crucial dans la mise en place de la **polarité** des cellules épithéliales (F. Liu, Koval, et al., 2016). Ce complexe recrute ensuite d'autres protéines de la plaque cytoplasmique au pôle apico-latéral comme **MPDZ, PAR-3, ZO-3** ainsi que les **claudines** (Guillemot et al., 2008; Schneeberger & Lynch, 2004; Shin et al., 2005).

Les **protéines du cytosquelette** jouent un rôle essentiel dans l'assemblage des jonctions serrées et dans leur stabilisation en formant un grand réseau péri-membranaire (Van Itallie & Anderson, 2014).

b) Adhérence intercellulaire

Les **claudines** sont responsables du maintien de l'adhérence des cellules épithéliales *via* leurs boucles EL1 et EL2 qui assurent leur dimérisation « head-by-head » (Balda & Matter, 2000; Furuse et al., 1999). De plus, les claudines 1 et 2 ont montré une forte

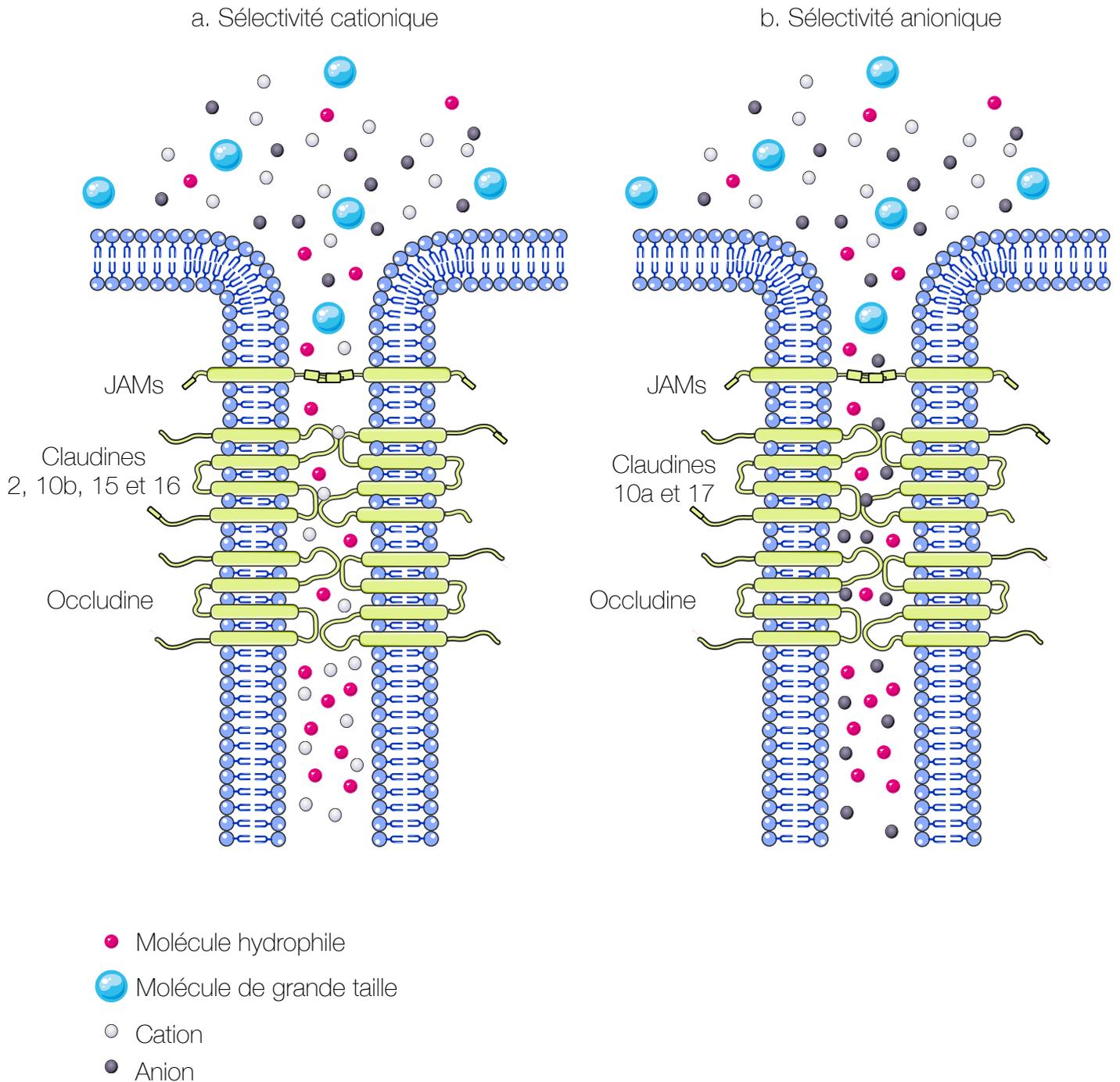


Figure 10 : Les jonctions serrées : rôle de régulation de la perméabilité paracellulaire

La barrière de diffusion paracellulaire est semi-perméable et sélectionne les différents solutés en fonction de leur taille et de leur charge. Les molécules roses sont hydrophiles et suffisamment petites pour diffuser à travers la jonction. Les molécules bleues sont trop grosses pour traverser les jonctions serrées. Les ions sont sélectionnés en fonction de leur charge, les ions blancs sont des cations et les ions noirs sont des anions. Les claudines 2, 10b, 15 et 16 favorisent le passage des cations alors que les claudines 10a et 17 favorisent le passage des anions. *D'après Zihni et al., 2016*

capacité à former des brins intercellulaires dans les membranes plasmiques et à maintenir l'adhérence intercellulaire (Furuse, Sasaki, et al., 1998). Il a également été démontré que l'**occludine** et les **JAMs** sont directement impliqués dans l'adhérence cellulaire (Balda & Matter, 2000; Furuse, Sasaki, et al., 1998).

c) Perméabilité paracellulaire

La barrière de diffusion paracellulaire n'est pas une barrière étanche mais semi-perméable car elle permet le passage sélectif de certains solutés et ions (Balda & Matter, 2000). En effet, les jonctions serrées régulent par la taille et la charge le transit extracellulaire des ions et des molécules entre des cellules épithéliales voisines, c'est ce que l'on appelle la **perméabilité paracellulaire (Figure 10)** (González-Mariscal et al., 2008).

La composition moléculaire des brins intercellulaires est tissu-dépendante en raison de l'expression variable des claudines dans les tissus. La boucle **EL1** des claudines porte des acides aminés aromatiques chargés ainsi qu'un site de fixation aux ions. Cette caractéristique est cruciale car elle détermine la sélectivité ionique paracellulaire (Colegio et al., 2003; González-Mariscal et al., 2008; Günzel & Yu, 2013a; J. Li et al., 2013; Wen et al., 2004). Les claudines déterminent ainsi la sélectivité paracellulaire à travers l'ouverture et la fermeture de canaux qui sont formés par un ou plusieurs types de claudines (Balda & Matter, 2000). Les claudines sont ainsi regroupées selon leurs propriétés de régulation du flux paracellulaire : celles qui soutiennent la sélectivité cationique : les claudines 2, 10b, 15 et 16 (**Figure 10a**) ; et celles qui soutiennent la sélectivité anionique les claudines 10a et 17 (**Figure 10b**) et enfin la claudine 1 qui inhibe le flux paracellulaire (Günzel & Fromm, 2012; Zihni et al., 2016). La **claudine 1** semble être particulièrement importante pour réguler la perméabilité paracellulaire :

- L'inhibition de son expression dans des kératinocytes humain augmente la perméabilité paracellulaire
- Sa surexpression dans les cellules épithéliales de rein canin MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) réduit la perméabilité paracellulaire (Shi et al., 2018).

Il a également été prouvé que le domaine C-terminal de l'**occludine** est primordial pour la régulation sélective de la perméabilité paracellulaire (Balda & Matter, 2000). La

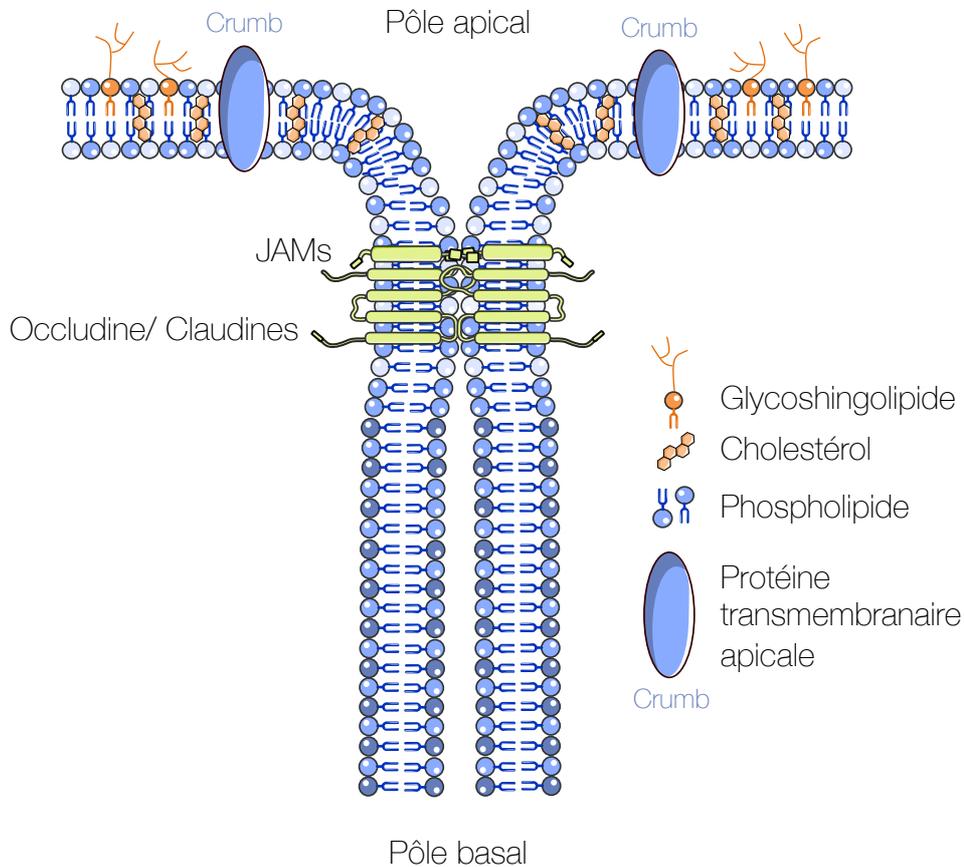


Figure 11 : Les jonctions serrées : rôle de barrière de diffusion

Les jonctions serrées jouent un rôle de barrière de diffusion qui évite le mélange des lipides et des protéines de la membrane plasmique entre le pôle apical et le pôle basal. Cette barrière permet le maintien des composants de la membrane au pôle apical ou au pôle basal de la cellule. Contrairement à la membrane basale, le feuillet externe de la membrane apicale est riche en glycosphingolipides et en cholestérol. *D'après revue Zihni et al., 2016*

surexpression et la phosphorylation de l'occludine diminue la perméabilité dans les cellules MDCK (Shi et al., 2018).

De récentes études suggèrent que le **cholestérol** membranaire jouerait également un rôle important dans la fonction de régulation du flux paracellulaire des jonctions serrées (Otani & Furuse, 2020).

d) Barrière de diffusion

Les jonctions serrées forment une barrière de diffusion intramembranaire qui **limite le mélange des composants de la membrane apicale et basolatérale** (Figure 11). Cette barrière de diffusion restreint ainsi le mélange des lipides et des protéines transmembranaires des pôles apical et basolatéral dans les feuillettes de la membrane plasmique. Il a aussi été suggéré qu'en limitant la diffusion des lipides et des protéines dans leurs membranes, les cellules pourraient réguler la composition de leurs compartiments apical et basolatéral. La fonction de barrière de diffusion serait ainsi impliquée dans l'établissement et le maintien de la **polarité cellulaire** (Balda & Matter, 2000).

Le rôle de barrière de diffusion des jonctions serrées est souvent associé aux protéines transmembranaires. En effet, lorsque le domaine cytoplasmique de l'**occludine** est délété, elle est incapable d'interagir avec la plaque cytoplasmique ce qui perturbe la barrière de diffusion lipidique (Zihni et al., 2016). Les **claudines** sont également essentielles pour former la barrière de diffusion et pour la polarisation des cellules (Balda & Matter, 2000). La claudine 1, par exemple, est importante pour maintenir la fonction de barrière puisque l'inhibition de son expression dans les kératinocytes induit des ruptures de la barrière de diffusion. Les claudines 4, 5, 6, 8, 9, 11, 15 et 19 sont également classées comme des claudines « de barrière ». Les **JAMs** sont importantes pour le maintien de la fonction de barrière des jonctions serrées et dans le maintien de la polarité des cellules épithéliales (Shi et al., 2018).

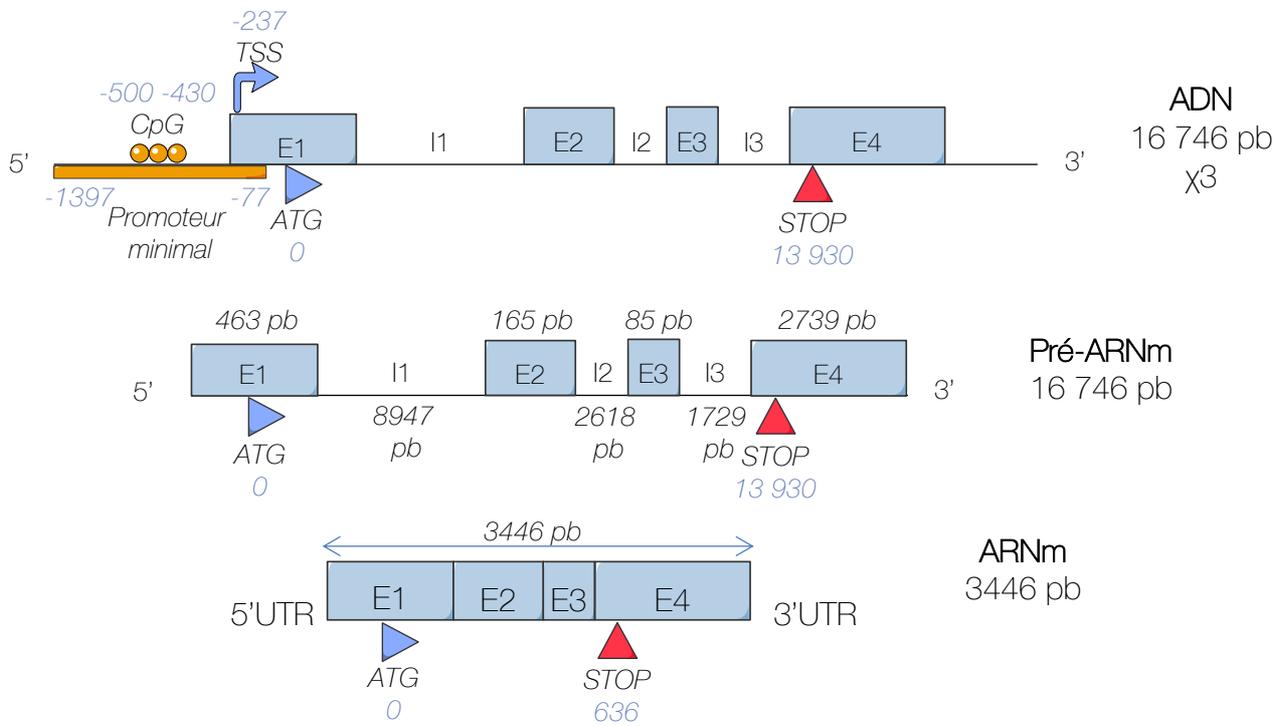


Figure 12 : Structure du gène de la claudine 1 chez l'Homme.

Le gène de la claudine 1 est positionné sur le chromosome 3 (X3) et est composé de 16 746 paires de bases (pb). Le site d'initiation de la traduction (ATG) est situé en position 0 dans l'exon 1 et le codon STOP est localisé en position 13 930 par rapport à l'ATG dans l'exon 4. Le site d'initiation de la transcription (TSS) a été prédit en position -237. Dans le promoteur de la claudine 1, des régions riches en îlots CpG ont été identifiées en position -430 à -500. Le promoteur minimal de la claudine 1 est situé de la région -77 à -1397. La transcription du gène de la claudine 1 donne un ARN pré-messager qui contient 4 exons (E1 de 463 pb, E2 de 165 pb, E3 de 85 pb et E4 de 2739 pb) et 3 introns (I1 de 8947 pb, I2 de 2618 pb et I3 de 1729 pb). L'épissage du pré-ARN messager donne un ARNm mature de 3 446 pb. Cet ARNm contient une séquence codante de 636 pb avec en amont une région 5'UTR de 240 pb et en aval une région 3'UTR de 2570 pb.

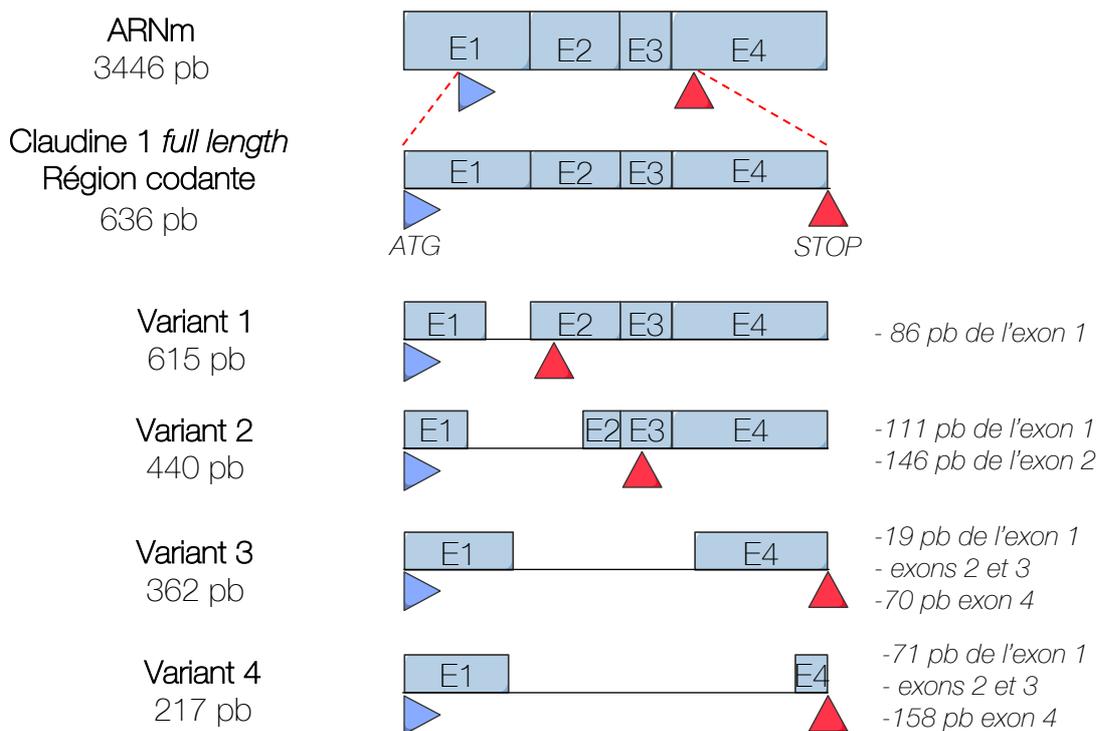


Figure 13 : L'épissage alternatif de la claudine 1

Les 4 variants du transcrit de la claudine 1 sont alignés à la région codante du transcrit *full length* de 636 pb. Quatre variants de la claudine 1 ont été identifiés de 615, 440, 362 et 217 pb. Les paires de bases délétées pour chaque exon sont précisées. *Adapté de Blanchard et al, 2016*

II. LA CLAUDINE 1

En 1998, l'équipe de Furuse découvre la protéine claudine 1 au sein d'une fraction membranaire de jonctions isolée à partir de foie de poulet. L'ADNc murin de la claudine 1 a ensuite été cloné et séquencé à partir de foie murin (Furuse, Fujita, et al., 1998). En 1999, l'ADNc humain de la claudine 1 est cloné à partir de cellules épithéliales humaines mammaires, les HMECs. L'équipe de Swisshelm établit également qu'il existe 91 % d'homologie protéique entre les claudines 1 humaine et murine (Swisshelm et al., 1999).

1) Le gène de la claudine 1

Le gène humain de la claudine 1 (CLDN1) est localisé sur le chromosome 3 en position 3q28 et comporte 16 746 paires de bases (pb) (**Figure 12**) (Halford et al., 2000). Le TSS (site d'initiation de la transcription) se situe en position -237 par rapport à l'ATG (Adenine Thymine Guanine) (Krämer et al., 2000). Trois régions promotrices conservées du gène de la claudine 1 sont décrites chez les mammifères :

- -2998 à -2650 par rapport à l'ATG (352pb)
- -1203 à -1497 par rapport à l'ATG (294pb)
- -940 à +1 par rapport à l'ATG (941pb)

De plus, l'activité minimale de son promoteur est comprise entre -1397 et -77 pb par rapport à l'ATG (Shiou et al., 2007). L'ARN pré-messager de la claudine 1 comporte 4 exons de 463, 165, 85 et 2739 pb, ainsi que 3 introns. L'épissage donne un ARNm (ARN messenger) de 3446 pb. L'ATG, ou site d'initiation de la traduction, se situe en position 0 dans l'exon 1 et le codon stop TGA (Thymine Guanine Adenine) se trouve en position 636 dans l'exon 4. Cet ARNm contient une séquence codante de 636 pb avec en amont une région 5'UTR (UnTranslated Region) de 240 pb et en aval une région 3'UTR de 2570 pb (Krämer et al., 2000). La traduction aboutit à une protéine composée de 211 acides aminés.

En 2016, un **épissage alternatif** du transcrit de la claudine 1 a été décrit dans 12 tumeurs mammaires humaines et 6 échantillons de tissus mammaires sains (**Figure 13**). Quatre variants de la claudine 1 ont été identifiés de 615, 440, 362 et 217 pb. Les variants de

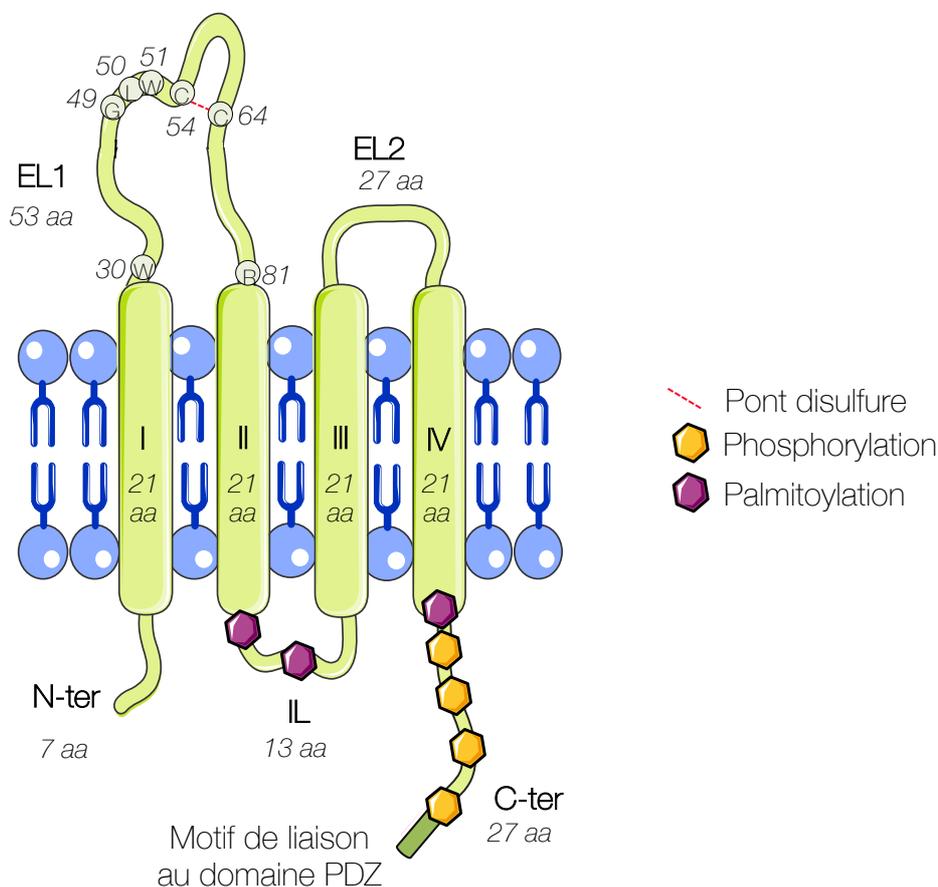


Figure 14 : Structure protéique de la claudine 1

La claudine 1 possède quatre régions transmembranaires (I-IV) de 21 acides aminés. La partie extracellulaire est organisée en 2 boucles EL1 et EL2 de 53 et 27 acides aminés respectivement. Au niveau de la boucle EL1, les résidus cystéines 54 et 64 sont reliés par un pont disulfure et on retrouve également le motif conservé W-G-L-W-C-C-R. Du côté cytoplasmique on retrouve la queue N-terminale, la boucle IL et la queue C-terminale de 7, 13 et 27 acides aminés respectivement. Les sites de palmitoylation sont situés dans la boucle IL, à l'extrémité cytoplasmique du domaine transmembranaires IV et au niveau de la queue C-terminale. La queue C-terminale de la claudine 1 possède de nombreux sites de phosphorylation et un motif de liaison au domaine PDZ : Tyrosine (Y)-Valine (V). *D'après Cukierman et al., 2009.*

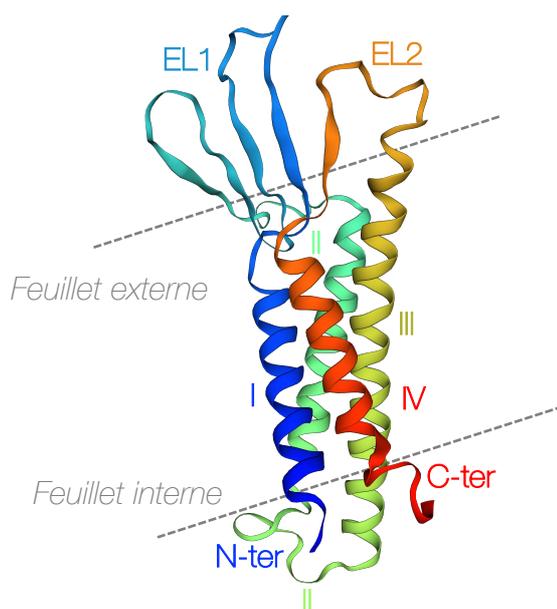


Figure 15 : Structure protéique 3D de la claudine 1

En modélisation 3D, les domaines transmembranaires sont organisés en d'hélice α . La boucle EL1 est composée de 4 feuillets β antiparallèles et la boucle EL2 d'un seul feuillet β . *D'après Swissmodel, 2021*

615 et 362 pb sont également retrouvés dans les tissus mammaires sains. Ces variants sont plus courts que le transcrit *full length* (Blanchard et al., 2016).

2) La protéine

La claudine 1 est une protéine de 211 acides aminés qui possède une masse moléculaire de 22,744 kDa. La claudine 1 comprend différents domaines (**Figure 14 et 15**) (Cukierman et al., 2009; Lal-Nag & Morin, 2009; Suzuki et al., 2014, 2017) :

- Une queue N-terminale cytoplasmique de 7 acides aminés,
- Quatre domaines transmembranaires de 21 acides aminés organisés en hélices α ,
- Une boucle intracellulaire de 13 acides aminés,
- Une boucle extracellulaire EL1 de 53 acides aminés composée de 4 feuillets β antiparallèles comportant le motif conservé W-GLW-C-C-R (tryptophane-glycine leucine tryptophane – cystéine- cystéines-Arginine) et dont les résidus cystéines 54 et 64 sont reliés par un pont disulfure,
- Une boucle extracellulaire EL2 de 27 acides aminés comportant un feuillet β ,
- Une queue C-terminale cytoplasmique de 27 acides aminés qui porte le motif de liaison au domaine PDZ : Tyrosine-Valine (Y-V).

La claudine 1 est exprimée de manière ubiquitaire dans la plupart des tissus du corps. Elle est fortement exprimée dans l'intestin, la rate, le cerveau, le foie, les reins, les testicules, les voies respiratoires, les poumons, les endothéliums, la vessie, l'épiderme, les yeux, les glandes salivaires, la glande mammaire, le pancréas exocrine, les ovaires, et la prostate (Bhat et al., 2020; Günzel & Yu, 2013a).

3) Régulation de l'expression de la claudine 1

De nombreux facteurs régulent la transcription du gène de la claudine 1. Ces différents acteurs sont des facteurs de transcription ou de croissance, des cytokines, des miR (microARN) ou des mécanismes de régulation épigénétiques. Ils peuvent être des activateurs ou des répresseurs de la transcription (Bhat et al., 2020).

Tableau 4 : Liste des facteurs de transcription répresseur de l'expression de la claudine 1

La zone de fixation des facteurs de transcription sur le promoteur de la claudine 1 par rapport à l'ATG est indiquée ainsi que les modèles cellulaires utilisés dans les différents travaux de recherche.

Facteurs répresseurs	Zone de fixation sur le promoteur de la claudine 1 par rapport à l'ATG	Modèles cellulaires
Snail/Slug	E-boxes -59 et -35	Cellules cancéreuses mammaires et Cellules épithéliales de rein canin (MDCK)
RON	E-boxes -59 et -35	Cellules cancéreuses mammaires (T47D) Cellules épithéliales de rein canin (MDCK)
Smad 4	-40	Cellules d'adénocarcinome colorectal (SW480 et SW620)
STAT3	Sites -1955, -1143 et -941	Cellules de carcinome hépatique (Huh-7)
DEC1	E-boxes ?	Carcinomes canaux mammaires invasifs (MCF7 et MDA-MB-231)
HES1	N-boxes ?	Cellules intestinales humaines (caco-2)
bHLHE40	Fragment -470 à -298	Carcinomes canaux mammaires invasifs (MCF7)

Tableau 5 : Liste des facteurs de transcription activateurs de l'expression de la claudine 1

La zone de fixation des facteurs de transcription sur le promoteur de la claudine 1 par rapport à l'ATG est indiquée ainsi que les modèles cellulaires utilisés dans les différents travaux de recherche. La mention ND signifie non déterminé

Facteurs activateurs	Zone de fixation sur le promoteur de la claudine 1 par rapport à l'ATG	Modèles cellulaires
NR3C1	GREs -259 et -700	Cellules intestinales humaines (caco-2)
NFκBp65	-310 à -301	Cellules de carcinome cervical (HeLa) Cellules de carcinome hépatique (HepG2)
Cdx 1 et 2	-1160 à -850	Cellules cancéreuses du côlon humain (SW480 et HCT116)
GATA4	-1160 à -850	Cellules cancéreuses du côlon humain (SW480 et HCT116)
P63	-280 à -245 -1393 à -1299	Kératinocytes murins Cellules de carcinome de poumons (H1299)
HIF1α HIF2α	HRE -226 et -590	Cellules intestinales humaines (caco-2) Cellules de carcinome cervical (HeLa)
TCF4	-689 et -1055	Cellules cancéreuses du côlon humain (SW480)
RUNX3	-1143 à -1134 -1132 à -1123 -1088 à -1079	Cellules de carcinome gastrique (AGS)
SP-1/BRM	-138 à -76	Cellules épithéliales intestinales de rat (IEC-6)
HFN-4α	ND	Cellules intestinales humaines (caco-2)
Sox9	Entre -41 et +57	Cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-468)
BHLHE41	ND	Carcinomes canaux mammaires invasifs (MCF7)

a) Les facteurs de transcriptions

Les **facteurs de transcription répresseurs** sont les facteurs **Snail** et **Slug** (Martínez-Estrada et al., 2006), **RON** (Récepteur d'Origine Nantais) (K. Zhang et al., 2008), **Smad 4** (Shiou et al., 2007), **STAT3** (Signal transducer and activator of transcription 3) (Y.-J. Chen et al., 2017), **DEC1** (Differentiated Embryo-Chondrocytes expressed gene 1) (Y. Liu et al., 2013, p. 1), **HES1** (Hairy and Enhancer of Split-1) (G. Zheng et al., 2017), et **bHLHE40** (basic helix-loop-helix family member e40) (Q. Zheng et al., 2018) (**Tableau 4**).

Les **facteurs de transcription activateurs** de l'expression de la claudine 1 sont **NR3C1** (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member) (G. Zheng et al., 2017), **NFκBp65** (Nuclear Factor-kappa B sous-unité p65) (Fortier et al., 2013), les facteurs **Cdx 1 et 2** (Caudal Homeobox-1 and 2), **GATA4** (Bhat et al., 2012), **P63** (Lopardo et al., 2008), **HIF1α** et **HIF2α** (Hypoxia Inducible Factor 1 et 2 α) (Saeedi et al., 2015), **TCF4/β-caténine** (Miwa et al., 2001; Shiou et al., 2007), **RUNX3** (Runt-related transcription factor 3) (Chang et al., 2010, p. 3), **SP-1/BRM** (Specificity Protein 1/ Protein brahma homolog) (H.-B. Wang et al., 2012; Y. Yang et al., 2019), **HFN-4α** (hepatocyte nuclear factor-4) (Zhong et al., 2010), **Sox9** (SRY-box 9) (Y. Ma et al., 2020), et **BHLHE41** (D. Zhang et al., 2020) (**Tableau 5**).

b) Les facteurs de croissance

Certains **facteurs de croissance** régulent également l'expression de la claudine 1 (**Tableau 6**). L'**EGF** (Epidermal Growth Factor) induit la transcription et l'expression de la claudine 1 (Grände et al., 2002; Singh & Harris, 2004) alors que le **TGF-β** (Transforming growth factor beta) réprime son expression sans modifier le niveau de son ARNm (Kojima et al., 2008).

c) Les cytokines

De nombreuses **cytokines** modulent l'expression de la claudine 1 (**Tableau 6**). Les cytokines connues pour réprimer l'expression de la claudine 1 sont : l'**IFNγ** (Interferon γ) (Tedelind et al., 2003; Watson et al., 2005; X. Wei et al., 2009), l'**IL-4**, l'**IL-6** et l'**IL-13** (Interleukine -4, 6 et 13) (Fujita et al., 2011; S.-S. Kim et al., 2017). Les cytokines connues

Tableau 6 : Liste des autres facteurs qui régulent l'expression de la claudine 1

De nombreux facteurs régulent la transcription du gène de la claudine 1. Ces différents acteurs sont des facteurs de croissance et des cytokines. Ces facteurs peuvent être des répresseurs (rouge) ou des activateurs (vert) de la transcription ou de la traduction. Les modèles cellulaires utilisés dans les différents travaux de recherche sont précisés.

Type de facteurs	Facteurs répresseurs	Modèle cellulaire
Facteur de croissance	TGFβ	Hépatocyte de rat
Cytokine	IFNγ	Cellules épithéliales de parotide de rat (Par-C10), Thyrocytes humains, Cellules intestinales humaines (caco-2)
	IL-4	Cellules musculaires lisses
	IL-6	Cellules épithéliales des voies respiratoires
	IL-13	Cellules musculaires lisses
Type de facteurs	Facteurs activateurs	Modèle cellulaire
Facteur de croissance	EGF	Cellules épithéliales de rein canin (MDCK), Thyrocytes de cochon
Cytokine	TNFα	Cellules épithéliales de pancréas (PANC-1), Cellules épithéliales intestinale de rat (IEC-18), Cellules de carcinome de colon (HT29), Thyrocytes humains, Cellules épithéliales de parotide de rat (Par-C10)
	IL-17	Cellules épithéliales intestinales (T87)
	IL-1α	Thyrocytes humains
	IL-1β	Astrocytes humains

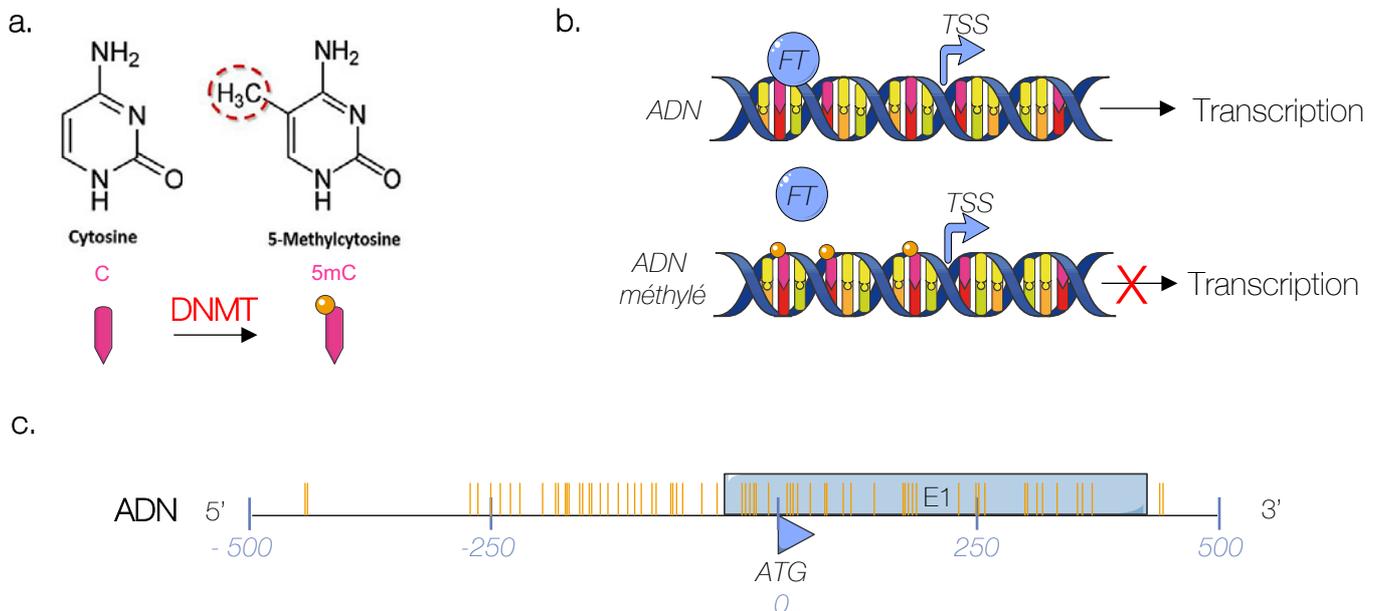


Figure 16 : La méthylation du gène de la claudine 1

a. La cytosine est convertie en 5-méthylcytosine par les enzymes DNMT ce qui permet à l'ADN d'être méthylé. **b.** Les 5-méthylcytosines bloquent la fixation des facteurs de transcription sur le promoteur des gènes et inhibent ainsi la transcription. **c.** Carte des îlots CpG du promoteur de la claudine 1 : l'emplacement des îlots CpG sont marqués par de fines marques verticales oranges sur la carte agrandie de la région de 1000 pb encadrant l'ATG. Un nombre élevé d'îlot CpG est retrouvé sur la zone de 500 pb entourant l'ATG. *D'après Di Cello et al., 2013*

induisant son expression sont : l'**IL-17** (Kinugasa et al., 2000), l'**IL-1 α** (Tedelind et al., 2003), l'**IL-1 β** (Duffy et al., 2000; Fujita et al., 2011), et le **TNF α** (Tumor Necrosis Factors α) (Baker et al., 2008; Bhat et al., 2016; Fujita et al., 2011; Kondo et al., 2008; Poritz et al., 2011; Tedelind et al., 2003).

d) La régulation épigénétique de l'expression du gène de la claudine 1

L'expression de la claudine 1 est aussi régulée par des modifications épigénétiques comme la méthylation de son promoteur. La **méthylation** régule l'expression d'un gène par l'ajout d'un groupement méthyl au niveau du carbone 5 d'une cytosine par une méthyltransférase (DNMT) (**Figure 16a**). Les 5-méthylcytosines sont concentrées au sein des îlots CpG (Cytosine phosphate Guanine) qui se trouvent essentiellement dans les régions proximales des promoteurs. Les groupements méthyles bloquent la fixation des facteurs de transcription sur le promoteur et inhibent sa transcription (**Figure 16b**). Un gène faiblement méthylé sera, le plus souvent, fortement exprimé ; alors qu'un gène hautement méthylé sera faiblement exprimé.

Le promoteur de la claudine 1 comporte des îlots CpG dans la région -430 à -500 par rapport à l'ATG (**Figure 13**) (Krämer et al., 2000). En effet, la base de données The Cancer Genome Atlas (TCGA) montre que le gène de la claudine 1 fait partie du groupe de gènes hautement **méthylé** dans les tumeurs mammaires (Cancer Genome Atlas Network, 2012). L'équipe de Di Cello a étudié spécifiquement la méthylation du gène de la claudine 1 et a mis en évidence un nombre élevé d'îlots CpG sur la portion de 500 pb entourant l'ATG (**Figure 16c**). Il montre également qu'il existe une corrélation entre la régulation négative de l'expression de la claudine 1 et la méthylation de son promoteur au niveau de ces îlots CpG (Di Cello et al., 2013).

e) La régulation post-transcriptionnelle

La régulation **post-transcriptionnelle** comprend tous les mécanismes de régulation de l'expression des gènes affectant les **ARN** (**Tableau 7**). Les principales régulations post-transcriptionnelles de l'expression de la claudine 1 connues à ce jour reposent sur les **microARN**. Les miARN sont capables d'éteindre l'expression d'un gène en s'appariant à un ARNm ce qui aboutit à l'inhibition de sa traduction ou à sa dégradation selon le degré

Tableau 7 : Liste des microARN et des protéines qui se lie à l'ARN de la claudine 1 et régulent son expression

La région de fixation des miARN et des protéines sur la région 3'UTR de l'ARNm de la claudine 1 est précisée ainsi que les modèles cellulaires utilisés pour leur mise en évidence.

Facteurs activateurs	Région ciblée de l'ARNm	Modèles cellulaires
miR 155	3'UTR (AGCAUUA)	CSC ovariennes humaines isolée de patients Cellules de la barrière hématoencéphalique hCMEC/D3
miR 29	3'UTR (UGGUGCUA)	Souris miRNA-29 ^{-/-} et issus intestinal de patient Cellules de carcinome hépatique HepG2 et HLE et tissus de carcinome hépatique humain Cellules épithéliales de l'intestin porcine IPEC-1
miR 142-5P	3'UTR (ACUUUUAU)	Tissus de thyroïde humain Culture primaire de thyrocytes Cellules épithéliales de rein humain HEK293T
miR 375	3'UTR (GAACAAA)	Cellules cancéreuses pulmonaires A549, H1650, H1975, H358 et SK-MES-1
miR 101-3P	3'UTR (UUAXCAXXXXGUACUGU)	Cellules de rein embryonnaires humaines HEK-293
miR 31-3P	3'UTR (CAUAGCA)	Kératinocytes humains immortalisés HaCaT
Protéine HuR	3'UTR (AUUUA)	Cellules cancéreuses de côlon SW480 et SW620
Protéine Tristetraprolin	3'UTR (AUUUA)	Cellules cancéreuses de côlon SW480 et SW620

Tableau 8 : Les modifications post-traductionnelles de la claudine 1

Le tableau reprend les différents domaines de la claudine 1, leur position et leur séquence d'acides aminés. Les sites de phosphorylation sont surlignés en bleu tandis que les sites de palmitoylation sont surlignés en rose. D'après Shi et al., 2018 et Butt et al., 2012.

Domaines	Position	Séquence en acides aminés
N-ter	1-7	MANAGLQ
I	8-28	LLGFILAFLGWIGAVSTALP
EL1	29-81	QWRIYSYAGDNIVTAQAMYEGLWMSCVVSQSTGQIQCKVFDSLNLSTLQATR
II	82-102	ALMVGILLGVIAIFVATVGM
IL	103-115	K [◻] OMK [◻] LEDDEVQK
III	116-136	MRMAVIGGAIFLLAGLAILVA
EL2	137-163	TAWYGNRIVQEFYDPMTPVNARYEFGQ
IV	164-184	ALFTGWAAASLCLLGGALL [◻] CC
C-ter	185-211	S [◻] CPRK [◻] TTSYPT [◻] PRYPKPAP [◻] SSGKD [◻] Y [◻] V

de complémentarité entre la séquence du miARN et celle de son ARNm cible (Xie et al., 2005). Il a été démontré que de nombreux miARN ciblent la région 3'UTR de l'ARNm de la claudine 1 et régulent négativement son expression comme par exemple les **miR 155** (Etzrodt et al., 2021; B. Zhou, Moodie, et al., 2015), **miR 29** (Mahati et al., 2017; Q. Zhou et al., 2015; Y. Zhu et al., 2017), **miR 142-5p** (J. Zhu et al., 2016), **miR 375** (Mao et al., 2021; Yoda et al., 2014), **miR 101-3p** (Du et al., 2021) et **miR 31-3p** (Tu et al., 2020). La base de données expérimentales miRTarBase indique que trente autres miARN ciblent la claudine 1 dans sa région 3'UTR (Chou et al., 2016).

La protéine **HuR** (human antigen R) qui stabilise le transcrite de la claudine 1 alors que la **tristetraprolin** le déstabilise. Ces protéines se lient sur des séquences AUUUA qui sont des ARE (AU-rich element) dans la région 3'UTR de l'ARNm de la claudine 1 (Sharma et al., 2013).

4) Localisation, recyclage et dégradation de la claudine 1

a) Les modifications post-traductionnelles

Les **modifications post-traductionnelles** de la claudine 1 jouent un rôle important pour sa localisation membranaire (**Tableau 8**).

Les **phosphorylations** de la queue C-terminale de la claudine 1 sont fortement impliquées dans sa localisation membranaire (Günzel & Yu, 2013a). Ainsi, une délétion de la queue C-terminale de la claudine 1 engendre sa rétention au niveau cytoplasmique (Ruffer, 2004). Il a par ailleurs été montré que **la phosphorylation** de la claudine 1 favorise son insertion dans la membrane plasmique (Günzel & Yu, 2013a; Van Itallie & Anderson, 2006). Les kinases MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), PKC, PKA et PKG sont capables de phosphoryler la queue C-terminale de la claudine 1 sur plusieurs sites :

- Les serines 192, 205 et 206
- Les thréonines 190, 191 et 195
- La tyrosines 193 et 210

Les mutations des sites de phosphorylation de la claudine 1 induisent la délocalisation membranaire de la claudine 1 (Angelow et al., 2008; Butt et al., 2012; Fujibe et al., 2004;

Günzel & Yu, 2013a; Z. Lu et al., 2011; Morin, 2005; Shi et al., 2018; Shigetomi & Ikenouchi, 2018). De même, la **déphosphorylation** de la claudine 1 induite par PP2A induit sa délocalisation des jonctions serrées et son accumulation dans le cytoplasme (Nita-Lazar et al., 2010).

La **palmitoylation** des claudines est nécessaire pour leur localisation aux jonctions serrées. Elle crée une liaison covalente entre les cystéines et l'acide palmitique. Les sites de **palmitoylation** de la claudine 1 sont contenus entre les domaines membranaires et cytoplasmiques (Butt et al., 2012; Lynch et al., 2007; Van Itallie et al., 2005) :

- Les cystéines 104 et 107 de la boucle IL
- Les cystéines 183, 184 du 4^{ème} domaine transmembranaire
- La cystéine 186 de la queue C-terminale

b) Le recyclage et la dégradation de la claudine 1

L'internalisation des protéines membranaires est un mécanisme clé régulant la plasticité et la fonction des jonctions serrées dans les tissus épithéliaux et endothéliaux. Les protéines des jonctions serrées sont internalisées dans les endosomes et leur trafic dépend directement du stimulus initial et des voies de signalisation en aval qui régulent le tri des protéines. Les protéines seront alors dirigées soit vers le **recyclage à la membrane plasmique**, soit vers les **endosomes tardifs et les lysosomes**. Les endosomes sont identifiés comme précoces, tardifs ou de recyclage en fonction de l'activation de différents membres de la superfamille des Ras, les Rab-GTPase (**Figure 17**) (Stamatovic et al., 2017b).

La claudine 1 est constamment endocytée et **recyclée à la membrane plasmique** dans différents types de cellules épithéliales (Matsuda et al., 2004; Yu & Turner, 2008). De nombreuses protéines sont impliquées dans la localisation membranaire de la claudine 1. Le complexe protéique **ESCRT** (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) joue un rôle bien établi dans le trafic des protéines transmembranaires. En effet l'inhibition de ce complexe entraîne l'accumulation intracellulaire de la claudine 1 mais pas sa dégradation puisqu'elle n'est pas colocalisée avec LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1), un marqueur lysosomal. Le recyclage et la localisation

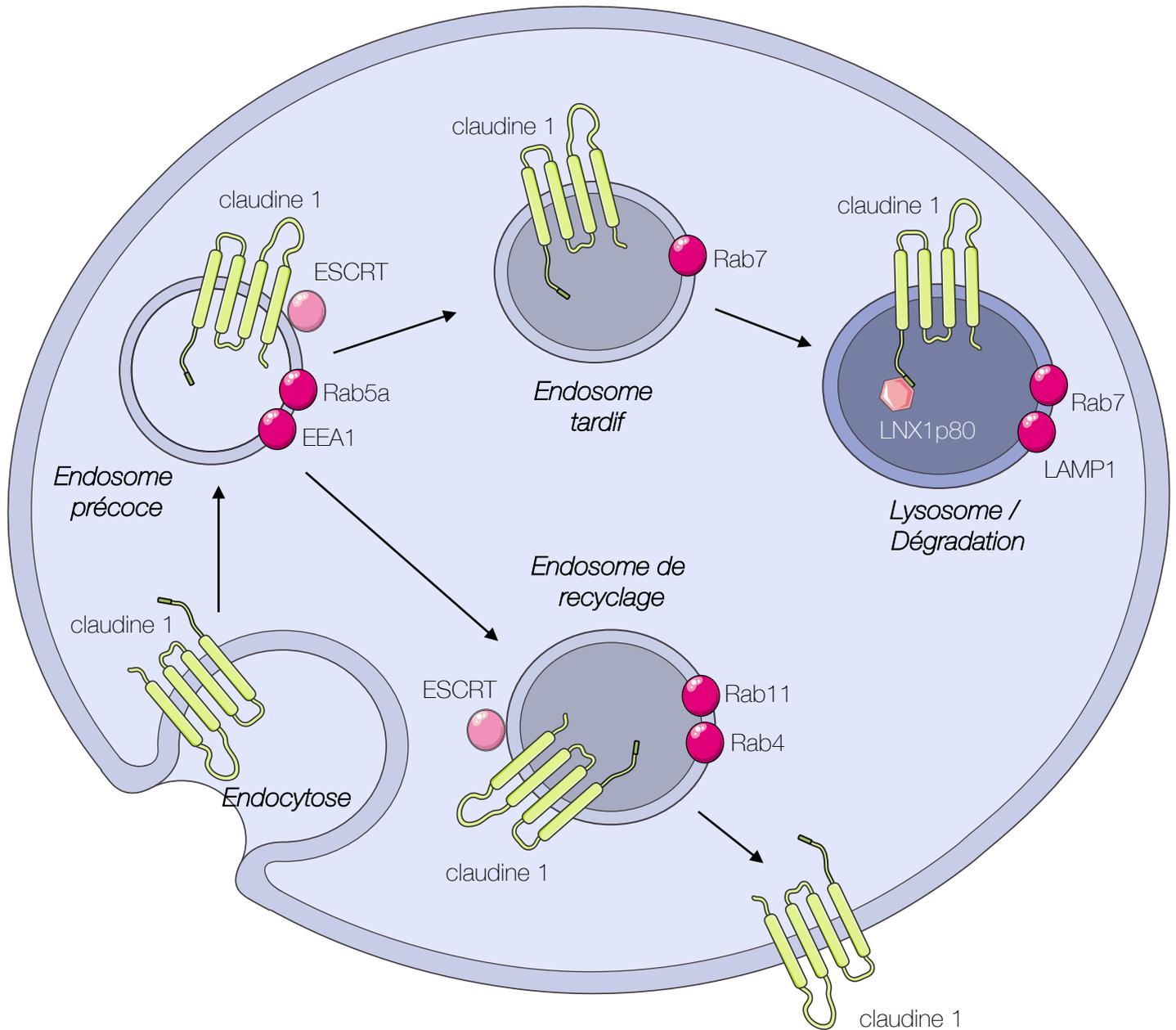


Figure 17 : Recyclage et dégradation de la claudine 1

La claudine 1 est internalisée par endocytose dans les endosomes précoces qui portent les marqueurs EEA1 et Rab5a. Le devenir des protéines sera alors soit le recyclage vers la membrane plasmique dans les endosomes de recyclage, soit la dégradation vers les endosomes tardifs et les lysosomes. Les endosomes de recyclage portent les marqueurs Rab11 et Rab4, les endosomes tardifs présentent le marqueurs Rab7 et les lysosomes portent les marqueurs Rab7 et LAMP1. Le recyclage de la claudine 1 à la membrane plasmique dépend du complexe ESCRT et sa dégradation dépend de la liaison de LNX1p80 sur le motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1.

membranaire de la claudine 1 sont donc dépendants du complexe ESCRT dans les cellules épithéliales (Dukes et al., 2011). L'inhibition du protéasome induit également la colocalisation de la claudine 1 avec Rab5A et EEA1 (Early Endosome Antigen 1) dans des endosomes précoces. Ainsi, le protéasome joue aussi un rôle dans la localisation membranaire de la claudine 1 (Asaka et al., 2011).

La localisation intracellulaire de la claudine 1 a été mise en évidence en réponse à différents stimuli (Yu & Turner, 2008). Par exemple, la **déplétion en calcium** extracellulaire induit l'endocytose de la claudine 1 (González-Mariscal et al., 2008; Ivanov et al., 2004). L'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le **TNF α** et l'**IFN γ** induisent le même processus (Amasheh et al., 2010; Citalán-Madrid et al., 2013). L'**IFN γ** induit l'endocytose de la claudine 1 et sa colocalisation avec le **marqueur endosomal précoce** EEA1 et avec les **marqueurs de recyclage endosomaux** Rab4 et Rab11. La claudine 1 n'est cependant pas colocalisée avec les marqueurs lysosomal tels que LAMP1 démontrant que la claudine 1 n'est pas dégradée sous l'effet de l'IFN γ (Bruewer et al., 2005). Par ailleurs, elle est recyclée à la membrane apicale lorsque l'IFN γ est éliminé (Citalán-Madrid et al., 2013).

c) La dégradation de la claudine 1

Les protéines ubiquitinées sont dégradées lorsqu'elles se retrouvent dans les **endosomes tardifs** et les **lysosomes** (Figure 17). Les endosomes tardifs sont générés à partir des endosomes précoces par l'augmentation de l'acidification luminale et l'expression du marqueur Rab7 (Stamatovic et al., 2017b). Selon la base de données PhosphoSitePlus, la claudine 1 contient des sites **d'ubiquitination**.

La protéine **LNx1p80** (Ligand-of-Numb protein X) engendre la délocalisation membranaire et la dégradation de la claudine 1. Elle induit l'ubiquitination de la claudine 1 en se liant à son motif de liaison au domaine PDZ. Cette dernière est alors localisée dans les **endosomes tardifs** puis dégradée dans les **lysosomes** où elle est alors colocalisée avec les marqueurs Rab7 et LAMP1 (Günzel & Yu, 2013a; Shigetomi & Ikenouchi, 2018; Stamatovic et al., 2017b; Takahashi et al., 2009). De plus, la claudine 1 excédentaire, non incorporée à la membrane plasmique, est mono-ubiquitinée sur la lysine 189 et est

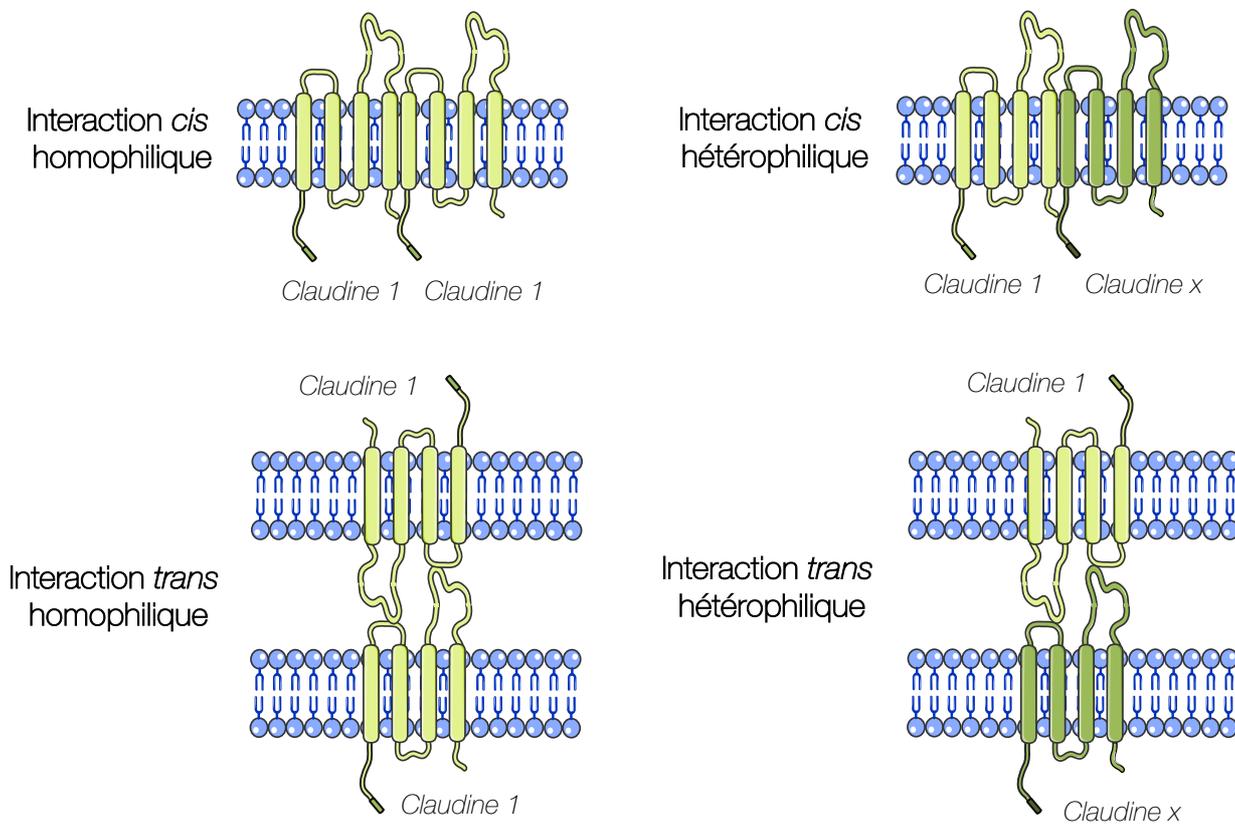


Figure 18 : Les différents types d'interactions de la claudine 1 avec les autres claudines

La claudine 1 se lie avec les autres claudines via l'interaction des boucles extracellulaires EL1 et EL2. Les interactions *cis* concernent les liaisons qu'effectue la claudine 1 avec les autres claudines localisées sur la même cellule. Les interactions *trans* concernent les liaisons de la claudine 1 avec les claudines localisées sur deux cellules différentes. Les interactions *cis* et *trans* peuvent être homophiliques (homodimérisation de la claudine 1), ou hétérophiliques (entre la claudine 1 et une autre claudine : hétérodimérisation). D'après Krause et al., 2008

Tableau 9 : Interactions de la claudine 1 avec les autres claudines

Le tableau reprend les différentes interactions de la claudine 1 avec les autres claudines. Le type d'interaction (*cis* et *trans*) est précisé.

Claudines	<i>Cis</i>	<i>Trans</i>
Claudine 1	✓	✓
Claudine 2	✓	✗
Claudine 3	✓	✓
Claudine 4	✓	✓
Claudine 5	✓	✓
Claudine 6	✓	✗
Claudine 7	✓	✗
Claudine 9	✓	✗

dégradée par protéolyse dans les lysosomes des cellules épithéliales (Shigetomi & Ikenouchi, 2018; Takahashi et al., 2009).

5) L'interactome de la claudine 1 et les différents rôles de ses partenaires

Nous avons vu précédemment que les claudines sont capables d'interagir avec un grand nombre de protéines. Les nombreux partenaires protéiques de la claudine 1 présentent des rôles très variés : architecture des jonctions serrées, transport de la claudine 1, adhérence, migration et prolifération cellulaire, apoptose, progression tumorale, signalisation immunitaire et entrée des virus dans les cellules.

a) Interaction de la claudine 1 avec les protéines des jonctions serrées

La claudine 1 interagit avec les autres claudines grâce aux boucles extracellulaires EL1 et EL2. Ces boucles permettent les interactions *cis* et *trans* de la claudine 1 de type homophiliques (homodimérisation) ou hétérophiliques (hétérodimérisation) (**Figure 18 ; Tableau 9**) (Daugherty et al., 2007; Krause et al., 2008; Suzuki et al., 2017; Van Itallie & Anderson, 2013). La **claudine 1** s'homodimérise en *cis* et en *trans*. Les acides aminés 53 à 80 de la boucle EL1 sont responsables de l'interaction *trans* de la claudine 1 (Daugherty et al., 2007; Krause et al., 2008; Mrsny et al., 2008). La claudine 1 établit également des interactions hétérophiliques *cis* et *trans* avec la **claudine 3** (Angelow et al., 2008; Furuse et al., 1999; Krause et al., 2008; Lim et al., 2008), la **claudine 4** (Harris et al., 2010; Turksen, 2004) et la **claudine 5** (Coyne et al., 2003; Piontek et al., 2011; Van Itallie & Anderson, 2013).

Elle établit aussi des interactions *cis* avec la **claudine 2** (Furuse et al., 1999; Lim et al., 2008), la **claudine 6**, la **claudine 9** (Harris et al., 2010) et la **claudine 7** (Z. Lu et al., 2011; C.-J. Wu et al., 2013).

L'**occludine** interagit avec la claudine 1 *via* les acides aminés 32 et 48 de la boucle EL1 (Harris et al., 2010; Mrsny et al., 2008). Il a été montré que la claudine 1 est colocalisée avec la **tricelluline** et **MarvelD3** mais leurs interactions avec la claudine 1 ne sont pas démontrées (Cording et al., 2012). D'autres travaux suggèrent que les TAMPs pourraient

Tableau 10 : Les partenaires de la claudine 1

Les partenaires de la claudine 1 ont été répertoriés selon leur fonction. Le tableau précise également les caractéristiques des partenaires ainsi que les bases de données et références bibliographiques qui ont permis de mettre en évidence les interactions avec la claudine 1.

Fonction	Partenaire de la claudine 1	Caractéristiques	Base de données /référence
Architecture des jonctions serrées	Trop2	Transmembranaire	IntAct, I2D, GPSprot, Genemania (Nakatsukasa et al., 2010; Trerotola et al., 2012; Wu et al., 2020)
	EpCAM	Transmembranaire (jonctions serrées)	(Wu et al., 2013)
	WNK4	Serine/thréonine kinase (Jonctions serrées)	I2D, GPSprot, pathwaycommons
	KRT76	Cytokeratine	(Liu et al., 2016; DiTommaso et al., 2014)
	FNDC9	Fibronectine (Transmembranaire)	Biogrid, IntAct (Luck et al., 2020)
Transport de la claudine 1	Sec24c	Membrane du réticulum endoplasmique	(Yin et al., 2017)
	TMEM9	Membrane des endosomes tardifs et lysosomes	Biogrid, IntAct, pathwaycommons (Luck et al., 2020)
	ARF6	Membrane des endosomes	Biogrid (Go et al., 2021)
	LAMP3	Membrane des lysosomes	
	LAMTOR1	Membrane des endosomes tardifs et lysosomes	
	RAB35	Membrane plasmique et des endosomes (Famille de Ras)	
Adhérence cellulaire	ESAM	Transmembranaire (jonctions serrées et adhérentes)	Genemania
	PECAM	(Transmembranaire dans toutes les jonctions)	
Migration	MMP2	Métalloprotéinases	I2D, GPSprot, Genemania, pathwaycommons (Liu et al., 2016)
	MMP14		
	Ephrine B	Récepteur tyrosine kinase (noyaux et membrane plasmique)	(Tanaka et al., 2005; Zhou et al., 2015; Liu et al., 2016)
	Integrine α 2	Transmembranaire	(Ding et al., 2012)
Prolifération	DRG1	GTPase	Biogrid, I2D, GPSprot, pathwaycommons

aussi former des interactions *cis* avec les domaines transmembranaires ou la queue C-terminale de la claudine 1 (Cording et al., 2012; Ikenouchi et al., 2008).

Enfin la claudine 1 interagit aussi avec les **protéines de la plaque cytoplasmique** au niveau de la séquence YV de son motif de liaison au domaine PDZ (Van Itallie & Anderson, 2013). **ZO-1**, **ZO-2** et **ZO-3** se fixent à la claudine 1 *via* leur 1^{er} domaine PDZ (Daugherty et al., 2007; Itoh et al., 1999; Mrsny et al., 2008; Umeda et al., 2006), **PATJ** et **MPDZ** interagissent avec la claudine 1 *via* leur 8^{ème} et 10^{ème} domaine PDZ respectivement (Hamazaki et al., 2002; Poliak et al., 2002; Roh et al., 2002).

b) Les autres partenaires de la claudine 1

Les différents partenaires de la claudine 1 ne faisant pas partie des jonctions serrées ont été répertoriés en fonction de leurs rôles grâce aux banques de données suivantes : IntAct, Biogrid, String, GPSprot, MINT (Molecular INTERaction database), HPRD (Human Protein Reference Database), GeneMANIA, I2D (interologous interaction database), innatdb et InterPro (**Tableau 10 ; Figure 19**).

i) Partenaires impliqués dans l'architecture des jonctions serrées

Certains partenaires de la claudine 1 sont impliqués dans l'organisation, la formation et le maintien des jonctions serrées.

- Dans ce contexte, **TROP2** (TROPhoblast cell surface antigen 2) est une protéine transmembranaire impliquée dans l'inhibition de la migration des cellules épithéliales et la différenciation cellulaire. Des travaux ont mis en évidence que Trop2 interagit directement avec la claudine 1 et qu'il induit sa stabilisation dans les jonctions serrées (Nakatsukasa et al., 2010; Trerotola et al., 2012; C.-J. Wu et al., 2020).
- **EpCAM** (Epithelial cell adhesion molecule) est une glycoprotéine transmembranaire exprimée dans les épithéliums et certains carcinomes invasifs. Elle est généralement localisée aux contacts latéraux des cellules épithéliales polarisées, au niveau des jonctions serrées. Les travaux de Wu ont mis en évidence que l'interaction physique entre la claudine 1 et EpCAM dans les cellules épithéliales protège la claudine 1 de la dégradation et la maintient à la membrane

Tableau 10 bis : Les partenaires de la claudine 1

Les partenaires de la claudine 1 ont été répertoriés selon leur fonction. Le tableau précise également les caractéristiques des partenaires ainsi que les bases de données et références bibliographiques qui ont permis de mettre en évidence les interactions avec la claudine 1.

Fonction	Partenaire de la claudine 1	Caractéristiques	Base de données /référence
Apoptose	PERP	Transmembranaire (desmosomes)	Genemania
	RhoB	GTP-binding protéine Suppresseur de tumeur (Membrane des endosomes tardifs et noyaux)	Biogrid (Go et al., 2021)
Carcinogénèse	CD9	Suppresseur de tumeur/oncogène Transmembranaire	(Kovalenko et al., 2007)
	HRAS	Famille de Ras (Membranes plasmique, cytoplasme, noyaux)	Biogrid
	KRAS		Biogrid, pathwaycommons
	BRD4	Associé à la chromatine (Noyaux)	I2D, GPSprot
	Src / ZO1	Tyrosine kinase (Noyaux, cytoplasme et membrane)	(Liu et al., 2016; Singh et al., 2012)
Signalisation immunitaire	CD69	Transduction de signal (Transmembranaire)	Biogrid, IntAct, pathwaycommons (Luck et al., 2020)
	CD79A		
	MS4A3	Tyrosine kinase (Perinucléaire)	
	TMEM179B	Transporteur transmembranaire et nucléaire	Biogrid, IntAct (Luck et al., 2020)
Entrée du virus dans les cellules	Virus de l'hépatite C / CD81	Virus	String (Bonander et al., 2013; Davis et al., 2012; Harris et al., 2010)
	Virus de la dengue		(Che et al., 2013)
ND	Virus sarsCov2	Virus	Biogrid

plasmique. De plus, ce contact physique s'est avéré nécessaire pour la localisation membranaire de la claudine 1 et la stabilisation des jonctions serrées (C.-J. Wu et al., 2013, 2020; B. Zhou, Moodie, et al., 2015).

- **WNK4** (protein kinase with no lysine 4) est une serine/thréonine kinase qui fait partie du complexe des jonctions serrées. WNK4 se lie à la claudine 1 et la phosphoryle permettant ainsi son ancrage membranaire (Paris et al., 2008).
- La **KRT76** (cytokératine 76) interagit avec la claudine 1 et cette interaction est nécessaire pour la localisation membranaire de la claudine 1 dans les jonctions serrées (DiTommaso et al., 2014).
- En 2020, les travaux de Luck ont montré que **FNDC9** (Fibronectin type III domain containing 9) interagit avec la claudine 1 mais les conséquences de cette interaction sont encore inconnues. FNDC9 est une protéine transmembranaire impliquée dans l'organisation du cytosquelette sous-membranaire (He et al., 2017; Luck et al., 2020).

ii) Partenaires impliqués dans le transport vésiculaire

Les partenaires protéiques de la claudine 1 les plus récemment identifiés sont impliqués dans le transport vésiculaire des protéines dans les endosomes, les lysosomes et la membrane plasmique.

- **Sec24c** interagit avec la claudine 1 *via* son motif de liaison au domaine PDZ et permet le transport de la claudine 1 depuis le réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Yin et al., 2017).
- En 2020 et 2021, les équipes de Luck et de Go ont montré par expérience de 2-hybrid-assay et par Proximity Label-MS respectivement que **TMEM9** (Transmembrane protein 9) (Luck et al., 2020), **ARF6** (ADP-ribosylation factor 6), **LAMP3** (lysosomal-associated membrane protein 3), **LAMTOR1** (late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1) et **Rab35** (Ras-related protein 35) (Go et al., 2021) interagissent avec la claudine 1. Les répercussions biologiques de ces interactions avec la claudine 1 ne sont cependant pas encore déterminées. TMEM9 est impliquée dans le transport des protéines dans les endosomes et les lysosomes (Jung et al., 2018). ARF6 et Rab35 participent au transport des protéines transmembranaires dans les endosomes de

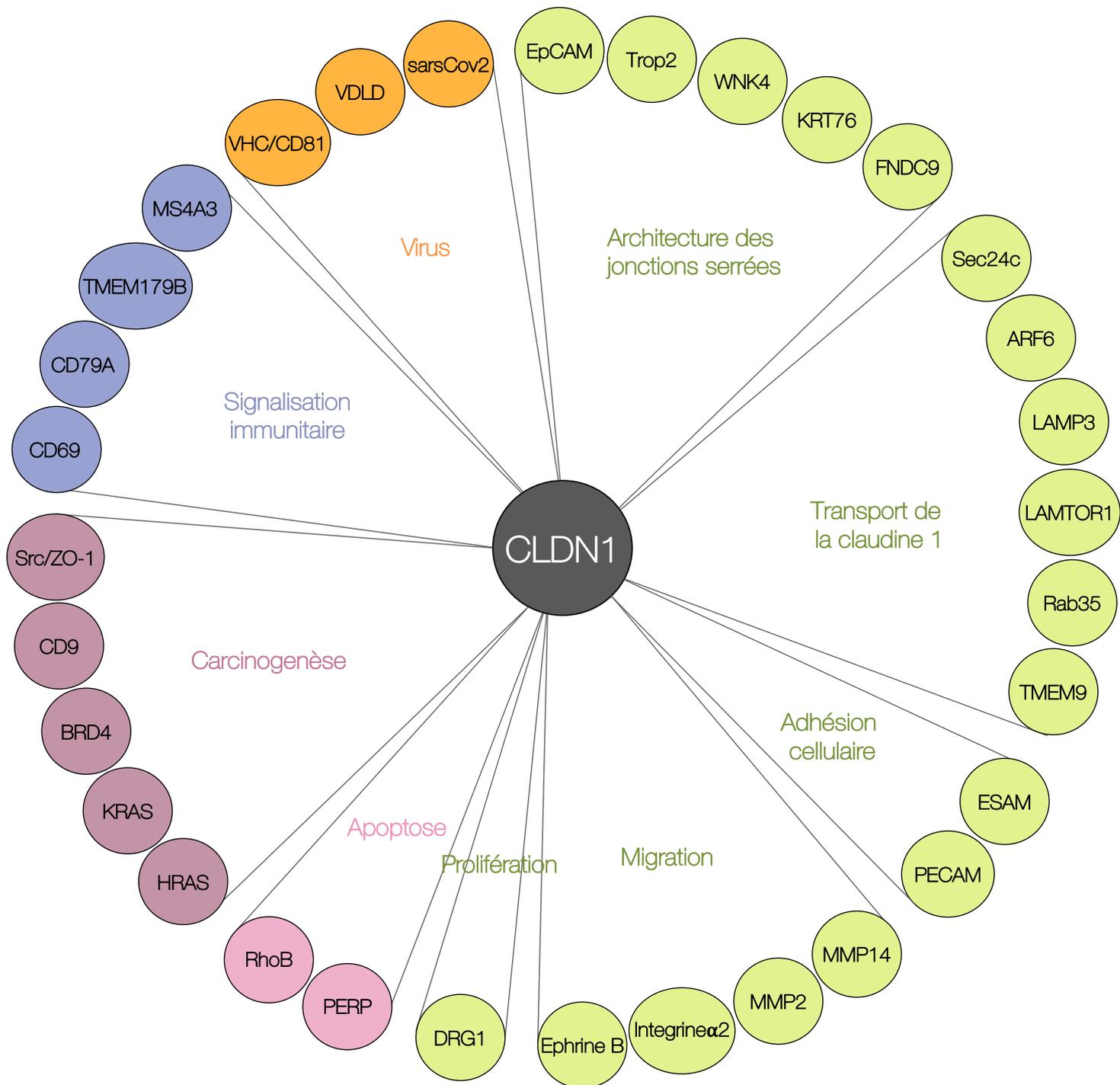


Figure 19 : Interactome de la claudine 1

Les différents partenaires protéiques de la claudine 1 sont répertoriés en fonction de leur rôle

recyclage (Kouranti et al., 2006, p. 35; Van Acker et al., 2019). LAMP3 et LAMTOR1 sont impliqués dans la biogenèse des endosomes tardifs et des lysosomes (Alessandrini et al., 2017; Nowosad et al., 2020).

iii) Partenaires impliqués dans l'adhérence cellulaire

D'après la banque de données geneMANIA, la claudine 1 interagit physiquement avec les protéines membranaires **ESAM** (Endothelial cell adhesion molecule) et **PECAM** (platelet and endothelial cell adhesion molecule). Ce sont des protéines transmembranaires exprimées dans les cellules endothéliales au niveau des jonctions qui maintiennent l'adhérence cellulaire. Par ailleurs, la claudine 1 et PECAM sont colocalisées dans de nombreux tissus (Liévano et al., 2006; Pfeiffer et al., 2011).

iv) Partenaires impliqués dans la migration cellulaire

Il a été démontré que d'autres partenaires de la claudine 1 comme les MMP (matrix metalloproteinases), l'éphrine B et l'intégrine $\alpha 2$ sont impliqués dans la migration cellulaire.

- Les MMPs sont des protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. La claudine 1 interagit avec **MMP 2** et **MMP14** ce qui facilite leur recrutement aux jonctions serrées, augmente l'activation de MMP2 dépendante de MMP14 et conduit à la migration des cellules (Miyamori et al., 2001).
- L'**Ephrine B** est un récepteur tyrosine kinase qui interagit avec la boucle EL1 de la claudine 1 à la membrane plasmique. Cette interaction avec la claudine 1 induit la phosphorylation de l'éphrine B ce qui entraîne la migration et l'invasion cellulaire via l'exocytose des MMP (Tanaka et al., 2005; B. Zhou, Moodie, et al., 2015).
- Enfin, la claudine 1 forme un complexe avec **l'intégrine $\alpha 2$** ce qui augmente l'expression des MMP et induit une perte de l'adhérence cellulaire (Ding et al., 2012; B. Zhou, Moodie, et al., 2015).

v) Partenaire impliqué dans la prolifération cellulaire

Le seul partenaire de la claudine 1 qui présente un rôle dans la prolifération cellulaire est **DRG1** (developmentally regulated GTP binding protein 1). DRG1 se lie à la claudine 1 et

est impliqué dans la prolifération cellulaire, cependant, la conséquence de cette interaction n'est pas connue (F. Liu, Koval, et al., 2016; J. Wang et al., 2011).

vi) Partenaires impliqués dans l'apoptose

La claudine 1 et **PERP** (p53 apoptosis effector related to PMP22) font parties de la même famille protéique que les claudines (Price et al., 2005; Simske, 2013). Selon la banque de donnée GeneMANIA, PERP et la claudine 1 sont coexprimées et pourraient interagir ensemble dans les cellules tumorales (Dobbin et al., 2005; Duchatelet et al., 2019; Ramaswamy et al., 2001). PERP est une protéine transmembranaire identifiée à l'origine comme un effecteur apoptotique de p53 et qui est également impliquée dans la formation des desmosomes. PERP est un suppresseur de tumeur qui induit l'apoptose des cellules cancéreuses. En effet, l'inhibition de PERP dans l'épiderme prédispose les souris mutantes au développement de carcinome (Chung et al., 2011). Bien qu'aucune interaction physique entre PERP et la claudine 1 n'ai été démontrée, les deux protéines étaient colocalisées au sein des épithéliums (Franke et al., 2013).

En 2021, l'équipe de Go démontre par Proximity Label-MS que **RhoB** (ras homolog family member B), un suppresseur de tumeur, interagit avec la claudine 1 (Go et al., 2021). RhoB est impliqué dans l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses et sa délétion induit la formation de tumeurs dans les tissus sains. Il est, par ailleurs, requis pour la mort cellulaire induite par des dommages de l'ADN dans les cellules cancéreuses mammaires (Srougi & Burridge, 2011).

vii) Partenaires impliqués dans la progression tumorale

Certains partenaires de la claudine 1 comme CD9 (cluster de différenciation 9), HRAS (Harvey Rat sarcoma virus), KRAS (Kirsten rat sarcoma virus), BRD4 (Bromodomain-containing protein 4) et Src (sarcome) sont impliqués dans la carcinogenèse :

- **CD9** est une protéine transmembranaire qui s'assemble avec d'autres protéines dont la claudine 1 pour réguler l'invasion, la migration et la différenciation cellulaire. CD9 délocalise la claudine 1 de la membrane et empêche sa localisation aux jonctions serrées (B. Zhou, Moodie, et al., 2015). Les complexes CD9-claudine 1 sont alors cytoplasmiques (Kovalenko et al., 2007). Par ailleurs, CD9 pourrait favoriser la progression tumorale. Il contribue à l'augmentation de la TEM et par

conséquent induit la migration de cellules de lignées d'adénocarcinome pulmonaire humain et de myélome humain (Ikeyama et al., 1993; B. Zhou, Moodie, et al., 2015). De plus, la surexpression de CD9 dans le cancer du sein favorise le développement de métastases osseuses (Kischel et al., 2012; Rappa et al., 2015).

- Des études sur le protéome proximal des différentes isoformes de Ras dans le cancer indiquent que **HRAS** et **KRAS** pourraient interagir avec la claudine 1 du fait de leur forte proximité. Ces isoformes sont impliquées dans la progression tumorale de nombreux cancer épithéliaux (Go et al., 2021; Kovalski et al., 2019).
- La claudine 1 s'associe également avec **BRD4** (Stelzl et al., 2005), une protéine se liant à la chromatine et souvent requise pour l'expression d'oncogènes comme Myc dans les cancers hématologiques (Da Costa et al., 2013; F. Liu, Koval, et al., 2016).
- La claudine 1 s'associe aussi physiquement à **Src/p-Src** dans un complexe multi-protéique qui comprend également **ZO-1**. Ce complexe induit la résistance à l'anoikis qui est une apoptose induite lors de la perte de contacts cellule-matrice. La claudine 1 est responsable de cette résistance qui implique également Src, Akt et Bcl-2 dans des cellules de cancer colorectal (Singh et al., 2012).

viii) Partenaires impliqués dans la signalisation immunitaire

Certains partenaires de la claudine 1 sont impliqués dans la signalisation immunitaire. Il a été mis en évidence par des expériences 2-hybrid-assay que **CD69**, **CD79A**, **MS4A3** (membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3) et **TMEM179B** (Transmembrane protein 179B) se lient à la claudine 1 (Luck et al., 2020). Ces protéines transmembranaires sont fortement impliquées dans l'activation des cellules immunitaires (Luck et al., 2020).

ix) Interactions entre la claudine 1 et les virus

La claudine 1 fonctionne également comme un récepteur et constitue donc une porte d'entrée pour les virus (B. Zhou, Moodie, et al., 2015).

Dans ce contexte, la claudine 1 est un corécepteur nécessaire pour l'entrée du **virus de l'hépatite C** (VHC) dans les cellules (Yin et al., 2017). **CD81** est une glycoprotéine transmembranaire exprimée dans toutes les cellules épithéliales et endothéliales. En condition physiologique, elle permet la transduction des signaux de prolifération, de différenciation et de migration. CD81 forme un corécepteur en se complexant avec la boucle EL1 de la claudine 1 ce qui permet l'entrée du VHC dans les cellules hépatiques (Davis et al., 2012; Evans et al., 2007; Fukasawa, 2014; Harris et al., 2010; X. Wei et al., 2009). La glycoprotéine **sE2** du VHC se lie à CD81 et est principalement impliquée dans l'entrée du virus *via* la claudine 1 (Bonander et al., 2013; Davis et al., 2012; Harris et al., 2010).

La claudine 1 est également impliquée dans l'entrée du **virus de la dengue** (VDLD). Dans ce contexte, la **protéine prM** du VDLD se lie à la claudine 1 *via* la boucle EL1 ce qui induit l'entrée du virus dans la cellules (Che et al., 2013).

Enfin, il a récemment été montré que le **SARS-CoV-2** interagit avec la claudine 1 bien que les conséquences de cette interaction ne soient pas connues. Par ailleurs, après 24 h d'infection au SARS-CoV-2, l'expression de la claudine 1 augmente (Jang & Seo, 2020; Laurent et al., 2020; Stukalov et al., 2021).

6) Rôle physiologique et pathologique de la claudine 1

Le principal rôle physiologique de la claudine 1 est la formation des jonctions serrées ainsi que la régulation du flux paracellulaire. Ainsi, la surexpression de la claudine 1 dans des fibroblastes de souris dépourvus de jonctions serrées est suffisante pour reformer ces structures (Furuse, Sasaki, et al., 1998). La fonction essentielle de la claudine 1 dans la régulation du flux paracellulaire a été démontrée avec la création des souris KO pour la claudine 1. Ces dernières meurent de déshydratation un jour après leur naissance en raison de pertes en eau trans-épidermiques importantes (Furuse et al., 2002).

Il a été mis en évidence que la claudine 1 pourrait être impliquée dans certaines maladies. Pour la plupart des pathologies auxquelles elle est associée, son expression est diminuée

(Günzel & Fromm, 2012). Une perte d'expression de la claudine 1 est ainsi observée dans de nombreuses maladies de la peau caractérisée par une sécheresse cutanée comme la dermatite atopique et le psoriasis. Certaines mutations qui induisent une perte de fonction de la claudine 1 provoquent également la cholangite sclérosante néonatale et une ichtyose. Ces mutations sont localisées dans l'exon 1 du gène de la claudine 1 et consiste en une délétion des paires de bases en position 200 et 201 entraînant la création d'un codon stop prématuré (Günzel & Yu, 2013b; Hadj-Rabia et al., 2004; Tsukita et al., 2019; Zihni et al., 2016). Comme nous l'avons vu dans le point précédent, la claudine 1 est aussi un corécepteur pour l'entrée de certains virus dans les cellules (Evans et al., 2007). Finalement, comme nous le verrons dans les chapitres suivant, **la claudine 1 peut jouer le rôle de suppresseur ou de promoteur de tumeur dans le cancer du sein** (J. Li, 2021).

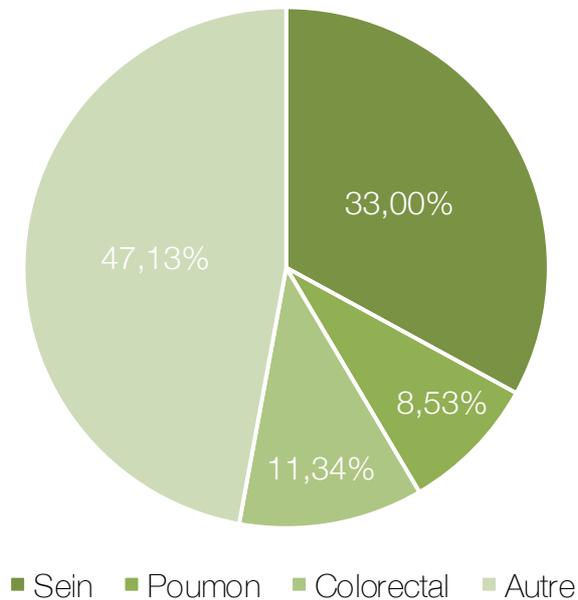


Figure 20 : Répartition de l'incidence des principaux cancers chez les femmes en France au cours de l'année 2018

Le graphique en secteur représente la distribution de l'incidence des différents types de cancers féminins pour l'année 2018 en France. Le cancer du sein est le plus fréquent avec 33 % d'incidence contre 11,34 % pour le cancer colorectal et 8,53 % pour le cancer du poumon. *D'après l'Institut National du Cancer*

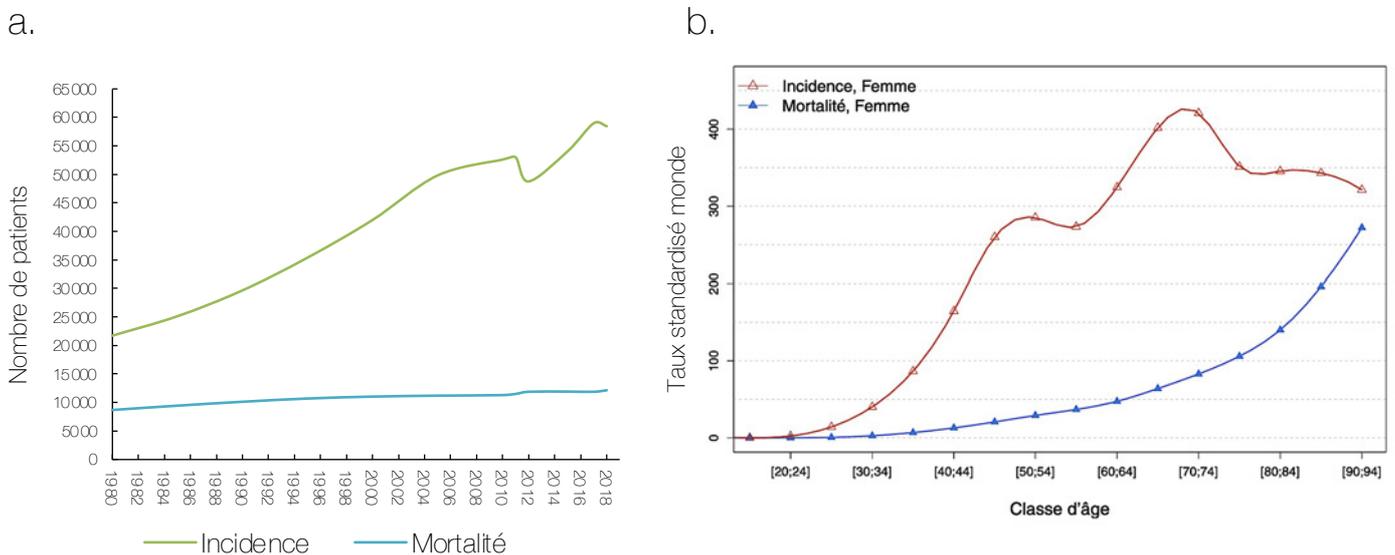


Figure 21 : Incidence et mortalité du cancer du sein en France selon l'année et taux d'incidence et de mortalité selon la classe d'âge en 2018 (standardisés monde)

a. Le graphique indique l'incidence et la mortalité du cancer du sein en France pour chaque année. L'incidence correspond au nombre de patients diagnostiqués. La mortalité du cancer du sein correspond au nombre de patients décédés des suites de la pathologie. b. Le graphique présente le taux l'incidence et de mortalité du cancer du sein chez les femmes en fonction de la classe d'âge en 2018. Le taux d'incidence s'exprime en nombre de personnes pour 100 000 personnes par année. *D'après l'Institut National du Cancer*

CHAPITRE 2 : LE CANCER DU SEIN

I. EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN

1) Les chiffres du cancer du sein

a) L'incidence

Le cancer du sein est **le plus fréquent** de tous les cancers. Il représentait 33 % des cas de cancer en France en 2018, devant le cancer colorectal (11,34 %) et le cancer du poumon (8,53 %) (**Figure 20**) (Gautier Defossez et al., 2019). On estime à 58 459 le nombre de nouveaux cas de cancer du sein chez la femme en France en 2018. Son taux d'incidence standardisé au niveau mondial est de 99,9 cas pour 100 000 personnes par an. En France on estime actuellement qu'**une femme sur huit** sera touchée par cette pathologie dans sa vie (d'après l'institut national du cancer, INCA).

L'**incidence** de cette pathologie ne cesse d'augmenter dans la population française et demeure donc un réel problème de santé publique. Entre 1990 et 2018, le nombre annuel de nouveaux cas de cancer du sein chez la femme a presque doublé en passant de 30 000 à 58 400 cas annuel (+95 %) (**Figure 21a**). Toutefois, l'évolution de l'incidence n'est pas régulière : elle est en forte augmentation entre 1990 et 2010, elle diminue légèrement en 2010 puis elle remonte plus modérément jusqu'en 2018 (**Figure 21a**). Cette hausse de l'incidence est attribuable à l'augmentation et au vieillissement de la population. Le taux d'incidence augmente à partir de l'âge de 30 ans puis il atteint une valeur maximale pour les femmes entre 70 et 74 ans (**Figure 21b**). L'incidence du cancer du sein est également influencée par l'évolution des pratiques de dépistages et des principaux facteurs de risque connus. En effet, les facteurs hormonaux et reproductifs ont évolué défavorablement au fil des générations comme la diminution de l'âge de la puberté, la diminution du nombre d'enfants moyen par femme, l'augmentation de l'âge au premier enfant et la diminution des pratiques d'allaitement tout comme la ménopause plus tardive (Gautier Defossez et al., 2019).

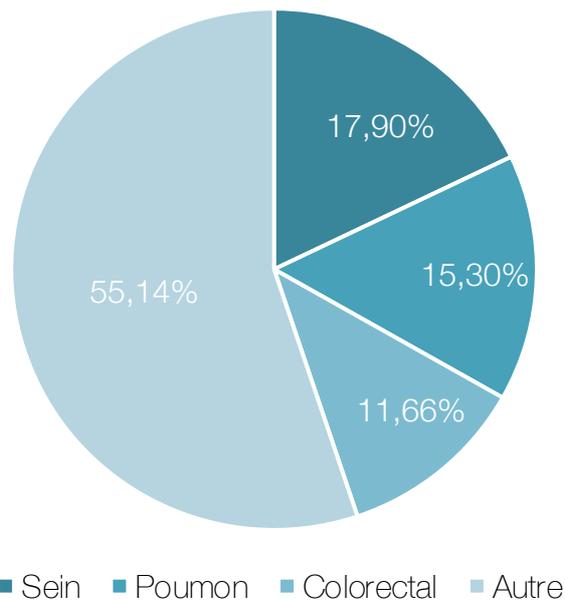


Figure 22 : Répartition de la mortalité des principaux cancers chez les femmes en France au cours de l'année 2018

Le graphique en secteur représente les pourcentages de décès féminins par cancer pour l'année 2018 en France. Le cancer du sein est le plus meurtrier avec 17,90 % des décès contre 15,3 % pour le cancer du poumon et 11,65 % pour le cancer colorectal. *D'après l'Institut National du Cancer*

b) La mortalité

Le cancer du sein est le cancer **le plus meurtrier** chez la femme avec 17,9 % des décès par cancer en France et 12 146 décès en 2018. Les cancers du poumon et colorectal représentaient respectivement 15,3 % et 11,66 % des décès par cancer cette même année chez les femmes (**Figure 22**). Son **taux de mortalité** standardisé mondial est de 14 pour 100 000 par an. Entre 1990 et 2018, le taux de mortalité a présenté une diminution moyenne de -1,3 % par an bien que le nombre de patients décédés des suites de la pathologie ne cesse d'augmenter (**Figure 21a**) (Gautier Defossez et al., 2019). Il reste stable jusqu'à l'âge de 30 ans puis augmente de manière exponentielle à partir de 40 ans (**Figure 21b**). Le taux de survie net à 5 ans du cancer du sein était d'environ 87 % en 2018 pour les patients diagnostiqués entre 2010 et 2015 (INCA). Cependant, le cancer du sein métastatique est presque universellement mortel en 5 à 10 ans, une triste statistique qui n'a pas beaucoup changé au cours des 20 à 30 dernières années (Scully et al., 2012; Tevaarwerk et al., 2013). Les métastases sont la principale cause de mortalité dans le cancer du sein (Mallini et al., 2014).

2) Facteurs de risques

Un facteur de risque est défini comme tout ce qui augmente la probabilité de contracter une maladie, dans ce cas le cancer du sein (Feng et al., 2018).

a) Principaux facteurs de risque

Le sexe est le principal facteur de risque de cancer du sein, car cette maladie est environ 100 fois plus susceptible de survenir chez une femme que chez un homme (Barnard et al., 2015). **L'âge** augmente inévitablement le risque de développer un cancer du sein. Près de 78 % des cancers du sein sont diagnostiqués après 50 ans (INCA, (Hulka, 1996)). **Les antécédents familiaux** concernent environ 20 à 30 % des cancers du sein. Avoir un parent au premier degré (mère, sœur ou fille) atteints d'un cancer du sein augmente jusqu'à trois fois le risque de développer un cancer du sein. De même, une femme atteinte d'un cancer dans un sein a un risque 3 à 4 fois plus élevé de développer un nouveau cancer dans l'autre sein ou de récidiver dans une autre partie du même sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001; Feng et al., 2018).

Tableau 11 : Liste des gènes fréquemment mutés dans le cancer du sein à prédisposition génétique
 Le nom et la fonction principale de chaque gène sont indiqués. *Selon Feng et al., 2018*

Gènes	Nom de la protéine	Fonctions
BRCA 1/2	BReast CAncer 1 et 2	Réparation de l'ADN
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2	
TP53	Tumor Protein 53	Régulation du cycle cellulaire
CHEK2	CHEKpoint kinase 2	
PTEN	Phosphatase and TENsin	
CDH1	CaDHerin-1	Adhérence intercellulaire
LKB1	Liver Kinase B1	Régulateur de l'apoptose

Environ 5 à 10 % des cancers du sein sont liés à des **mutations génétiques héritées** d'un parent. La mutation la plus fréquente du cancer du sein est celle des gènes BRCA1 ou BRCA2. Statistiquement, les femmes porteuses d'une mutation BRCA1 ont un risque de 55-65 % de développer un cancer du sein. Pour les femmes porteuses d'une mutation BRCA2, le risque est de 45 %. De nombreuses études ont également montré que d'autres mutations de gènes augmentent la probabilité de développer un cancer du sein comme celles des gènes ATM, TP53, CHEK2, PTEN, CDH1, LKB1 et PALB2 (**Tableau 11**) (Allison, 2012; Colditz et al., 2012; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001; Feng et al., 2018; Hulka, 1996).

b) Autres facteurs de risque

Certaines **affections mammaires bénignes** peuvent également constituer des facteurs de risque pour le cancer du sein. Les femmes ayant une **forte densité mammaire** présentent un risque 1,5 à 2 fois supérieur à celui des femmes ayant une densité mammaire moyenne. Certaines **lésions non prolifératives** (tels que les fibroses, les kystes, les hyperplasies légères, les adénoses et les papillomes) ou **prolifératives** (comme l'hyperplasie canalaire, le fibroadénome, l'adénose sclérosante et la papillomatose) peuvent également accroître le risque de cancer du sein (Feng et al., 2018).

Les femmes qui ont été traitées par **radiothérapie** au niveau de la poitrine pour un autre cancer lorsqu'elles étaient jeunes ont un risque plus élevé de développer un cancer du sein. Par ailleurs, le risque est encore plus élevé si la personne a subi une radiothérapie au moment de la puberté. La radiothérapie après 40 ans ne semble pas augmenter le risque de cancer du sein (Feng et al., 2018).

Les **modifications du cycle hormonal** peuvent également augmenter le risque de développer un cancer du sein.

Avoir des **règles précoces** avant 12 ans ou être **ménopausée tardivement** après 55 ans augmente le risque de cancer du sein. Dans ces conditions, les femmes auront plus de cycles menstruels et seront ainsi exposées plus longtemps aux hormones œstrogène et progestérone (Barnard et al., 2015; Feng et al., 2018).

Être **nullipare, ne pas allaiter** ou **avoir son premier enfant après 30 ans** accroît le risque de développer un cancer du sein alors qu'avoir des grossesses multiples et/ou être enceinte à un âge précoce réduit ce risque. L'allaitement peut également réduire le risque de cancer du sein, surtout s'il est poursuivi pendant 1,5 à 2 ans. Une explication possible est que l'allaitement réduit le nombre total de cycles menstruels (Barnard et al., 2015; Feng et al., 2018).

De nombreuses **méthodes contraceptives** utilisent des hormones, ce qui peut augmenter le risque de cancer du sein. Les femmes utilisant des contraceptifs oraux ont un risque légèrement plus élevé de développer un cancer du sein mais ce risque semble revenir à la normale avec le temps une fois la contraception arrêtée (Anothaisintawee et al., 2013; Barnard et al., 2015).

Certains traitements comme le diéthylstilbestrol (DES), un médicament à base d'œstrogène administré chez les femmes enceintes des années 1940 au début des années 1970, engendrent un risque accru de développer un cancer du sein. De plus, les femmes dont les mères ont pris du DES pendant la grossesse présentent également un risque plus élevé (Bluming, 2012; Frigo et al., 2012; Tournaire, 2009).

L'utilisation de l'**hormonothérapie à la ménopause** est associée à une augmentation importante du risque de cancer du sein généralement observée après deux ans d'utilisation. Le traitement hormonal substitutif est constitué d'œstrogènes souvent associé à la progestérone. Il a été utilisé pour soulager les symptômes de la ménopause et prévenir l'ostéoporose (Barnard et al., 2015; Feng et al., 2018). Ces traitements ont été fortement prescrits durant les années 1990 suivie d'une baisse brutale à partir de l'année 2003 ce qui a conduit à une diminution de l'incidence observée au début des années 2000 (Gautier Defossez et al., 2019).

Bien que controversé, les **conditions environnementales** telles que l'exposition aux **perturbateurs endocriniens** et aux **polluants** sont également des facteurs de risque connus (Rodgers et al., 2018; Romagnolo et al., 2016; Shafei et al., 2018; W. Wei et al., 2021).

Il existe aussi d'autres **facteurs de risques liés au mode de vie**.

La consommation excessive d'**alcool** entraîne pour les femmes qui boivent deux à trois verres par jour, un risque de développer cancer du sein environ 20 % plus élevé que les

femmes qui ne boivent pas d'alcool (Barnard et al., 2015; Byrne et al., 2002; Smith-Warner et al., 1998). Le **tabagisme** passif ou actif augmente le risque de 10 % et 16 % respectivement (Dossus et al., 2014). Le **surpoids important et l'obésité** sont aussi des facteurs de risques. Avant la ménopause, les ovaires produisent la plupart des œstrogènes, tandis que le tissu adipeux n'en fabrique qu'une petite quantité. Cependant, lorsque les ovaires cessent de produire des œstrogènes à la ménopause, la plupart des œstrogènes proviennent du tissu adipeux. Ainsi, avoir plus de tissu adipeux après la ménopause augmentera les niveaux d'œstrogènes et le risque de développer un cancer du sein (McTiernan, 2003; Patterson et al., 2010).

II. DEPISTAGE, DIAGNOSTIC ET SUIVI

1) Dépistage du cancer du sein

85 % des cancers du sein surviennent après 50 ans ce qui explique le développement des campagnes de prévention pour son dépistage à partir de cet âge. L'objectif du dépistage est de diminuer la mortalité par cancer du sein en le diagnostiquant à un stade plus précoce, ce qui permet l'utilisation de traitement plus efficaces et moins agressifs. La survie à 5 ans des patients est ainsi de 99 % si le cancer du sein est dépisté à un stade précoce. Or, comme 90 % des cancers du sein dépistés sont asymptomatiques, ils sont encore trop souvent diagnostiqués à un stade avancé. La faible participation au dépistage constitue ainsi un frein important à l'amélioration du pronostic vital des patients. En effet, entre 2016 et 2017, seul 50 % des femmes âgées de 50 à 74 ans se sont fait dépister sur l'ensemble du territoire français (Gautier Defossez et al., 2019) (INCA, 2020).

2) Diagnostic du cancer du sein

Devant une suspicion de cancer du sein, un **bilan initial** est établi pour chaque patient. Les objectifs de ce bilan sont d'affirmer le diagnostic de cancer, de préciser le type histologique, le stade et le grade du cancer, de recueillir les facteurs prédictifs connus de réponse à certains traitements et d'identifier les contre-indications éventuelles à certains traitements.

Il repose sur différents examens :

- Une **mammographie bilatérale** toujours réalisée en premier lieu.
- Une **échographie mammaire bilatérale** réalisée en cas de mammographie non informative, d'images douteuses ou de seins denses.
- Un **examen anatomopathologique** qui établit le diagnostic de cancer du sein. Il repose sur une **biopsie mammaire** percutanée qui est systématiquement réalisée en cas de mammographie confirmant la présence d'une tumeur. Il consiste, notamment, à analyser le statut des récepteurs hormonaux et le statut HER2.
- Une **exploration échographique axillaire** réalisée lors de l'échographie mammaire ou de la biopsie mammaire. Lors de l'examen le médecin recherche les ganglions axillaires anormaux en les palpant puisqu'ils sont les premiers à être potentiellement envahis par les cellules tumorales.

Un bilan d'extension peut ensuite être réalisé si les résultats suggèrent que les cellules cancéreuses ont pu migrer vers d'autres parties du corps : radiographie du thorax, scintigraphie osseuse, scanner, échographie abdominale ou IRM (Imagerie par résonance magnétique) et bilan sanguin complet.

D'autres pistes existent pour améliorer le diagnostic des tumeurs mammaires comme l'analyse de l'ADN circulant ou des **cellules circulantes tumorales (CTC)** mais ces techniques ne sont pas utilisées en routine en clinique. De nombreuses études dont celle de l'équipe de Kingston a mis en évidence que **l'étude de l'ADN circulant** tumoral permet de disséquer l'hétérogénéité intra et inter-tumorale et pourrait ainsi améliorer le bilan réalisé au moment du diagnostic (Kingston et al., 2021).

3) Suivi des patients atteints de cancer du sein

Le suivi des patients en cours de traitement pour un cancer du sein repose sur une surveillance clinique régulière. Des bilans sanguins et des analyses d'imagerie permettent de suivre l'évolution de la tumeur et de vérifier que cette dernière répond toujours aux traitements.

Le suivi des patients à long terme après rémission permet de détecter le plus tôt possible les signes d'une éventuelle rechute ou l'apparition d'un cancer dans l'autre sein. Il dépend du stade auquel a été diagnostiqué le cancer et des traitements reçus. En règle générale, il repose sur des consultations médicales régulières plusieurs fois par an pendant 5 ans,

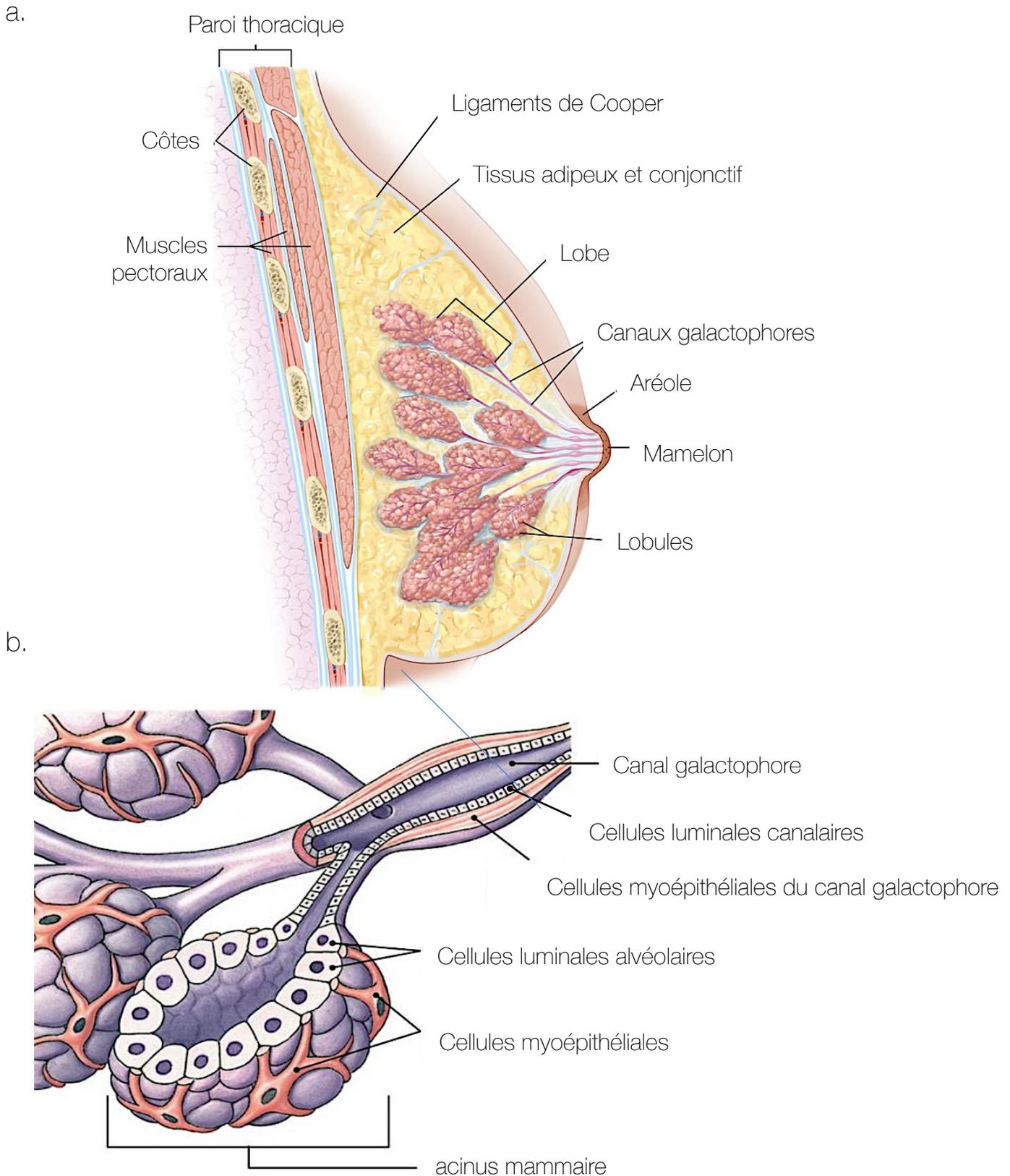


Figure 23 : Anatomie et organisation cellulaire de la glande mammaire

a. Le sein repose sur la paroi thoracique par l'intermédiaire des muscles pectoraux. La glande mammaire est une structure composée d'acini regroupés en lobules, eux-mêmes regroupés en lobes. Un réseau de canaux galactophores collecte les sécrétions des acini et convergent vers le mamelon. Le sein est aussi composé de tissus adipeux et conjonctif entourant et séparant les lobes. b. Les acini mammaires sont composés de cellules luminales alvéolaires qui bordent la lumière des acini et secrètent le lait et de cellules myoépithéliales sur la couche externe des acini. Les canaux galactophores sont composés d'une assise de cellules myoépithéliales positionnées entre les cellules luminales canalaire et la membrane basale. *D'après Associate Degree Nursing Physiology Review*

suivi d'une par an à vie (INCA, 2021). La **récidive** du cancer du sein peut prendre deux formes : métastase (généralement os, cerveau, foie, poumon et ganglions lymphatiques distants) et rechute locorégionale (récidive dans le sein, la paroi thoracique ou les ganglions lymphatiques régionaux). La rechute locorégionale survient pour environ 10 % des patients, malgré une prise en charge optimale de la tumeur primitive. Cette rechute locorégionale est très souvent associée à la présence de métastases concomitantes ou futures dans 30 % et 60 % des cas respectivement (Yates et al., 2017).

III. STRUCTURE DE LA GLANDE MAMMAIRE

La glande mammaire est l'organe qui permet de distinguer les mammifères des autres animaux. Son rôle est de synthétiser, sécréter et délivrer le lait aux nouveaux nés (Hassiotou & Geddes, 2013).

1) Anatomie de la glande mammaire

La glande mammaire est un organe annexé à la paroi antérieure du thorax et qui est soutenue par les ligaments de Cooper qui sont des fibres de soutien (**Figure 23a**). C'est une glande exocrine sécrétrice dont l'unité principale est l'acinus. Les acini sont composés de cellules luminales alvéolaires sécrétrices du lait et de cellules myoépithéliales contractiles (**Figure 23b**). Les acini forment des grappes appelées lobules, eux-mêmes groupés en 15 à 20 lobes qui sont séparés par du tissu adipeux et du tissu conjonctif. Des canaux galactophores ramifiés collectent les sécrétions des acini et se regroupent pour aboutir au mamelon qui constitue la papille mammaire. Ce dernier est entouré d'une zone pigmentée : l'aréole. La glande mammaire est également richement vascularisée et drainée par un réseau lymphatique (vaisseaux et ganglions) qui entoure la glande et assure un rôle de protection immunitaire.

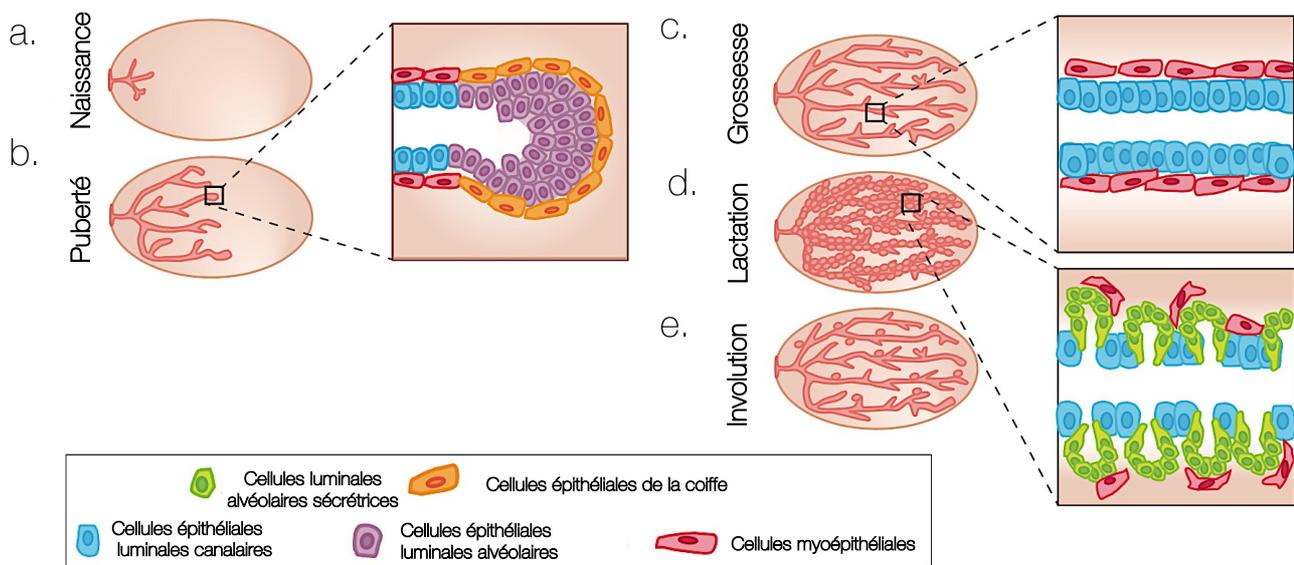


Figure 24 : Les différentes étapes du développement de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire se fait en plusieurs étapes et se produit après la naissance. L'ébauche de la glande mammaire **(a)** est présente à la naissance et reste au repos jusqu'à la puberté. Les hormones libérées pendant la puberté **(b)** permettent le développement du réseau tubulaire. À l'extrémité, de petits bourgeons sécrétoires apparaissent (encart) et contiennent les cellules luminales alvéolaires et les cellules épithéliales de la coiffe qui permettent l'expansion du bourgeon dans le tissu adipeux. Les périodes de grossesse **(c)** et de lactation **(d)** s'accompagnent de différents changements hormonaux qui permettent une grande expansion des cellules alvéolaires qui se développent et forment des acini/alvéoles sécrétant le lait. Au sevrage **(e)**, l'involution se déroule par un processus de mort cellulaire et de remodelage de la MEC, donnant lieu à un état qui ressemble à la glande mammaire adulte au repos. *Adapté de Inman et al., 2015*

2) Développement de la glande mammaire

La glande mammaire est à l'origine une glande sudoripare modifiée qui provient de l'ectoderme et du mésoderme au niveau embryonnaire. La glande mammaire se développe durant les différentes phases de la vie : embryonnaire, pubertaire, gestationnelle, lactation et involution (**Figure 24**). A la naissance, l'ébauche de la glande mammaire est réduite à un court système de tubules comprenant **un ensemble de canaux primaires et secondaires** et **de cellules mésenchymateuses** qui formeront le stroma. A la puberté, le développement de la glande mammaire s'accélère sous le contrôle des œstrogènes et de la progestérone. Le réseau tubulaire s'étend et de petits bourgeons sécrétoires apparaissent. Les cellules épithéliales de la coiffe se situent à l'apex du bourgeon sécrétoire canalaire et permettent l'expansion du réseau tubulaire. A la gestation et la lactation, le réseau de tubulaire devient très dense et les bourgeons terminaux se creusent **en alvéoles**. Les cellules alvéolaires s'hypertrophient et secrètent le lait qui sera expulsé grâce aux capacités contractiles des **cellules myoépithéliales**. **A la fin de la lactation, le tissu alvéolaire est détruit** et est remplacé par du tissu adipeux lors de l'involution. De la puberté à la vie adulte, le développement de la glande mammaire est principalement induit par les hormones circulantes relarguées par l'hypophyse et les ovaires : œstrogènes, progestérone et prolactine.

3) Composition et organisation cellulaire

La glande mammaire est composée de différents types cellulaires qui s'organisent et communiquent pour former et maintenir un organe fonctionnel. La glande mammaire est composée d'un compartiment épithélial et d'un compartiment conjonctif (**Figure 24**).

a) Le compartiment épithélial

Le compartiment épithélial est composé de deux types cellulaires épithéliaux principaux (**Figure 25**) (Macias & Hinck, 2012) :

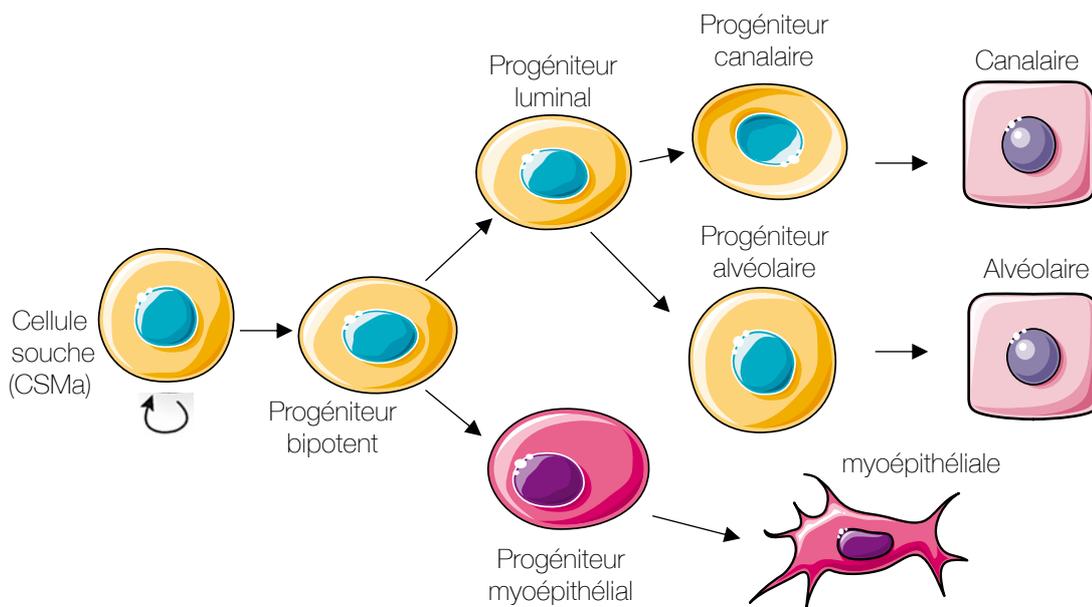


Figure 25 : Schéma hypothétique de la hiérarchie des lignages épithéliaux mammaires

Les différents lignages mammaires proviennent des cellules souches mammaires (CSMa). Elles ont un fort potentiel d'auto-renouvellement afin de maintenir leur pool et sont à l'origine d'un progéniteur bipotent qui donne ensuite les progéniteurs luminal ou myoépithélial. Le progéniteur luminal se différencie en progéniteur canalaire ou alvéolaire qui donneront naissance aux cellules lumineales canalaire ou alvéolaires respectivement. Le progéniteur myoépithélial se différencie quant à lui en cellule myoépithéliale. *D'après la revue Macias et al., 2012*

- L'**épithélium basal** est constitué de cellules **myoépithéliales** qui constituent la couche externe des acini et des canaux. Ce sont des cellules épithéliales contractiles spécialisées situées à la surface de la membrane basale.
- L'**épithélium luminal** forme la couche interne des canaux et des acini bordant ainsi leur lumière. Elles proviennent d'un progéniteur luminal commun qui donne naissance aux progéniteurs canaux ou alvéolaires qui se différencient respectivement en cellules lumineuses canaux ou alvéolaires.

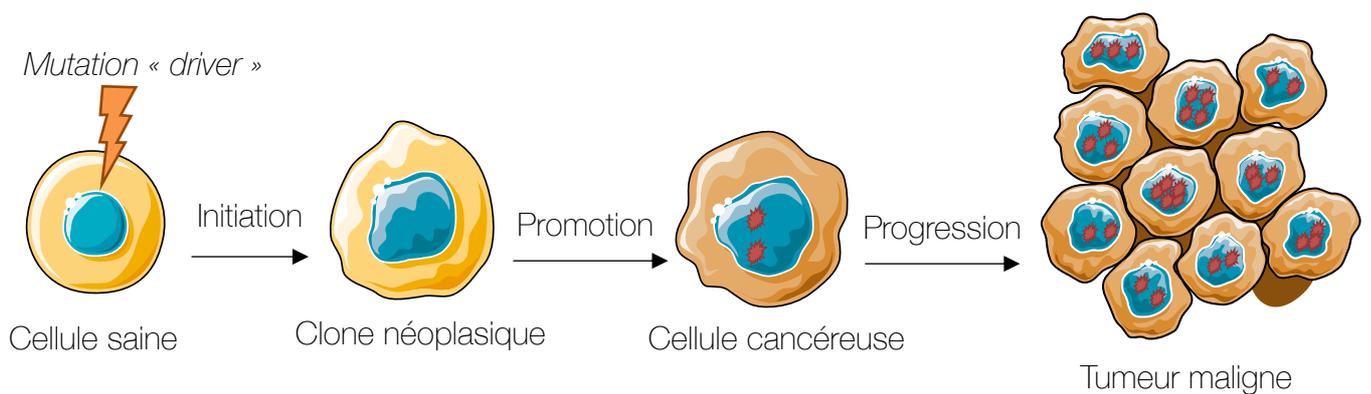
L'épithélium basal et l'épithélium luminal forment une bicouche de cellules formant acini et canaux. Les cellules myoépithéliales permettent l'excrétion du lait dans les canaux en se contractant autour des cellules lumineuses produisant le lait (Inman et al., 2015) (**Figure 23b**).

Les **cellules souches mammaires** (CSMa) sont situées au niveau basal et sont capables de s'autorenouveler et de générer tous les types cellulaires retrouvés au sein du tissu mammaire mature (Macias & Hinck, 2012). Elles confèrent à l'épithélium mammaire son fort pouvoir de régénération et sa capacité à subir de nombreux cycles de croissance puis d'involution (Inman et al., 2015). En effet, les CSMa sont importantes pour le développement de l'organe mais également pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. Le maintien des capacités et fonctions des CSMa est dû à leurs interactions avec les cellules épithéliales et le stroma mammaire (Visvader, 2009).

b) Le compartiment conjonctif

Le **stroma** de la glande mammaire est un tissu de connexion qui constitue un microenvironnement entourant le compartiment épithélial. Il provient du mésenchyme et est composé d'adipocytes, de fibroblastes et d'un réseau vasculaire et lymphatique (Sakakura et al., 2013). Le stroma régule le développement et l'homéostasie de l'épithélium. En effet, au cours de la morphogenèse de la glande, le mésenchyme envoie des signaux clés au tissu épithélial ce qui permet la différenciation et le lignage des cellules épithéliales mammaires (Macias & Hinck, 2012).

Les **adipocytes** composent une large partie du stroma de la glande mammaire. Pendant la grossesse et l'allaitement, les adipocytes contiennent moins de lipides, suggérant que ce réservoir de graisse est nécessaire pour la production de lait (Gregor et al., 2013). Les adipocytes ont également une fonction endocrine. Ils régulent la prolifération et la fonction



✱ Altérations génétique et épigénétique

Figure 26 : Principales étapes de la carcinogenèse

La carcinogenèse débute par une mutation dite « driver » dans une cellule saine qui aboutit à la production de clones néoplasiques : c'est l'étape d'initiation. Dans la phase de promotion, le clone néoplasique acquiert de nouvelles altérations génétiques ou épigénétiques qui lui donne un avantage sélectif. Au cours de la phase de progression, le clone néoplasique devient tumoral et donne naissance aux cellules cancéreuses. Ces dernières prolifèrent et continuent d'acquérir d'autres mutations ce qui instaure l'hétérogénéité intra-tumorale caractéristique des tumeurs malignes. *Adapté de la revue de Compton, 2020*

de l'épithélium mammaire et permettent la communication avec les autres types cellulaires comme les cellules endothéliales *via* la libération de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Hovey et al., 2001).

Les **fibroblastes** sont contenus dans le tissu conjonctif qui traversent le tissu adipeux formé par les adipocytes. Ils sont le plus souvent localisés au niveau basal de l'épithélium et synthétisent la matrice extracellulaire du tissu mammaire (Howard & Lu, 2014).

Le tissu adipeux de la glande mammaire est traversé par un important **réseau vasculaire et lymphatique** qui se met en place à la puberté. Ce réseau est en étroite association avec le tissu épithélial (Betterman et al., 2012).

IV. CARCINOGENESE MAMMAIRE

La **carcinogénèse** (ou oncogénèse ou tumorigénèse) est un processus multi-étapes qui transforme une cellule « normale » en cellule cancéreuse (**Figure 26**).

1) Origines moléculaires de la carcinogénèse

Le processus de la carcinogénèse repose sur l'acquisition progressive de nouvelles mutations. Ces altérations du génome peuvent résulter en une perte, un gain ou à des réarrangements chromosomiques, à des mutations ponctuelles, ou à des méthylations du promoteur d'un gène inactivant ou activant sa transcription. Les **altérations du génome** peuvent avoir de nombreuses causes telles que les virus, les radiations ionisantes, les produits génotoxiques, l'érosion des télomères, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et certains produits du métabolisme et de l'inflammation (Compton, 2020). De nombreuses études mettent en avant que certaines mutations, appelés **mutations « driver »** conduiraient à la prolifération d'un clone néoplasique qui serait à l'origine de la tumeur (Nik-Zainal et al., 2016). Le **clone néoplasique** présente des anomalies caractéristiques de son architecture et/ou de sa fonction dues aux mutations « driver » qui touchent les gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et/ou ceux impliqués dans la machinerie de réparation de l'ADN. Ces altérations du génome constituent la première étape de la carcinogénèse : **l'initiation**. Lors de la seconde étape de la carcinogénèse : **la promotion**, l'accumulation de nouvelles **altérations génétiques** ou **épigénétiques** confère alors à la cellule un avantage sélectif qui lui permet de proliférer de

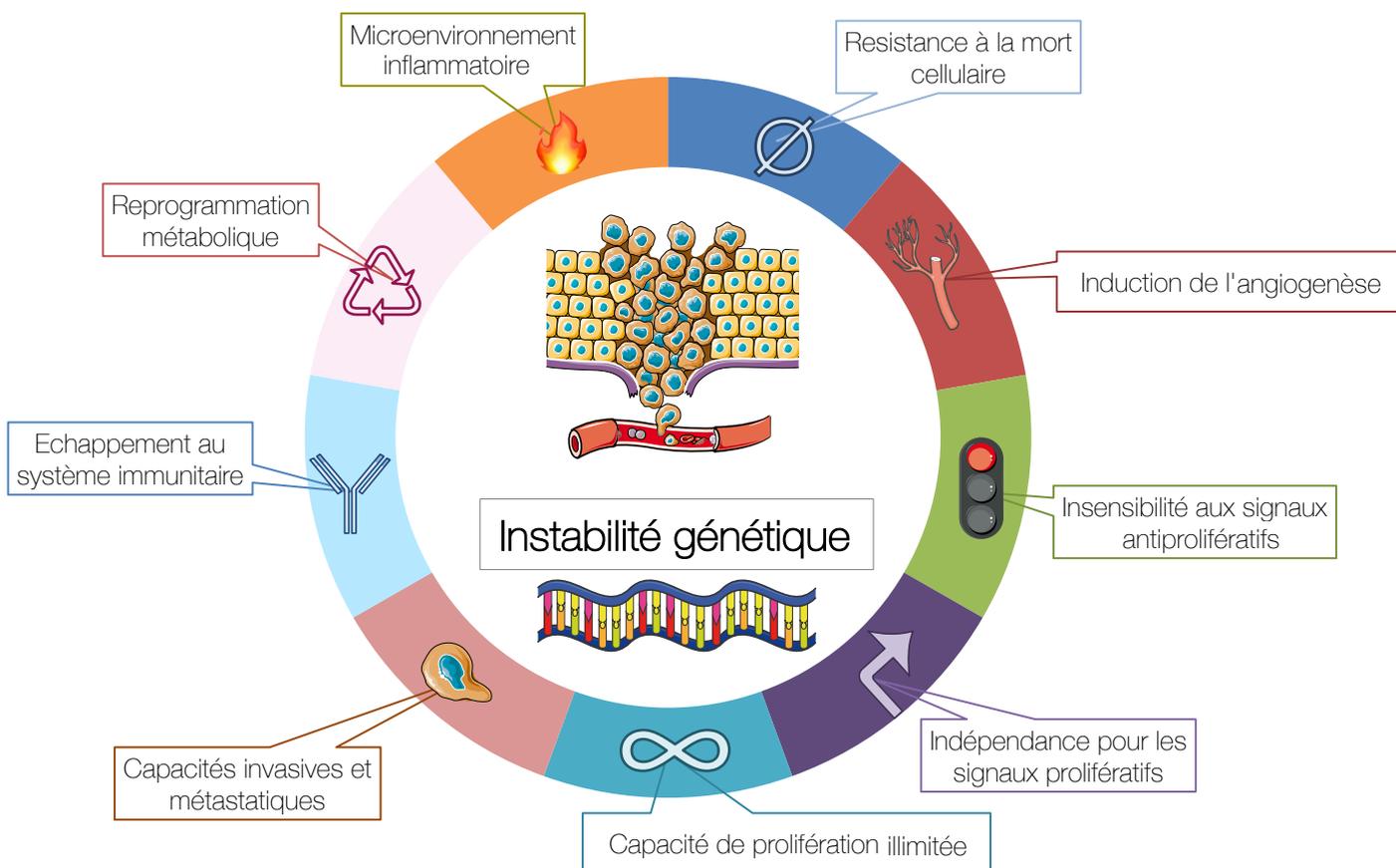


Figure 27 : Caractéristiques des cellules cancéreuses

L'instabilité génétique et les mutations confèrent aux cellules cancéreuses des altérations génétiques qui entraînent la progression tumorale. Cette illustration englobe les neuf caractéristiques des cellules cancéreuses. *Adapté de la revue de Hanahan and Weinberg, 2011*

manière très importante (Compton, 2020). Les cellules filles vont alors acquérir des mutations additionnelles donnant naissance à des sous-populations de cellules très différentes. Cette troisième étape de la carcinogenèse, **la progression**, instaure l'hétérogénéité intra-tumorale caractéristique des tumeurs malignes (Compton, 2020).

Les **cellules cancéreuses** présentent une très grande instabilité génomique et sont définies par 9 caractéristiques :

- Une insensibilité aux signaux antiprolifératifs
- Une indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs
- Des capacités de prolifération illimitée
- Une résistante à l'apoptose
- Une capacité à induire l'angiogenèse
- Des propriétés invasives
- Des capacités à induire de l'inflammation dans son microenvironnement
- Des mécanismes d'échappement au système immunitaire
- Des capacités de reprogrammation métabolique

L'ensemble de ces caractéristiques conduit les cellules à proliférer de manière incontrôlée et à la formation d'une tumeur (**Figure 27**) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Les gènes altérés ou dérégulés sont appelés proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur. Les **proto-oncogènes** sont des gènes pour lesquels l'altération d'un seul allèle suffit tandis que l'inactivation des deux allèles est requise pour un **gène suppresseur de tumeur** (Compton, 2020). Ces gènes sont majoritairement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la durée de vie réplivative, la mort cellulaire, la différenciation des cellules ou l'intégrité du génome. Les gènes TP53 et PIK3CA (sous unité alpha de la phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate kinase) sont les plus fréquemment mutés dans les tumeurs mammaires avec une fréquence de 50,75 % et 32,5 %. De nombreuses autres mutations moins fréquentes ont été identifiées telles que celles des gènes GATA3, PTEN, AKT, AFF2, CDH1, CCND3, CDKN1B, CFBF, FOXA1, MAP3K1, MAP3K13, PIK3R, PTPN22, PTPRD, MLL3, NF1, TBX3, RB1, RUNX1, SF3B1 (**Tableau 12**) (Cancer Genome Atlas Network, 2012; D. Ma et al., 2017; Nik-Zainal et al., 2016). Certaines études ont mis en évidence la présence de variants de gènes héréditaires (**Tableau 13**) (ATM,

Tableau 12 : Liste des gènes les plus fréquemment mutés à l'origine des tumeurs mammaires
Le nom et la fonction principale de chaque gène sont indiqués. *Selon Feng et al., 2018*

Gènes	Nom de la protéine	Fonctions
TP53	Tumor Protein 53	Régulation du cycle cellulaire
PIK3CA	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate Kinase alpha	
PTEN	Phosphatase and TENSin	
CCND3	Cyclin D3	
CDKN1B	Cyclin-Dependent Kinase 1	
RB1	Retinoblastoma-associated protein	
MAP3K1, 13	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1 et 13	
PTPRD	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	
AFF2	AF4/FMR2 Family Member 2	Facteur/Activateur de la transcription
TBX3	T-Box Transcription Factor 3	
FOXA1	FORKhead boX A1	
MLL3	Mixed-Lineage Leukemia protein 3	
RUNX1	Runt-Related Transcription Factor	Hématopoïèse
CBFB	Core-Binding Factor Beta	
GATA3	GATA binding protein 3	Différenciation
NF1	NeuroFibromine 1	Suppresseur de tumeur
AKT	serine-threonine protein kinase	Inhibiteur de l'apoptose
PIK3R	Phosphoinositide 3-kinase	Métabolisme de l'insuline
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22	Réponse immunitaire
CDH1	CaDHerin-1	Adhérence intercellulaire
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1	Épissage

Tableau 13 : Liste des variants de gènes héréditaires des tumeurs mammaires
Le nom et la fonction principale de chaque gène sont indiqués. *Selon Feng et al., 2018*

Gènes	Nom de la protéine	Fonctions
TP53	Tumor Protein 53	Régulation du cycle cellulaire
PTEN	Phosphatase and TENSin	
CHEK2	CHEKpoint kinase 2	
BRCA 1/2	BReast CAncer 1 et 2	Réparation de l'ADN
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	
NBN	NiBrIN	
BRIP1	BRCA1-interacting protein 1	
RAD51C	DNA Repair Protein RAD51 Homolog 3	

BRCA1 et 2, BRIP1, CHEK2, NBN, PTEN, RAD51C et TP53). L'existence de ces variants supporte l'hypothèse que 10 % des cancers mammaires pourraient avoir une origine héréditaire (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

2) Origine cellulaire des tumeurs mammaires

L'origine des cellules cancéreuses reste une question fortement débattue. Il existe actuellement deux modèles hypothétiques non exclusifs pour expliquer l'origine cellulaire des tumeurs mammaires : le modèle de l'évolution clonale et le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) (**Figure 28**).

Dans le **modèle de l'évolution clonale**, les altérations du génome ont lieu dans les progéniteurs spécialisés ou dans les cellules différenciées. Le phénotype des cellules tumorales dépend alors du type cellulaire initiateur de la tumeur et des altérations génétiques et épigénétiques acquises par les cellules au cours des divisions cellulaires (**Figure 28a**) (Polyak, 2007).

Dans le **modèle des cellules souches cancéreuses (CSC)**, il est décrit que les altérations génomiques ont lieu dans les cellules souches mammaires qui donnent naissance à des CSC (Polyak, 2007). Les CSC peuvent ensuite proliférer pour aboutir à une masse tumorale dont les cellules sont peu différenciées. Dans ce modèle, seules les CSC sont capables d'initier et de soutenir la tumorigenèse (**Figure 28b**) (Visvader, 2011). Il existe de nombreuses preuves de l'existence des CSC, en effet les cellules souches adultes sont des cellules à longue durée de vie et qui, de par leur nature, sont exposées à des agents nocifs pendant de longues périodes ce qui fait d'elles des candidates pour l'accumulation de mutations génétiques (S. Liu et al., 2005; Stingl et al., 2006; Visvader, 2009). De plus, certains sous-types de tumeurs mammaires partagent le même profil moléculaire que les CSCMa comme l'activation des voies de signalisation Hedgehog, Notch et Wnt ou encore l'expression des marqueurs CD44⁺ et CD24^{-/low} (Al-Hajj et al., 2003; Lim E et al., 2009; S. Liu et al., 2005).

a. Modèle de l'évolution clonale

b. Modèle des cellules souches cancéreuses

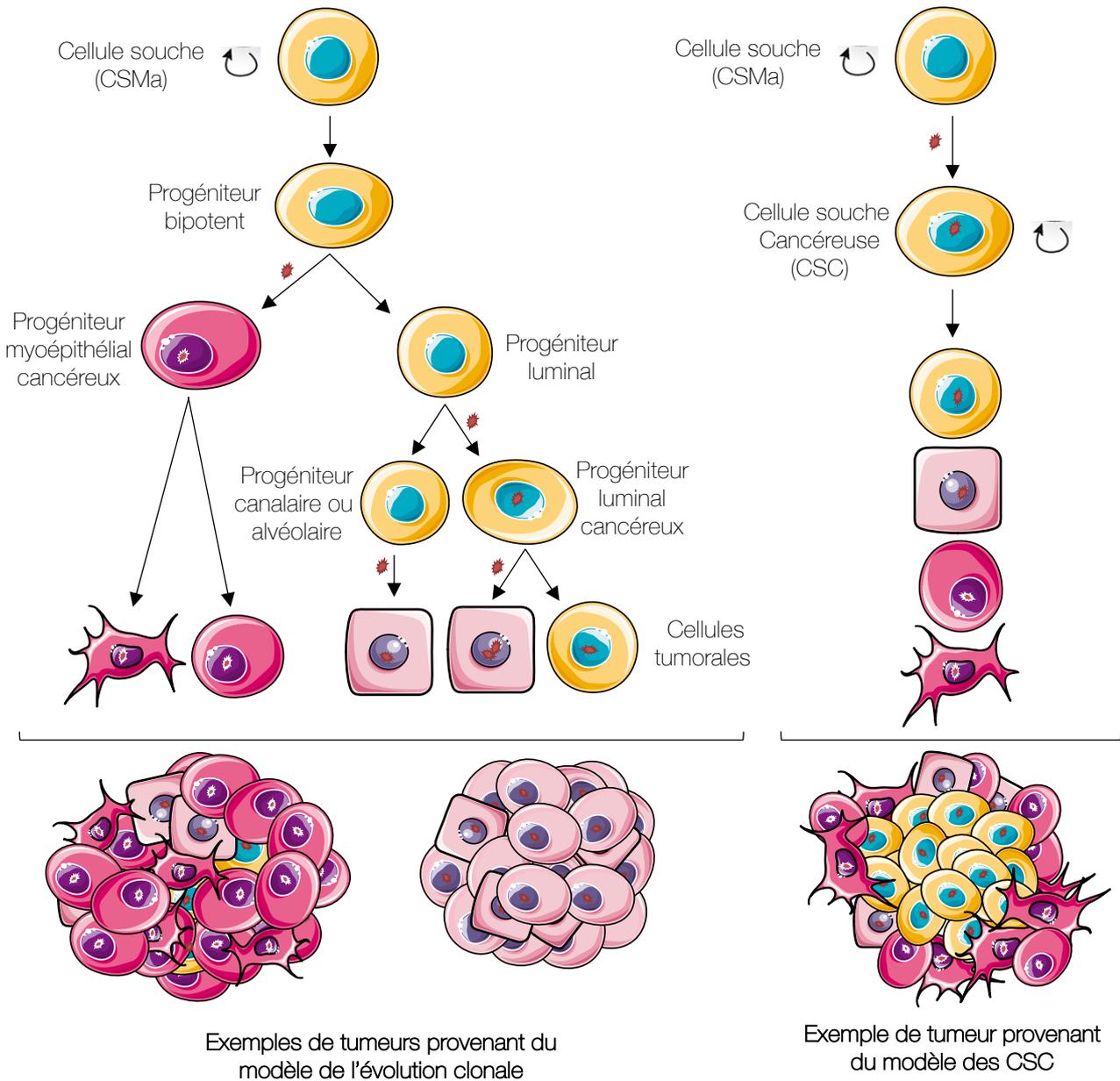


Figure 28 : Origine des cellules cancéreuses et de l'hétérogénéité intra-tumorale

a. Dans le modèle de l'évolution clonale, la tumeur est initiée à partir d'une cellule différenciée ou d'un progéniteur. Le type cellulaire initiateur de la tumeur détermine donc son phénotype. Dans ce modèle, l'hétérogénéité intra-tumorale provient soit de la combinaison de plusieurs cellules initiateurs tumorales distinctes, soit d'une seule cellule initiateur qui donnera naissance à des clones tumoraux distincts.

b. Dans le modèle des cellules souches, les CSMa deviennent des CSC qui sont les seules à pouvoir initier et soutenir la tumorigenèse. L'hétérogénéité intra-tumorale provient dans ce modèle de la différenciation des CSC dû à l'accumulation de mutations au fil des divisions cellulaires. La carcinogenèse peut donc mener à des tumeurs principalement composées de cellules bien différenciées, à des tumeurs composées de plusieurs sous-types cellulaires tumoraux ou à des tumeurs dont le centre est composé de cellules peu différenciées et la périphérie de cellules différenciées. *Adapté des revues de Polyak et al 2007 et Visvader, 2011*

L'origine de l'**hétérogénéité intra-tumorale** proviendrait ainsi de processus différents en fonction du modèle (Figure 28) :

- Dans le **modèle de l'évolution clonale**, soit plusieurs cellules initiatrices (progéniteurs ou cellules différenciées) sont à l'origine de la masse tumorale ; soit une seule cellule initiatrice est à l'origine de clones tumoraux distincts par accumulation des mutations. Ces hypothèses expliqueraient alors l'existence de sous-populations tumorales distinctes au sein de la tumeur.
- Dans le **modèle des CSC**, ce serait l'accumulation d'altérations génomiques dans les CSC qui conduirait à l'apparition de sous-populations tumorales. Il a également été montré que ces altérations et le microenvironnement tumoral peuvent induire les CSC à se différencier. On retrouve ainsi des CSC ainsi que des cellules cancéreuses différenciées dans la masse tumorale.

Les tumeurs possèdent ainsi de nombreuses sous-populations cellulaires différentes. Ceci explique pourquoi toutes les tumeurs sont différentes, même au sein d'un sous-type tumoral bien décrit. C'est ce qu'on appelle l'**hétérogénéité inter-tumorale** (Samocho et al., 2019; Visvader, 2011).

3) Le microenvironnement tumoral

a) Le stroma mammaire

De nombreux travaux soulignent que la prolifération, la survie, la polarisation, l'état de différenciation et la capacité invasive des cellules cancéreuses peuvent être modulés par le **stroma mammaire**. En effet, un stroma mammaire normal est capable de révoquer le phénotype malin des cellules cancéreuses en induisant un état plus différencié, suggérant que les cellules cancéreuses ne peuvent prospérer que dans un microenvironnement anormal (DeCosse et al., 1975). Ainsi, une inflammation chronique ou des lésions tissulaires induisent des altérations génétiques et épigénétiques dans les cellules stromales ce qui modifie le microenvironnement et augmente le risque de prolifération du cancer (Polyak & Kalluri, 2010).

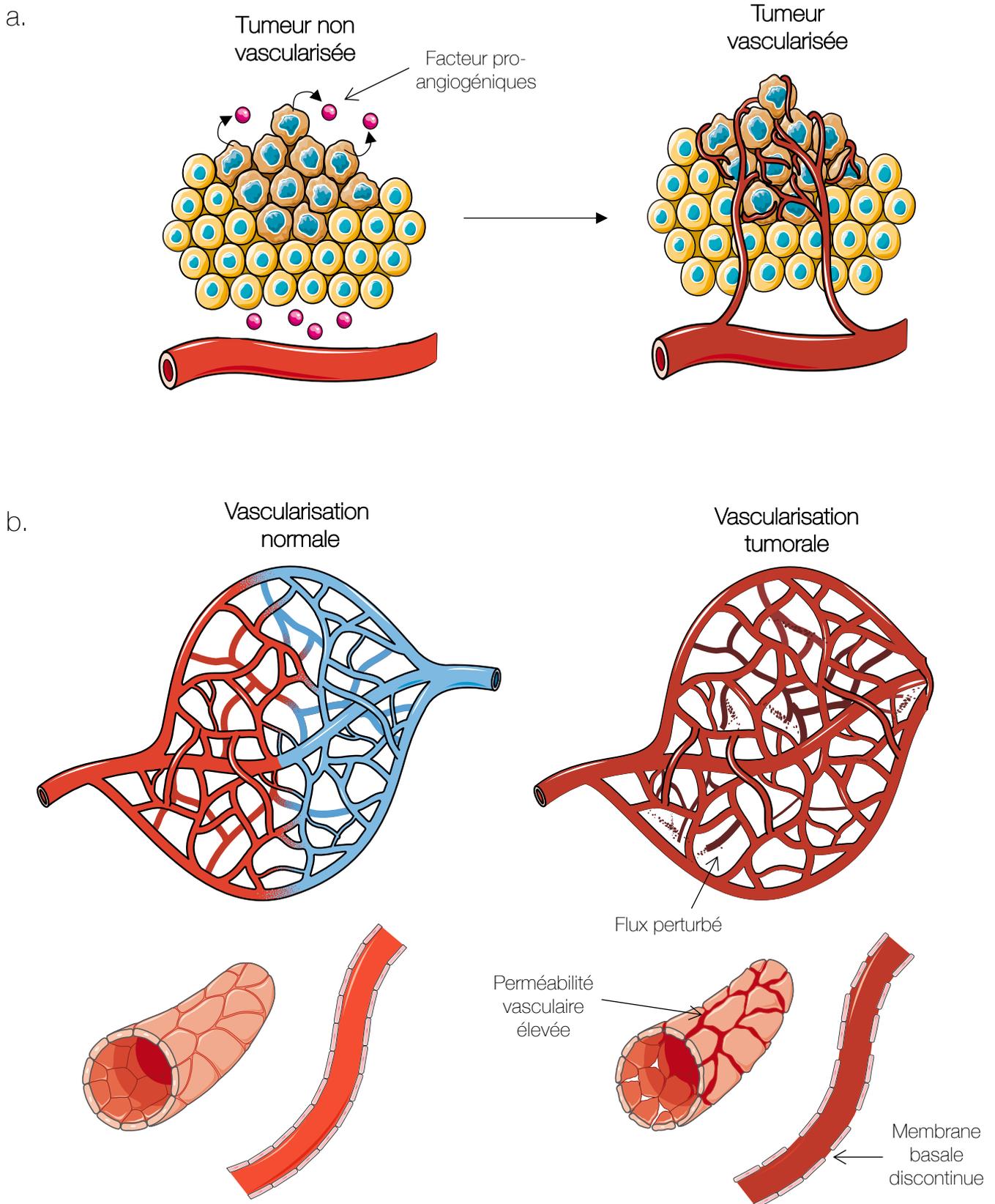


Figure 29 : L'angiogénèse tumorale

a. L'angiogénèse tumorale est un processus de développement de nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux à partir de vaisseaux ou capillaires préexistants sous l'effet de facteurs pro-angiogéniques libérés par les cellules cancéreuses. Les nouveaux vaisseaux sanguins, à proximité et dans la tumeur, lui fournissent les nutriments et l' O_2 essentiels à sa croissance (*adapté de Madu, 2020*).

b. L'organisation générale d'un réseau vasculaire normal structuré et hiérarchisé s'oppose à celle de la vascularisation aberrante et tortueuse observée dans les tumeurs. Les vaisseaux tumoraux ont une perméabilité vasculaire anormale, une membrane basale discontinue et un flux sanguin perturbé. *Adapté de Treps and Gavard, 2015*

b) L'angiogenèse tumorale

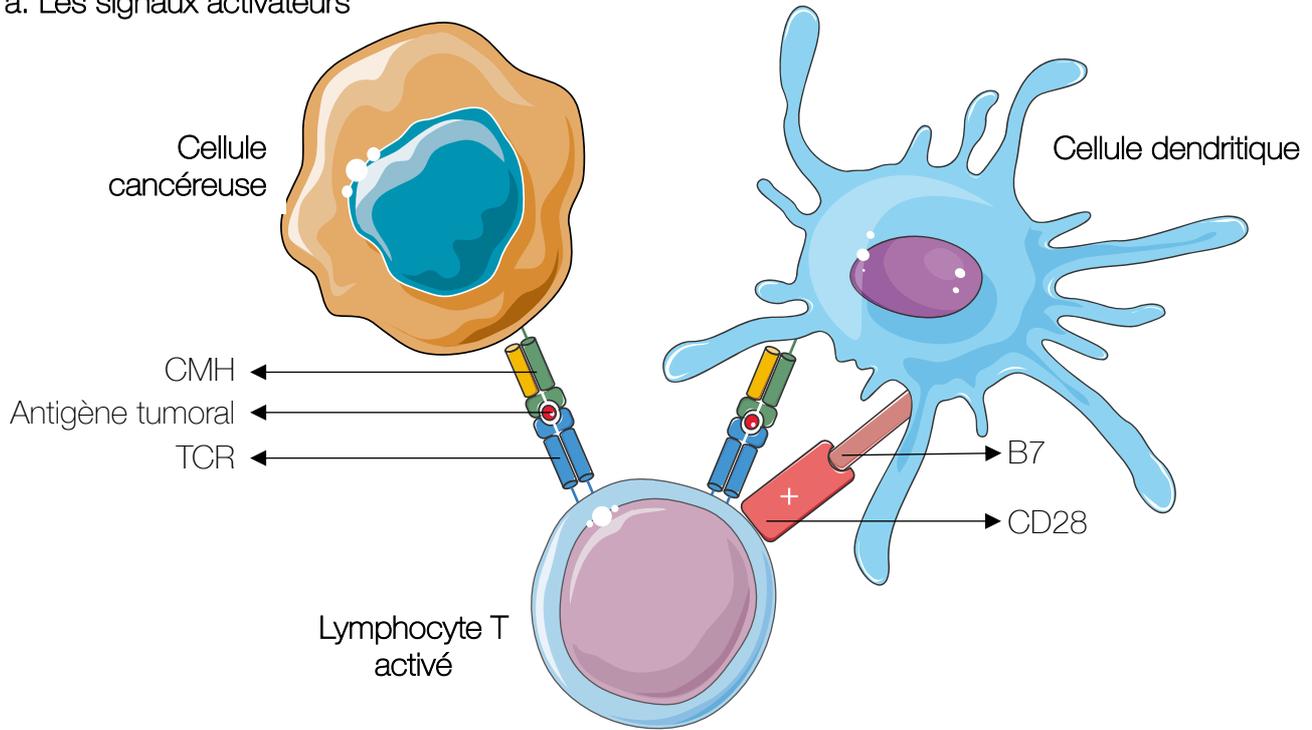
L'**angiogenèse tumorale** est l'une des principales adaptations à long terme du microenvironnement tumoral aux faibles niveaux d'O₂ et de nutriments. L'angiogenèse correspond à la formation rapide de capillaires sanguins dédiés à l'irrigation du tissu cancéreux à partir de précurseurs de cellules endothéliales et de vaisseaux préexistants. Au cours de sa formation, une tumeur mammaire va proliférer jusqu'à atteindre une taille d'environ 1 à 2 mm de diamètre. A ce stade, le microenvironnement tumoral ne permet plus d'apporter suffisamment d'O₂ et de nutriments aux cellules tumorales et les processus angiogéniques débutent. Les cellules tumorales initient et stimulent l'angiogenèse en synthétisant des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). Un faible niveau en O₂ aussi appelé hypoxie active également certains facteurs de transcription HIF (facteurs inductibles par l'hypoxie). Tous ces facteurs contrôlent la vitesse et la progression des vaisseaux sanguins dans la tumeur (**Figure 29a**). Cependant, la vascularisation tumorale est généralement peu efficace et désorganisée. Elle est caractérisée par une perméabilité vasculaire constitutive, une dilatation importante des vaisseaux, un réseau chaotique et un flux de sang aberrant non constant qui peut même changer de direction (**Figure 29b**). Bien que chaotique, l'angiogenèse tumorale contribue néanmoins à l'agressivité de la tumeur et à son éventuelle dissémination. L'angiogenèse est, en effet, une étape critique dans le développement, la progression et les processus métastatiques des tumeurs mammaires. De fortes capacités angiogéniques de la tumeur sont associées à une diminution de la survie chez les patients atteints de cancer du sein (Madu et al., 2020; Treps & Gavard, 2015).

c) Le système immunitaire et l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire

Le **système immunitaire** fait également partie du microenvironnement tumoral. Les interactions entre la tumeur et le système immunitaire reposent sur trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement.

Dans la phase d'**élimination**, le système immunitaire reconnaît et élimine les cellules tumorales. En effet, les altérations moléculaires et phénotypiques acquises par les cellules cancéreuses leur permettent d'être reconnues comme étrangères par le système

a. Les signaux activateurs



b. Les signaux inhibiteurs

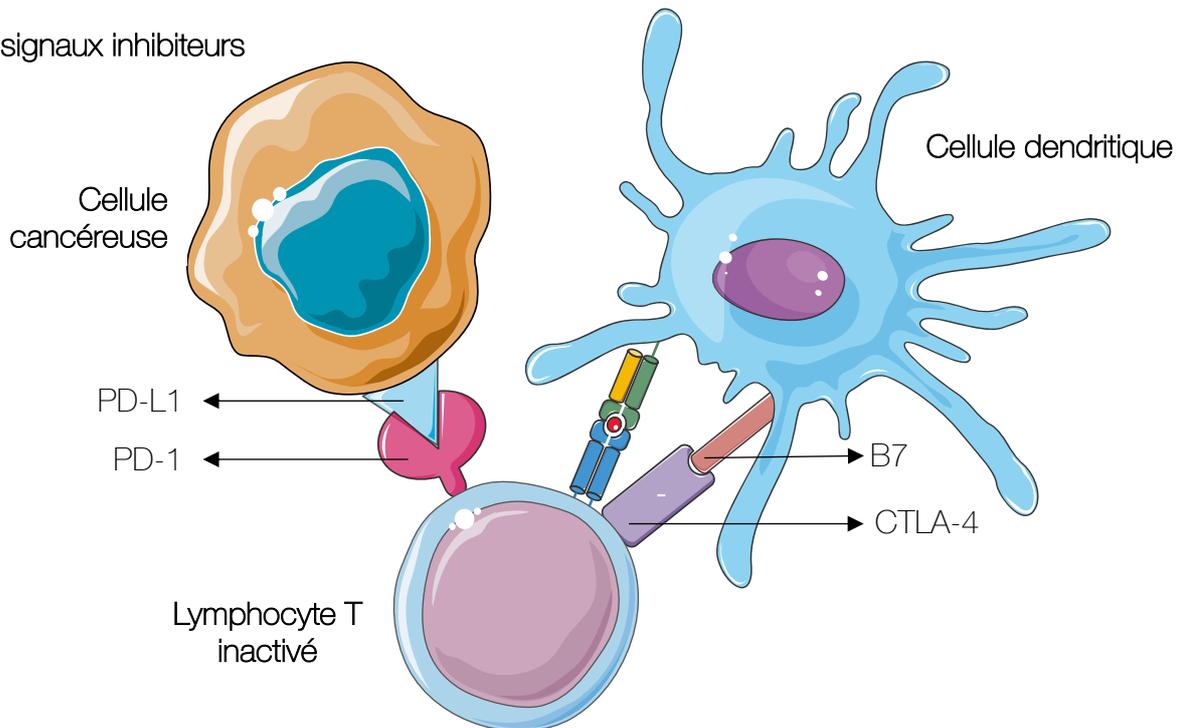


Figure 30 : Mécanismes d'activation et d'inhibition des LT *via* les points de contrôles immunitaires
a. Les signaux activateurs des LT. Les cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques présentent l'antigène tumoral (cercle rouge) via le CMH au TCR des LT. Les cellules tumorales peuvent également présenter leur antigènes directement aux LT. Cette étape constitue le premier signal d'activation des lymphocytes T. Le deuxième signal d'activation est donné par la liaison de CD28 (lymphocytes T) à son ligand B7 (cellules dendritiques). **b. Les signaux inhibiteurs des LT.** Les LT activés expriment également la protéine membranaire CTLA-4. CTLA-4 possède la même affinité que CD28 pour B7 mais cette liaison inactive les LT. La protéine membranaire PD-1 est exprimée à la surface des LT activés. La liaison de PD-L1 au récepteur PD-1 inhibe l'activation des LT. PD-L1 est très souvent exprimé à la surface des cellules cancéreuses alors qu'en condition physiologique PD-L1 est exprimé sur les macrophages. La liaison du récepteur et de son ligand inhibe l'activation des LT et bloque le système immunitaire du patient qui ne reconnaît pas sa tumeur. D'après Kim et al., 2020

immunitaire et notamment par les lymphocytes T (LT). Les LT aident l'organisme à lutter contre le cancer et leur activation est régulée par l'interaction de signaux stimulants et inhibiteurs, connus sous le nom de **points de contrôles immunitaires**. Les LT sont activés par 2 signaux (**Figure 30a**) :

- 1) La présentation des **antigènes tumoraux** aux cellules LT : les antigènes tumoraux sont portés par le **CMH** (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II) des **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)**, comme les cellules dendritiques et par le CMH des **cellules tumorales**. Les CPA vont alors présenter les antigènes tumoraux aux LT *via* leur **TCR** (récepteur des cellules LT).
- 2) L'interaction entre les molécules de **co-stimulation CD28**, portée par les LT, et le **ligand B7**, porté par les CPA.

Dans la phase d'**équilibre**, le système immunitaire ne parvient pas à éliminer toutes les cellules tumorales. Il reste cependant actif et permet de garder la tumeur sous contrôle en réduisant par exemple le risque de propagation métastatique. Ce contrôle sélectionne les cellules cancéreuses en favorisant celles qui résistent.

Les **points de contrôles immunitaires** sont aussi composés de signaux qui vont **inactiver les LT** (**Figure 30b**). Les principaux mécanismes d'**échappement au système immunitaire** des tumeurs reposent sur ces points de contrôles inhibiteurs. Dans ce sens, **CTLA-4** (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) est un récepteur qui fait partie des points de contrôle immunitaire permettant de **modérer la réponse immunitaire des LT**. Il est cytoplasmique lorsque les LT sont au repos et il devient membranaire lorsqu'ils sont activés. CTLA-4 possède la même affinité que CD28 pour le ligand B7 mais la liaison entre CTLA-4 et B7 entraîne une inhibition des LT. L'expression de CTLA-4 entraîne donc l'anergie du système immunitaire et soutient les mécanismes d'**échappement du système immunitaire** des tumeurs (Syn et al., 2017). De même, la protéine membranaire **PD-1** (Programmed death 1) est exprimée à la surface des LT activés et fait partie de ces points de contrôles immunitaires. Le ligand de PD-1 : **PD-L1** (Programmed death-ligand 1) est très souvent exprimé **à la surface des cellules tumorales** alors qu'il est exprimé par les macrophages en condition physiologique saine. La liaison de PD-1 à PD-L1 inactive alors les LT et bloque le système immunitaire du patient qui ne reconnaît pas sa tumeur. **Les**

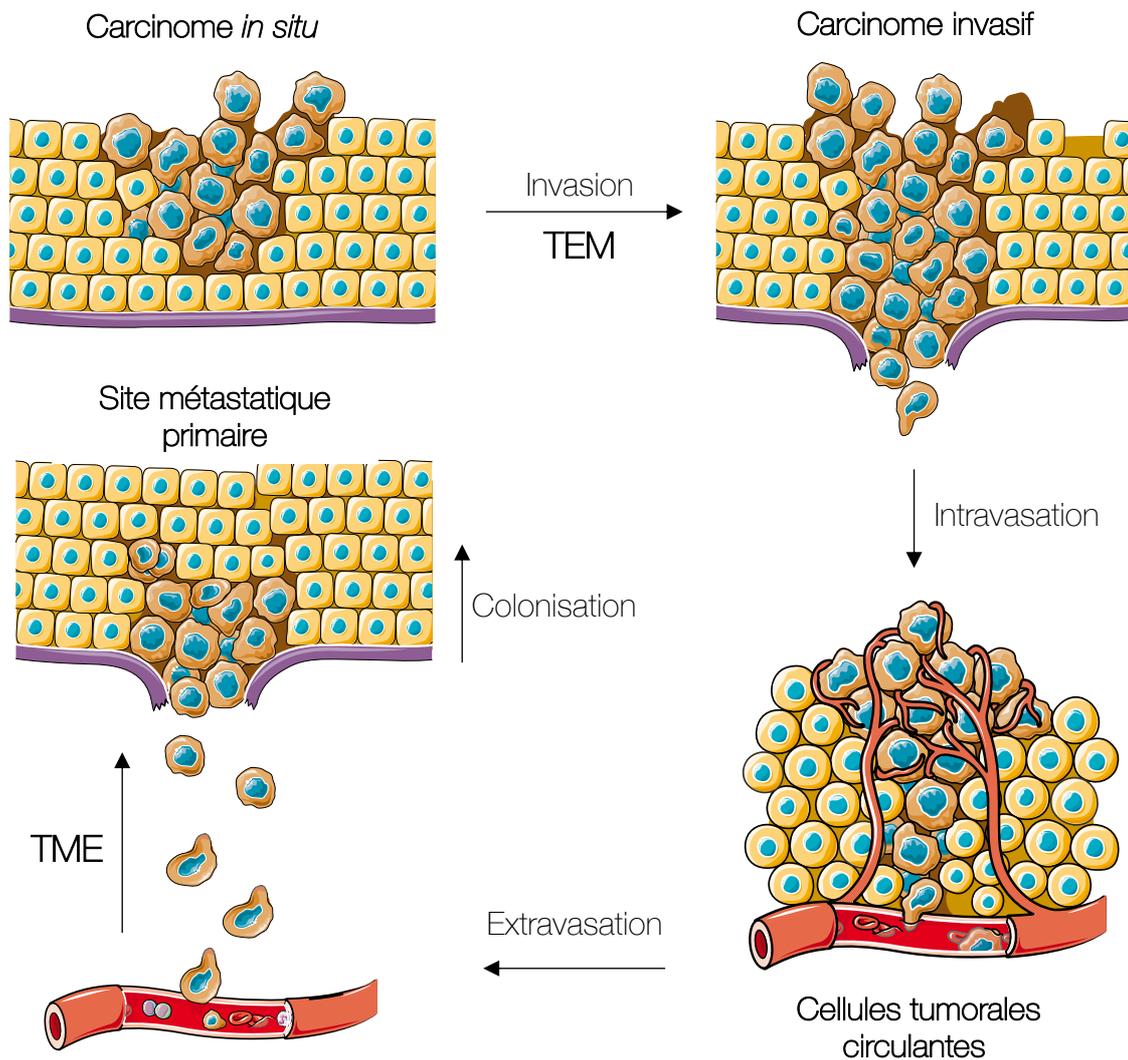


Figure 31 : Processus métastatique dans le cancer du sein

Un carcinome *in situ* se développe au sein d'un épithélium, il reste localisé et délimité par une lame basale intacte. L'invasion locale du tissu environnant par les cellules tumorales débute alors par la perte d'adhérence cellulaire et les cellules commencent à migrer. Les altérations génomiques peuvent, en effet, induire une dissémination locale des cellules du carcinome, via la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La lame basale se fragmente alors ce qui aboutit à un carcinome invasif. Les cellules tumorales circulantes peuvent alors pénétrer dans la lymphe ou les vaisseaux sanguins, permettant leur transport passif vers des organes distants, c'est le processus d'intravasation. Lors de l'extravasation, les cellules cancéreuses peuvent alors passer dans d'autres tissus que le site tumoral primaire. Elles peuvent alors le coloniser et former un nouveau carcinome via la transition mésenchymato-épithéliale (TME) et former le site métastatique primaire. *Adapté de Thiery, 2002*

cellules tumorales peuvent ainsi échapper aux LT en exprimant à leur surface PD-L1 (Bareche et al., 2018; Ghebeh et al., 2006; Mittendorf et al., 2014, p. 1; Schmid et al., 2018; Yi et al., 2021). L'échappement conduit ainsi à une anergie immunitaire, à de la tolérance voir à une indifférence vis-à-vis des cellules cancéreuses. En effet, les tumeurs ne sont pas toujours rejetées spontanément par le système immunitaire, reflétant leur capacité à maintenir un **microenvironnement immunosuppresseur** et à développer des **mécanismes d'échappement** (D. S. Chen & Mellman, 2013; Mittal et al., 2014).

4) Processus métastatique

Une **métastase** est un foyer de cellules tumorales qui prolifèrent à distance du site tumoral primaire. Le processus métastatique est constitué de plusieurs étapes : **l'invasion**, **l'intravasation**, **l'extravasation** et **la colonisation** (Figure 31).

a) L'invasion

Le processus métastatique débute par **l'invasion** locale du tissu environnant par les cellules tumorales. De très nombreux travaux ont mis en évidence que la **transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)** joue un rôle majeur dans l'invasion. Les cellules perdent leur phénotype épithélial pour passer à un phénotype mésenchymateux. La TEM est un processus réversible qui débute par la perte des marqueurs épithéliaux, tels que la E-cadhérine et la claudine 1 ce qui altère l'adhérence cellulaire (Martínez-Estrada et al., 2006). Suite à la perte d'adhérence cellulaire, la polarité apico-basale des cellules est modifiée et des remodelages du cytosquelette ont lieu, ce qui modifie la morphologie des cellules (Yilmaz & Christofori, 2010). Les cellules expriment alors des marqueurs mésenchymateux, tels que la vimentine et la N-cadherine et acquièrent des capacités migratrices (Guarino et al., 2007; Mallini et al., 2014). La TEM est régulée par de nombreuses voies de signalisation comme celles du TGF- β , de Notch, de Hedgehog et de Wnt. De nombreux facteurs de transcription activateurs ou répresseurs sont également activés tels que ceux des familles Snail (Snail et Slug), Zeb 1 et 2 (Zinc-finger E-box-binding) et bHLH tels que Twist. Les miR contribuent également à la TEM dans le cancer du sein et peuvent être répresseurs ou activateurs tel que le miR-21 ou miR-7 (Figure 32) (X. Kong et al., 2012; Kumar et al., 2020; F. Liu, Gu, et al., 2016; Thiery,

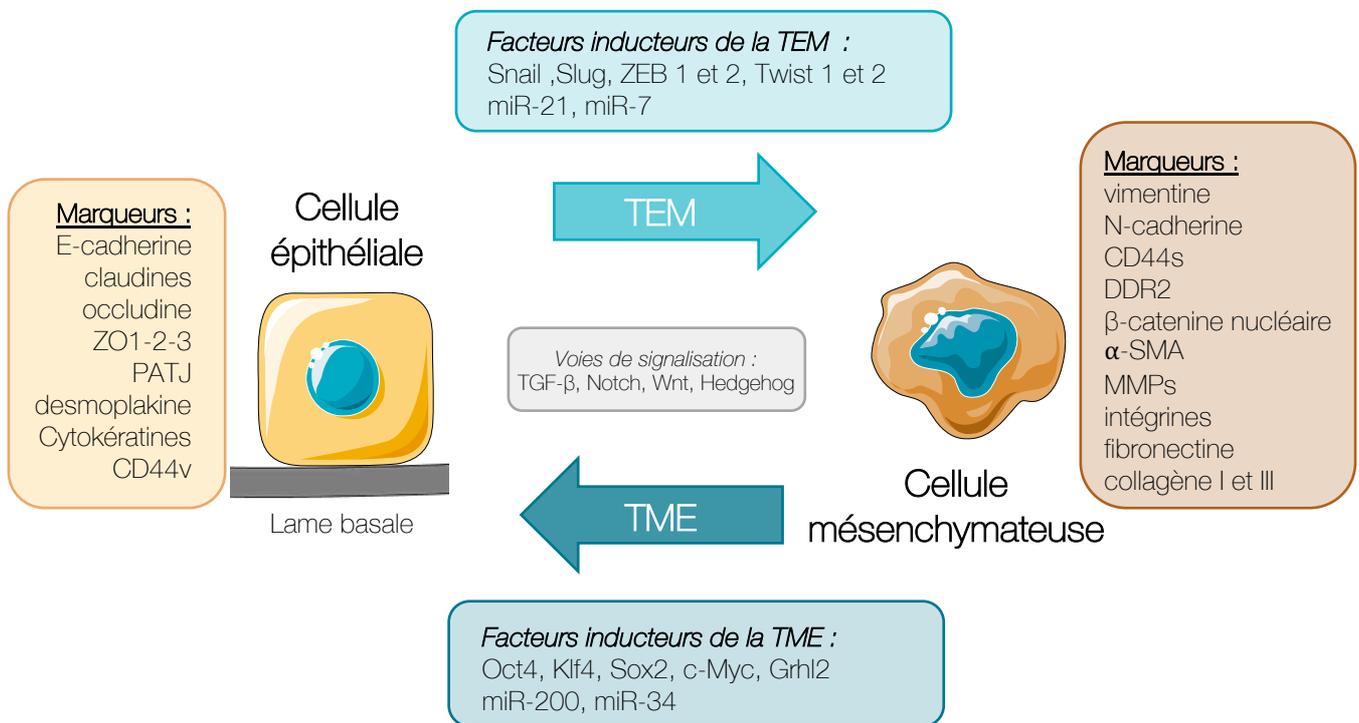


Figure 32 : Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et mésenchymato-épithéliale (TME) dans les cellules cancéreuses mammaires

Les cellules épithéliales reposent sur la lame basale et expriment des marqueurs tels que l'E-cadhérine, les claudines, l'occludine, les protéines de la famille ZO, les protéines de la famille PATJ, la desmoplakine, des cytokératines et CD44v. Lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), elles vont progressivement perdre l'expression des marqueurs épithéliaux au profit de l'expression des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, la N-cadhérine, le marqueur CD44s, l' α -SMA (α -smooth muscle actin), des intégrines et la fibronectine. La TEM est un processus réversible et est induite par des facteurs tels que Snail, Slug, ZEB 1 et 2, Twist 1 et 2, et par des miRNAs comme miR-21, et miR-7. La TME fait passer les cellules d'un état mésenchymateux à épithélial et induit l'expression des marqueurs épithéliaux. Ce processus est induit par l'expression de facteurs tels que Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc et Grhl2 et par des miRNAs comme miR-200 et miR-34. Les voies de signalisation du TGF- β , de Notch, de Wnt et de Hedgehog sont activées ou réprimées respectivement au cours de la TEM ou de la TME. *Adapté de Liu, 2016; de Kumar, 2020; Lamouille, 2014; Pei, 2019; Xiang, 2012*

2002). Pour migrer les cellules tumorales invasives sécrètent également des protéases telles que celles de la famille des MMP qui vont dégrader la matrice extracellulaire (MEC) (Hunter et al., 2008).

b) L'intravasation

Les cellules tumorales invasives peuvent alors entrer dans les circulations sanguine et lymphatique ce qui constitue l'étape d'**intravasation**. Au cours de cette étape, les cellules cancéreuses peuvent pénétrer dans la circulation sanguine en dégradant la paroi d'un vaisseau sanguin ou en empruntant directement le réseau vasculaire anarchique et perméable de la tumeur (Hunter et al., 2008). Les cellules cancéreuses se retrouvent alors dans la circulation sanguine et sont disséminées dans le corps. Elles sont appelées cellules tumorales circulantes (Scully et al., 2012).

c) L'extravasation

Les CTCs peuvent alors subir l'**extravasation** qui consiste au passage de cellules tumorales dans un organe distant du site tumoral primaire. De par leur taille, les CTCs peuvent se retrouver bloquées au niveau des capillaires d'un organe. Elles peuvent alors proliférer dans l'endothélium jusqu'à le rompre pour rejoindre le tissu constituant le site métastatique primaire (M. B. Chen et al., 2013). Les facteurs paracrines tels que le VEGF, régulent la perméabilité endothéliale et peuvent induire des ruptures de la barrière endothéliale facilitant alors passage des cellules tumorales vers l'organe (Connolly, 1991; Utoguchi et al., 1995).

d) La colonisation

Les cellules métastatiques peuvent alors **coloniser** le nouveau tissu et donner des métastases primaires. Si le microenvironnement métastatique est approprié, les cellules tumorales peuvent subir la **transition mésenchymato-épithéliale (TME)** et ré-exprimer des marqueurs épithéliaux. Ces transformations sont initiées par des facteurs de transcription tels qu'Oct4, Klf4 (Kruppel-like factor 4), Sox2, c-Myc ou encore Grhl2 (Grainyhead Like Transcription Factor 2) et permettent ainsi aux cellules tumorales de s'ancrer sur le site métastatique pour le coloniser (**Figure 32**) (Gunasinghe et al., 2012, p.; Pei et al., 2019; Xiang et al., 2012). L'ensemble de ces processus peuvent alors à nouveau se reproduire

et donner des métastases secondaires ou « métastases de métastases » (Scully et al., 2012).

V. CLASSIFICATION DES TUMEURS MAMMAIRES

1) Classification histologique

Les cancers du sein peuvent prendre naissance dans différentes parties de l'organe, telles que les canaux, les lobules ou le stroma. 95 % des tumeurs mammaires se développent à partir de cellules épithéliales dans les canaux galactophores ou dans les lobules et sont donc appelées **carcinome** ou **adénocarcinome** (Visvader, 2009). On parlera plus précisément de carcinome canalaire ou lobulaire infiltrant ou *in situ* en fonction de la localisation de la tumeur. Les tumeurs *in situ* sont des tumeurs dont les cellules restent localisées dans le tissu d'origine. Cependant, lorsque la tumeur grandit et s'infiltré dans les tissus qui l'entourent, on parle de tumeurs infiltrantes. Les carcinomes constituent la majorité des cancers du sein tandis que les **sarcomes**, qui se développent à partir du tissu mésenchymateux mammaire, sont plus rares (Feng et al., 2018).

2) Les stades du cancer

Au moment du diagnostic, le stade du cancer du sein permet de déterminer l'étendue de la maladie. Trois critères sont pris en compte pour l'évaluer : la taille de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques ainsi que la présence ou non de métastases. Depuis les années 1940, ces trois critères permettent de définir le stade du cancer selon la **classification TNM** (Tumor, Nodes, Metastasis) de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Elle est établie à partir de l'examen anatomopathologique des tumeurs et de l'analyse microscopique des ganglions prélevés. A partir des caractéristiques observées, une annotation par lettre ou chiffre est portée pour T, N et M (Cserni et al., 2018).

- **Tx à T4** pour la taille de la tumeur.
- **Nx à N3** pour le degré d'envahissement des ganglions.
- **Mx, M0 et M1** pour la présence ou non de métastases.

La lettre x correspond à une non-évaluation du paramètre soit parce que ce n'est pas possible, soit pour cause de renseignements insuffisants pour le classement.

Tableau 14 : Les grades du cancer du sein

L'anatomopathologiste évalue trois paramètres morphologiques : l'architecture tumorale, la forme et la taille du noyau des cellules tumorales et l'activité mitotique qui reflète la vitesse à laquelle les cellules cancéreuses se divisent. Il donne ensuite une note allant de 1 à 3 pour chaque paramètre. *Selon INCA*

Note	Architecture tumorale	Noyaux	Activité mitotique
1	Cellules tumorales bien différenciées (> 75% de la tumeur)	Noyaux réguliers entre eux et de taille < 2 fois la taille de noyaux de cellules normales	< à 9 mitoses
2	Cellules tumorales moyennement différenciées (10 à 75 % de la tumeur)	Atypies modérées des noyaux tumoraux	10 à 18 mitoses
3	Cellules tumorales peu différenciées (<10 % de la tumeur)	Noyaux irréguliers ou de taille > à 3 fois celle de noyaux normaux et nucléole proéminent	> à 18 mitoses

Tableau 15 : Histopronostique d'Elston-Ellis

La somme des notes obtenues pour chacun des trois paramètres donne un score classé de I à III aussi appelé histopronostique d'Elston-Ellis. Les tumeurs sont alors qualifiées respectivement de « bas grade », de « grade intermédiaire » et de « haut grade ». L'évaluation du grade des tumeurs précise également le pronostic de la maladie. *Selon INCA*

Score	Grade	Pronostic
3 à 5	Grade I : Bas grade	Favorable
6 à 7	Grade II : Grade intermédiaire	Intermédiaire
8 à 9	Grade III : Haut grade	Réservé

Bien que cette hiérarchisation des tumeurs soit reconnue et systématiquement utilisée en clinique, il a été montré que le stade d'une tumeur ne définit pas sa biologie (Cserni et al., 2018). C'est pourquoi elle a été révisée pour aboutir à la 8^{ème} édition en 2017. Cette classification incorpore, désormais, des facteurs biologiques tels que le statut des récepteurs HER2 (Human Epidermique Receptor 2), ER (Estrogen Receptor) et PR (Progesteron Receptor), le grade histologique et les tests pronostics multigéniques (Sawaki et al., 2019).

3) Le grade des tumeurs mammaires

L'agressivité d'une tumeur mammaire est définie par son grade. C'est l'examen anatomopathologique qui permet de l'évaluer à l'aide de trois paramètres morphologiques : l'architecture cellulaire, la forme et la taille du noyau et l'activité mitotique des cellules tumorales (INCA).

- **L'architecture cellulaire** : au cours du processus tumoral, les cellules changent d'apparence. Il existe plusieurs degrés de malignité : plus une cellule ressemble aux cellules normales, plus elle est différenciée et moins elle est agressive. A l'inverse, plus une cellule se modifie et devient indifférenciée, plus elle est agressive.
- **La forme du noyau** : le noyau de la cellule change également de forme et de taille lorsque la cellule devient cancéreuse.
- **L'activité mitotique** : elle reflète le nombre de cellules en division. L'aspect d'une cellule en mitose est caractéristique ce qui permet à l'anatomopathologiste de compter sur une surface définie le nombre de cellules qui se divisent.

Chacun de ces critères est évalué par une note allant de 1 à 3 (**Tableau 14**). Le grade du cancer correspond à la somme des notes obtenues pour chacun des trois critères. Lorsque la somme de ces notes est comprise entre 3 et 5, on parle de grade I ; entre 6 et 7 de grade II et au-delà de 7 de grade III. On obtient ainsi un score classé de I à III aussi appelé **histopronostique d'Elston-Ellis** et les tumeurs sont alors qualifiées respectivement de « **bas grade** », de « **grade intermédiaire** » et de « **haut grade** » (**Tableau 15**) (INCA).

Tableau 16 : Classification moléculaire des tumeurs mammaires utilisée en clinique

Le tableau reprend les différents sous-types de tumeurs mammaires ainsi que leur prévalence, leur grade, le pronostic vital des patients ainsi que l'expression des marqueurs moléculaires. Le tableau reprend aussi les anomalies moléculaires caractéristiques de ces tumeurs. La mention *m* signifie que le gène de la protéine est muté. La mention + signifie que la protéine est fortement exprimée. La mention *a* signifie une amplification du gène. La mention – signifie une perte ou la non expression de la protéine. *D'après Szymiczek, 2021; Tsang and Tse, 2020 ; Eroles, 2012*

Sous-types	Prévalence	Grade	Pronostic vital	Marqueurs moléculaires utilisés en clinique	Autres marqueurs moléculaires
Luminal A	50-60%	1-2	Favorable	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ Ki-67 < 14%	PIK3CA ^m , GATA3 ^{m+} , MAP3K1 ^m , KRT8 ⁺ , KRT18 ⁺ Cycline D1 ^a
Luminal B	10-20%	2-3	Intermédiaire	ER ^{+/-} , PR ^{+/-} , HER ^{+/-} Ki-67 > 14%	PIK3CA ^m , TP53 ^m , MAPK ^m KRT8 ⁺ , KRT18 ⁺ ,
HER2	10-15%	2-3	Mauvais	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺ Ki-67 > 14%	EGFR ⁺ , TP53 ^m , FGFR4 ⁺ , BCL2- Cycline D1 ^a
TNBC	15-20%	3	Défavorable	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ Ki-67 > 14%	TP53 ^{m/-} (65%), KRT5/6 ⁺ , KRT17 ⁺ , MYC ^a PIK3CA ^{a/m} BRCA1/2 ^{m/-}

4) Classification moléculaire utilisée en clinique

Depuis les années 2000, les avancées considérables des techniques de biologie moléculaire et notamment celle des puces à ADN ont permis la mise en place de classifications dites moléculaires. Ces études ont mis en évidence l'existence de sous-types tumoraux mammaires avec des profils d'expression génique susceptibles de refléter leurs différences moléculaires. Le but de ces classifications est de déterminer le plan de traitement optimal pour les patients sur la base de la biologie des tumeurs et de leur sensibilité aux traitements (Szymiczek et al., 2021).

La classification moléculaire couramment utilisée en clinique est principalement basée sur le niveau d'expression de 3 récepteurs hormonaux : les récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) et le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) ; ainsi que sur le marqueur de prolifération Ki67 (Perou et al., 2000; Soliman & Yussif, 2016; Sorlie et al., 2001; Szymiczek et al., 2021) (**Tableau 16**).

a) Le sous-type luminal A

Les tumeurs luminal A dérivent principalement de cellules épithéliales lumorales et expriment les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, elles sont dites hormono-dépendantes ER⁺PR⁺ (Perou et al., 2000). Ce sous-type représente la majorité des tumeurs mammaires (50-60 %) et les patients qui en sont atteints possèdent le pronostic vital le plus favorable (Eroles et al., 2012; Sorlie et al., 2001; Szymiczek et al., 2021). Ces tumeurs sont principalement de bas grade et présentent une expression élevée des gènes épithéliaux lumoraux. Elles expriment les cytokératines 8 et 18 (KRT8 et 18) (Sorlie et al., 2001) et présentent une surexpression de la cycline D1 (Tsang & Tse, 2020). Elles sont souvent associées à des mutations somatiques des gènes PIK3CA, GATA3 et MAP3K1 (Dai et al., 2015; Norum et al., 2014).

b) Le sous-type luminal B

Les tumeurs du sous-groupe B expriment moins les récepteurs ER et PR que le sous type luminal A (Norum et al., 2014; Sorlie et al., 2003). Elles peuvent également présenter une surexpression du récepteur au facteur de croissance HER2 et représentent 10 à 20 %

des tumeurs mammaires (Eroles et al., 2012; Perou et al., 2000). Le marqueur de prolifération Ki-67 a été introduit pour séparer les tumeurs Luminal A et B (Sorlie et al., 2001). Le pourcentage de cellules marquées au Ki-67 est supérieur à 14 % pour les tumeurs luminal B et inférieur pour les tumeurs luminal A. Les patients atteints de ce sous-type présentent un moins bon pronostic vital que ceux du sous-type luminal A. Ces tumeurs expriment les cytokératines 8 et 18 et présentent des mutations fréquentes dans les gènes PIK3CA et TP53 et la voie de signalisation MAPK (Norum et al., 2014; Sorlie et al., 2001).

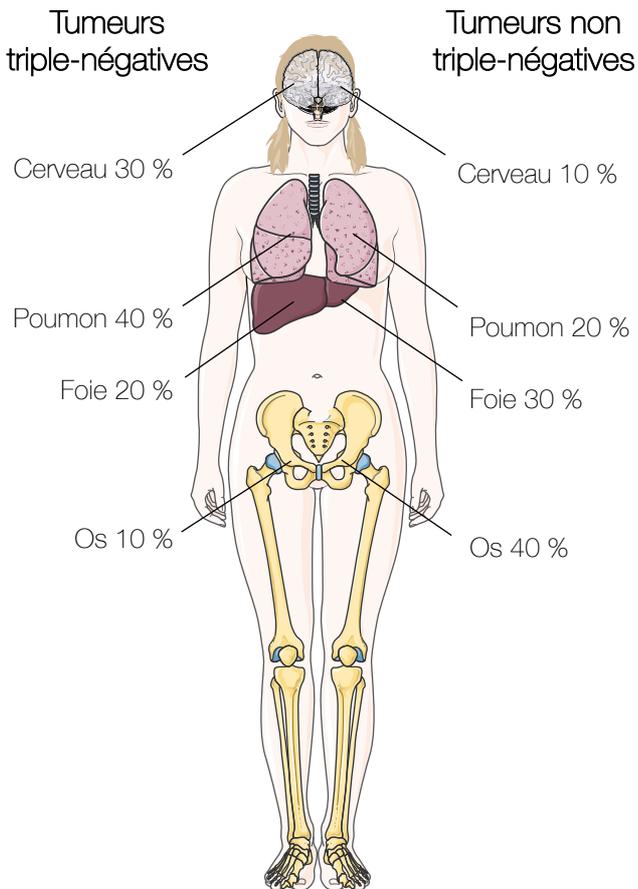
c) Le sous-type HER2

Les tumeurs HER2 représentent 10-15 % des cancers mammaires et présentent une amplification anormalement élevée du gène du récepteur HER2, mais aucune expression de PR et ER. Ces tumeurs sont dites HER2⁺ (Eroles et al., 2012; Perou et al., 2000). L'augmentation membranaire de HER2 est corrélée aux tumeurs de haut grade et à une prolifération accrue des cellules tumorales (Ki67 > 14 %) (Mueller et al., 2018; Nassar et al., 2014). La croissance tumorale de ces cellules est principalement stimulée par la voie de signalisation EGFR/HER2 (récepteur au facteur de croissance épidermique) (Moasser, 2007). TP53 est fréquemment muté dans ce sous-type. Les patients atteints de ces tumeurs présentent un mauvais pronostic vital (Sorlie et al., 2001).

d) Le sous-type triple-négatif

Ces tumeurs n'expriment aucun des récepteurs ER, PR ou HER2 c'est pourquoi elles sont appelées triple-négatives ou TNBC (Triple Negative Breast Cancer) (Perou et al., 2000). Elles représentent 15 à 20 % des tumeurs mammaires (Szymiczek et al., 2021). Les tumeurs triple-négatives constituent le sous-groupe le plus hétérogène (Andre et al., 2009; Bertucci et al., 2008; Han et al., 2008; Kreike et al., 2007; Turner et al., 2010) et sont également appelées basal-like par certains auteurs (Kreike et al., 2007; Sotiriou et al., 2003) ce qui explique pourquoi il n'y a pas de dénomination internationalement acceptée pour ces tumeurs (Manjunath & Choudhary, 2021). Les tumeurs triple-négatives expriment fortement les cytokératines 5/6 et 17 (KRT5/6 et 17) (Tan et al., 2008) et présentent le plus haut pourcentage de tumeurs mutées pour BRCA1 et 2

a.



b.

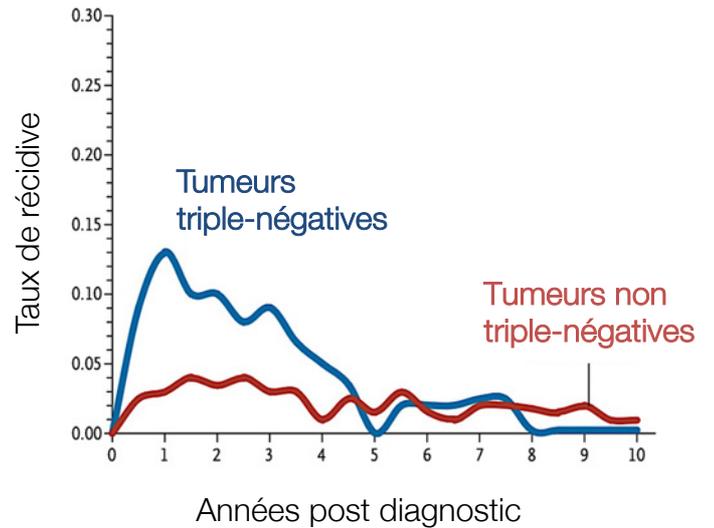


Figure 33 : Principaux sites métastatiques et taux de récurrence des tumeurs mammaires après diagnostic

a. Les tumeurs triple-négatives forment préférentiellement des métastases au niveau du cerveau (30 %) et des poumons (40 %) comparés aux tumeurs mammaires non triple-négatives qui métastasent majoritairement dans les os (40 %). b. Les patients atteints d'une tumeur triple-négative ont un taux de récurrence nettement supérieur à celui des patients atteints d'un cancer du sein non triple-négatif durant les 5 années suivant leur diagnostic. Adapté de Rodríguez-Pinilla et al., 2006 et Foulkes et al., 2010

(Bianchini et al., 2016; Schneider et al., 2008). Ces mutations expliquent en partie le niveau élevé d'instabilité génomique de ces tumeurs (Koboldt et al., 2012). Les gènes TP53 (82 %) et PIK3CA (10 %) sont les deux gènes somatiques les plus fréquemment mutés (Bareche et al., 2018; Cancer Genome Atlas Network, 2012; Lehmann & Pietenpol, 2015; Sorlie et al., 2001). Les gènes MYC (64 %), PIK3CA (51 %) sont souvent amplifiés dans les tumeurs TNBC alors que TP53 (55 %) est généralement délété (Bareche et al., 2018). Cependant, aucune anomalie moléculaire caractéristique du sous-type TNBC n'a pu être identifiée jusqu'à présent (Nik-Zainal et al., 2016; Rakha & Pareja, 2021).

VI. LES CARACTERISTIQUES DES TNBC

Les tumeurs triple-négatives touchent des femmes significativement plus jeunes que les autres sous-types de tumeurs (Foulkes et al., 2010; S. Kim et al., 2020). La plupart des cancers du sein de type triple-négatif sont des tumeurs très agressives, dit de haut grade (Foulkes et al., 2010; Tan et al., 2008). Les TNBC prolifèrent de manière accrue ce qui explique qu'elles ont, en général, une taille plus importante que celles des autres sous-types (Dent et al., 2007; Foulkes et al., 2010). Il s'agit souvent d'un cancer dit d'intervalle, c'est-à-dire qu'il est découvert entre deux dépistages (Rakha et al., 2008). De plus, beaucoup sont diagnostiqués à un stade avancé, alors que le cancer s'est déjà propagé aux ganglions lymphatiques (Foulkes et al., 2010) ou à d'autres organes comme les poumons (40 %) et le cerveau (30 %) (Minn et al., 2005; Tsuda et al., 2000). Contrairement aux autres sous-types tumoraux, les tumeurs triple-négatives forment plus de métastases cérébrales et pulmonaires et moins de métastases osseuses (**Figure 33a**) (Rodríguez-Pinilla et al., 2006). Les TNBC présentent également un taux de récurrence 2 à 3 fois supérieur aux tumeurs non triple-négatives dans les 5 ans suivant leur diagnostic (**Figure 33b**) (Dent et al., 2007; Foulkes et al., 2010). Tous les décès consécutifs aux TNBC surviennent dans les 10 ans suivant leur diagnostic alors qu'ils ne surviennent qu'au bout de 18 ans pour les autres sous-types tumoraux. L'ensemble de ces facteurs engendre le pronostic vital le moins favorable parmi tous les sous-types (Perou et al., 2000; Szymiczek et al., 2021).

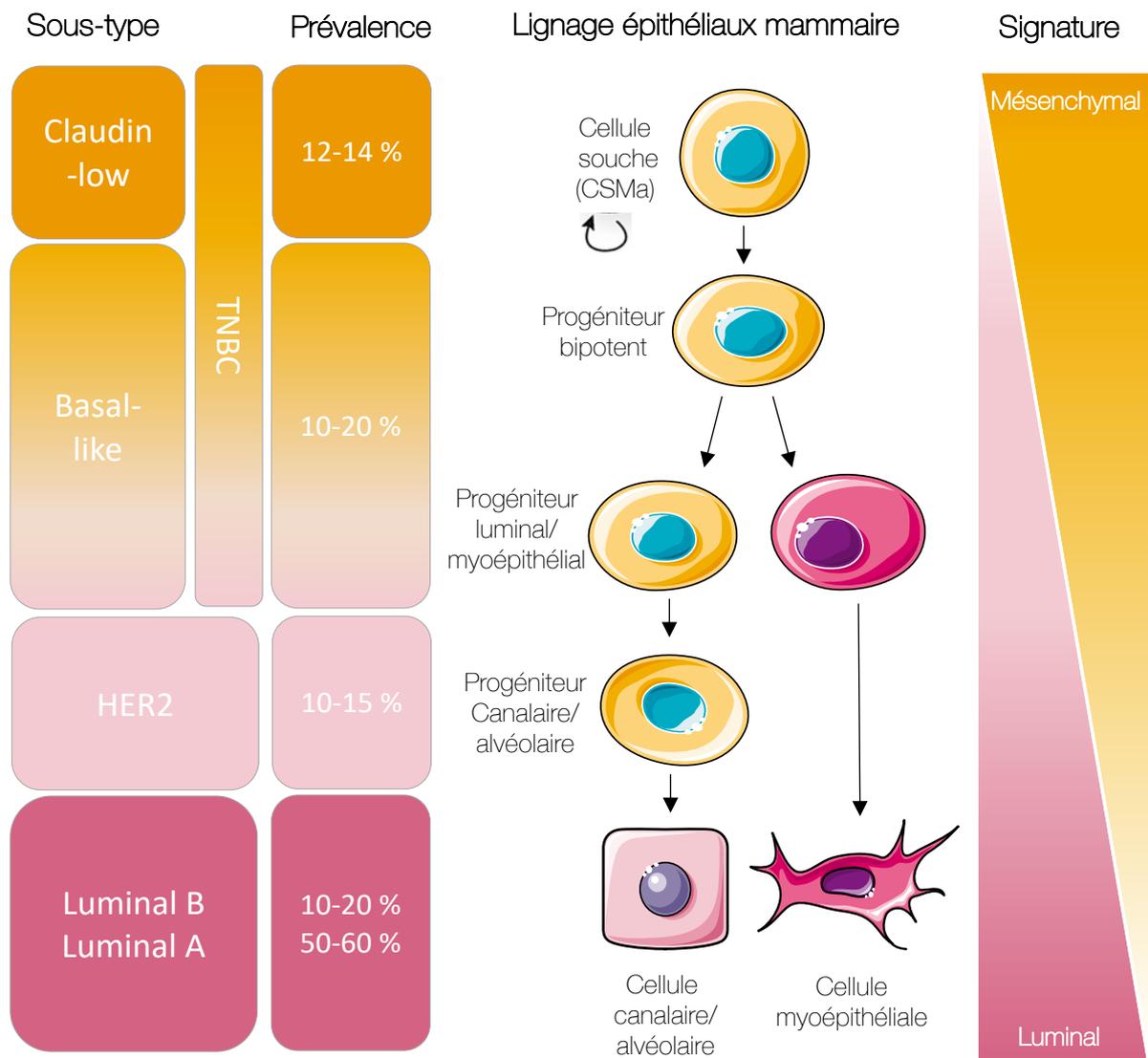


Figure 34 : Les sous-types tumoraux mammaires : sous-type, prévalence, lignage et signature moléculaire

Le profilage moléculaire des tumeurs mammaires a permis d'établir un lien entre les caractéristiques moléculaires et phénotypiques de chaque sous-type tumoral et l'origine cellulaire de ces tumeurs. La fréquence des sous-types est également indiquée. *Adapté de Herschkowitz et al., 2007 et Prat and Perou, 2009*

La classification établie par Perou en 2000 ne prend pas en compte l'hétérogénéité des TNBC, c'est pourquoi d'autres classifications ont été établies avec de nouveaux marqueurs tumoraux (Szymiczek et al., 2021).

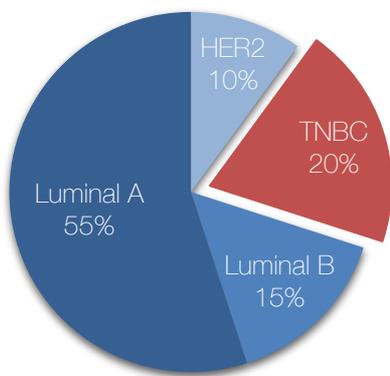
1) Les tumeurs claudin-low et basal-like

En 2007, Herschkowitz et son équipe mettent en évidence l'existence du sous-type « claudin-low » (Herschkowitz et al., 2007). Ces tumeurs représentent environ 7 à 14 % des tumeurs mammaires et n'expriment pas les récepteurs ER, PR et HER2 (Dai et al., 2016). Elles sont cliniquement classées comme TNBC avec les tumeurs basal-like. Ces tumeurs présentent un faible niveau d'expression des gènes impliqués dans l'adhérence cellule-cellule tels que les claudines 3, 4 et 7, l'occludine, la cinguline et la E-cadhérine (Herschkowitz et al., 2007; Prat & Perou, 2011). Elles sont souvent désignées comme des tumeurs mésenchymateuses et n'expriment pas ou peu de caractéristiques des cellules épithéliales comme CD24, EpCAM et MUC1 (Mucin-1). De plus, elles sont enrichies en signatures génomiques de la TEM comme la vimentine (Prat & Perou, 2011; Taube et al., 2010) et des cellules souches comme les marqueurs CD44⁺/CD49f⁺, CD24⁻/EpCAM⁻ et ALDH1 (aldehyde dehydrogenase isoform 1) (Creighton et al., 2009; Hennessy et al., 2009; Prat et al., 2010). Ces tumeurs resteraient donc au stade peu différencié de CSC (**Figure 34**) (Carey et al., 2007; Lim E et al., 2009; Prat & Perou, 2009).

2) Sous classification des TNBC par Lehmann

En 2011, différents sous-groupes de TNBC ont été identifiés sur la base des signatures moléculaires (**Figure 35**) (Lehmann et al., 2011). Bien que ces sous-types moléculaires ne fassent pas partie de l'évaluation de routine des TNBC, ils ont mis en évidence le degré d'hétérogénéité de ces tumeurs (Rakha & Pareja, 2021). En 2013, une autre sous-classification des TNBC a été proposée par l'équipe de Burstein ; elle regroupe les TNBC en 4 sous-groupes (Burstein et al., 2015). Cependant, cette sous-classification a été montré comme moins efficace que celle de Lehmann pour prédire la réponse aux traitements (Bareche et al., 2018; Lehmann et al., 2011, 2014).

- **Basal-Like 1 ou BL1 :**



Sous-type	%	Caractéristiques
Basal like 1 BL1	22%	Prolifération cellulaire Réponse aux altérations de l'ADN, instabilité génétique
Mesenchymal M	21%	Gènes de la TEM et de l'angiogenèse
Immunomodulatory IM	18%	Voie de signalisation immunitaires, d'échappement immunitaire, de l'inflammation
Basal like 2 BL2	12%	Voies des facteur de croissance, glycolyse et gluconéogenèse
Mesenchymal stem-like MSL	10%	Gènes de la TEM, des cellules souches et de l'angiogenèse
Luminal androgen receptor LAR	9%	Voies de signalisation des hormones stéroïdiennes

Figure 35 : Classification des différents sous-types de TNBC

En 2011, Lehmann établi une classification des TNBC et met en évidence l'existence de sous-types tumoraux : Basal-like 1 (BL1), Mesenchymal (M), Immunomodulatory (IM), Basal-like 2 (BL2), Mesenchymal stem-like (MSL), Luminal androgen receptor (LAR). Les pourcentages des différents types de tumeurs mammaires sont précisés dans le graphique bleu tandis que la prévalence des différents sous-type de TNBC et leurs signatures moléculaires sont présentés en rouge. *Adapté de Perou et al., 2000 et Lehmann et al., 2011*

Les tumeurs basal-like 1 sont caractérisées par une forte implication des gènes du cycle cellulaire et de la réparation des dommages de l'ADN. La nature hautement proliférative de ce sous-type entraîne un fort marquage de Ki67 (Burstein et al., 2015; S. Kim et al., 2020; Lehmann et al., 2011; Tsang & Tse, 2020).

- **Basal-Like 2 ou BL2 :**

Les tumeurs basal-like 2 sont associées à une forte expression des gènes des voies de signalisation des facteurs de croissance, de la glycolyse et de la néoglucogenèse. Ce sous-type présente des caractéristiques suggérant une origine basale/myoépithéliale (S. Kim et al., 2020; Lehmann et al., 2011).

- **Immunomodulatory ou IM :**

Les tumeurs du sous-type immunomodulatory présentent des signatures de gènes associés aux processus d'échappement au système immunitaire et aux processus d'inflammation favorisant le développement de la tumeur. Ces tumeurs présentent une forte activation des voies de signalisation des lymphocytes B, des cellules NK (natural killer), et des cellules LT (Th1 et Th2) comme les voies de CTLA4 et de PD-1/PD-L1 (Bareche et al., 2018; Burstein et al., 2015; Lehmann et al., 2011).

- **Mesenchymal ou M :**

Les tumeurs du sous-type mesenchymal présentent une faible expression des voies de signalisation immunitaire. Les voies de signalisation impliquées dans la migration, et la différenciation cellulaire sont fortement activées dans ces tumeurs. Les cellules de ces tumeurs présentent une morphologie principalement sarcomateuses (Burstein et al., 2015; S. Kim et al., 2020; Lehmann et al., 2011).

- **Mesenchymal Stem-Like ou MSL :**

Les tumeurs mesenchymal stem-like sont caractérisées par une activation des voies de signalisation associées aux cellules souches, des voies angiogéniques, des processus d'invasion et de métastases et par une faible expression des voies de la prolifération cellulaire. Les tumeurs MSL présentent le plus faible taux de mutation driver du cancer du sein. Le sous-type MSL présente également une faible expression des claudines 3, 4 et 7 correspondant au sous-type claudin-low identifié par l'équipe d'Herschowitz (Bareche et al., 2018; S. Kim et al., 2020; Lehmann et al., 2011).

- **Luminal Androgen Receptor ou LAR :**

Les tumeurs luminal androgen receptor présentent le profil moléculaire le plus distinct avec une expression élevée des voies de signalisation liées aux hormones stéroïdiennes androgène/oestrogène, au métabolisme de la porphyrine. Elles expriment les récepteurs aux androgènes ainsi que la prolactine. Ces tumeurs sont négatives pour ER α en IHC (immunohistochimie) (ER $^{-}$) mais présentent l'activation des voies de signalisation/régulation associées aux oestrogènes (Asghar et al., 2017; Bareche et al., 2018; Burstein et al., 2015; Denkert et al., 2017; Lehmann et al., 2011).

CHAPITRE 3 : LE TRAITEMENT DES TNBC UN DEFIS MAJEUR EN CANCEROLOGIE

I. LE TRAITEMENT DES TNBC

La forte hétérogénéité des TNBC et l'absence de marqueurs moléculaires caractéristiques de ce sous-type rendent complexe le développement de traitements spécifiques. Les patients atteints de TNBC sont principalement traités par chimiothérapie, chirurgie et radiothérapie. De nouveaux traitements ciblés sont également disponibles mais leur utilisation reste encore fortement limitée.

1) La chirurgie

La chirurgie est le principal traitement du cancer du sein triple-négatif. En effet, elle est utilisée dans 80 % des cas. Le plus souvent c'est une **chirurgie conservatrice** qui consiste à retirer uniquement la tumeur en conservant le sein. Elle peut parfois être plus large et nécessiter d'enlever la totalité du sein, c'est ce que l'on appelle une **mastectomie**. Si la totalité du sein est enlevée, différentes techniques de **reconstruction mammaire** sont alors proposées au patient (HAS, haute autorité de santé, 2020).

L'exérèse du ganglion sentinelle peut également être réalisée. Elle consiste à retirer par chirurgie le ou les ganglions les plus proches de la tumeur afin de les analyser pour savoir s'ils contiennent des cellules cancéreuses. L'objectif est de préciser si la tumeur s'étend au-delà du compartiment tumoral et de déterminer si un traitement complémentaire par chirurgie, chimiothérapie ou radiothérapie des ganglions est nécessaire (INCA, 2018).

2) La radiothérapie

La radiothérapie complète très souvent la chirurgie et utilise des **rayons ionisants** afin de détruire localement les cellules cancéreuses résiduelles tout en préservant au maximum les tissus sains voisins. La radiothérapie est la plus souvent externe mais peut aussi utiliser des sondes internes implantées dans le sein. Les rayons ionisants peuvent aussi être

Les classes d'agents de chimiothérapie	Les agents de chimiothérapie
Les antimétabolites	Méthotrexate, 5-FU, Capécitabine, Gemcitabine, 5-aza
Les inhibiteurs de topoisomérases	Épirubicine, Doxorubicine
Les agents alkylants	Cyclophosphamide, Carboplatine, Cisplatine
Les poisons du fuseau mitotique	Vinorelbine, Docétaxel, Paclitaxel, Éribuline

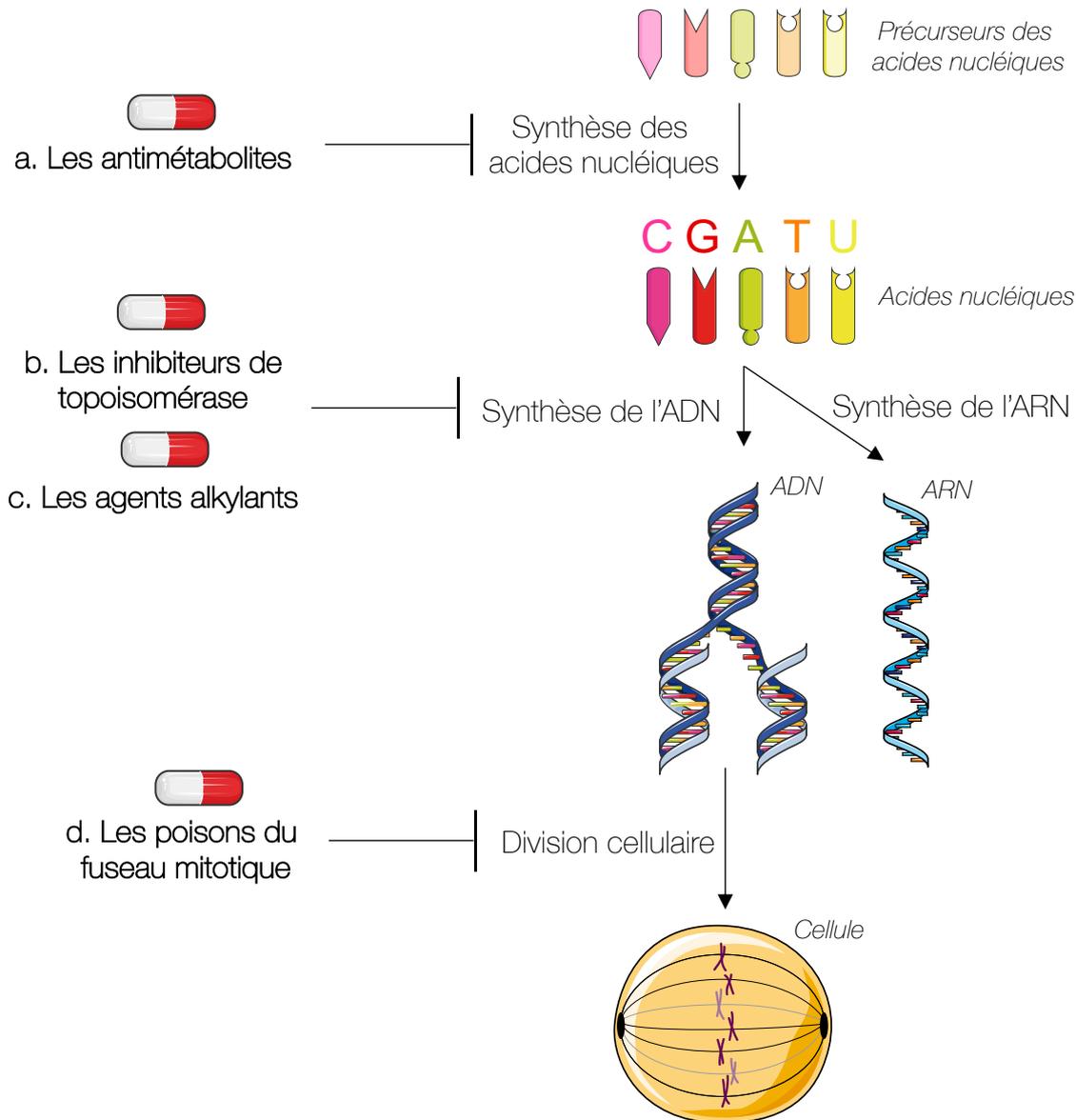


Figure 36 : Modes d'action des différentes classes d'agents de chimiothérapie et leurs cibles

Il existe plusieurs classes d'agents de chimiothérapie : les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases, les agents alkylants et les poisons du fuseau mitotique. Le tableau reprend les différents agents de chimiothérapie couramment utilisés dans le traitement des tumeurs mammaires. **a.** Les antimétabolites inhibent la synthèse des acides nucléiques et/ou sont incorporés dans l'ADN et les ARN. Ils inhibent ainsi la prolifération cellulaire tout en étant cytotoxiques. **b.** Les inhibiteurs de topoisomérase s'intercalent entre les bases de l'ADN et empêchent la séparation des brins d'ADN lors de la réplication. **c.** Les agents alkylants créent des liaisons covalentes entre les deux brins de l'ADN et inhibent la réplication de l'ADN. **d.** Les poisons du fuseau mitotique empêchent la formation des microtubules et du fuseau mitotique et inhibent ainsi la mitose. *D'après la HAS, 2021*

dirigés vers les ganglions colonisés par les cellules tumorales. La radiothérapie contribue à diminuer le risque de récurrence du cancer du sein de 70 % (HAS, 2019).

3) La chimiothérapie

La **chimiothérapie** n'est pas systématique, elle est proposée en fonction du stade et du risque de récurrence du cancer. Elle est toujours proposée en cas de cancer du sein métastatique (Manjunath & Choudhary, 2021). La chimiothérapie peut être **néoadjuvante** lorsqu'elle est réalisée avant la chirurgie en vue de réduire la taille de la tumeur. Elle est **adjuvante** lorsqu'elle est utilisée après la chirurgie afin de réduire le risque de récurrence. La **chimiothérapie** est un traitement systémique qui est administré, le plus souvent, par perfusion ou *via* une chambre implantable et parfois par voie orale.

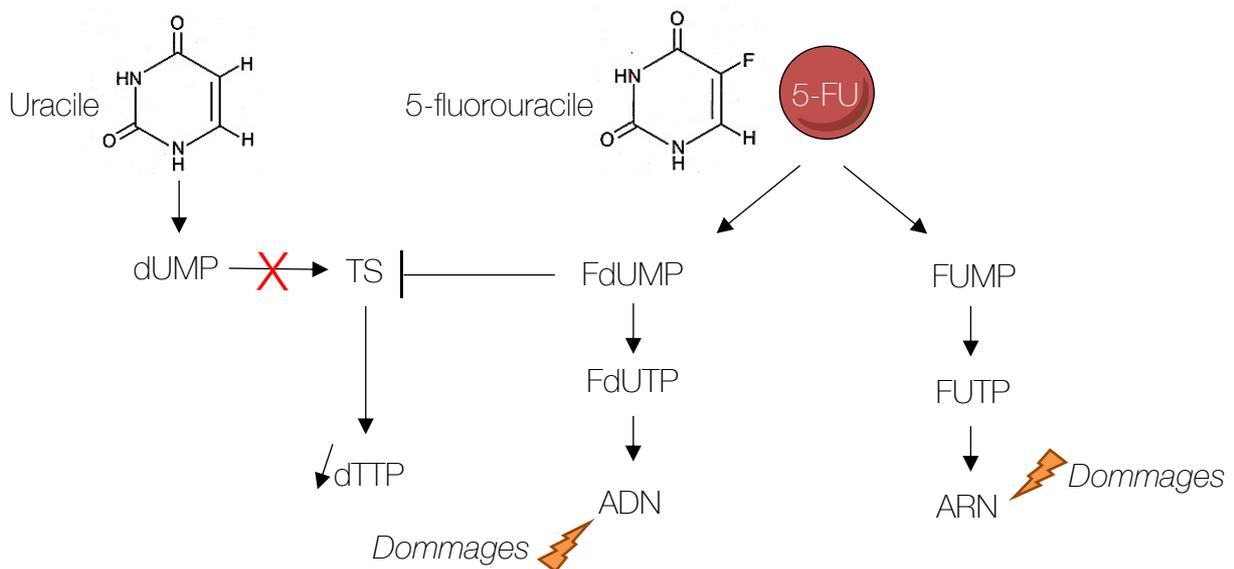
Il existe plusieurs classes d'**agents de chimiothérapies** (Figure 36). Ils sont utilisés dans le but d'engager les cellules cancéreuses vers un processus de mort cellulaire. Ce sont des composés **cytostatiques** qui ciblent les cellules qui se divisent très rapidement, comme les cellules cancéreuses, en bloquant leur cycle cellulaire. Ils peuvent aussi être **cytotoxiques** et induire des dégâts cellulaires importants qui provoquent la mort des cellules cancéreuses, le plus souvent par apoptose (INCA, juin 2021).

a) Les antimétabolites

Les antimétabolites sont des agents cytostatiques qui inhibent le cycle cellulaire en phase S. Ils bloquent les enzymes qui synthétisent les acides nucléiques et inhibent ainsi la prolifération cellulaire. Ils peuvent également être cytotoxiques lorsqu'ils sont incorporés dans l'ADN et les ARN.

On distingue 2 types d'antimétabolites :

- Les **analogues de l'acide folique** sont reconnus par les enzymes du cycle des folates du fait de leur analogie de structure avec l'acide folique et bloquent ainsi leur cycle. On retrouve ainsi le **méthotrexate** qui inhibe indirectement la



Dommages de l'ADN	Dommages des ARNs
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Perturbation de la synthèse de l'ADN ✓ Perturbation de la réparation de l'ADN ✓ Mauvaise incorporation dans l'ADN : mutagénèse ✓ Cassure des brins de l'ADN ✓ Mort cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Perturbation de la synthèse des ARNs ✓ Mauvaise incorporation de nucléotides dans les ARNs ✓ Perturbation des fonctions des ARNs ✓ Mort cellulaire

Figure 37 : Structure et mécanisme d'action du 5-fluorouracile

La base pyrimidique uracile est métabolisée en dUMP qui est le substrat naturel de la thymidilate synthase (TS). Le 5-fluorouracile (5-FU) est métabolisé par les cellules en fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP). Ce dernier inhibe l'enzyme TS qui catalyse la synthèse de la thymidine (dTTP). L'absence de dTTP dans les cellules engendre des perturbations de la synthèse de l'ADN, des défauts de réplication et de réparation de l'ADN, des dommages de l'ADN et la mort des cellules. La 5-FU est également métabolisé en FdUTP et en FUMP puis FUTP qui s'incorporent respectivement dans l'ADN et les ARN. Cette mauvaise incorporation de nucléotides induit des mutations de l'ADN, des cassures des brins d'ADN et la mort cellulaire. L'incorporation de FUTP dans les ARN induit des perturbations de la synthèse et de la fonction des ARN. *Adapté de Longley et al., 2003.*

thymidylate synthase, une enzyme responsable de la synthèse des bases thymidine qui composent l'ADN.

- Les **analogues des bases pyrimidiques** sont des composés capables de bloquer la synthèse des bases pyrimidiques. Le principal représentant de cette catégorie est le **5-fluorouracile (5-FU)** qui se différencie de l'uracile par l'ajout d'un atome de fluor. Ce dernier est métabolisé par les cellules en fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) qui se lie à la thymidilate synthase (TS). La TS est une enzyme clé du processus de synthèse des thymidines. La liaison du FdUMP à la TS au niveau du site de reconnaissance des nucléotides inhibe la TS en l'empêchant de reconnaître son substrat naturel. Les cellules sont alors appauvries en thymidine (dTTP) et la synthèse de l'ADN ainsi que sa réparation sont inhibées. Un autre métabolite du 5-FU, le métabolite FdUTP (fluorodeoxyuridine triphosphate) peut s'incorporer dans l'ADN induisant des cassures des brins et causant la mort des cellules. Enfin, le troisième métabolite du 5-FU, le FUMP (Fluorouridine monophosphate), est fortement incorporé dans les ARNs, perturbant ainsi leur synthèse et leur fonction. La transcription, la biosynthèse, les modifications post-transcriptionnelles et l'épissage des ARNs sont alors inhibés (**Figure 37**) (Longley et al., 2003). Dans cette catégorie, on retrouvera également la **gemcitabine** et la **capécitabine** qui font partie des chimiothérapies à prise orale et qui sont transformées en 5-FU après métabolisation.

b) Les inhibiteurs de la topoisomérase II

De nombreux mécanismes expliquent les effets cytostatiques et cytotoxiques des inhibiteurs de topoisomérase II. Ils s'intercalent entre les bases de l'ADN ce qui empêche la séparation des brins lors de la biosynthèse de l'ADN. Ils induisent également des cassures doubles brins de l'ADN et bloquent la réplication. Leurs effets cytotoxiques sont dû au fait, qu'ils induisent la formation de radicaux libres et de ROS, et la peroxydation des lipides ce qui conduit à l'apoptose des cellules. Les **anthracyclines** comme

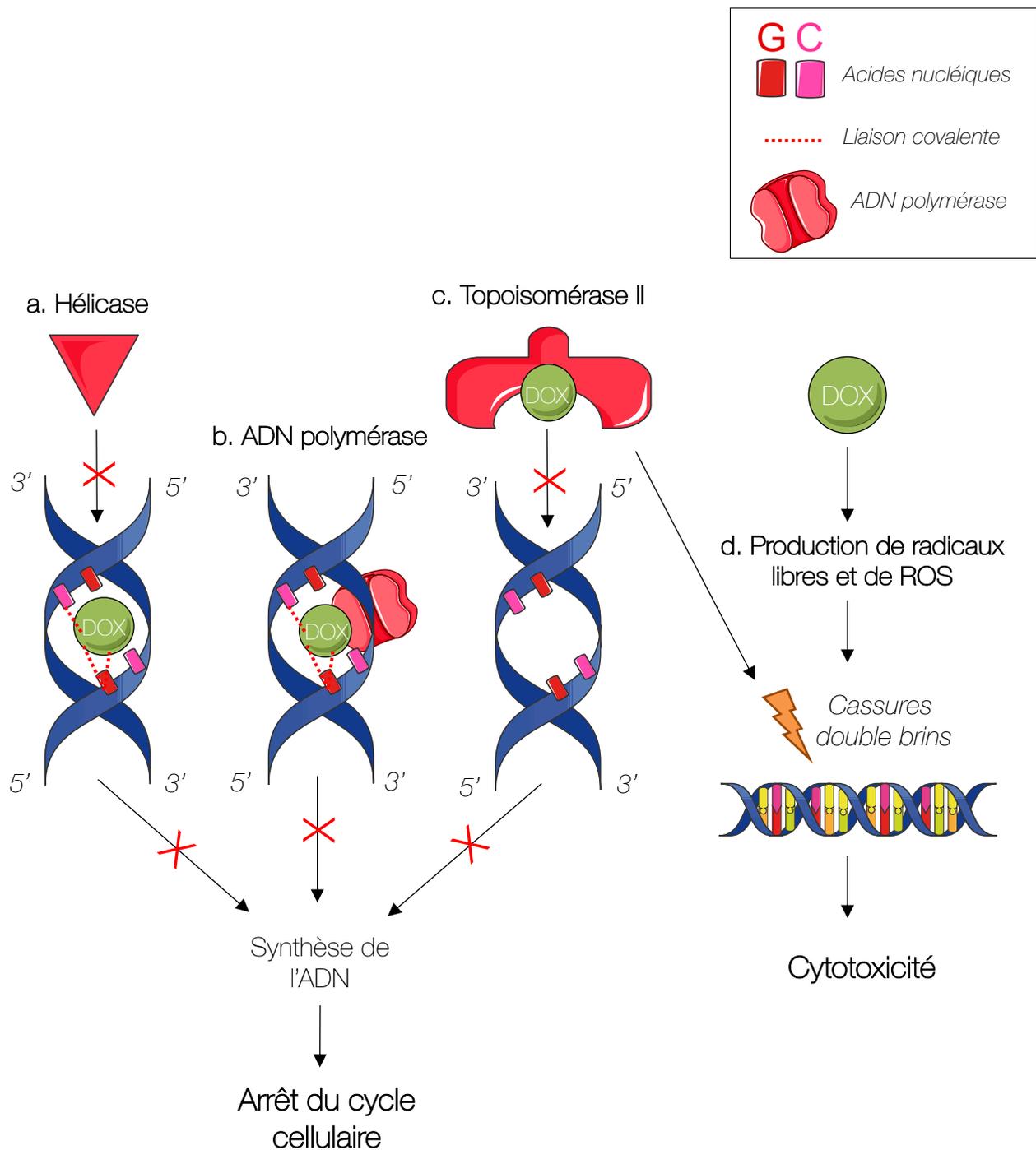


Figure 38 : Mécanisme d'action de la doxorubicine

a. La doxorubicine est un agent s'intercalant entre les bases C et G de l'ADN ce qui inhibe le passage des hélicases et bloque ainsi la synthèse de l'ADN. **b.** Elle forme également un complexe stable avec l'ADN polymérase inhibant la réplication de l'ADN. **c.** Elle induit aussi la formation d'un complexe stable entre l'ADN et la topoisomérase II ce qui inhibe la réplication et conduit à des cassures double brins de l'ADN. **d.** La métabolisation de la doxorubicine forme des radicaux libres et des ROS qui induisent également des cassures doubles brins de l'ADN. Les cassures doubles brins de l'ADN sont responsables de la cytotoxicité de la doxorubicine. *Adapté de Meredith et Dass., 2016*

l'épirubicine, le mitoxantrone, l'étoposide et la doxorubicine (DOX) font partie de cette catégorie. Ce sont des inhibiteurs de la topoisomérase II. Parmi eux, la doxorubicine s'intercale dans l'ADN ce qui bloque l'action des hélicases essentielles à la synthèse de l'ADN. Elle forme également un complexe stable avec l'ADN polymérase conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. La doxorubicine stabilise aussi le complexe topoisomérase-II/ADN, produisant des cassures doubles brins de l'ADN et le blocage ou arrêt de la réplication. Enfin, son activité cytotoxique est principalement liée à la production de ROS et de radicaux libres qui conduisent à la formation de cassures doubles brins de l'ADN et à l'apoptose des cellules cancéreuses (**Figure 38**) (Meredith & Dass, 2016; Tacar et al., 2013).

c) Les agents alkylants

Les agents alkylants sont des composés possédant un ou plusieurs groupements alkyles très réactifs capables d'établir des liaisons covalentes avec des sites très nucléophiles comme l'azote N7 du cycle purine des bases guanine de l'ADN. Ces liaisons covalentes avec l'ADN vont créer des ponts intra ou inter-caténaux qui vont inhiber la transcription et la réplication de l'ADN et induire une forte cytotoxicité. Les agents alkylants peuvent être de la famille des **moutardes azotées** comme le cyclophosphamide ou de celles des **sels de platines** comme le carboplatine et le cisplatine.

- Le **cyclophosphamide** est l'agent alkylant le plus couramment utilisé dans le traitement des tumeurs mammaires. Ce composé a besoin d'être métabolisé dans le foie pour être actif et induit la formation d'adduits de l'ADN par ajout de groupements alkyles (Heylmann et al., 2013).
- Les sels de platine comme le **carboplatine** ou le **cisplatine** conduisent à des ruptures de brins de l'ADN et à l'apoptose des cellules incapables de réparer efficacement ces lésions (Bianchini et al., 2016).

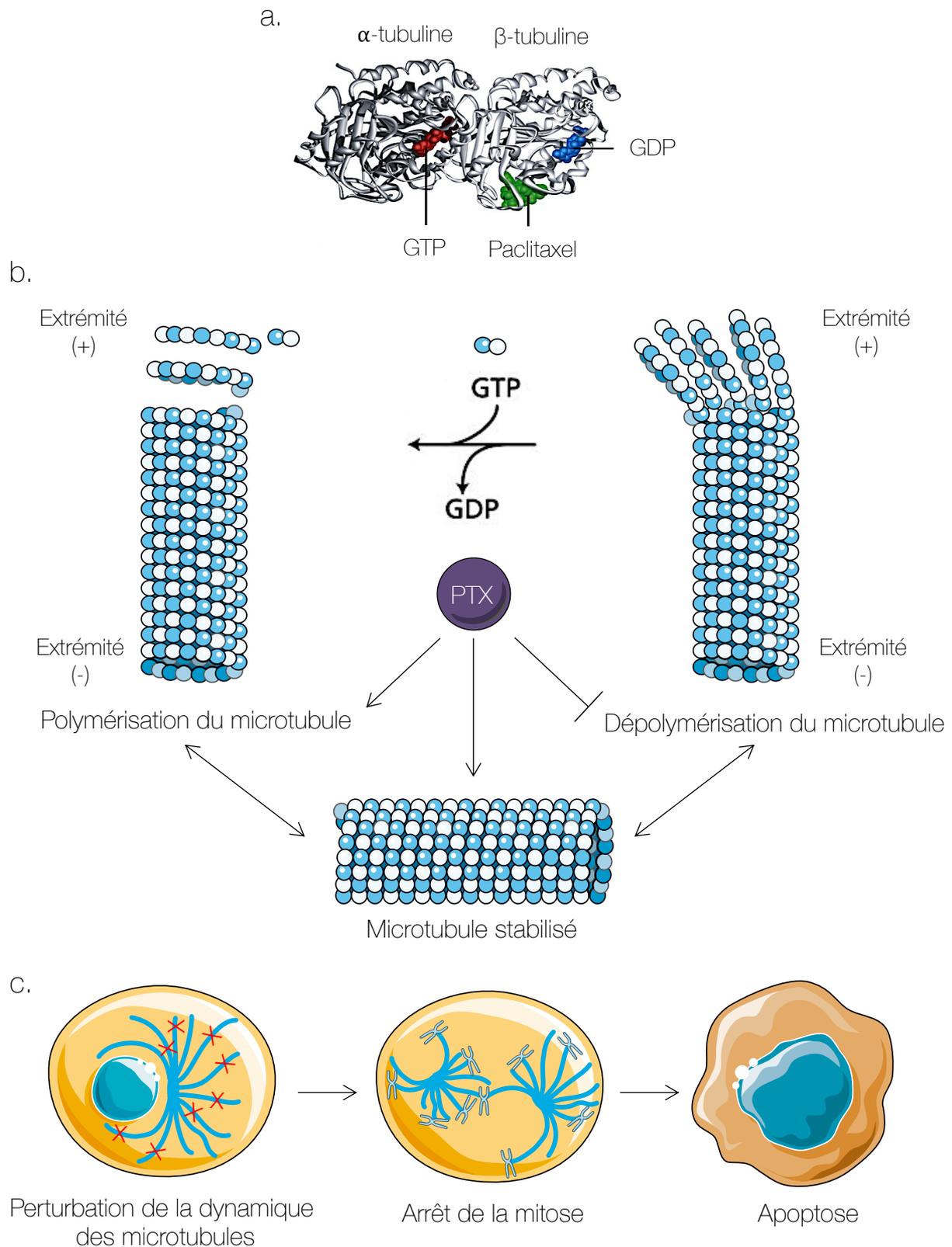


Figure 39 : Mécanisme d'action du paclitaxel sur les microtubules

a. Le paclitaxel se fixe à la tubuline β et rigidifie le dimère tubuline α /tubuline β ce qui empêche son détachement du microtubule. **b.** Les microtubules font partie des composants majeurs du cytosquelette. Ils sont composés de dimères de tubulines α et β . Il existe un équilibre entre leur polymérisation et dépolymérisation qui est dépendant de la concentration locale en dimères de tubulines α et β et de la présence de GTP. Le paclitaxel stimule donc la stabilisation et la polymérisation du microtubule et inhibe sa dépolymérisation. **c.** Les microtubules permettent la formation du fuseau mitotique essentiel à la migration des chromatides lors de la mitose. Ainsi le paclitaxel induit une perturbation de la dynamique des microtubules qui conduit à un arrêt de la mitose et à l'apoptose des cellules. *D'après Xiao et al., 2006*

d) Les poisons du fuseau mitotique

Ces composés se lient tous à la tubuline et bloquent la division cellulaire en empêchant la synthèse des microtubules et la formation du fuseau mitotique. Ils vont ainsi désorganiser la ségrégation des chromosomes au moment de la mitose et entraîner la mort de la cellule.

Parmi ces composés, on retrouve :

- Le groupe des **alcaloïdes de la Pervenche** comme le **vinorelbine** et la **vindésine** qui empêchent la polymérisation des microtubules et les déstabilisent.
- Le groupe des **taxanes** avec le **docétaxel** et le **paclitaxel (PTX)** qui stabilisent le fuseau mitotique. Le paclitaxel se fixe sur l'extrémité amino-terminale de la tubuline β ce qui rigidifie le dimère tubuline α / tubuline β et empêche son détachement du microtubule. Le paclitaxel stimule donc la polymérisation et la stabilisation des microtubules et inhibe sa dépolymérisation. Les perturbations de la dynamique des microtubules bloquent ainsi le mouvement des chromosomes à chaque pôle de la cellule, ce qui inhibe la mitose juste avant l'anaphase et induit l'apoptose des cellules (**Figure 39**) (Xiao et al., 2006).
- L'**éribuline** n'appartient pas à la famille des taxanes, mais à la classe des agents antinéoplasiques de type halichondrine. C'est un analogue de l'halichondrine B, une substance isolée d'une éponge marine qui inhibe la phase de croissance des microtubules et bloque ainsi la formation du fuseau mitotique (Chaffer et al., 2016).

Cancer du sein localement avancé

- ✓ AC-T – doxorubicine + cyclophosphamide suivies de taxanes
- ✓ T-AC – Taxanes suivis de doxorubicine et de cyclophosphamide
- ✓ TC – paclitaxel et cyclophosphamide
- ✓ FAC – cyclophosphamide, doxorubicine et 5-FU
- ✓ FAC suivi paclitaxel (ou docétaxel)
- ✓ FEC – cyclophosphamide, épirubicine et 5-FU
- ✓ FEC suivi de paclitaxel (ou docétaxel)
- ✓ EC – épirubicine et cyclophosphamide
- ✓ Doxorubicine et docétaxel
- ✓ Carboplatine et paclitaxel
- ✓ Docétaxel et cyclophosphamide

- ✓ Capécitabine et docétaxel (2^{ème} ligne)
- ✓ Capécitabine (3^{ème} ligne)
- ✓ Docétaxel (2^{ème} ligne)
- ✓ Eribuline (3^{ème} ligne)

Cancer du sein avancé (Métastatique)

- ✓ FAC – cyclophosphamide, doxorubicine et 5-FU
- ✓ FEC – cyclophosphamide, épirubicine et 5-FU
- ✓ AC – doxorubicine et cyclophosphamide
- ✓ CMF – cyclophosphamide, méthotrexate, 5-FU
- ✓ EC – épirubicine et cyclophosphamide
- ✓ FUN – 5-FU et vinorelbine
- ✓ Doxorubicine et cyclophosphamide
- ✓ Carboplatine et paclitaxel
- ✓ Gemcitabine et carboplatine
- ✓ Vinorelbine et capécitabine
- ✓ Doxorubicine et docétaxel
- ✓ Epirubicine
- ✓ Cyclophosphamide

- ✓ Docétaxel et capécitabine (2^{ème} ligne)
- ✓ Gemcitabine et paclitaxel (2^{ème} ligne)
- ✓ Paclitaxel et gemcitabine (2^{ème} ligne)
- ✓ Doxorubicine ou doxorubicine liposomale pégylée (2^{ème} ligne)
- ✓ Paclitaxel ou nab-paclitaxel ou docétaxel (2^{ème} ligne)
- ✓ Vinorelbine (2^{ème} ligne)
- ✓ Docétaxel (2^{ème} ligne)
- ✓ Éribuline (3^{ème} ligne)
- ✓ Capécitabine (3^{ème} ligne)

Figure 40 : Liste des agents de chimiothérapie et des combinaisons utilisées pour le traitement des tumeurs mammaires

La chimiothérapie est composée de différents agents anticancéreux. Elle est proposée lorsque le risque de récurrence du cancer du sein est élevé, en cas de tumeurs métastatiques ou dans le but de réduire la taille de la tumeur avant opération. Les agents de chimiothérapie peuvent être administrés seul ou en combinaison. Certains agents ou combinaisons d'agents de chimiothérapie ne sont proposés qu'en 2^{ème} ou 3^{ème} ligne de traitement. *Adapté de la Société Canadienne du Cancer, 2021 et de Manjunath and Choudhary, 2021 .*

e) Les combinaisons d'agents de chimiothérapie

Les agents de chimiothérapie sont principalement utilisés en combinaison pour optimiser leurs effets. Le choix de la combinaison est déterminé à partir des paramètres de la tumeur. Il existe de nombreuses combinaisons d'agents de chimiothérapie pour le traitement des TNBC et les agents les plus souvent utilisés dans ces combinaisons sont le 5-FU, le paclitaxel, la doxorubicine et le cyclophosphamide (**Figure 40**) (HAS et ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé), 2021).

D'après l'ANSM et la FDA et la société canadienne du cancer, il n'existe pas de protocole standard : on administre une chimiothérapie tant que la tumeur y réagit et que les effets secondaires sont limités. Lorsque le traitement n'est plus efficace, une nouvelle chimiothérapie est proposée au patient en seconde ou en troisième ligne de traitement (ANSM, FDA (Food and Drug Administration), Société Canadienne du Cancer, 2021).

4) Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées permettent une très forte efficacité thérapeutique avec très peu d'effets secondaires (Polyak, 2007). En raison de leur grande hétérogénéité, il existe peu de thérapies ciblées dirigées spécifiquement contre les TNBC. Ces thérapies sont développées à partir de l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques ou de processus tumoraux majeurs comme l'angiogénèse (**Figure 41**).

a) Les thérapies actuellement disponibles

i) Les anti-VEGF :

La thérapie anti-angiogénique se concentre sur l'inhibition de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. Le **bevacizumab** est un anticorps monoclonal humanisé qui cible toutes les isoformes du VEGF-A. Il inhibe la prolifération endothéliale et prive les cellules tumorales de l'apport vasculaire. Il est systématiquement et uniquement prescrit en cas de TNBC métastatique. L'association du bevacizumab avec de la chimiothérapie (Taxanes) entraîne une augmentation de la durée de survie sans progression pour les

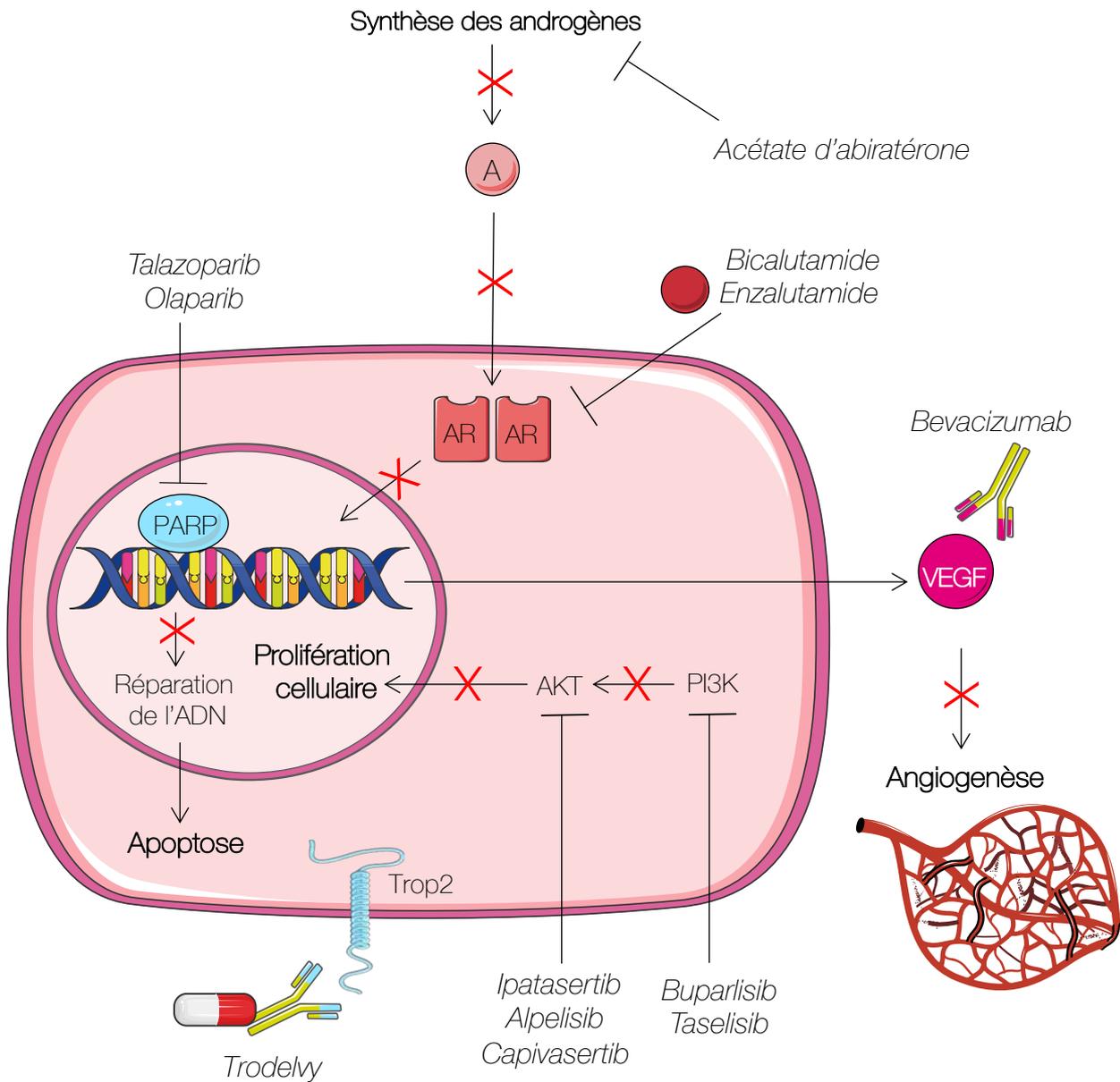


Figure 41 : Schéma des thérapies ciblées des TNBC

Cette illustration englobe les différentes thérapies ciblées utilisées pour traiter les TNBC. Le bevacizumab est un **anti-VEGF** qui limite l'angiogenèse. L'olaparib et le talazoparib sont des **inhibiteurs de PARP** qui permettent d'augmenter la sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie en rendant les cellules plus sensibles à l'apoptose. Le bicalutamide et l'enzalutamide sont des **inhibiteurs compétitifs pour le récepteur aux androgènes (AR)** qui inhibent sa translocation nucléaire. L'acétate d'abiratérone est un **inhibiteur de la synthèse des androgènes (A)**. Ces anti-androgènes limite la prolifération cellulaire tumorale. L'ipatasertib, l'alpelisib et le capivasertib qui sont des **inhibiteurs d'AKT** et le buparlisib et le taseslisib qui sont des **inhibiteurs de PI3K**. Ces inhibiteurs d'AKT et de PI3K inhibent la prolifération cellulaire tumorale. *Adapté de la HAS, 2021.*

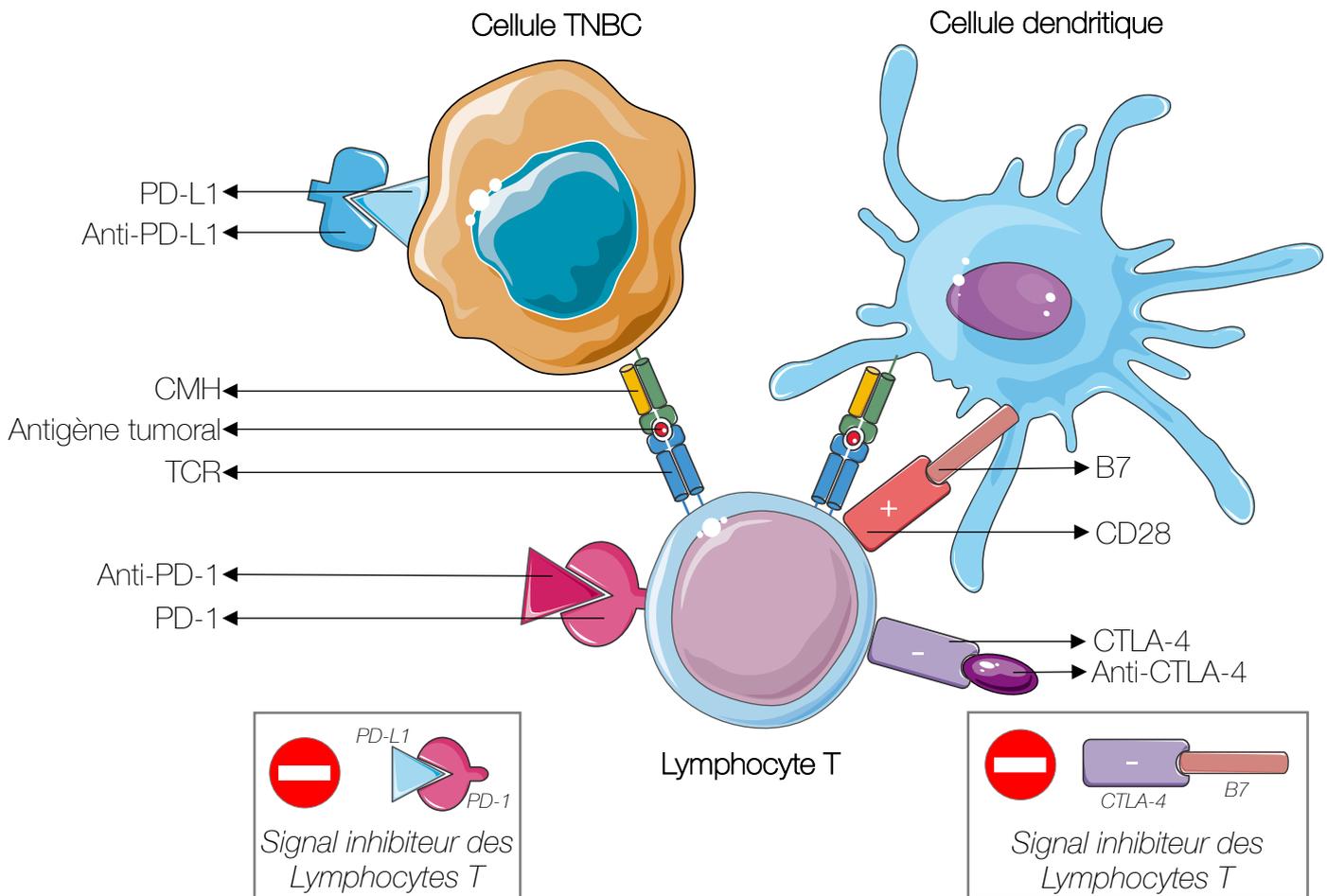
patients atteints de tumeurs mammaires métastatiques (Luu et al., 2011; Scully et al., 2012; HAS, 2021).

ii) Les inhibiteurs de PARP

PARP (PolyADP-ribose Polymérase) est une enzyme nucléaire abondante et exprimée de manière constitutive qui facilite la réparation de l'ADN et la prolifération cellulaire. Elle est activée en réponse aux cassures simple et double brins de l'ADN (Bianchini et al., 2016). Dans les cellules non mutées pour BRCA1 et 2, les cassures doubles brins sont réparées par recombinaison homologue, mais dans les cellules déficientes en BRCA1 et 2, la recombinaison homologue est altérée et par conséquent, la réparation des cassures des brins d'ADN repose sur la fonctionnalité de PARP (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Les inhibiteurs de PARP permettent ainsi d'augmenter la sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans ces cellules en les rendant incapables de réparer leur ADN (Bianchini et al., 2016). L'**olaparib** et le **talazoparib** sont utilisés dans le traitement des TNBC localement avancés ou métastatiques, mutées pour BRCA1/2. Ils sont administrés comme alternative à la chimiothérapie en seconde ligne de traitement. Les inhibiteurs de PARP sont également en étude clinique en association avec la chimiothérapie et l'immunothérapie (Manjunath & Choudhary, 2021).

iii) Anticorps drogue-conjugué anti-TROP2

La protéine **Trop2** est une protéine transmembranaire exprimée par de nombreuses cellules du cancer du sein triple-négatif (H. Liu et al., 2021; Shvartsur & Bonavida, 2015). Le Trodelvy (ou Sacituzumab govitecan) est un **anticorps drogue-conjugué**, il associe un anticorps avec une chimiothérapie, ce qui permet d'amener la chimiothérapie plus spécifiquement à la tumeur. Le **Trodelvy** se compose ainsi d'un anticorps ciblant Trop2, couplé à un inhibiteur de topoisomérase I : le Irinotécan. L'Irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase I utilisé dans le traitement des cancers colorectaux. Le Trodelvy est disponible depuis le 1er novembre 2021, pour une durée d'un an. Il a obtenu une autorisation temporaire d'utilisation à la fin de l'année 2020 et une autorisation d'accès précoce pré-AMM (autorisation de mise sur le marché) en septembre 2021. Les résultats de l'étude clinique de phase III montrent que la survie médiane sans progression est de 5,6 mois avec le Trodelvy contre 1,7 mois avec une chimiothérapie classique. Quant à la



Classe d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires	Molécules
Anti-PD-L1	Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab
Anti-PD1	Nivolumab, Pembrolizumab
Anti-CTLA4	Ipilimumab, Tremelimumab

Figure 42 : Les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires

Les inhibiteurs du point de contrôles immunitaires PD-1/PD-L1 (**anti-PD1** et **anti-PD-L1**) permettent de bloquer les signaux inactivateurs des LT et de restaurer les capacités du système immunitaire du patient. Le deuxième point de contrôle immunitaire CTLA4 peut aussi être bloqué par les **anti-CTLA4**. Ils permettent de maintenir l'activation des LT et augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale. D'après Kim et al., 2020

survie globale, elle a atteint 12,1 mois contre 6,7 mois avec une chimiothérapie classique (Gilead Sciences, 2021). Un doublement de la survie globale des patients est donc observé avec ce traitement. Ce résultat est le plus encourageant depuis de nombreuses années pour les patients ayant une tumeur triple-négative non résécable ou métastatique, ayant reçu préalablement 2 lignes de traitements (HAS, octobre 2021).

iv) L'immuno-oncologie

L'**immuno-oncologie** a pour objectif d'exploiter et de renforcer les capacités du système immunitaire du patient afin qu'il puisse reconnaître et détruire les cellules cancéreuses. Les **TNBC** présentent un nombre plus élevé de **lymphocytes T infiltrants la tumeur (TIL)** comparé aux autres sous-types (Yi et al., 2021). C'est pourquoi l'immuno-oncologie et plus particulièrement **l'inhibition des points de contrôles immunitaires** sont très étudiés dans ces tumeurs (Herbst et al., 2014; Tumei et al., 2014, p. 1).

Il a été montré qu'environ 20 % des TNBC expriment PD-L1 et de nombreuses études pointent que ces tumeurs constitueraient le sous-type Immunomodulatory (Bareche et al., 2018; Ghebeh et al., 2006; Mittendorf et al., 2014, p. 1; Schmid et al., 2018; Yi et al., 2021). Dans ce contexte, l'**Atezolizumab** est anticorps monoclonal qui cible PD-L1 et inhibe l'interaction entre PD-1 et PD-L1 ce qui va restaurer la prolifération, l'activation des lymphocytes T et la réponse immunitaire anti-tumorale (**Figure 42**) (Karn et al., 2017; S. Kim et al., 2020; Schmid et al., 2018; Syn et al., 2017). Sur la base des résultats d'un essai clinique de phase III, l'Atezolizumab obtient en 2019 une AMM pour le traitement des TNBC métastatiques PD-L1⁺ en combinaison avec le paclitaxel en seconde ligne de traitement.

b) Les thérapies en essais cliniques

i) L'immuno-oncologie

D'autres inhibiteurs des **points de contrôle immunitaire** sont également en cours d'études dans des essais cliniques de phase III (**Figure 42**) (Yi et al., 2021).

Il existe d'autres molécules capables d'inhiber l'interaction entre PD-1 et PD-L1 dans le but de restaurer une réponse immunitaire anti-tumorale (Syn et al., 2017) :

- **Le blocage de PD-L1** : L'**Avelumab** et le **Durvalumab**, des anticorps monoclonaux qui ciblent PD-L1, sont en cours d'évaluation pour le traitement des TNBC (Karn et al., 2017; S. Kim et al., 2020; Schmid et al., 2018).
- **Le blocage de PD-1** : Le **Nivolumab** et le **Pembrolizumab** sont des anticorps monoclonaux qui ciblent PD-1 et qui sont en essai clinique en combinaison à la chimiothérapie néoadjuvante pour le traitement des TNBC (S. Kim et al., 2020; Schmid, Cortes, et al., 2020; Schmid, Salgado, et al., 2020).

Il a été montré que **CTLA-4** est fortement exprimé à la surface des TIL (lymphocytes T infiltrants la tumeur) des TNBC et notamment dans les tumeurs immunomodulatory. C'est pourquoi, on peut également neutraliser **CTLA-4** avec des anticorps pour **maintenir l'activation des lymphocytes T** et augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans ce contexte, l'**Ipilimumab** et le **Tremelimumab** sont des anticorps monoclonaux dirigés contre CTLA-4 qui sont en essai clinique de phase II pour le traitement des TNBC (Bareche et al., 2018; Peng et al., 2020).

ii) Anti-androgène

Le récepteur aux androgènes appartient à la famille des récepteurs nucléaires stéroïdiens et de récentes études ont montré que cette signalisation est impliquée dans le sous-type LAR des TNBC. Ces tumeurs présentent une sensibilité aux antagonistes des récepteurs aux androgènes *in vitro* et *in vivo* (Lehmann & Pietenpol, 2014; Lyons & Traina, 2019). Les principales thérapies anti-androgènes étudiées sont (**Figure 41**) : le **bicalutamide** et l'**enzalutamide** qui sont des inhibiteurs compétitifs pour le récepteur aux androgènes qui bloquent sa translocation nucléaire. L'**acétate d'abiratérone** est un inhibiteur sélectif de la biosynthèse des androgènes. C'est un inhibiteur sélectif et irréversible du cytochrome CYP17. Il a la capacité de bloquer la sécrétion des androgènes par les gonades. Des essais cliniques de phase II avec ces molécules ont montré des effets prometteurs pour les patients atteints de TNBC du sous-type LAR.

iii) Inhibiteurs de PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K/AKT est impliquée dans la croissance tumorale. Cette voie de signalisation est régulée négativement par PTEN qui est fréquemment muté chez les

patients TNBC tout comme PI3K (Lyons & Traina, 2019). Des études cliniques de phase II et III sont en cours d'investigation pour les TNBC présentant une faible expression de PTEN ou des mutations de PI3K (**Figure 41**) (Manjunath & Choudhary, 2021) :

- L'**ipatasertib**, l'**alpelisib** et le **capivasertib** qui sont des inhibiteurs d'AKT
- Le **buparlisib** et le **taselisib** qui sont des inhibiteurs de PI3K

Ces études cliniques montrent des résultats très prometteurs et en particulier pour les tumeurs LAR pour lesquelles la voie de signalisation PI3K/AKT est fortement impliquée. Par ailleurs, l'alpelisib a très récemment obtenu une AMM en association au fulvestrant pour le traitement d'autres tumeurs mammaires que les TNBC : les tumeurs hormonosensibles HER2⁻, ayant une mutation PI3K, et ayant progressé après une hormonothérapie en monothérapie (HAS, janvier 2021).

II. LES LIMITES ET RESISTANCES AUX TRAITEMENTS

Les effets secondaires tout comme la **résistance des TNBC** aux traitements peuvent constituer un frein pour la prise en charge thérapeutique des patients.

1) Résistance des cellules cancéreuses aux traitements

Bien qu'il existe différents traitements pour les **TNBC**, il a été montré que ces tumeurs deviennent rapidement **insensibles** voir **résistantes** à ces traitements dû au développement de **mécanismes de résistance** et à l'**hétérogénéité intra-tumorale** (S. Liu et al., 2005; Prat et al., 2010).

a) Le développement de mécanismes de résistance

La chimiothérapie reste le pilier du traitement des TNBC (Darb-Esfahani et al., 2009; Liedtke et al., 2008) et seuls les protocoles à dose élevée, et donc avec un fort impact sur la qualité de vie des patients, semblent être efficaces chez ces patients (Berry et al., 2006; Citron et al., 2003; Gluz et al., 2008). De plus, seul 30 à 40 % des patients atteints de TNBC et traités par chimiothérapie néoadjuvante obtiennent une réponse pathologique complète après traitement (von Minckwitz et al., 2012). En effet, de nombreuses études ont montré que les cellules TNBC peuvent exprimer certains **miR** responsables de la

résistance à la chimiothérapie. Ces miARN augmentent les capacités de réparation des dommages de l'ADN et inhibent l'apoptose des cellules cancéreuses (Cochrane et al., 2010; Ding et al., 2019).

De même, plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'émergence de la **résistance aux thérapies ciblées** comme les anti-angiogéniques (anti-VEGF). Le mécanisme le plus décrit concerne la capacité des cellules cancéreuses à produire de nombreux types de signaux angiogéniques non ciblés par les anti-VEGF comme le facteur de croissance placentaire Bv8 (Bombina variegata 8) (Masoud & Pagès, 2017).

b) L'hétérogénéité intra-tumorale

Les travaux de recherche sur l'**hétérogénéité intra-tumorale** décrivent que la périphérie des tumeurs est composée de **cellules relativement différenciées** contrairement au compartiment central composé de **CSCma**. Or, les différents **traitements des TNBC** (chimiothérapie, radiothérapie et thérapies ciblées) sont majoritairement dirigés contre une seule population de cellules cancéreuses sensibles à ces traitements (Diehn et al., 2009; S. Liu et al., 2005).

Des études ont, par exemple, montré qu'après un traitement à la chimiothérapie les cellules tumorales résiduelles présentent un phénotype **CD44⁺/CD24⁻, mésenchymateux** avec une signature **claudin-low** montrant ainsi que **les CSC sont résistantes à la chimiothérapie** (Chaffer et al., 2016; Creighton et al., 2009; Diehn et al., 2009; Fischer et al., 2015; X. Li et al., 2008; Prat & Perou, 2011; Smith & Bhowmick, 2016). De plus, l'expression de la claudine 1 est corrélée à une diminution du phénotype de cellules souches des cellules tumorales mammaires. En effet, **l'expression de la claudine 1 est corrélée à l'expression du marqueur CD24⁺** dans les tumeurs mammaires (Madaras et al., 2016). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'expression de la claudine 1 serait associée à une plus forte différenciation épithéliale des cellules cancéreuses.

D'autre part, la chimiothérapie et la radiothérapie ne ciblent que les cellules qui se divisent rapidement. Or, il a été montré que certaines **CSC** sont **quiescentes** et ne sont donc pas ciblées par ces traitements. Ces CSC quiescentes peuvent alors entrer à nouveau en prolifération et engendrer la **récidive** du cancer (X. Li et al., 2008).

Tous ces mécanismes expliquent, en partie, pourquoi les **TNBC**, fortement enrichies en CSC, sont moins sensibles aux différents traitements et pourquoi les patients souffrent d'une faible survie globale et d'un taux de récurrence plus élevé (Prat et al., 2010).

2) Le manque de cibles thérapeutiques

Le sous-type triple-négatif est considéré comme une entité clinique unique et tous les patients atteints de TNBC sont traités de la même manière. Cependant, le profilage moléculaire et les avancées technologiques ont révélé un niveau élevé d'hétérogénéité ainsi que des caractéristiques communes permettant de différencier ces tumeurs (Bianchini et al., 2016; Lehmann et al., 2011). Compte tenu de l'hétérogénéité des TNBC, de nouvelles thérapies ciblées doivent être développées pour cibler les altérations moléculaires spécifiques de des tumeurs (Bianchini et al., 2016). De plus comme nous l'avons vu précédemment, la chimiothérapie néoadjuvante lorsqu'elle n'est pas efficace à 100 %, sélectionne les cellules résistantes aux traitements constituant alors un frein supplémentaire pour la prise en charge des patients (Balko et al., 2014). La majorité des patients atteints de TNBC ne bénéficient pas encore de thérapie ciblée (Szymiczek et al., 2021). De nombreuses études indépendantes ont montré que les voies Ras/MAPK, JAK/STAT, Wnt, TGF- β , Hedgehog et Notch contribuent au maintien des CSC_{ma}. Des inhibiteurs de ces voies de signalisation ont montré des résultats encourageants *in vitro* et *in vivo* mais ont échoué lors des études cliniques de phase I ou II (Bianchini et al., 2016; X. Yang et al., 2017). Cependant, à l'heure actuelle, aucun inhibiteur des cellules souches du cancer du sein n'a été établi. De plus, les thérapies ciblées existantes ne sont administrées qu'en seconde ou troisième ligne de traitement. La chimiothérapie reste donc, à ce jour, le principal traitement médicamenteux des TNBC, or ces patients présentent de moins bons résultats après la chimiothérapie que les patients atteints de cancers du sein d'autres sous-types (Liedtke et al., 2008; Tan et al., 2008).

Ainsi, le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients atteints de TNBC est un enjeu majeur en cancérologie.

Tableau 17 : Répartition des tumeurs « claudin-1-low » et « claudin-1-high » dans les différents sous-types moléculaires

Le pourcentage de tumeurs « claudin-1-low » et « claudin-1-high » est indiqué pour chaque sous-type avec le nombre de cas analysés correspondant entre parenthèse. *Adapté de Lu et al., 2013*

Sous-types	« claudin-1-low »	« claudin-1-high »	total
Luminal	94,74% (54)	5,26% (3)	100% (57)
HER2	86,88% (53)	13,12% (8)	100% (61)
TNBCC	77,17% (71)	22,83% (21)	100% (92)
Total	84% (186)	16% (36)	100% (222)

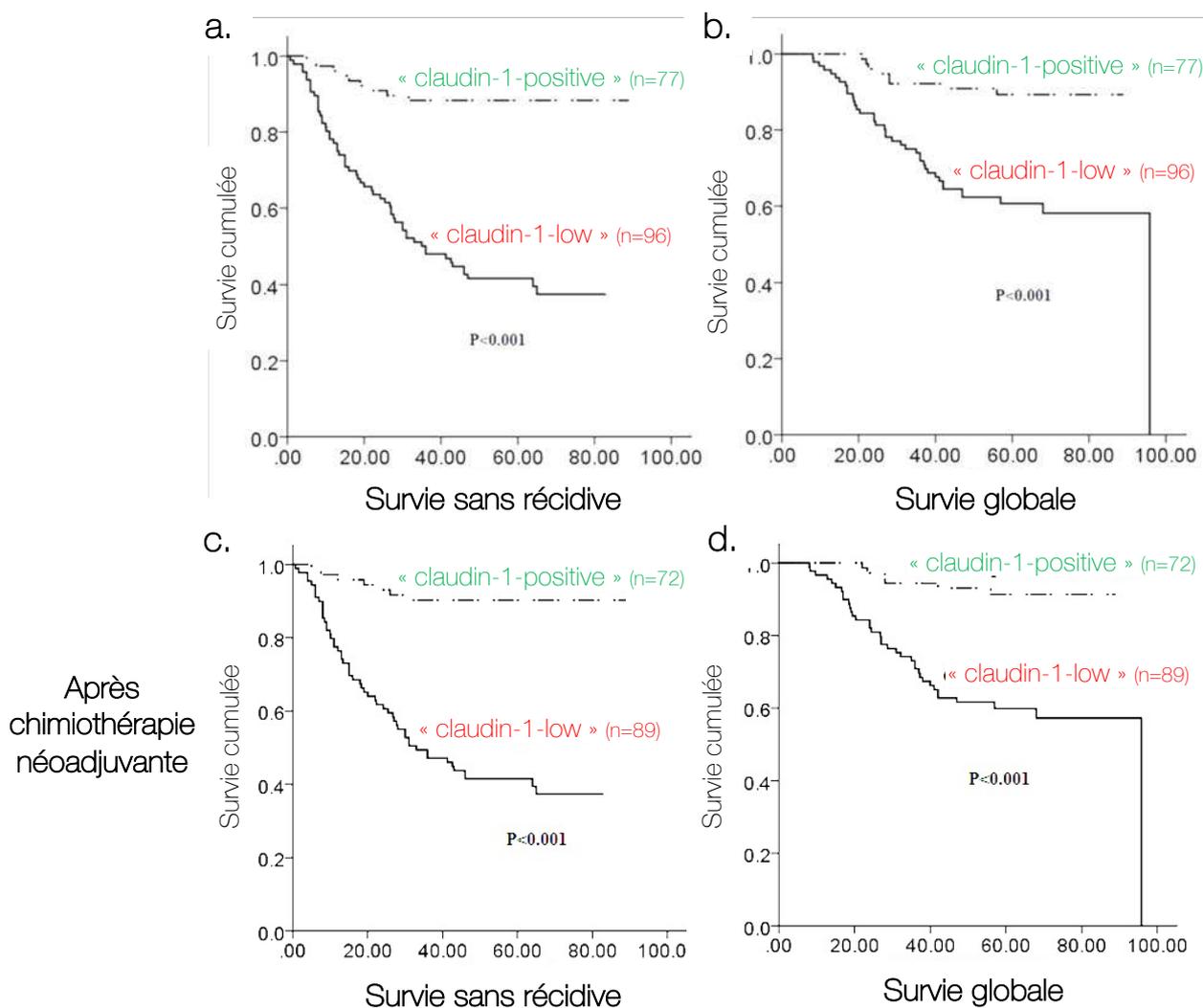


Figure 43 : Courbe de Kaplan-Meier de la survie sans récurrence et de la survie globale en fonction de l'expression de la claudine 1 dans les tumeurs

Les patients qui présentent une tumeur de type « claudin-1-low » ont une survie sans récurrence (a.) et une survie globale (b.) nettement diminuée puisqu'aucun ne survit 100 mois post diagnostic. L'absence d'expression de la claudine 1 dans les TNBC est aussi corrélée à une diminution de la survie sans récurrence (c.) et de la survie globale (d.) chez les patients traités par chimiothérapie néo-adjuvante. *D'après Ma et al., 2014*

III. LES TNBC « CLAUDIN-1-LOW »

L'expression de la claudine 1 est réprimée dans 84 % des tumeurs des tumeurs mammaires (Gerhard et al., 2012; Gowrikumar et al., 2019; Herschkowitz et al., 2007; S. Lu et al., 2013; Morohashi et al., 2007). Plus spécifiquement, 77,17 % des TNBC n'expriment plus la claudine 1 et sont dites **TNBC « claudin-1-low »** (Tableau 17) (S. Lu et al., 2013). Les mécanismes impliqués dans la perte d'expression de la claudine 1 sont encore inconnus et aucune mutation du gène de la claudine 1 n'a été identifiée à ce jour dans le cancer du sein (Blanchard et al., 2016; Krämer et al., 2000; Swisshelm et al., 1999). La méthylation pourrait expliquer cette perte d'expression, une méthylation élevée du gène de la claudine 1 est associé à une faible expression de la claudine 1 dans des échantillons de cancer du sein établit à partir de la base de données Cancer Genome Atlas (Cancer Genome Atlas Network, 2012). L'absence d'expression de la claudine 1 se trouve être un facteur de très mauvais pronostic et est associé à la carcinogenèse mammaire (Charpin et al., 2012; Hoevel et al., 2004; F. Ma et al., 2014a; Morohashi et al., 2007; Myal et al., 2010; Pyo et al., 2019; Tokés et al., 2005). Dans les cellules cancéreuses mammaires, la perte d'expression de la claudine 1 est corrélée à un **fort pouvoir métastatique et invasif** des cellules ainsi qu'à une augmentation des métastases dans le cancer du sein (F. Ma et al., 2014a; Myal et al., 2010; Szasz et al., 2011). En comparaison aux tumeurs mammaires qui expriment la claudine 1, les tumeurs « claudin-1-low » présentent également un plus **fort taux de récurrences** (Charpin et al., 2012; F. Ma et al., 2014a; Morohashi et al., 2007; Pyo et al., 2019; Szasz et al., 2011). En 2014, l'équipe de Ma a montré que la perte d'expression de la claudine 1 est associée à une **moins bonne survie sans récurrence** par rapport aux tumeurs qui expriment la claudine 1 (Figure 43a). En effet, à 80 mois post diagnostic le pourcentage de survie sans récurrence des patients atteints de TNBC « claudin-1-low » est de 40 % tandis que celui des patients « claudin-1-positive » est de 90 %. Cette équipe a également montré que la perte d'expression de la claudine 1 est associée à une **moins bonne survie globale** des patients (Figure 43b). La survie globale des patients « claudin-1-low » est plus courte puisqu'elle chute drastiquement à 100 mois post diagnostic alors que celui du groupe « claudin-1-positive » est toujours de 90 % (F. Ma et al., 2014b). De plus, il a été mis en évidence que l'absence d'expression de la claudine 1 est corrélée à une **moins bonne réponse à la**

chimiothérapie des tumeurs (**Figure 43c et d**). Après un traitement néoadjuvant de chimiothérapie, la survie globale et la survie sans récurrence des patients « claudine-1-low » restent significativement plus faibles que celle des patients « claudine-1-positif » (F. Ma et al., 2014b).

L'ensemble de ces travaux révèle que la perte d'expression de la claudine 1 dans les tumeurs mammaires est facteur de très mauvais pronostic. Cependant, à l'heure actuelle la claudine 1 n'est pas utilisée comme marqueur lors du diagnostic des tumeurs mammaires. La prise en charge thérapeutique des TNBC « claudine-1-low » est donc identique à celle des TNBC. Ces constats laissent penser que l'expression de la claudine 1 dans les TNBC « claudine-1-low » pourrait être une piste thérapeutique pour améliorer le pronostic vital des patients.

IV. LA CLAUDINE 1, UN SUPPRESSEUR DE TUMEUR DANS LE CANCER DU SEIN ?

1) Le rôle de la claudine 1 dans le cancer

La perte d'expression et la surexpression de la claudine 1 ont été associées à la tumorigenèse, suggérant que la claudine 1 pourrait alternativement fonctionner soit comme un **suppresseur de tumeur** soit comme un **oncogène**. Par exemple, dans les carcinomes de l'ovaire et de l'estomac, la surexpression de la claudine 1 induit une augmentation du phénotype malin (Gupta & Ryan, 2010; Myal et al., 2010). Inversement, dans les cancers colorectaux, de l'œsophage, de la tête et du cou, de la vésicule biliaire, de la prostate, du poumon, la perte de claudine 1 est corrélée avec la progression du cancer, une augmentation des capacités métastatiques et une survie sans récurrence plus courte (J. Li, 2021; Myal et al., 2010; Pyo et al., 2019). Le rôle contradictoire de la claudine 1 dans le cancer reflète la capacité des voies oncogéniques à détourner son rôle pour contribuer à la progression du cancer (J. Li, 2021).

Tableau 18 : Rôle de suppresseur de tumeur de la claudine 1 dans les différentes lignées tumorales mammaires

Le tableau reprend les différentes lignées mammaires cancéreuses et saine dans lesquelles la claudine 1 joue un rôle de suppresseur de tumeur. L'expression de la claudine 1, le sous-type tumoral et les références bibliographiques sont précisées. *Adapté de Dai et al., 2017*

Lignées tumorales mammaires	Expression de la claudine 1	Sous type tumoral	Lignées tumorales mammaires
MCF-7	« Claudin-1-low »	Luminal A	(Zheng et al., 2018 ; Zhou et al., 2015b)
T-47D	« Claudin-1-high »		(Zhang et al., 2008)
MDA-MB-361	« Claudin-1-low »	Luminal B	(Hoevel et al., 2002 ; 2004)
MDA-MB-231	« Claudin-1-low »	TNBC	(Hou et al., 2015 ; Mattern et al., 2019 ; Geoffroy et al., 2020 ; 2017)
Hs578T			(Geoffroy et al., 2017 ; 2020)
MDA-MB-453			(Di Cello et al., 2013)
MDA-MB-435			(Hoevel et al., 2002)
SUM-159			(Chiang et al., 2019a)
BT-549			
MCF12A	« Claudin-1-high »	non cancéreuses	(Kulawiec et al., 2008)

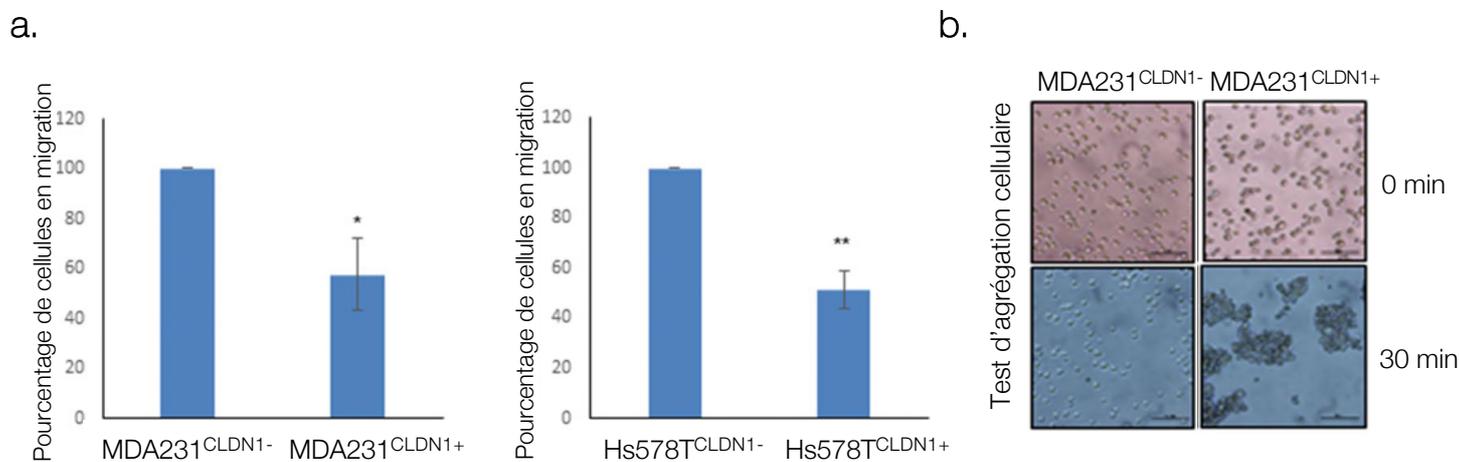


Figure 44 : La réexpression de la claudine 1 dans les lignées de cellules MDA-MB-231 et Hs578T inhibent leur migration et induit l'agrégation cellulaire

Les lignées MDA-MB-231 et Hs578T ont été transfectées transitoirement par le vecteur d'expression de la claudine 1 (pcDNA3.1-CLDN1) ou par un vecteur vide (pcDNA3.1) pendant 48h pour obtenir les population MDA231^{CLDN1-}, MDA231^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1-}, Hs578T^{CLDN1+} respectivement. **a.** La migration cellulaire a été évaluée à l'aide de chambres de Boyden 24 heures après la transfection. Les cellules qui ont migré ont été colorées au cristal violet et observées au microscope à contraste de phase. Les graphiques sont représentatifs de quatre à cinq expériences. Différences statistiquement significatives par rapport aux cellules témoins : * p < 0,05 et ** p < 0,01. **b.** Un test d'agrégation rapide a été réalisé pour les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+}. Les cellules ont été observées à 0 min et après 30 min, et photographiées en microscopie à contraste de phase.

2) Le rôle de suppresseur de tumeur de la claudine 1 dans le cancer du sein

Dans le cancer du sein, de nombreux travaux suggèrent que la claudine 1 serait un **suppresseur de tumeur** (Blanchard et al., 2009; Gerhard et al., 2012; Krämer et al., 2000; S. Lu et al., 2013; Myal et al., 2010; Tokés et al., 2005; B. Zhou, Moodie, et al., 2015). La claudine 1 n'est pas exprimée dans la plupart des lignées cellulaires cancéreuses mammaires humaines (Dai et al., 2017; Martin et al., 2011). De plus, une étude *in vitro* montre que l'inhibition de l'expression de la claudine 1 favorise la transformation néoplasique des cellules épithéliales mammaires saines MCF-12A (Kulawiec et al., 2008). Le rôle suppresseur de tumeur de la claudine 1 a été démontré dans l'inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire, dans l'apoptose et dans la sensibilité aux agents de chimiothérapie dans différentes lignées cellulaires qui expriment ou n'expriment pas la claudine 1 (**Tableau 18**).

a) Rôle de la claudine 1 dans l'inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire

De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que **la claudine 1 est impliquée dans l'inhibition de la TEM, la migration et l'invasion** des cellules cancéreuses (J. Li, 2021). L'expression de la claudine 1 inhibe la prolifération ainsi que la migration de cellules tumorales mammaires murines *in vivo* (Knight et al., 2013). De plus, l'inhibition de l'EMT est corrélée avec une ré-expression de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires (Basu et al., 2017; X.-M. Li et al., 2017). Dans les cellules cancéreuses mammaires T-47D, l'inhibition de l'expression de la claudine 1 est liée à une augmentation de la mobilité cellulaire (K. Zhang et al., 2008). De même, dans les cellules MCF-7, le facteur de transcription BHLHE40 induit l'invasion des cellules en inhibant la transcription de la claudine 1 (Q. Zheng et al., 2018). Dans les cellules TNBC SUM-159 et BT-549, l'inhibition de l'expression de DOCK-1 par ARN interférence induit l'expression de la claudine 1 et inhibe la migration cellulaire (Chiang et al., 2019a). Hou et ses collaborateurs ont aussi mis en évidence que la stanniocalcine 2 inhibe le phénotype métastatique des cellules MDA-MB-231 et des tumeurs mammaires *in vivo* via l'inhibition de la voie de signalisation PKC/claudine 1 (Hou et al., 2015). Dans ces cellules, ADAM15 inhibe la migration cellulaire et se colocalise aux jonctions serrées avec la claudine 1 et ZO-1

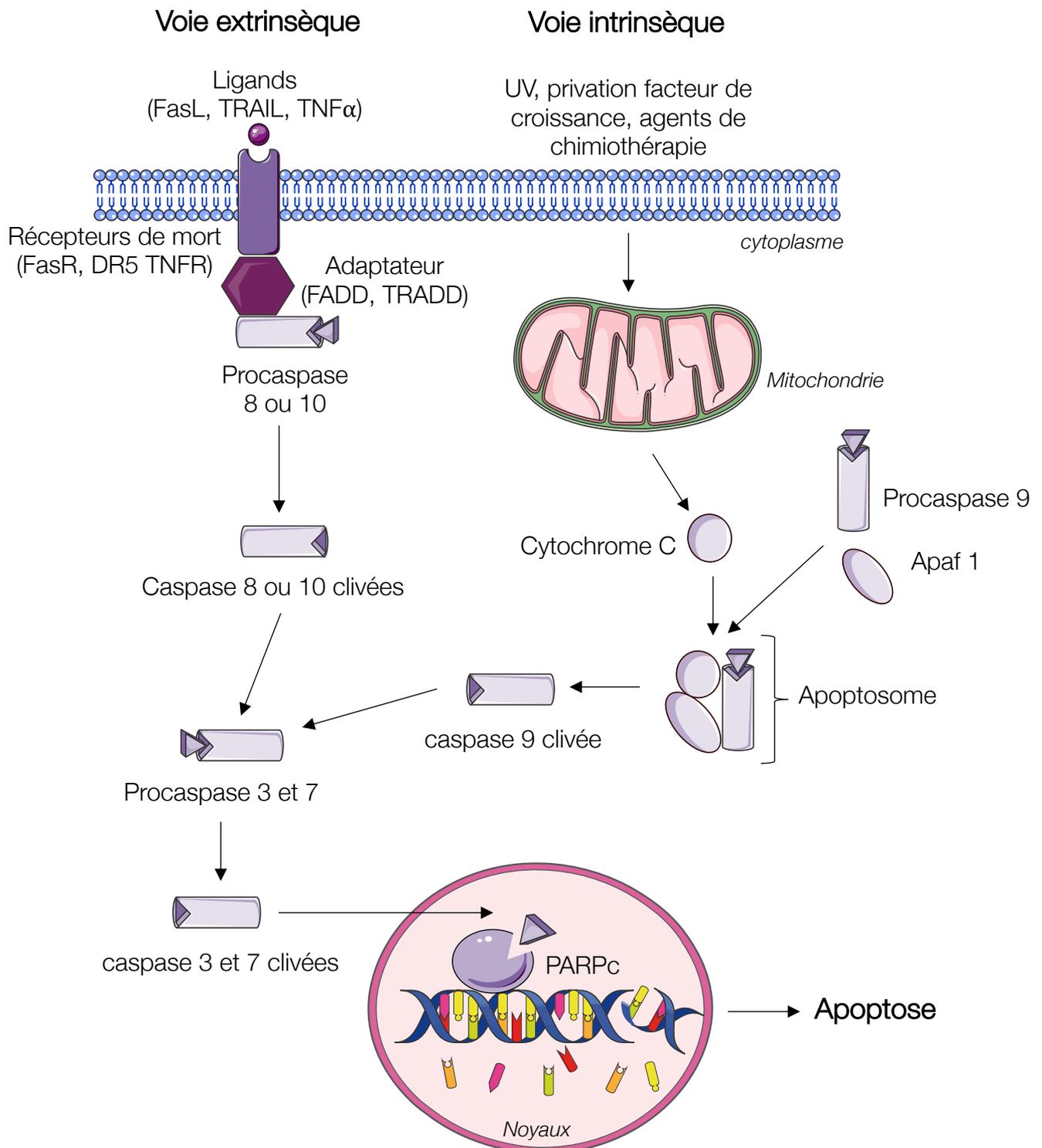


Figure 45 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

Les principaux acteurs des voies de signalisation conduisant à l'apoptose sont présentés dans cette figure. L'activation de la voie extrinsèque passe par l'activation des récepteurs de mort comme FasR, DR5 et TNFR qui recrutent des protéines adaptatrices (FADD et TRADD) lorsqu'ils sont activés par leur ligand (FasL, TRAIL ou TNF α). Ces protéines recrutent les procaspases initiatrices 8 et 10 et les clivent pour les activer. La voie intrinsèque est déclenchée par la perméabilisation des membranes mitochondriales internes et externes. La perméabilisation des membranes mitochondriales entraîne la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme dont le cytochrome c. Le cytochrome c va former un complexe appelé apoptosome avec la procaspase 9 initiatrice et la protéine Apaf-1. La formation de ce complexe permet le clivage de la pro-caspase 9 pour l'activer. Les procaspases initiatrices activées 8, 9 ou 10 clivent par la suite les procaspases effectrices 3 et 7 qui induisent l'apoptose par le clivage de PARP, la condensation nucléaire et la fragmentation de l'ADN. *D'après de Blondel B et al, 2004*

(Mattern et al., 2019). Ces données sont en accord avec les travaux de Hoevel qui montrent que l'expression de la claudine 1 est suffisante pour induire la formation des jonctions serrées dans les cellules tumorales métastatiques MDA-MB-435 et MDA-MB-361 (Hoevel et al., 2002). En 2020, les travaux de notre équipe corroborent ces résultats et montrent que l'expression de claudine 1 inhibe la migration des cellules TNBC MDA-MB-231 et Hs578T (**Figure 44**). On observe une diminution de la migration de 1,67 fois et de 2 fois entre les cellules MDA231^{CLDN1+} et les cellules MDA231^{CLDN1-}, et entre les cellules HS578T^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1-} respectivement (**Figure 44b**). La surexpression de la claudine 1 augmente l'agrégation des cellules MDA-MB-231 et induit la formation de jonctions serrées et adhérentes dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T (Geoffroy et al., 2020). Ainsi, l'expression de la claudine 1 pourrait constituer une piste thérapeutique pour réduire le caractère invasif des tumeurs mammaires triple-négatives.

b) Rôle de la claudine 1 dans l'apoptose

Plusieurs études ont mis en évidence que **la claudine 1 pouvait favoriser la mort des cellules par apoptose**.

Deux voies contrôlent principalement l'activation de l'apoptose (**Figure 45**) : la voie extrinsèque par les récepteurs à domaine de mort comme FasR (First apoptosis signal Receptor) qui activent les caspases initiateuses 8 et 10 ; et la voie intrinsèque qui active la caspase initiateuse 9. L'activation des caspases initiateuses entraîne l'activation des caspases effectrices 3 et 7 qui vont cliver PARP dans le noyau. PARP est l'un des régulateurs clé de la réparation de l'ADN et il devient inactif sous sa forme clivée.

Il a été montré que la surexpression de la claudine 1 induit sa localisation membranaire et l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-361 en culture tridimensionnelle (Hoevel et al., 2004). De même l'apoptose induite par la décitabine et la 5-azacitidine, deux agents déméthylants, est corrélée avec l'expression membranaire de la claudine 1 dans des modèles de culture 3D de cellules MDA-MB-453 (Di Cello et al., 2013). Fortier a mis en évidence que la localisation membranaire de la claudine 1 inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique sFLIP (FLICE-like inhibitory protein s) et induit

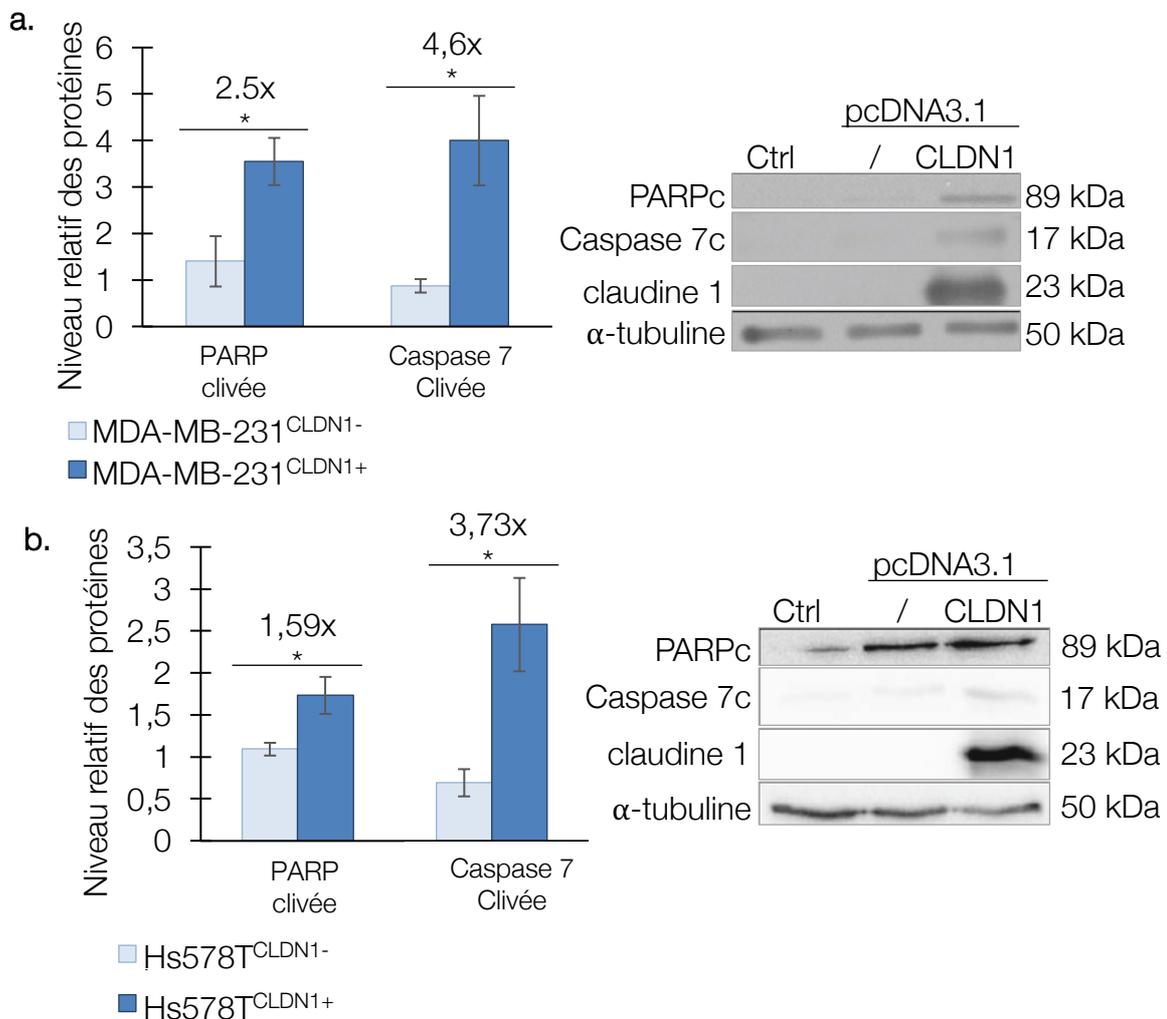


Figure 46 : La surexpression de la claudine 1 induit l'apoptose des lignées MDA-MB-231 et Hs578T. Les lignées MDA-MB-231 (a.) et Hs578T (b.) ont été transfectées transitoirement avec le vecteur d'expression de la claudine 1 (pcDNA3.1-CLDN1) ou par un vecteur vide (pcDNA3.1) pendant 48h. L'induction de l'apoptose a été analysée en Western-blot par l'étude des marqueurs PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (Caspase 7c). L'expression de claudine 1 a également été vérifiée. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios protéines d'intérêt / tubuline α . * significativement différent $p < 0,05$. D'après Geoffroy *et al.*, 2017

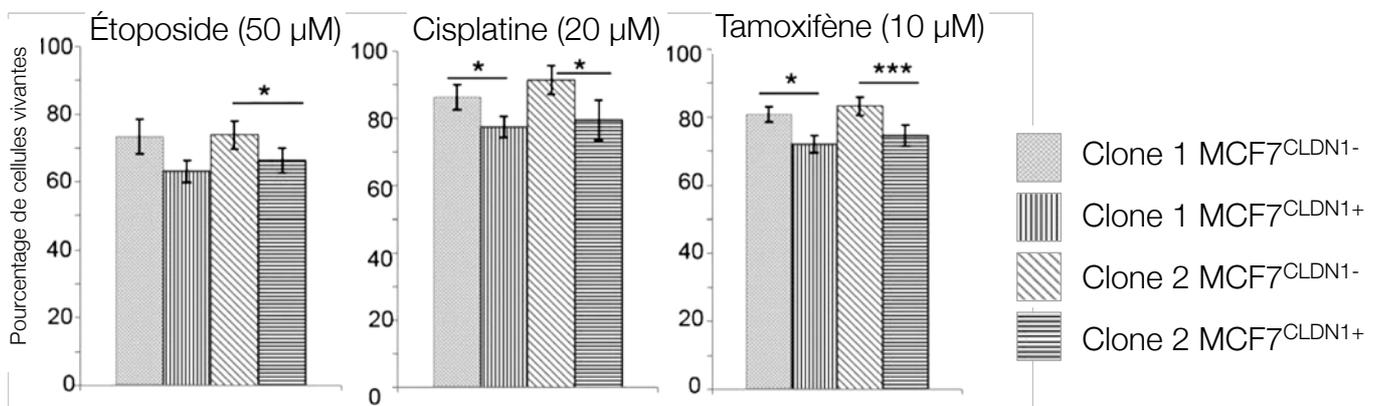


Figure 47 : Les cellules surexprimant la claudine 1 sont plus sensibles à l'étoposide, au cisplatine et au tamoxifène

Les cellules MCF7 ont été transfectées stablement avec le vecteur vide (MCF7^{CLDN1-}) et le vecteur contenant la séquence codante pour la claudine 1 (MCF7^{CLDN1+}). Les clones 1 et 2 ont été obtenus. Les cellules sont traitées à l'étoposide, au cisplatine et au tamoxifène. La viabilité cellulaire a été déterminée après 24 heures en utilisant le test Crystal violet. Les données représentent la moyenne \pm SEM de huit expériences indépendantes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Zhou *et al.*, 2015

la colocalisation de FasR avec la claudine 1 à la membrane suggérant que la claudine 1 membranaire pourrait interagir avec les récepteurs de mort et induire l'apoptose *via* la voie extrinsèque (Fortier et al., 2013). Les récents travaux de notre équipe soutiennent ce rôle de suppresseur de tumeur et d'inducteur de l'apoptose. La surexpression de la claudine 1 dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T de type TNBC « claudin-1-low » engendre la mort des cellules par apoptose observé par une induction des clivages de PARP et de la caspase 7 (**Figure 46**) (Geoffroy et al., 2017).

c) Rôle de la claudine 1 dans la sensibilité aux agents anticancéreux

Il est bien décrit que le phénotype mésenchymateux des tumeurs est responsable de la chimiorésistance des cellules cancéreuses (Gowrikumar et al., 2019; Mani et al., 2008). Or comme vu précédemment, l'expression de la claudine 1 est corrélée à une diminution du phénotype mésenchymateux des cellules cancéreuses (Madaras et al., 2016). De plus, l'expression de la **claudine 1 semble jouer un rôle dans la sensibilité des cellules cancéreuses à différents composés anticancéreux** (Chiang et al., 2019b; Kwon, 2013). Dans ce contexte, la surexpression de la claudine 1 augmente la sensibilité au cisplatine des cellules de carcinome de l'endomètre humain KLE et de carcinome hépatocellulaire humain HepG2 (Fortier et al., 2013). L'expression de la claudine 1 augmente également la sensibilité des cellules d'adénocarcinome pulmonaire au cisplatine. D'après ces auteurs, la claudine 1 pourrait également être un marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie pour les patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire (J.-E. Wu et al., 2020). Dans le cancer du sein, l'équipe de Zhou a mis en évidence que la surexpression de la claudine 1 dans les cellules MCF-7 augmentent leur sensibilité au cisplatine, à l'étoposide et au tamoxifène. Le pourcentage de cellules vivantes après la chimiothérapie est plus faible pour les cellules MCF-7^{CLDN1+} qui expriment la claudine 1 que pour les cellules MCF-7^{CLDN1-} (**Figure 47**) (B. Zhou, Blanchard, et al., 2015). Enfin, une étude récente a montré que la chimiothérapie néoadjuvante induit l'expression de la claudine 1 et diminue celle du Ki-67 dans les tumeurs mammaires. Ces données soulignent que la chimiothérapie néoadjuvante peut modifier le profil moléculaire d'une tumeur mammaire et par conséquent sa chimiosensibilité (Skálová et al., 2019).

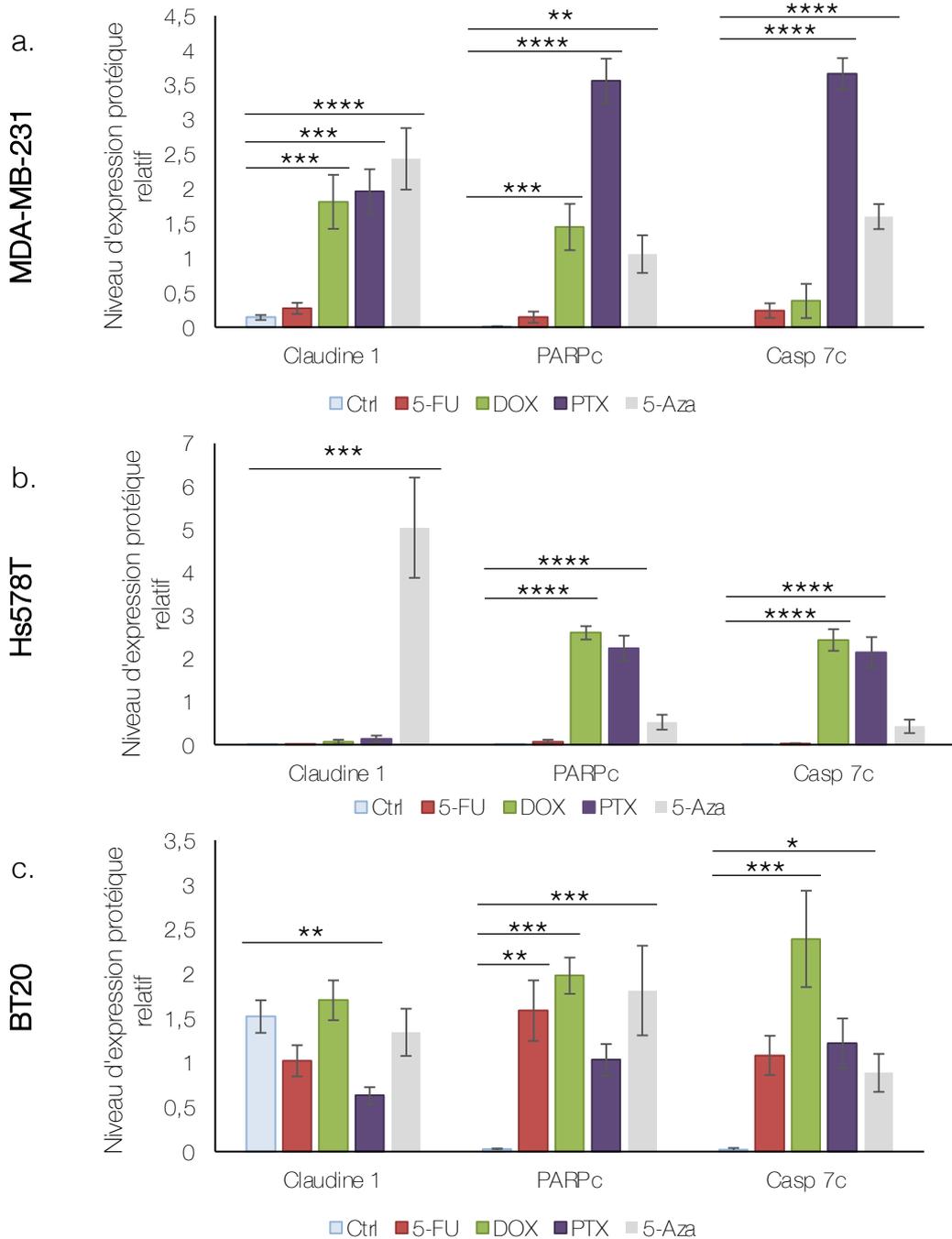


Figure 48 : Effet de différents agents de chimiothérapie sur les cellules MDA-MB-231 (a), Hs578T (b) et BT20 (c)

Les cellules ont été traitées pendant 72h au 5-fluorouracile (5-FU) à 50 μ M, à la doxorubicine (DOX) à 86,2 nM, au paclitaxel (PTX) à 5 nM et à la 5-azacytidine (5-Aza) à 5 μ M. L'induction de l'apoptose a été analysée en Western-blot par l'étude des marqueurs PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (Casp 7c). Le taux de claudine 1 a également été vérifié. Le taux de tubuline α est utilisé comme référence interne. Le graphique correspond à la moyenne des quantifications de 4 à 6 expériences indépendantes +/- leur SEM. ANOVA avec test posthoc de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la claudine 1 pourrait jouer un rôle dans la réponse à la chimiothérapie des tumeurs mammaires et permettre de diminuer le phénotype malin de ces tumeurs. La réexpression de la claudine 1 pourrait donc être une approche clé dans le traitement des TNBC, en particulier pour le sous-type « claudin-1-low ».

V. RESULTATS PRELIMINAIRES

Dans ce contexte, mon laboratoire s'est intéressé à déterminer si la claudine 1 pouvait jouer un rôle dans la sensibilité des cellules issues de tumeurs TNBC « claudin-1-low » aux agents de chimiothérapie. Ces travaux ont commencé par la caractérisation de la réponse des cellules à la chimiothérapie. Les lignées TNBC MDA-MB-231, Hs578T et BT-20 ont été traitées par différents agents de chimiothérapie pendant 72 h à des doses précédemment établies au laboratoire (**Figure 48**) (thèse de Remy Klotz). La 5-azacitidine (5-Aza) est utilisée comme témoin positif de l'induction de la claudine 1 puisque Di Cello a montré en 2013 qu'elle permet la réexpression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-453 (Di Cello et al., 2013).

- Dans la lignée MDA-MB-231, nous pouvons observer une réexpression de la claudine 1 et des marqueurs apoptotiques PARP clivée et caspase 7 clivée après un traitement avec 86,2 nM de doxorubicine, 5 nM de paclitaxel et 5 µM de 5-azacitidine. A l'opposé, aucune expression de la claudine 1 et aucun clivage des marqueurs apoptotiques ne sont observés à la dose de 50 µM de 5-FU. Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de la claudine 1 apparait corrélé à la sensibilité aux agents de chimiothérapie dans les cellules MDA-MB-231 (**Figure 48a**).
- Pour la lignée Hs578T, seule la 5-azacytidine induit l'expression de la claudine 1. La doxorubicine, le paclitaxel et la 5-azacytidine induisent le clivage des marqueurs apoptotiques. La 5-FU n'induit ni l'expression de la claudine 1, ni celles ces marqueurs apoptotiques. La lignée Hs578T présente un profil de réponse différent comparé aux cellules MDA-MB-231 (**Figure 48b**).
- La lignée BT20, également triple-négative, est un modèle de « claudin-1-high ». Contrairement aux deux lignées TNBC « claudin-1-low », cette lignée présente

une réponse apoptotique pour l'ensemble des agents de chimiothérapie testés avec une augmentation significative du clivage des marqueurs apoptotiques. Ainsi, il semblerait que les cellules de la lignée BT20 qui expriment la claudine 1 soient plus sensibles aux agents de chimiothérapie que les deux lignées TNBC « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T (**Figure 48c**).

Ces résultats mettent en évidence qu'il existe une corrélation entre l'expression de la claudine 1 et la réponse aux agents de chimiothérapie dans la lignée MDA-MB-231 « claudin-1-low » et dans la lignée BT20 « claudin-1-high ».

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Ma thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux. L'objectif est de déterminer si l'expression de la claudine 1 dans les cellules mammaires triple-négatives « claudin-1-low » pourrait constituer une piste pour les sensibiliser à la chimiothérapie ?

Celle-ci comporte trois volets :

1) L'expression de la claudine 1 permet-elle de sensibiliser les cellules TNBC à la chimiothérapie ?

L'objectif de cette première partie est d'étudier la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie, en fonction du niveau d'expression de la claudine 1. Ce volet est le plus conséquent. La sensibilité est mesurée en termes d'apoptose, de viabilité cellulaire, d'autophagie et de cycle cellulaire. L'implication de la claudine 1 dans la sensibilité a été déterminée par inhibition de son expression par ARN interférence et par l'utilisation de lignées stables surexprimant la claudine 1.

2) Identifier les partenaires protéiques de la claudine 1 impliqués dans la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires triple-négatives en réponse aux agents de chimiothérapie.

L'identification des partenaires protéiques de la claudine 1 constitue également une étape clé à la compréhension de sa fonction dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-low » aux agents de chimiothérapie. Notre objectif est d'identifier les protéines partenaires qui interagissent avec la claudine 1 et seraient responsables de son rôle dans la mort cellulaire et dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 « claudin-1-low » aux agents de chimiothérapie. La mise au point de l'approche biochimique de « crosslink » *in vivo* a été réalisée au cours de ma thèse. Elle sera suivie d'une analyse par spectrométrie de masse qui nous permettra d'identifier les partenaires protéiques directs de la claudine 1. Ces approches expérimentales ont été complétées d'une analyse bio-informatique à l'aide des banques de données.

3) Quels sont les facteurs clés qui stimulent l'expression de la claudine 1 ?

L'objectif de ce volet consiste à identifier la région promotrice minimale impliquée dans la régulation de la transcription de la claudine 1 en réponse aux agents de chimiothérapie. La région promotrice de 1000 pb du gène de la claudine 1 a été clonée puis étudiée par expérience de gène rapporteur. Ces travaux ont déterminé que cette région est responsable de l'induction de l'expression de la claudine 1 sous l'effet de la doxorubicine. Les analyses bio-informatiques de la région de 1000 pb ainsi que la littérature scientifique nous ont permis d'identifier 12 sites et facteurs de transcription pouvant être impliqués dans la régulation de l'expression de la claudine 1.

a.

Lignées cellulaires	Sous-types		Statut claudine 1
MCF10A	Non cancéreuses		+
HCC1806	BL2	TNBC	« claudin-1-high »
MDA-MB-231	MSL		« claudin-1-low »
Hs578T	MSL		

b.

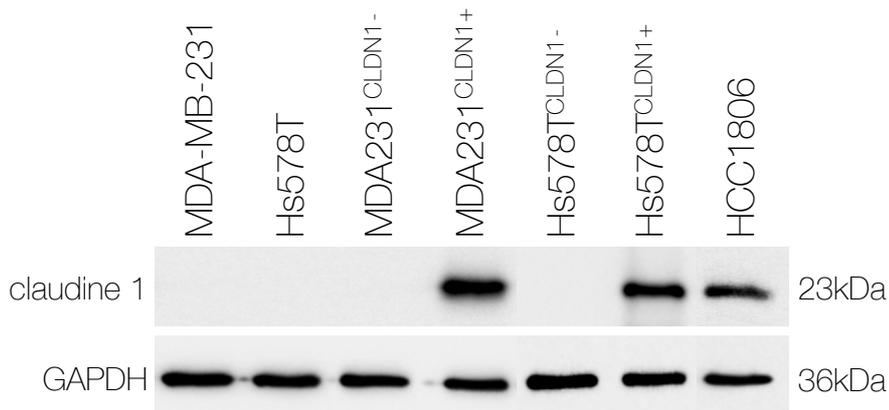
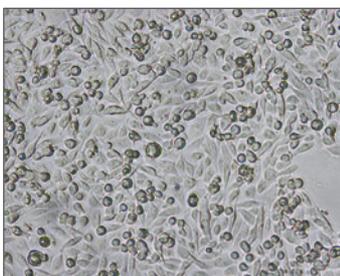


Figure 49 : Expression de la claudine 1 dans les lignées cancéreuses mammaires

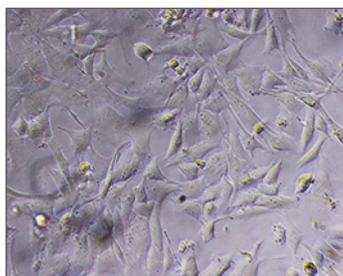
a. Le sous-type ainsi que le statut claudine 1 des différentes lignées cellulaires sont indiqués.
 b. L'expression de la claudine 1 et de la GAPDH on été analysés par Western Blot. Les cellules de la lignée MCF-10A sont des cellules épithéliales immortalisées non tumorales qui expriment la claudine 1 et servent de témoin positif pour le Western blot.

a.



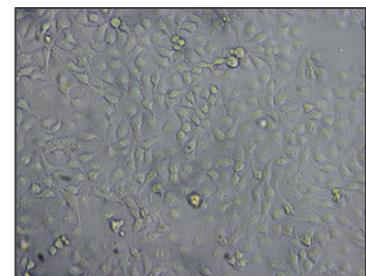
MDA-MB-231

b.



Hs578T

c.



HCC1806

« claudin-1-low »

« claudin-1-high »

Figure 50 : Observations en lumière blanche des cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 au microscope optique

Les cellules MDA-MB-231 (a.), Hs578T (b.) et HCC1806 (c.) sont à confluence et l'observation est réalisée au grossissement x20.

MATERIELS ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE

1) Lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires utilisées au laboratoire proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection) (**Figure 49a**).

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 (**Figure 50a**) (Cailleau et al., 1974). Elle est dite triple-négative car elle n'exprime aucun des trois récepteurs ER α , PR et HER2. Cette lignée fibroblastique présente un fort pouvoir métastatique. Elle appartient au sous-type Mesenchymal-stem-Like décrit par Lehmann en 2011 (Lehmann et al., 2011). Cette lignée est caractérisée par une absence d'expression protéique de la claudine 1 et fait partie du groupe des « claudin-1-low ».

Les lignées cancéreuses mammaires **MDA-MB-231^{CLDN1-}** et **MDA-MB-231^{CLDN1+}** ont été établies au laboratoire en 2017 par la doctorante Marine Geoffroy. Les cellules MDA-MB-231^{CLDN1-} et MDA-MB-231^{CLDN1+} ont été transfectées avec le vecteur pcDNA3.1 vide ou le vecteur pcDNA3.1-CLDN1 contenant l'ADNc humain du gène de la claudine 1 respectivement.

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 (**Figure 50b**) (Hackett et al., 1977). Elle fait également partie des tumeurs triple-négatives et du sous-type Mesenchymal-stem-Like (Lehmann et al., 2011). Cette lignée est aussi caractérisée par une absence d'expression protéique de la claudine 1 et fait partie du groupe des « claudin-low ».

Les lignées **Hs578T^{CLDN1-}** et **Hs578T^{CLDN1+}** ont été établies en 2021 en collaboration avec Catherine Tomasetto et Fabien Alpy au laboratoire IGBMC (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire) à Illkirch. Les cellules Hs578T^{CLDN1-} et Hs578T^{CLDN1+} ont

été transfectées avec le vecteur retroviral pQCXIP-*vide* ou avec le vecteur pQCXIP-CLDN1 respectivement. Ces deux vecteurs contiennent une cassette de résistance pour la puromycine. Les cellules ont par la suite été sélectionnées pendant 2 semaines par une exposition à la puromycine à 50 ng/mL (Gibco).

La lignée cancéreuse mammaire **HCC1806** a été isolée en 1995 à partir d'une tumeur primaire d'une femme âgée de 60 ans atteinte d'un carcinome épidermoïde acantholytique mammaire (**Figure 50c**) (Gazdar et al., 1998). Cette lignée est triple-négative et fait partie du sous-type basal-like 2 (Lehmann et al., 2011). Cette lignée exprime la claudine 1 et est qualifiée de « claudin-1-high ».

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**).

2) Entretien des cellules

Toutes les lignées ont été cultivées en monocouche. Elles sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂. La lignée **Hs578T** est cultivée en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) avec rouge phénol (Life Technologies) supplémenté de 10 % de SVF (sérum de veau foetal) (Sigma-Aldrich), de 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich) et de 10 µg/mL d'insuline bovine (Sigma-Aldrich). Les lignées **MDA-MB-231** et **HCC1806** sont cultivées en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 avec rouge phénol (Life Technologies) supplémenté de 10 % de SVF et de 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich).

Les cellules atteignent la confluence deux fois par semaine et sont alors rincées avec du D-PBS (Life Technologies) et décollées avec de la trypsine 1x + EDTA 1 % (Life Technologies). Elles sont par la suite réensemencées dans une flasque de culture T₇₅ dans des proportions variables dépendant du temps de doublement de chaque lignée. Ainsi, les cellules HCC1806 sont diluées au quinzième, les MDA-MB-231 au quart et les Hs578T au tiers.

Tableau 19 : Liste des agents de chimiothérapie utilisés pour le traitement des cellules
 Le tableau regroupe les concentrations mères de chaque composé, le solvant utilisé, leur masse molaire ainsi que leur référence.

Molécules	Concentration mère	Solvant	M (g/moles)	Références
5-Azacytidine (5-aza)	500 µM	Eau stérile	244,20	A2285 Sigma Aldrich
5-Fluorouracile (5-FU)	250 mM	DMSO	130,1	F6627 Sigma Aldrich
Paclitaxel (PTX)	1 mM	EtOH 100%	853,91	T7402 Sigma Aldrich
Doxorubicine (DOX)	3,45 mM	Eau stérile	579,98	D1515 Sigma Aldrich

Tableau 20 : Concentration des agents de chimiothérapie utilisées lors des expériences

Molécules	Concentrations utilisées pour établir les EC60	Concentrations de comparaison
5-aza	/	5 µM
5-FU	5 - 10 - 50 -100 - 200 µM	50 µM
PTX	5 - 10 -15 - 20 - 25 nM	5 nM
DOX	50 - 80 - 160 - 400 - 800 nM	86 nM

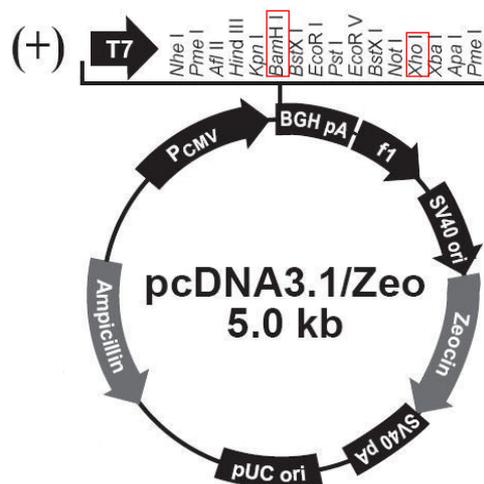


Figure 51 : Carte du vecteur d'expression pcDNA3.1

Le vecteur d'expression pcDNA3.1 de 5 kb est composé du promoteur fort du cytomégalovirus (P_{CMV}), de multiples sites de clonage (T7), de 3 origines de réplication dont une procaryote (pUC), une du phage M13 monobrin (f1) et une du virus SV40 (SV40), 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). Les différentes construction du gène de la claudine 1 ont été clonées au niveau des sites de restriction BamH I et Xho I, encadrés en rouge.

3) Traitements des cellules

Les cellules ont été traitées avec différents agents de chimiothérapie : le 5-fluorouracile (**5-FU**), le paclitaxel (**PTX**) et la doxorubicine (**DOX**). Les traitements sont réalisés 24h après l'ensemencement. Pour chaque traitement, une solution intermédiaire est réalisée dans le solvant de l'agent (**Tableau 19**) puis les cellules sont incubées en présence des différents agents de chimiothérapie dans leur milieu de culture respectif. Pour chaque agent de chimiothérapie, nous avons choisi deux doses de traitements différents : la dose EC_{50} établie pour chaque lignée cellulaire et une dose commune pour chaque agent de chimiothérapie afin de permettre la comparaison des différentes lignées entre elles (**Tableau 20**). Nous avons également utilisé la 5-azacitidine (**5-aza**) puisqu'elle permet d'induire l'expression de la claudine 1. Les cellules contrôles (Ctrl) sont cultivées dans le milieu de culture en présence du solvant de l'agent de chimiothérapie, en ne dépassant pas 0,1 % du volume total. Les temps de traitement sont variables en fonction des expériences.

4) Transfections transitoires

a) Transfection de vecteurs d'expression

Les cellules MDA-MB-231 sont ensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules/puits et les cellules Hs578T à $1 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques 6 puits. Elles sont ensuite transfectées avec les vecteurs pcDNA3.1-CLDN1 ou pcDNA3.1- Δ PDZ (**Figure 51**). Pour la transfection d'un puits, 7,5 μ L de l'agent de transfection cationique Transit LT1 (Mirus Bio) est mélangé à 250 μ L du milieu de culture OptiMEM (Gibco) à température ambiante. Après homogénéisation douce, 2,5 μ g du vecteur est ajouté à la solution de transfection et incubé 15 minutes à température ambiante. Le mélange de transfection est ensuite déposé goutte-à-goutte dans les puits de culture. Les cellules sont ensuite incubées entre 24 et 72 heures à 37°C.

b) Transfection d'ARN interférents

Les cellules MDA-MB-231 sont ensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules/puits et les cellules HCC1806 à $1 \cdot 10^5$ cellules/puits en plaque 6 puits. Elles sont transfectées avec des ARN

a.

Annotations	Références	Séquences des ARN interférents
siCLDN1	Human claudin-1 (M-017369-01-0005 siGENOME SMART pool siRNA CLDN1)	5'-GCAAUAGAAUCGUUCAAGA-3' 5'-GCAUGAAGUGUAUGAAGU-3' 5'-AGAAUUCUAUGACCUAUG- 3' 5'-ACGAUGAGGUGCAGAAGAU- 3'
scRNA	Scrambled duplex ScRNAs (D-001206-14-05, siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #2)	Contrôle négatif 4 séquences aléatoires

b.

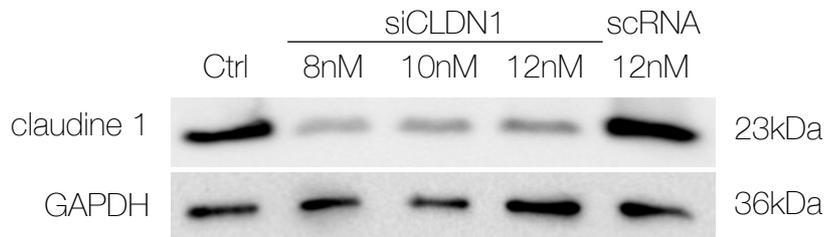


Figure 52 : Inhibition de l'expression de la claudine 1 par ARN interférence

a. Les séquences des ARNs interférents dirigés contre la claudine 1 (siCLDN1) sont indiquées. Les ARN interférents contrôles scRNA sont composés de 4 séquences ne ciblant aucun gène connu chez l'Homme, la souris et le rat et servent ici de contrôle négatif. b. La lignée HCC1806 a été transfectée avec plusieurs concentrations de siCLDN1 (8, 10 et 12 nM) et à la concentration de 12 nM de scRNA. Plusieurs concentrations en ARN interférent ont été testées afin de déterminer la plus efficace pour inhiber l'expression de la claudine 1. Le taux d'expression de la claudine 1 ont été analysés par western blot après 72 h.

interférents aléatoires scRNA (siGENOME Non-Targeting siRNA Pool, ThermoFisher Scientific) ou spécifiques de la claudine 1 appelé siCLDN1 (siGENOME SMARTpool siRNA CLDN1, ThermoFisher Scientific) (**Figure 52**). Dans un premier temps la solution d'ARN interférents est diluée dans 175 μL de milieu Opti-MEM pour un puits de plaque 6 puits. En parallèle, 5 μL d'Oligofectamine (ThermoFisher Scientific) ou l'agent de lipofection, sont dilués dans 10 μL d'Opti-MEM à température ambiante. Les deux solutions sont incubées 10 minutes à température ambiante. La solution d'Oligofectamine est ensuite mélangée doucement à celle contenant les ARN interférents puis le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, les cellules sont rincées avec du milieu sans sérum. Enfin, 200 μL du mélange de transfection sont ajoutés goutte-à-goutte dans chaque puits et sont ensuite complétés avec 800 μL de milieu sans sérum. Les ARN interférents sont utilisés à la concentration finale de 2 nM pour les cellules MDA-MB-231 (Concentration définie, thèse Marine Geoffroy) et à 12 nM pour les cellules HCC1806. Le siCDLN1 a été vérifié avec la lignée HCC1806 qui exprime fortement la claudine 1 (**Figure 52b**).

La transfection est stoppée après 4h d'incubation à 37°C en ajoutant 500 μL de milieu supplémenté de 30 % de SVF. Le traitement des cellules est réalisé 3h plus tard avec 500 μL de milieu de culture à 10 % de SVF contenant les différents agents de chimiothérapie pour 72 h.

II. ANALYSE DES TRANSCRITS

1) Extraction des ARN

Les cellules sontensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules par puits dans une plaque 6 puits. Elles sont ensuite traitées aux agents de chimiothérapie pendant 3, 6, 9, 24, 48 ou 72 h. Après chaque traitement, le surnageant est éliminé et 500 μL de Trizol (Ambion-Life Technologies) sont déposés dans chaque puits pour 5 minutes pour lyser les cellules tout en conservant l'intégrité des ARN. Les lysats cellulaires sont ensuite transférés dans des microtubes où l'on ajoute 20 μg de glycogène (Fermentas) et 200 μL de chloroforme. Le tout est vortexé 15 secondes et incubé 3 minutes à température ambiante. Les tubes sont

Tableau 21 : Liste des couples d'amorces utilisés pour les PCR quantitative et semi-quantitative
 Les couples d'amorces ainsi que leurs séquences, les conditions de PCR et le nombre de paires de bases des transcrits sont indiqués

Type de PCR	Gène	Amorces	Conditions de PCR	Taille du transcrit (pb)
PCR semi-quantitative	CLDN1 <i>Full length</i>	5'-CGCGGATCCACCATGGCCAACGCGGGGCTG-3' 5'-CCGCTCGAGCACGTAGTCTTTCCC-3'	5 min à 94°C 45 sec à 94°C 45 sec à 71°C 1 min à 72°C 10 min à 72°C	40 cycles 636 pb
	RPLPO	5'-ACAACCCAGCTCTGGAGAAA-3' 5'-TCGTTTGTACCCGTTGATGA-3'	10 min à 94°C 45 sec à 94°C 45 sec à 58°C 1 min à 72°C 10 min à 72°C	25 cycles 530 pb
qPCR	CLDN1	5'-CCCTATGACCCCAGTCAATG-3' 5'-ACCTCCCAGAAGGCAGAGA-3'	5 min à 95°C 15 sec à 95°C 45 sec à 58°C	40 cycles 87 pb
	RPLPO	5'-GGCGACCGTGAAGTCCAAC-3' 5'-CCATCAGCACACAGCCTTC-3'	5 min à 95°C 30 sec à 95°C 30 sec à 58°C	40 cycles 149 pb

centrifugés 15 minutes à 25 000 g à 4°C. La phase supérieure aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et un volume équivalent d'isopropanol à -20°C y est ajouté. Les tubes sont homogénéisés et incubés 10 minutes à température ambiante. Ils sont centrifugés 20 minutes à 25 000 g à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont lavés avec 1 mL d'EtOH à 70 % à -20°C. Les tubes sont centrifugés une dernière fois à 25 000 g pour 15 minutes à 4°C, l'éthanol est retiré et les culots sont mis à sécher à température ambiante pendant 20 minutes. Les culots sont repris dans 12 µL d'eau RNase free. Chaque échantillon est enfin dosé au spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Scientific) et la pureté est estimée par le rapport A_{260}/A_{280} . Les ARN sont conservés à -80°C.

2) RT-PCR semi-quantitative

a) Rétrotranscription (RT)

1 µg d'ARN totaux sont mélangés avec 300 ng d'amorces aléatoires (Invitrogen) et 1 µL de dNTP (désoxyribonucléoside triphosphate) à 25 mM dans un volume final de 14 µL. Le tout est chauffé à 65°C pendant 5 minutes dans un thermocycleur (BioRad) puis déposé sur glace. Ensuite, un mélange contenant 4 µL de tampon RevertAid 5x (Thermoscientific) ; 1,5 µL d'H₂O mq RNase free et 0,5 µL d'enzyme RevertAid sont ajoutés dans chaque tube. La rétrotranscription est ensuite réalisée dans le thermocycleur pendant 10 minutes à 25°C, 1 h à 42°C et 15 minutes à 70°C. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C à court terme et -80°C à long terme.

b) PCR semi-quantitative

2 µL d'ADNc sont utilisés pour chaque PCR (Réaction en chaîne par polymérase) semi-quantitative. Dans chaque tube, on ajoute 0,5 µL de dNTP à 10 mM ; 2,5 µL de tampon Invitrogen 10x ; 0,75 µL de MgCl₂ (pour obtenir une concentration finale de 1,5 mM) ; 0,1 µL de Taq Invitrogen ; 16,65 µL d'H₂O mq RNase free et 1,25 µL d'amorce sens et antisens à 10 µM. Le mix de PCR est réalisé dans un volume final de 25 µL. Les conditions de PCR sont indiquées dans le **Tableau 21**. RPLPO est utilisé comme gène de référence. Les fragments amplifiés sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 0,8 % de 100 mL contenant du tampon de migration 1x (Tris, acide acétique glacial 100 % et EDTA 0,5 M

pH 8) et 3,5 µL de GelRed (Interchim). Le GelRed est un intercalant de l'ADN et qui émet une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN. Les molécules d'ADN sont séparées par électrophorèse en fonction de leur masse moléculaire pendant 2 h à 80 V. Le résultat obtenu est observé grâce au Gel Doc 2000 et au logiciel Quantity One 1-D (Bio-Rad).

3) RT-PCR quantitative

a) Transcription inverse

2 µg d'ARN totaux sont mélangés avec 300 ng d'amorces aléatoires (Invitrogen) dans un volume final de 12,5 µL puis ils sont chauffés à 65°C pendant 5 minutes dans un thermocycleur (BioRad) et déposés sur glace. Ensuite, un mélange contenant : 2 µL de dNTP à 25 mM ; 4 µL de tampon Hminus 5x (Thermoscientific) ; 0,5 µL d'H₂O mq RNase free et 1 µL d'enzyme RT Hminus (Thermoscientific) sont ajoutés dans chaque tube. Ils sont ensuite placés dans le thermocycleur pendant 10 minutes à 25°C, 1 h à 42°C et 15 minutes à 70°C. Les ADNc sont dosés au NanoDrop.

b) qPCR

Pour chaque PCR : 50 ng d'ADNc sont utilisés pour RPLPO et 300 ng pour la claudine 1 dans un volume final de 1,5 µL. On ajoute ensuite 12 µL d'une solution contenant : 7,5 µL de SYBR Green (Biorad) ; 1,5 µL d'H₂O mq RNase free et 1,5 µL de chaque amorce sens et anti-sens à 300 nM final. L'amplification est réalisée par le Real-Time PCR Detector (DNA Engine, opticon 2). Les conditions de PCR sont regroupées dans le **Tableau 21**. Pour chaque condition, les qPCR sont réalisées en duplicat. La PCR se termine par l'établissement de la courbe de fusion. Les C_q(t) de la claudine 1 sont normalisés par rapport au C_q(t) du gène de référence RPLPO, puis sont rapportés au témoin. Nous avons utilisé la technique des $\Delta\Delta C_t$, 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.

Tableau 22 : Composition des gels de polyacrylamide à 5 et 12%

Gels de concentration 5%	2 gels	Gels de séparation 12%	Pour 2 gels
Eau stérile	3,63 mL	Eau stérile	4,26 mL
Bis acrylamide 40%	750 μ L	Bis acrylamide 40%	3 mL
Tris pH 6,8 à 0,5M	1,5 mL	Tris pH 8,8 à 1,5M	2,5 mL
SDS 10%	60 μ L	SDS 10%	200 μ L
PSA 10%	64 μ L	PSA 10%	46 μ L
TEMED	10 μ L	TEMED	14,3 μ L
Volume final	6,01 mL	Volume final	10,02mL

III. ANALYSE PROTEIQUE

1) Extraction protéique

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans des plaques 6 puits à $0,8 \cdot 10^5$ cellules/mL et les cellules HCC1806 et Hs578T à $0,4 \cdot 10^5$ cellules/mL. Après 72 h de traitement par les différents agents de chimiothérapie, les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir et récupérées avec leur surnageant sur glace. L'ensemble est centrifugé 10 minutes à 145 g à 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris dans 40 µL de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Triton 0,1x, sodium déoxycholate 0,25 %, Tris pH 7,5 50 µM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Sigma-Aldrich)). Les cellules sont incubées 30 minutes à 4°C puis une centrifugation de 5 minutes à 20 124 g à 4°C nous permet d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants contenant l'extrait protéique sont récupérés et dosés.

2) Dosage protéique

La méthode de Bradford est utilisée pour doser les extraits de protéines totales. Une gamme étalon de BSA (bovin serum albumin) est réalisée afin de déterminer la concentration protéique des échantillons. La BSA est diluée à 1440, 600, 300, 100 et 50 µg/µL et chaque échantillon protéique est dilué au dixième. 10 µL de chaque point de la gamme et des échantillons sont déposés dans une plaque 96 puits. 200 µL du réactif BioRad Protein assay dilués au quart sont ensuite déposés dans la plaque. Enfin la densité optique est mesurée à la longueur d'onde de 595 nm par un lecteur de plaque (Victor X3, PerkinElmer).

3) Western blot

50 µg de protéines sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon de Laemmli 5x (Tris/HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 10 % ; saccharose 50 % ; bleu de bromophenol 0,05 % ; DTT (Dithiothréitol) 0,5 M). Les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide composé d'un gel de concentration à 5 % et d'un gel de séparation à 12 % (**Tableau 22**). Les protéines sont séparées par électrophorèse à 100 V pendant 2 h dans un tampon de

Tableau 23 : Liste des différents anticorps utilisés en Western Blot

Le tableau regroupe les références des anticorps primaires, leur poids moléculaire, les dilutions utilisées ainsi que la référence de l'anticorps secondaire utilisé pour chaque anticorps primaire.

Protéines	Poids moléculaire (kDa)	Anticorps primaire	Dilution anticorps primaire	Anticorps secondaire
PARP clivé	89	552596 BD Pharmingen tm	1/1000	Goat anti-Mouse IgG-HRP A4416 Sigma
GAPDH	36	60004-1-Ig ProteinTech	1/5000	
Caspase 7 clivée	20, 30, 35	#9494 CS CellSignaling	1/800	
Claudine 1	23	C538-02C USBiological	1/1000	Goat anti-rabbit IgG-HRP A9169 Sigma
Tubuline- α	50	GTX102079 GeneTex	1/6000	

migration 1x (Tris/HCl 24,7 mM, Glycine 191 mM, SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,1 %) en condition dénaturante (SDS-PAGE). Les protéines sont, par la suite, transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioRad). Le transfert est réalisé en milieu liquide dans du tampon de transfert 1x (Tris/HCL 25 mM, Glycine 192 mM, EtOH 20 %) pendant 1 heure à 100 V à 4°C.

Les membranes sont ensuite colorées au rouge ponceau afin de contrôler la qualité de la migration et du transfert. Les membranes sont saturées dans du TNT 1x (Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 170 mM, Tween 20 0,1 %) contenant 5 % de lait pendant 1h à température ambiante. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TNT lait 5 % (**Tableau 23**) la nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes sont rincées 3 fois 5 minutes avec du TNT 1x puis incubées dans l'anticorps secondaire à température ambiante pendant 1h. L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort en présence de son substrat (Clarity Western ECL substrate, BioRad) émet un signal chimioluminescent qui est détecté par le système d'imagerie Chemidoc Touch Imaging System (BioRad).

L'intensité du signal est ensuite quantifiée grâce au logiciel Image Lab (BioRad). Les taux relatifs de protéines d'intérêt sont normalisés par rapport à la protéine de référence GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

L'anticorps dirigé contre la claudine 1 (USBiological C5838-02C) a été vérifié en western blot sur des cellules de la lignée MDA-MB-231^{CLDN1+} qui surexpriment stablement la claudine 1. Ce dernier a également été testé sur la lignée HCC1806 après inhibition de l'expression de la claudine 1 par des expériences d'ARN interférence (**Figures 52**).

IV. CLONAGE

L'objectif de cette partie est de réaliser la construction de la claudine 1 déletée du motif de liaison au domaine PDZ. Cette construction contient la séquence complète de la

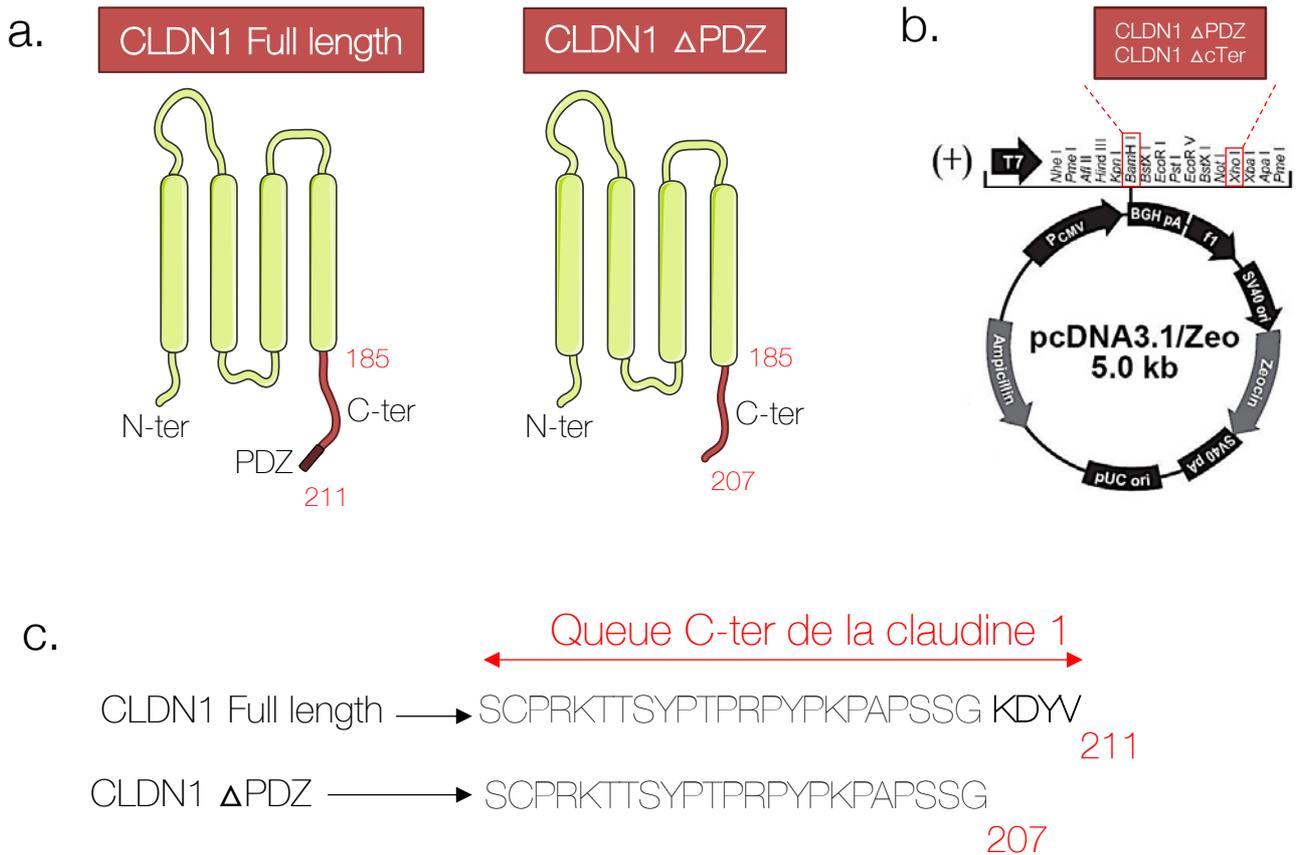


Figure 53 : Les différentes constructions de la claudine 1

a. Schéma de la claudine 1 Full length et sans le motif de liaison au domaine PDZ **b.** Carte du vecteurs d'expression pcDNA3.1. Les différentes constructions du gène de la claudine 1 ont été clonées au niveau des sites de restriction BamH I et Xho I. **c.** Séquences en acides aminées de la queue C-terminales des différents mutants de la claudine 1.

Tableau 24 : Liste des couples d'amorces utilisés pour les PCR quantitative et semi quantitatives

Les couples d'amorces ainsi que leur séquences, les conditions de PCR et le nombre de paires de bases des transcrits sont indiqués.

Gène	Amorces	Conditions de PCR	Taille du transcrits (pb)
CLDN1 <i>Full lenght</i>	5'-CGCGGATCCACCATGGCCAACGCGGGGCTG-3' 5'-CCGCTCGAGTCACACGTAGTCTTTCCC-3'	5 min à 94°C 45 sec à 94°C 45 sec à 71°C 1 min à 72°C 10 min à 72°C 30 cycles	636 pb
CLDN1 ΔPDZ	5'-CGCGGATCCACCATGGCCAACGCGGGGCTG-3' 5'-AAGCTCGAGTCACCCGCTGGAAGGTGCAGG-3'	5 min à 94°C 45 sec à 94°C 45 sec à 71°C 1 min à 72°C 10 min à 72°C 30 cycles	624 pb

claudine 1 délétée des acides aminés KDYV terminaux qui a été insérée dans le vecteur pcDNA3.1 (**Figure 53**).

1) Amplification de l'insert

Le vecteur pcDNA3.1-CLDN1 déjà cloné au laboratoire (thèse de Marine Geoffroy) a été utilisé pour amplifier l'insert de la claudine 1 délétée du motif de liaison au domaine PDZ. Les PCR semi-quantitatives ont été réalisées avec 20 ng d'ADNc, 1 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de Taq polymérase Invitrogen, 1,5 mM de MgCl₂ et les couples d'amorces regroupés dans le **Tableau 24**. Après la PCR, 4 µL de bleu de dépôt 6x (10 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 0,03 % bleu de bromophénol ; 0,03 % Xylène cyanol FF ; 60 % glycérol ; 60 mM EDTA) (Thermo Scientific) sont ajoutés dans chaque échantillon. Ils sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 0,8 % contenant du tampon de migration 1x (Tris, acide acétique glacial 100 % et EDTA 0,5 M pH 8) et 3,5 µL de GelRed. Les molécules d'ADN sont séparées par électrophorèse en fonction de leur masse moléculaire pendant 2 h à 80 V. Le résultat obtenu est observé grâce au Gel Doc 2000 et au logiciel Quantity One 1-D (Bio-Rad).

2) Élution insert

Le fragment de gel contenant l'insert est élué grâce au kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). La bande découpée est pesée et 3 volumes de tampon de solubilisation L3 sont ajoutés. Le tout est incubé durant 10 minutes à 50°C pour permettre la dissolution de l'agarose. L'insert en solution est fixé sur une colonne de silice, puis est centrifugé durant 1 min à 10 000 g. La colonne est lavée deux fois à l'aide d'un tampon Wash W1 avec une centrifugation de 1 min à 10 000 g. L'insert est élué à l'aide du tampon d'éluion E1 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Après une incubation de 1 min à température ambiante, le tout est centrifugé durant 1 minute à 10 000 g. Les inserts extraits sont dosés au NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) à 260 nm.

3) Double digestion

La double digestion enzymatique est réalisée dans un volume final de 50 μL . 1,5 μg de plasmide pcDNA3.1 et 500 ng d'insert sont digérés séparément en présence de 5 μL de tampon FastDigest 10x, de 2,5 μL d'enzyme *XhoI* (1 U/ μL) et 2,5 μL d'enzyme *BamHI* (1 U/ μL) pour les plasmides ou de 1,5 μL d'enzyme *XhoI* et 1,5 μL d'enzyme *BamHI* (FastDigest, Thermo Scientific) pour les inserts. Les échantillons sont incubés 20 min à 37°C pour permettre leur digestion, puis 5 min à 80°C afin d'inactiver les enzymes.

4) Purification

La purification des inserts permet d'éliminer tous les sels contenus dans le tampon des enzymes de digestion qui inhibent la ligase. Cette étape permet également de concentrer les échantillons pour réaliser la ligation dans le plus petit volume possible. La purification des échantillons est réalisée avec le kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). Pour ce faire, 4 volumes de tampon Binding Buffer B2 sont ajoutés dans chaque tube de digestion. Les produits des doubles digestions sont ensuite fixés sur une colonne de silice, puis centrifugés durant 1 min à 10 000 g. La colonne est lavée à l'aide d'un tampon Wash W1 avec une centrifugation de 1 min à 10 000 g. La colonne est ensuite séchée 3 min à 10 000 g. Les produits des doubles digestions sont élués à l'aide du tampon d'éluion E1 (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Après une incubation de 1 min à température ambiante, le tout est centrifugé durant 1 minute à 10 000 g et stocké à 4°C. Les échantillons sont ensuite dosés au NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) à 260 nm.

5) Ligation

Pour les ligations du vecteur pcDNA3.1, 100 ng de vecteur (digéré et purifié) et 36 ng d'insert (digéré et purifié) sont ligués selon un ratio vecteur/insert de 1/3. La ligation est réalisée dans un volume final de 20 μL à l'aide de 2 μL de tampon T4 DNA ligase 10x (Tris-HCl 400 mM pH 7,8 ; MgCl_2 100 mM, ATP 5 mM, DTT 100 mM, 5 mM ATP) (Thermo Scientific) et de 0,4 μL de la T4 DNA ligase (5 U/ μL) (Thermo Scientific). Le tout est incubé durant 1h à 25 °C.

6) Transformation

L'ensemble du produit de ligation est utilisé pour la transformation. Il est d'abord incubé pendant 30 minutes avec les bactéries compétentes DH5 α (Invitrogen) à 4°C. Un choc thermique est effectué pendant 20 sec à 42°C, puis 2 min sur glace. 450 μ L de LB (Lysogeny Broth) (10 g Tryptone, 5 g extrait de levure, 5 g NaCl) sont ajoutés puis l'ensemble est placé sous agitation à 37°C durant 1h. La transformation est étalée sur boîte de pétri LB solide (10 g Tryptone, 5 g extrait de levure, 5 g NaCl, 16 g Agar) contenant de l'ampicilline à 100 μ g/ μ L (Sigma-Aldrich), puis incubée à 37°C durant la nuit. Seules les bactéries possédant le gène de résistance à l'antibiotique ampicilline (amp^R) et donc ayant incorporé le plasmide sont capables de croître.

7) Vérifications du clonage

a) PCR sur colonies

Les clones obtenus sont ensuite analysés par PCR sur colonie en suivant le même protocole que celui des PCR-semi quantitatives.

b) Miniprep

Les clones sélectionnés par PCR sur colonie sont remis en culture liquide sur la nuit dans 4 mL de LB avec ampicilline 100 μ g/mL. Les miniprep sont ensuite effectuées avec le kit PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Les miniprep permettent d'extraire l'ADN plasmidique contenu dans les bactéries. Tout d'abord, la culture bactérienne est centrifugée 5 minutes à 5000 g à 4°C. Le culot est re-suspendu dans 250 μ L de tampon R3. La lyse bactérienne est effectuée par l'ajout de 250 μ L de tampon L7 contenant un détergent à pH 13. A ce pH, l'ADN est dénaturé puis 350 μ L de tampon N4 sont ajoutés. Il permet de neutraliser la solution et de précipiter l'ADN chromosomique ainsi que les protéines. Après une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, l'ADN plasmidique présent dans le surnageant est fixé sur une colonne de silice. Des lavages sont effectués avec du tampon W9 puis l'ADN plasmidique est élué avec 75 μ L de tampon E1. La concentration en ADN est dosée au NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

La vérification des vecteurs est ensuite effectuée par digestion enzymatique. Pour chaque vecteur, une digestion simple est réalisée avec l'enzyme BamHI pour le linéariser ; une

Tableau 25 : Liste des différents anticorps utilisés en immunofluorescence

Le tableau regroupe les références des anticorps primaires et les dilutions utilisées.

Protéines	Anticorps primaire	Dilution anticorps primaire	Anticorps secondaires
claudine 1	Calbiochem CB1046	1/200	Alexa Fluor 488 Donkey anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen) Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen)
Rab7	Produit dans le laboratoire l'IGBMC	1/150	Alexa Fluor 555 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen)
FADD	Avivasybio OAED00046	1/150	Alexa Fluor 555 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen)
Tubuline α	Epitomics EP13324	1/250	Alexa Fluor 555 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen)

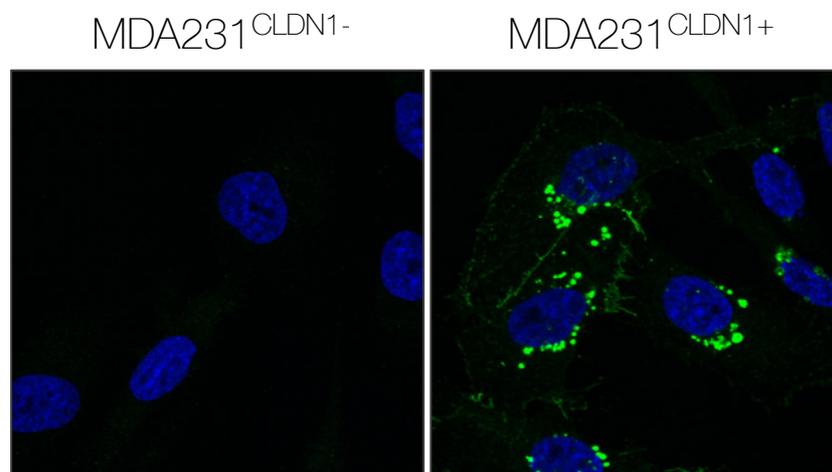


Figure 54 : Surexpression de la claudine 1 dans la lignée MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231 transfectées avec le vecteur vide pcDNA3.1 (MDA231^{CLDN1-}) et surexprimant stablement la claudine 1 (MDA231^{CLDN1+}) ont été marquées avec l'anticorps primaire dirigé contre la claudine 1 (Calbiochem CB1046) puis avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488.

double digestion est aussi réalisée avec les enzymes XhoI et BamHI afin d'extraire l'insert du vecteur. Pour ce faire, on utilise 500 ng de plasmide auxquels on ajoute 0,5 µL de chaque enzyme et 2 µL de tampon FastDigest 10x (Thermo Scientific) dans un volume final de 20 µL. Les échantillons sont incubés dans le thermocycleur pendant 10 minutes à 37°C, puis durant 5 minutes à 80°C pour permettre l'inactivation des enzymes. Ils sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 0,8 % (milieu de migration, agarose) contenant du GelRed. Le résultat obtenu est observé grâce au logiciel Quantity One (BioRad). Les séquences d'acides nucléiques des clones sont ensuite confirmées par séquençage (Eurofins).

V. IMMUNOCYTOFLUORESCENCE

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules par puits et à $1 \cdot 10^5$ cellules par puits pour les cellules HCC1806 et Hs578T sur des lamelles de verres rondes dans une plaque 24 puits. Après 72 h 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, les cellules sont légèrement perméabilisées avec une solution de PBT (PBS 1x triton 0,1 %) pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite saturées pendant 30 minutes à température ambiante avec une solution de PBT-BSA (PBS 1x, triton 0,1 %, BSA 4 %). L'anticorps primaire est dilué dans une solution de PBT-BSA et est incubé sur les lamelles la nuit à 4°C (**Tableau 25**). Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois au PBS 1x puis mises en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome l'Alexa fluor 555 (Invitrogen) ou l'Alexa Fluor 488 Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody (Invitrogen) dilué 1000 fois pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1x, les cellules sont marquées pendant 15 minutes par une solution de Hoechst 33342 (AAT Bioquest) diluée 1000 fois dans du PBS 1x. Les lamelles sont enfin rincées 5 fois avec du PBS 1x, puis une fois dans l'eau distillée pour éliminer les sels. Le montage sur lame est réalisé avec le milieu de montage Invitrogen™ ProLong™ Gold Antifade Mountant.

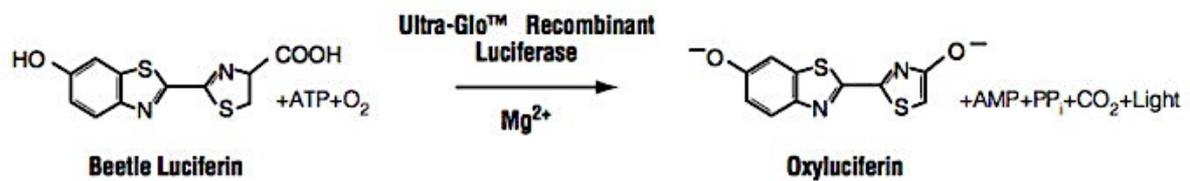


Figure 55 : Principe du test de viabilité cellulaire par mesure de l'ATP

Le test se base sur la mesure du taux d'ATP par réaction de bioluminescence. La mono-oxygénation de la luciférine est catalysée par la luciférase en présence de Mg²⁺, d'ATP et d'oxygène moléculaire. *D'après Proméga*

Les photographies sont réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra (Eclipse 80i microscope, Nikon) et à l'aide du logiciel NIS-Elements Basics Research. Certaines photographies ont également été réalisées avec le microscope confocal SP5-X (Leica) de la plateforme l'UMS2008 IBSLor et sur le microscope confocal SP8-X (Leica) du laboratoire IGBMC d'illkirch.

L'anticorps primaire dirigé contre la claudine 1 (Calbiochem – CB1046) a été vérifié sur des cellules MDA-MB-231^{CLDN1+} qui surexpriment la claudine 1 (**Figure 54**).

Pour l'étude de la localisation membranaire de la claudine 1, la Concanavaline A CF488® Dye Conjugates (ConA) est utilisée (Biotium). Après 72h de traitement, les cellules sont incubées 15 minutes à 37°C avec 250 µL de ConA à 200 µg/mL avant d'être fixées au paraformaldéhyde.

VI. TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE

1) Test ATP

L'ATP ou Adénosine Tri-Phosphate est un intermédiaire énergétique majeur, nécessaire à de très nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. Son taux est directement proportionnel au nombre de cellules vivantes. Le principe du test est de quantifier le taux d'ATP par une réaction de bioluminescence. Le réactif CellTiter-Glo (Promega) contient le substrat : la luciférine qui va réagir avec l'ATP présent dans le milieu en présence de luciférase recombinante. La luciférine est oxygénée par l'enzyme luciférase recombinante en présence de Mg²⁺, d'ATP et d'une molécule d'oxygène ce qui génère un signal luminescent (**Figure 55**).

Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à 0,32.10⁵ cellules par puits pour les cellules MDA-MB-231 et à 0,16.10⁵ cellules par puits pour les lignées HCC1806 et Hs578T. Les mesures de bioluminescence sont réalisées après 72 h de traitement dans des plaques blanches 96 puits opaques. Dans chaque puits, on dépose 50 µL de suspension cellulaire et après 30 minutes d'incubation à température ambiante, on ajoute

50 μ L de réactif Cell-Titer Glo. La plaque est ensuite soumise à une agitation orbitale vigoureuse de 1 minute puis incubée 10 minutes à température ambiante à l'obscurité. Les mesures de bioluminescence sont réalisées en duplicat à l'aide d'un lecteur de plaque (VictorX3, PerkinElmer).

Ces expériences permettent de déterminer l' EC_{50} (concentration efficace 50 %), des agents de chimiothérapie pour les différentes lignées. L' EC_{50} correspond à la concentration à laquelle la viabilité cellulaire est de 50 %.

2) Coloration au crystal violet

Le test crystal violet permet de déterminer la viabilité cellulaire. Le crystal violet est un colorant triarylmethane qui se lie aux protéines et à l'ADN des cellules vivantes qui adhèrent au fond des puits (Feoktistova et al., 2016).

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées à $0,05 \cdot 10^5$ cellules/mL et les cellules Hs578T et HCC1806 sontensemencées à $0,025 \cdot 10^5$ cellules/mL en plaque 96 puits. Le milieu de culture est éliminé après 72 h de traitement et les cellules sont rincées au PBS 1x. Les cellules sont colorées avec 50 μ L de crystal violet filtré (Crystal violet 0.2 % (Sigma Aldrich), 2 % EtOH) pendant 20 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés 3 fois à l'eau distillée dans le but d'éliminer l'excès de colorant. Enfin, 100 μ L d'acide acétique 10 % (Sigma Aldrich) sont ajoutés dans chaque puits pour dissoudre la coloration. Les mesures d'absorbance sont réalisées à l'aide d'un lecteur de plaque (VictorX3, PerkinElmer) à la longueur d'onde de 585 nm.

VII. CYTOMETRIE EN FLUX

Pour chaque analyse des cellules par cytométrie en flux, les cellules MDA-MB-231 ($0,8 \cdot 10^5$ cellules/mL), Hs578T ($0,4 \cdot 10^5$ cellules/mL) et HCC1806 ($0,4 \cdot 10^5$ cellules/mL) sontensemencées dans des plaques 6 puits. Après un traitement de 72 h, le milieu de culture est récupéré dans un flacon. Les cellules adhérentes sont ensuite rincées au PBS 1x, trypsinées, resuspendues dans du milieu de culture.

1) Étude de l'apoptose par marquage des cellules à l'Annexine V/IP

Les suspensions cellulaires sont centrifugées 5 minutes à 120 g puis les cellules sont rincées au PBS 1x. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu à une concentration finale de $1 \cdot 10^6$ cellules/mL dans le tampon de liaison 1x (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2). Par la suite, 100 μL de la suspension cellulaire sont marqués avec 2,5 μL d'annexine V-FITC (556419, BD pharmingen) et 2,5 μL d'iodure de propidium (IP) à 1 mg/mL (P3566, Life technologies) pendant 15 minutes à température ambiante à l'obscurité. 200 μL de tampon de liaison 1x sont ensuite ajoutés dans les tubes. La détection des cellules marquées positivement à l'annexine V et à IP est réalisée avec le cymomètre en flux CytoFLEX (Beckman). Les filtres 610/20 et 525/25 sont utilisés pour la détection de l'IP et de l'annexine V-FITC respectivement. Les acquisitions sont réalisées sur 10 000 évènements. Les cellules marquées à l'iodure de propidium sont les cellules en nécrose. Les cellules marquées à l'annexine V sont en apoptose précoce. Les cellules marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium sont en apoptose terminale ou mortes. Enfin, les cellules vivantes sont négatives pour les deux marquages.

2) Analyse du cycle cellulaire par marquage iodure de propidium

$1 \cdot 10^6$ cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 120 g, les cellules sont ensuite rincées au PBS 1x. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans 600 μL de PBS 1x puis les cellules sont séparées 5 fois à l'aide d'une aiguille 26G. les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées par l'ajout de 1400 μL d'éthanol absolu à -20°C déposé goutte à goutte tout en vortexant doucement la suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite conservées à -20°C . Pour réaliser le marquage, 1 mL de la suspension cellulaire est centrifugé. Le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans 500 μL de PBS contenant 10 μL de RNase A à 20 mg/mL et 2 μL d'IP à 1 mg/mL. Les tubes sont incubés 10 minutes à l'obscurité. Les acquisitions sont réalisées sur 6 000 évènements avec le cymomètre en flux CytoFLEX (Beckman) et le filtre 610/20.

VIII. TUNEL ASSAY

La méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) permet de mettre en évidence la présence de cellules apoptotiques dans une population cellulaire fixée. Les cellules apoptotiques possèdent un ADN fragmenté dû aux nombreuses cassures double brin engendrées par des nucléases lors de l'apoptose. Ces clivages libèrent des extrémités 3'OH libres qui peuvent être reconnues par la transférase du kit. Cette dernière va ainsi ajouter des dUTP (Deoxyuridine triphosphate) marqués à chaque extrémité libre marquant ainsi les cellules apoptotiques tandis que les cellules vivantes ne le seront pas.

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules/puits et les cellules Hs578T à $1 \cdot 10^5$ cellules par puits sur des lamelles de verre rondes dans une plaque 24 puits. Après un traitement de 72 h, 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 μ L des solutions « enzyme solution » et « label solution » respectivement. Un volume de 50 μ L de ce mélange est ajouté sur les cellules en chambre humide pendant 1 heure dans l'obscurité puis les noyaux des cellules sont colorés au Hoechst 33342 dilué au 1/1000 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 réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra (Eclipse 80i microscope, Nikon) et à l'aide du logiciel NIS-Elements Basics Research. Le nombre de cellules marquées positivement (Hoechst + TUNEL) et négativement (Hoechst) pour l'apoptose sont ensuite établies par comptage manuel de 5 à 8 photographies au grossissement x100.

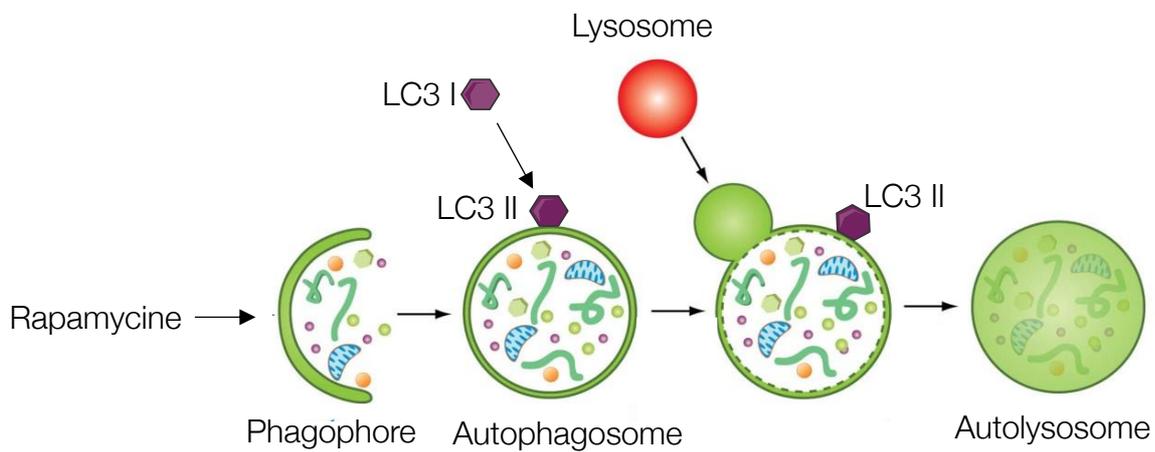


Figure 56 : Principe de l'autophagie

La rapamycine est un inducteur de l'autophagie qui peut initier la formation du phagophore. L'autophagosome est ensuite formé et la protéine LC3 I est convertie en LC3 II qui se retrouve alors à la membrane de l'autophagosome. Par la suite, le lysosome fusionne avec l'autophagosome pour donner l'autolysosome. La formation de ce dernier induit la mort des cellules. *D'après CYTO-ID Autophagy Detection, Enzo*

IX. AUTOPHAGIE

L'autophagie est un mécanisme de résistance au stress qui est induit par la formation d'un phagophore, qui va ensuite devenir un autophagosome, puis un autolysosome après la fusion avec le lysosome où aura lieu la dégradation des composants cellulaires. La détection de l'autophagie peut se faire par la mise en évidence des protéines clés de ce mécanisme telles que LC3 I (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) qui est converti en sa forme conjuguée LC3 II lors de la formation de l'autophagosome (**Figure 56**). L'autophagie est détectée grâce à la sonde fluorescente Cyto-ID couplée au FITC (Enzo). Cette sonde se fixe sur la protéine LC3-II présente à la surface des autophagosomes. L'autophagie peut être irréversible et favoriser la mort cellulaire en détruisant notamment les organites de la cellule.

Les cellules MDA-MB-231 ($0,32 \cdot 10^5$ cellules /mL) et Hs578T ($0,16 \cdot 10^5$ cellules /mL) sont ensemencées en plaques 24 puits sur des lamelles en verre. Le lendemain, elles sont traitées pour 72 h au 5-FU (50 et 186 μ M) ou à la rapamycine (2,5 μ M) (CYTO-ID Autophagy Detection Kit ENZ-51031 Enzo). La rapamycine sert ici de témoin positif pour l'induction de l'autophagie. Après traitement, les cellules sont rincées avec du tampon 1x (CytolD buffer 10X, 5 % SVF, H₂O distillée). Les cellules sont ensuite marquées pendant 30 min à l'obscurité à 37°C avec 110 μ L du mix de marquage contenant du tampon 1x dans lequel sont dilués : la sonde Cyto-ID (Enzo) (1/1000) et le Hoechst (Enzo) (1/500). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec 120 μ L de tampon 1x et les lamelles sont montées sur les lames avec le tampon 1x. La fluorescence est observée au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 80i) et les photographies sont prises au grossissement x100 pour le comptage et x400 pour les illustrations (Caméra : Nikon DS-Ri1, Logiciel : NIS- Elements BR 4.2).

X. PROCOLE POUR LA RECHERCHE DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1

1) Crosslink *in vivo*

Les cellules MDA231^{CLDN1+} sontensemencées à $12,5 \cdot 10^5$ cellules par flasque T25 dans 5 mL de milieu de culture puis incubée 48h à 37°C. Le DTME (dithiobismaleimidoethan) (22335, Thermo Scientific) est préparé fraîchement à 300 mM avant chaque expérience dans du DMSO (DiMéthylSulOxyde) puis dilué en cascade dans du D-PBS pour obtenir cinq concentrations différentes : 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM et 1 mM. Les six flasques sont rincées deux fois avec 500 µL de D-PBS puis incubées avec 400 µL de DTME pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Les solutions de DTME sont ensuite retirées puis les cellules sont incubées 10 minutes avec 800 µL de solution de quenching (20mM Tris-HCl pH7,4, 5 mM L-cystéine). Cette dernière permet d'épuiser le DTME restant en ajoutant de la cystéine en excès sur les cellules.

2) Lyse des cellules

Les flasques sont rincées avec 500 µL de D-PBS à 4°C puis les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 4°C avec 200 µL de tampon de lyse RIPA (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % acide déoxycholic, 0,1 % SDS). Les flasques sont ensuite légèrement grattées et le contenu de chaque flasque est collecté. Les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 20 minutes à 4°C et les surnageants contenant les extraits protéiques sont collectés dans de nouveaux tubes. Afin de maximiser l'extraction des protéines, 20 µL de chaque surnageant sont ajoutés pour re-suspendre les culots cellulaires puis les tubes sont à nouveau incubés 20 minutes à 4°C. Les tubes sont centrifugés à nouveau à 14 000 g pendant 20 minutes à 4°C et les surnageants sont collectés.

3) Préparation des échantillons protéiques

Les extraits protéiques sont dosés par la technique de Bradford décrite dans la partie ci-avant. Pour chaque condition, on dépose 50 µg de protéines dans de nouveaux tubes en double. Par la suite, la moitié des échantillons sont traités pendant 15 minutes à 4°C avec 50 mM DTT (D1532, Invitrogen) préparé extemporanément dans de l'eau distillée. L'autre

moitié des échantillons n'est pas traitée au DTT et ne subit donc aucune dénaturation. Le DTT a pour but de rompre les liaisons covalentes induite par le DTME. Enfin 4 μ L de tampon de Laemmli 5x (Tris/HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 10 % ; saccharose 50 % ; bleu de bromophenol 0,05 %) sont ajoutés dans chaque tube. La composition du tampon de Laemmli est identique à celle décrite en [précédemment](#) mais aucun DTT n'a été ajouté.

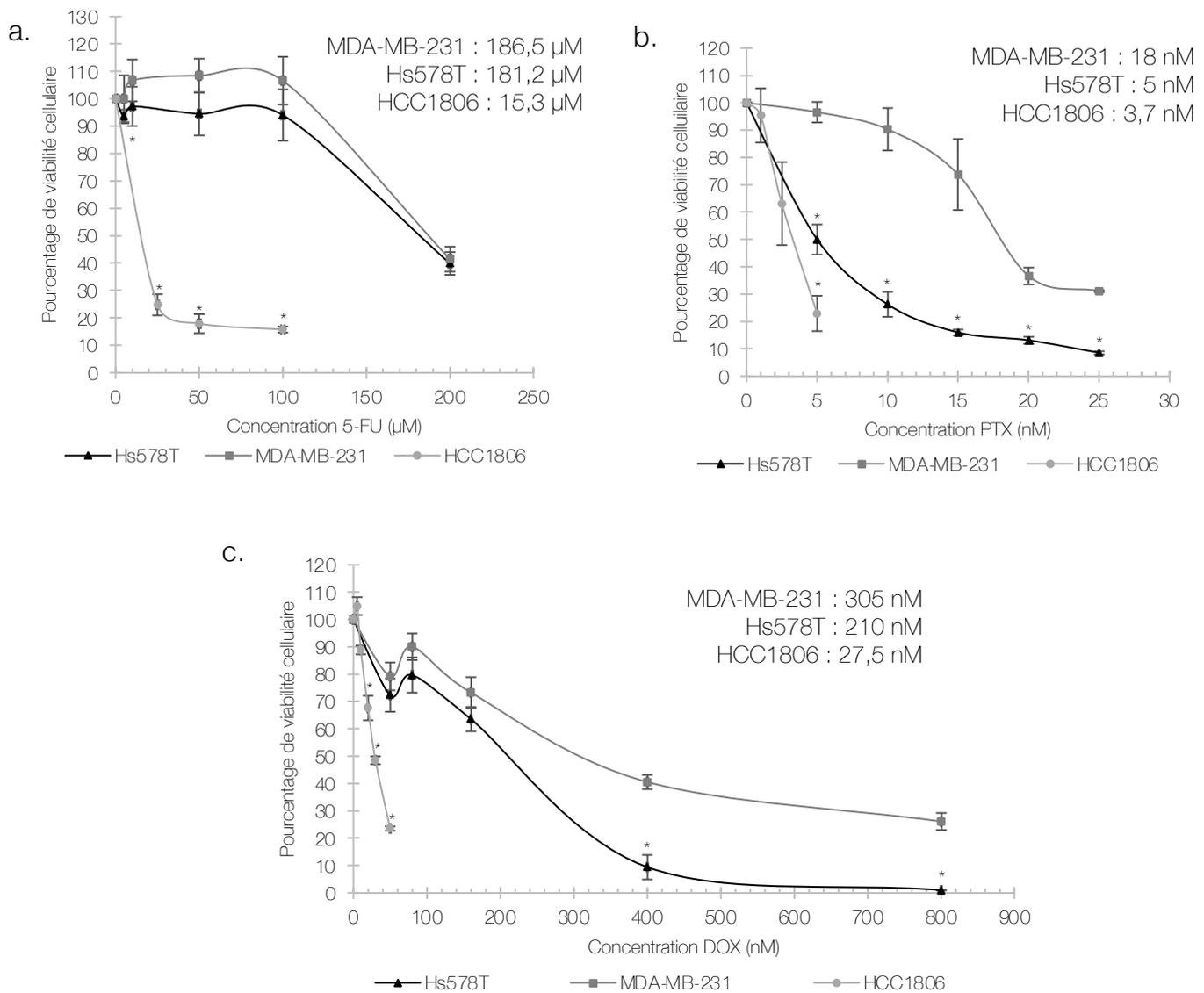
4) Western blot

Les conditions de western blot sont identiques à celles décrites précédemment [dans ce manuscrit](#) mais l'anticorps primaire dirigé contre la claudine 1 est déposé sur les membrane entière.

XI. STATISTIQUES

Les résultats présentés correspondent à la moyenne +/- l'erreur standard à la moyenne (SEM) de 3 à 8 expériences indépendantes. Les différents tests statistiques sont réalisés avec le logiciel Prism (GraphPad). Pour une même lignée cellulaire, la comparaison entre 2 conditions est réalisée par l'utilisation du test *t* de Student. Les comparaisons multiples sont réalisées par des ANOVA et tests Post'hoc de Tukey lorsque l'on compare les moyennes de chaque condition avec les moyennes de chaque autre condition ; et avec un test Post'hoc de Dunnett lorsque l'on compare la moyenne de la condition contrôle avec les moyennes de toutes les autres conditions. La valeur de *p* est calculée et les résultats sont considérés comme statistiquement significatif à partir d'une probabilité de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

RESULTATS



d.

Agents de chimiothérapie	MDA-MB-231	Hs578T	HCC1806
5-FU	186,5 \pm 7,96 μ M	181,2 \pm 8,3 μ M	15,3 \pm 0,8 μ M *
PTX	18 \pm 0,7 nM	5 nM \pm 0,8	3,7 \pm 0,35 nM *
DOX	305 \pm 18,7 nM	210 \pm 16 nM	27,5 \pm 1,65 nM *

Figure 57 : Comparaison de la réponse des cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 exposées aux agents de chimiothérapie : 5-FU, PTX et DOX

Les lignées **a.** MDA-MB-231, **b.** Hs578T et **c.** HCC1806 ont été traitées pendant 72h à des doses croissantes d'agents de chimiothérapie. Les lignées MDA-MB-231 et Hs578T ont été traitées au 5-FU (5, 10, 50, 100 et 200 μ M); au PTX (5, 10, 15, 20 et 25 nM) et à la DOX (50, 80, 160, 400 et 800 nM) de DOX. La lignée HCC1806 à été traitée au 5-FU (25, 50 et 100 μ M); au PTX (1, 2,5 et 5 nM) et à la DOX (5, 10, 20, et 30 nM). La viabilité cellulaire a été déterminée par la mesure du taux d'ATP. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin exposé au solvant. **d.** Tableau récapitulatif des EC₅₀ calculées à partir des courbes de viabilité cellulaire. Les valeurs obtenues pour chaque concentration correspondent à la moyenne +/- SEM de 4 à 6 expériences indépendantes. * signifie que la courbe de viabilité ou l'EC₅₀ de la lignée HCC1806 est significativement différente de celle des lignées « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey.

CHAPITRE 1 : L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1 PERMET-ELLE DE SENSIBILISER LES CELLULES TNBC À LA CHIMIOTHÉRAPIE ?

I. CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE APOPTOTIQUE DES CELLULES TNBC AUX AGENTS DE CHIMIOTHÉRAPIE

1) Comparaison de la viabilité des cellules TNBC exposées aux agents de chimiothérapie : 5-FU, PTX et DOX

Le 5-FU, le PTX et la DOX sont les molécules les plus fréquemment employées dans les combinaisons d'agents de chimiothérapie utilisées pour le traitement de TNBC. Ainsi, ces travaux de recherche ont débuté par la caractérisation de la réponse des cellules TNBC à ces différents agents. Nous avons choisi de travailler avec les deux lignées MDA-MB-231 et Hs578T « claudin-1-low » et la lignée HCC1806 « claudin-1 high ». Les cellules TNBC ont été traitées avec des doses croissantes de 5-FU, de PTX et de DOX pendant 72 h. Les lignées MDA-MB-231 et Hs578T ont été traitées avec 5, 10, 50, 100 et 200 μM de 5-FU ; 5, 10, 15, 20 et 25 nM de PTX et 50, 80, 160, 400 et 800 nM de DOX. La lignée HCC1806 a été traitée avec 25, 50 et 100 μM de 5-FU ; 1, 2,5 et 5 nM de PTX et 5, 10, 20, et 30 nM de DOX. La viabilité des cellules a ensuite été déterminée par un test de viabilité cellulaire par une mesure du taux d'ATP. Ces expériences ont permis d'établir les courbes de viabilité pour chaque lignée et chaque agent de chimiothérapie (**Figure 57**).

- **Pour le 5-FU**, dès la dose de 10 μM , la viabilité cellulaire des cellules HCC1806 « claudin-1-high » est significativement plus faible que celle des lignées « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T. En revanche, les courbes des deux lignées « claudin-1-low » ne présentent pas de différences significatives (**Figure 57a**).
- **Pour le PTX**, à partir de la dose de 5 nM, la viabilité cellulaire des cellules HCC1806 est significativement plus faible que celle des lignées MDA-MB-231 et Hs578T. De plus, j'ai montré que la viabilité cellulaire de la lignée Hs578T est aussi significativement plus faible que celle observée pour la lignée MDA-MB-231 à partir de cette dose (**Figure 57b**).

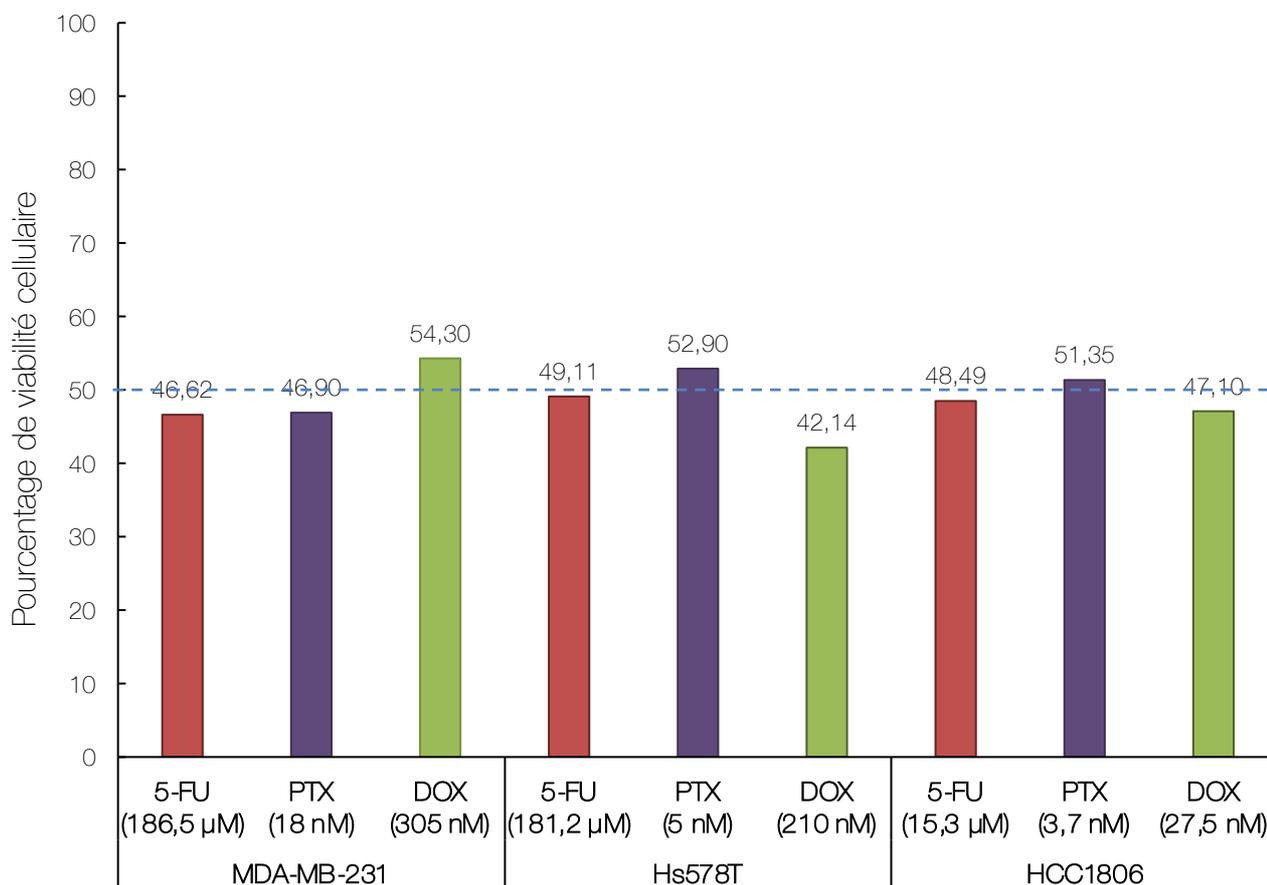


Figure 58 : Viabilité cellulaire des lignées MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 traitées à leur EC_{50} respectives pour le 5-FU, le PTX et la DOX

Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées à 186,5 μ M de 5-FU, à 18 nM de PTX et à 305 nM de DOX. Les cellules Hs578T ont été traitées à 181,2 μ M de 5-FU, 5 nM de PTX et 210 nM de DOX. Les cellules HCC1806 ont été traitées à 15,3 μ M de 5-FU, 3,7 nM de PTX et 27 nM de DOX. Après 72h de traitement, la viabilité cellulaire a été déterminée par coloration au crystal violet. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé par rapport aux cellules non traitées. Le graphique représente la moyenne d'au moins 2 expériences indépendantes.

- **Pour la DOX**, la viabilité cellulaire de la lignée « claudin-1-high » HCC1806 est significativement plus faible que celle des lignées « claudin-1-low » dès la dose de 20 nM. A partir de la dose de 400 nM, la viabilité cellulaire de la lignée Hs578T est significativement inférieure à celle de la lignée MDA-MB-231 (**Figure 57c**).

Les courbes de viabilité pour les trois agents de chimiothérapie montrent que la viabilité des cellules « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T est supérieure à celle des cellules « claudin-1-high » HCC1806.

A l'aide des courbes de viabilité cellulaire, les doses EC_{50} du 5-FU, du PTX et de la DOX ont été établies pour les trois lignées cellulaires (**Figure 57d**). L' EC_{50} correspond à la concentration pour laquelle la viabilité des cellules est à 50 %.

- **Pour le traitement au 5-FU**, les valeurs EC_{50} sont de 186,5 μ M, 181,2 μ M et 15,3 μ M pour les cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 respectivement.
- **Pour le traitement au PTX**, les valeurs EC_{50} sont de 18 nM, 5 nM et 3,7 nM pour les cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 respectivement.
- **Pour le traitement à la DOX**, les valeurs EC_{50} sont de 305 nM, 210 nM et 27,5 nM pour les lignées MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 respectivement.

Afin de confirmer les doses EC_{50} avec une autre technique, les cellules ont ensuite été traitées à ces doses pendant 72 h et la viabilité cellulaire a été déterminée par une coloration des cellules au crystal violet (**Figure 58**). Les données montrent que les pourcentages de viabilité cellulaire sont tous très proches de 50 %.

- **Pour la lignée MDA-MB-231**, un traitement à la dose EC_{50} montre que les viabilités cellulaires sont de 46,62 %, 46,9 % et 54,3 % pour le 5-FU, le PTX et la DOX respectivement.
- **Pour la lignée Hs578T**, un traitement à la dose EC_{50} montre que les viabilités cellulaires sont de 49,11 %, 52,9 %, et 42,14 % pour le 5-FU, le PTX et la DOX respectivement.
- **Pour la lignée HCC1806**, un traitement à la dose EC_{50} montre que les viabilités cellulaires sont de 48,49 %, 51,35 % et 47,1 % pour le 5-FU, le PTX et la DOX respectivement.

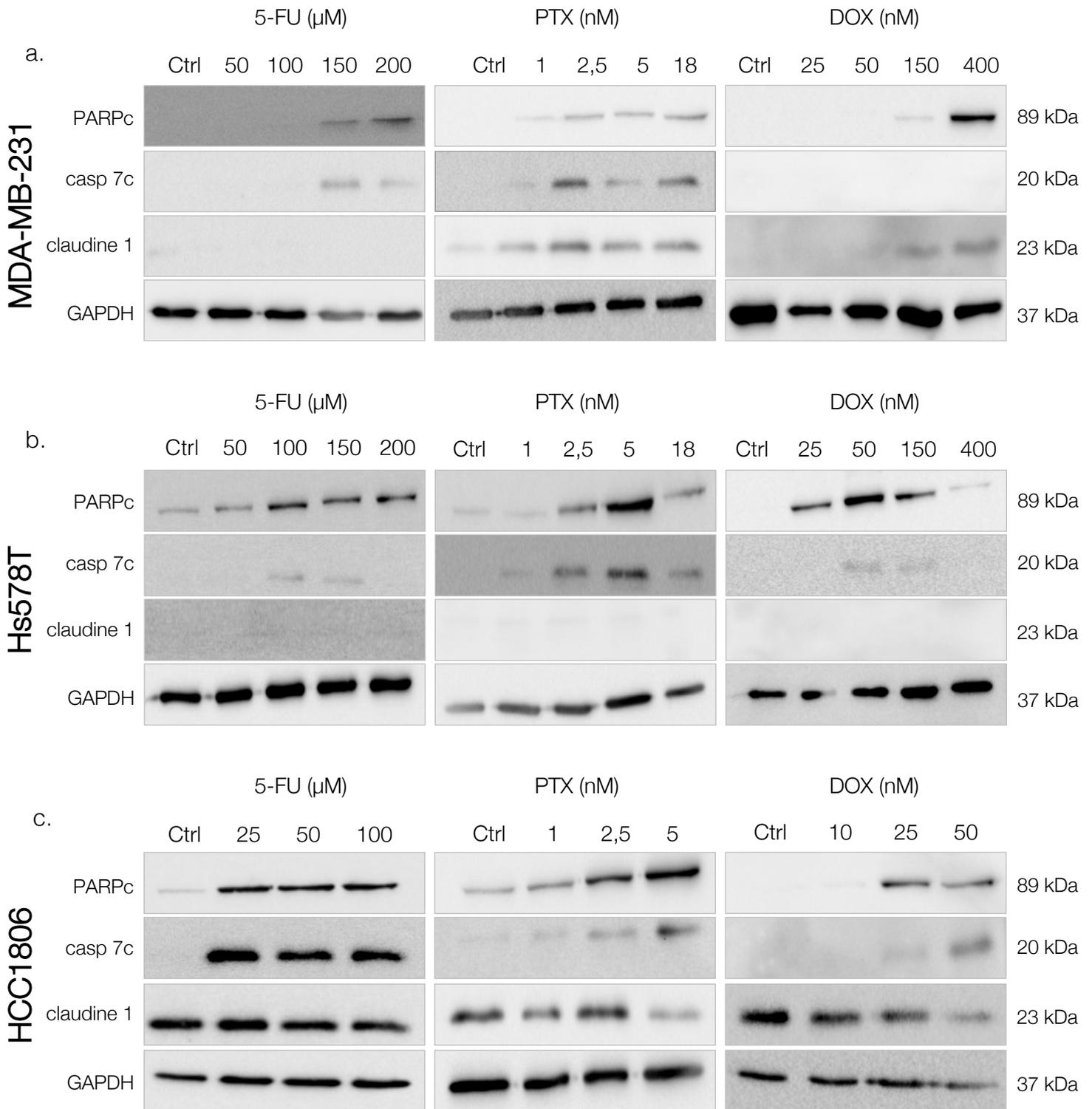


Figure 59 : Caractérisation de la réponse pro-apoptotique des lignées MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 en réponse à des doses croissantes de 5-FU, de PTX et de DOX en western blot

Les lignées MDA-MB-231 (a.), Hs578T (b.) et HCC1806 (c.) ont été traitées pendant 72h à différentes concentrations de 5-FU (0, 25, 50, 100, 150, 200 μM); de PTX (0, 1, 2,5, 5, 18 nM); et de DOX (0, 10, 25, 50, 150, 400 nM). L'analyse du niveau d'expression de la claudine 1 et de la réponse apoptotique pour PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (casp 7c) a été réalisée par western blot. La GAPDH est utilisée en référence interne. Les Western Blot sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

Mes résultats sur la viabilité cellulaire indiquent que les cellules HCC1806 « claudin-1 high » présentent des EC_{50} significativement plus faibles que celles des lignées « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T en réponse aux trois agents de chimiothérapie.

2) Caractérisation de la réponse apoptotique des cellules TNBC sous l'effet des agents de chimiothérapie

Comme nous l'avons vu dans [la partie introductive de ce manuscrit](#), les agents de chimiothérapie sont principalement décrits comme étant des inducteurs de l'apoptose. Dans ce contexte, ce processus a été étudié à l'aide de trois techniques complémentaires :

- L'étude du clivage des marqueurs apoptotiques PARP et caspase 7 par western blot
- La réponse apoptotique a été vérifiée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'annexine V.
- Le marquage TUNEL des cellules analysées par microscopie à fluorescence

a) Étude de l'apoptose par western blot

La réponse apoptotique des trois lignées a été étudiée par western blot après 72 h de traitement avec des doses croissantes de 5-FU, PTX et DOX (**Figure 59**). Les formes clivées des marqueurs apoptotiques PARP et caspase 7 ont été analysées ainsi que l'expression de la claudine 1.

- **Pour la lignée MDA-MB-231**, le 5-FU n'induit pas l'expression de la claudine 1 alors qu'elle est détectée dès la dose de 2,5 nM et 150 nM de PTX et de DOX respectivement. Les marqueurs apoptotiques PARP et caspase 7 clivés sont détectés à partir de 150 μ M de 5-FU et de 2,5 nM de PTX. La DOX induit seulement le clivage de PARP à la dose 150 nM (**Figure 59a**).
- **Pour la lignée Hs578T**, aucun des trois agents n'induit l'expression de la claudine 1. Les marqueurs apoptotiques PARP et caspase 7 clivés sont détectés à partir de 100 μ M de 5-FU, de 2,5 nM de PTX et de 50 nM de DOX (**Figure 59b**).
- **Pour la lignée HCC1806**, la claudine 1 est exprimée et son expression diminue à la concentration de 5 et 50 nM de PTX et DOX respectivement. Le clivage des

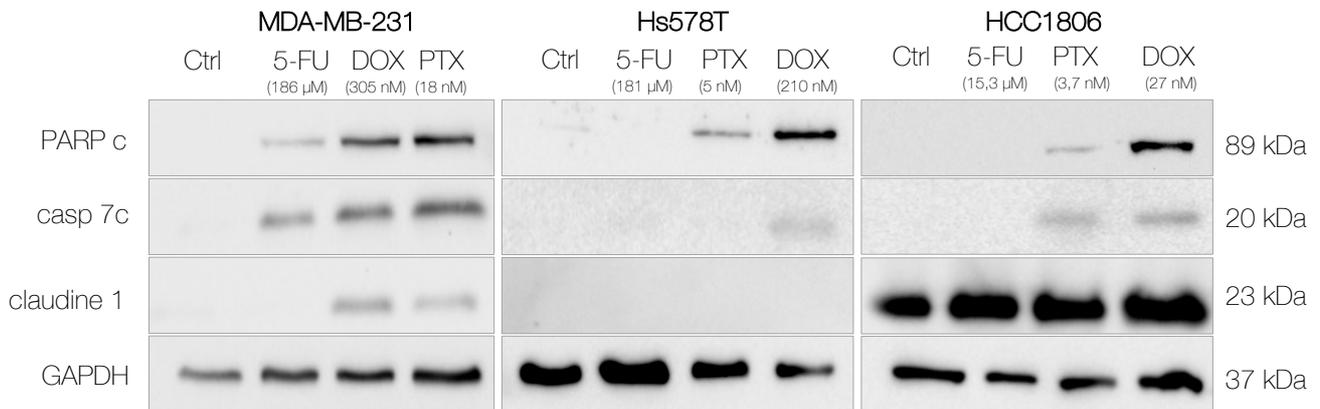


Figure 60 : Comparaison de la réponse des cellules MDA-MB-231, Hs578T et HCC1806 exposées aux doses EC_{50} des différents agents de chimiothérapie en western blot

Les lignées ont été traitées pendant 72h aux doses EC_{50} des différents agents de chimiothérapie : MDA-MB-231 (186,5 µM 5-FU; 18 nM PTX; 305 nM DOX); Hs578T (181,2 µM 5-FU; 5,5 nM de PTX; 210 nM DOX) et HCC1806 (15,3 µM 5-FU; 3,7 nM PTX; 27 nM de DOX). L'expression de la claudine 1 et des marqueurs apoptotiques PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (cas 7c), ont été analysés par Western Blot. Les western blot sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

marqueurs apoptotiques PARP et caspase 7 est induit dès la dose de 25 μ M de 5-FU, de 1 nM de PTX et de 25 nM de DOX (**Figure 59c**).

Ces données montrent que les formes clivées de PARP et de la caspase 7 sont toujours observées à des doses plus faibles de traitement pour les cellules HCC1806 comparé aux cellules MDA-MB-231 et Hs578T. De manière intéressante, le 5-FU n'induit aucune expression de la claudine 1 dans les cellules « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T. **Ainsi, les cellules HCC1806 « claudin-1-high » sont plus sensibles aux différents agents de chimiothérapie avec une induction des marqueurs apoptotiques pour des doses plus faibles comparé aux deux lignées « claudin-1-low ».**

Par la suite, la réponse apoptotique des cellules a été déterminée après un traitement de 72 h aux doses EC_{50} des trois agents de chimiothérapie. L'expression des marqueurs de l'apoptose PARP et caspase 7 clivés ainsi que celle de la claudine 1 a été analysée par Western blot (**Figure 60**).

- **Pour la lignée MDA-MB-231**, le 5-FU induit une faible expression des marqueurs PARP et caspase 7 clivés mais pas celle de la claudine 1. À leur EC_{50} , la DOX et le PTX induisent le clivage des marqueurs de l'apoptose, ainsi que l'expression de la claudine 1.
- **Pour la lignée Hs578T**, aucun des trois agents de chimiothérapie n'induit l'expression de la claudine 1. De plus, le 5-FU n'induit pas l'expression des marqueurs apoptotiques. Le PTX induit uniquement le clivage de PARP et la DOX induit le clivage de PARP ainsi qu'un faible clivage de la caspase 7.
- **Pour la lignée HCC1806**, le traitement par le 5-FU n'induit aucune augmentation du clivage des deux marqueurs de l'apoptose contrairement à la DOX et au PTX. La claudine 1 est exprimée aux doses EC_{50} pour les trois agents de chimiothérapie.

Les résultats montrent que le 5-FU n'induit pas ou peu l'apoptose des cellules « claudin-1-low » à l' EC_{50} . Le PTX et la DOX induisent l'apoptose des différentes lignées cellulaires à l' EC_{50} .

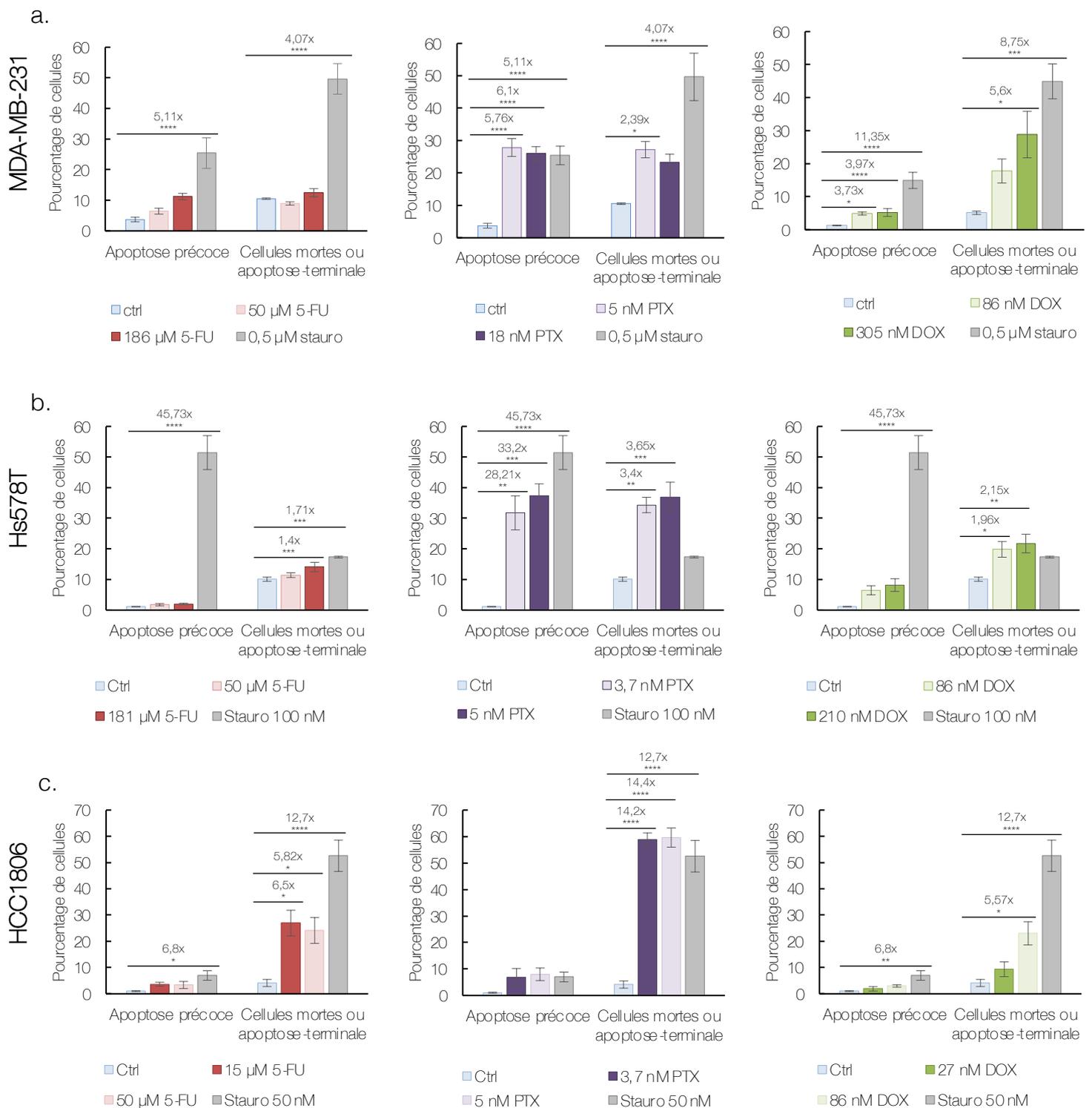


Figure 61 : Caractérisation de la réponse apoptotique des cellules TNBC en réponse au 5-FU, au PTX et à la DOX par nue analyse en cytométrie en flux

Les cellules **a.** MDA-MB-231, **b.** Hs578T et **c.** HCC1806 ont été traitées pendant 72h à la dose EC_{50} et à une dose de comparaison : 50 μ M de 5-FU, 5nM de PTX et 86 nM de DOX. Le traitement à la staurosporine (stauro) (500, 100 et 50 nM) correspond au témoin positif d'induction de l'apoptose. Les cellules sont co-marquées avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et sont analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale ou mortes sont co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

b) Étude de l'apoptose par marquage des cellules à l'annexine V – IP et cytométrie en flux

Pour confirmer ces résultats, l'apoptose a également été étudiée par un marquage des cellules à l'annexine V et à l'IP suivi d'une analyse par cytométrie en flux. Les cellules ont été traitées avec deux doses d'agents de chimiothérapie : la dose EC_{50} de chaque agent de chimiothérapie et une dose commune à toutes les lignées permettant de les comparer entre elles. Les doses de comparaisons sont les doses utilisées dans les résultats préliminaires de ma thèse (**Figure 48**). Elles sont de 50 μ M pour le 5-FU, 5 nM pour le PTX et 86 nM pour la DOX. Ces doses sont inférieures aux EC_{50} des lignées « claudin-1-low » et légèrement supérieures à celles de la lignée « claudin-1-high ». Les cellules ont été traitées pendant 72 h aux deux doses avec les différents agents de chimiothérapie puis elles ont été co-marquées avec de l'annexine V (couplée au FITC) et de l'iodure de propidium. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V, et celles en apoptose-terminale sont co-marquées à l'annexine V et à l'IP. La staurosporine est utilisée comme témoin positif de l'induction de l'apoptose : à 0,5 μ M pour la lignée MDA-MB-231, 100 nM pour la lignée Hs578T et 50 nM pour la lignée HCC1806 (**Figure 61**).

Pour chaque lignée cellulaire, nous avons tout d'abord étudié l'effet de chaque agent de chimiothérapie sur l'induction de l'apoptose.

Dans la lignée MDA-MB-231 (**Figure 61a**) :

- **Le 5-FU** n'induit pas l'apoptose puisqu'aucune augmentation significative du pourcentage de cellules apoptotiques n'est observé.
- **Le PTX** augmente significativement de 5,76 et 6,1 fois le pourcentage de cellules pro-apoptotiques à 5 et 18 nM respectivement. Il induit également une augmentation de 2,39 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale à la dose de 5 nM.
- **La DOX** induit une augmentation significative du pourcentage de cellules en apoptose précoce dès 86 nM (3,73 fois). A la dose de 305 nM, la DOX induit une

augmentation significative de 3,97x et 5,6x des pourcentages de cellules pro-apoptotiques et en apoptose terminale respectivement.

Dans la lignée Hs578T (Figure 61b) :

- **Le 5-FU** induit faiblement l'apoptose terminale de 1,4 fois à la plus forte dose de 181 μ M.
- **Le PTX** induit une forte augmentation du pourcentage de cellules en apoptose précoce de 28,21 x et 33,2 x pour les doses de 3,7 nM et 5 nM respectivement. Ceci s'accompagne d'une augmentation significative de l'apoptose terminale de 3,4 x et 3,65 x à 3,7 nM et 5 nM respectivement. Ces résultats confirment que le PTX induit l'apoptose des cellules Hs578T dès la dose de 3,7 nM.
- **La DOX** induit une augmentation significative de 1,96 et 2,15 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale à 86 et 210 nM respectivement. Aucune augmentation significative de l'apoptose précoce n'est détectée. Par conséquent, la DOX induit seulement l'apoptose terminale dès la dose de 86 nM.

Dans la lignée HCC1806 (Figure 61c) :

- **Le 5-FU** induit une augmentation significative de 6,5 et 5,82 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale à 15 et 50 μ M respectivement. Nous observons, également un clivage fort des marqueurs apoptotiques à partir de 25 μ M de 5-FU en western blot (**Figure 58c**).
- **Le PTX** induit l'apoptose avec une augmentation significative de 14,2 et 14,4 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale à 3,7 et 5 nM.
- **La DOX** induit l'apoptose à partir de 50 nM avec une augmentation significative de 5,57 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale à 86 nM.

Les résultats des analyses en cytométrie en flux sont similaires à ceux obtenus en western blot et confirment que l'apoptose est bien induite dans la lignée HCC1806 « claudin-1-high » à des doses plus faibles d'agents de chimiothérapie comparé aux lignées « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T.

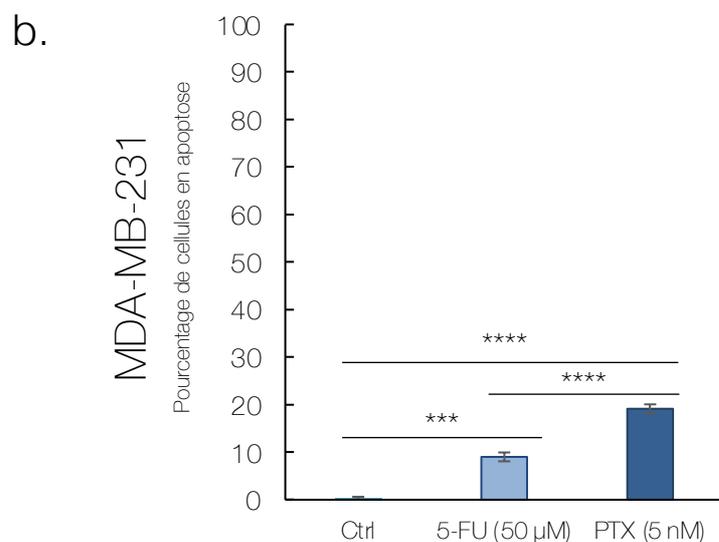
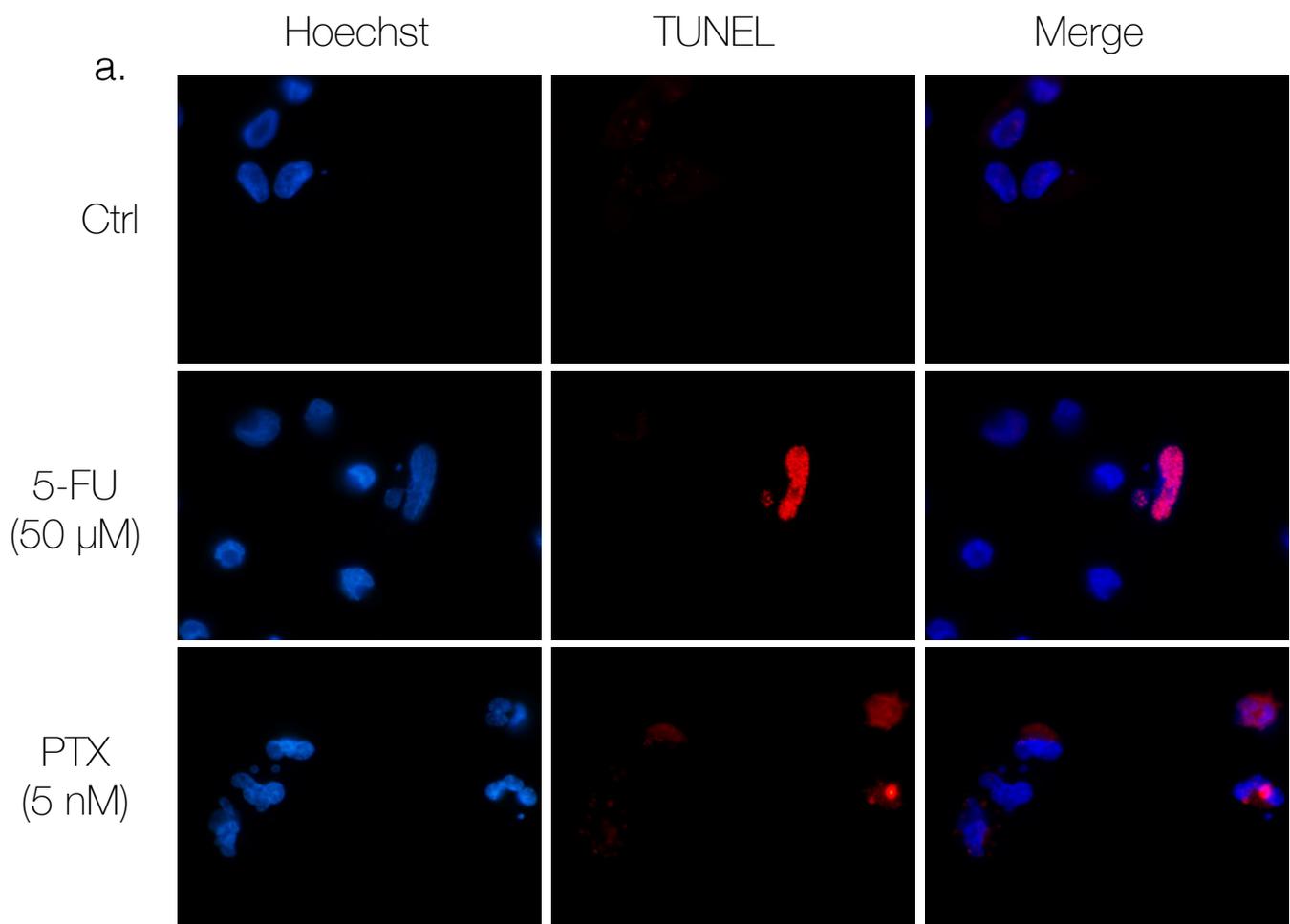


Figure 62 : Etude de la réponse pro-apoptotique des cellules MDA-MB-231 traitées au 5-FU et au PTX par la technique TUNEL

Les cellules de la lignée MDA-MB-231 ont été traitées pendant 72h au 5-FU (50 μM) et au PTX (5 nM). Les cellules contrôles (Ctrl) ont été exposées au solvant. L'apoptose a été analysée par un marquage TUNEL. Les noyaux sont marqués au Hoechst. **a.** Les photographies sont prises au grossissement x1000. **b.** Les cellules marquées au Hoechst et positives au marquage TUNEL ont été comptées pour déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques parmi la population cellulaire totale. 250 à 1000 cellules ont été comptées sur 4 champs différents pour chaque expérience au grossissement x400. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes ± l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

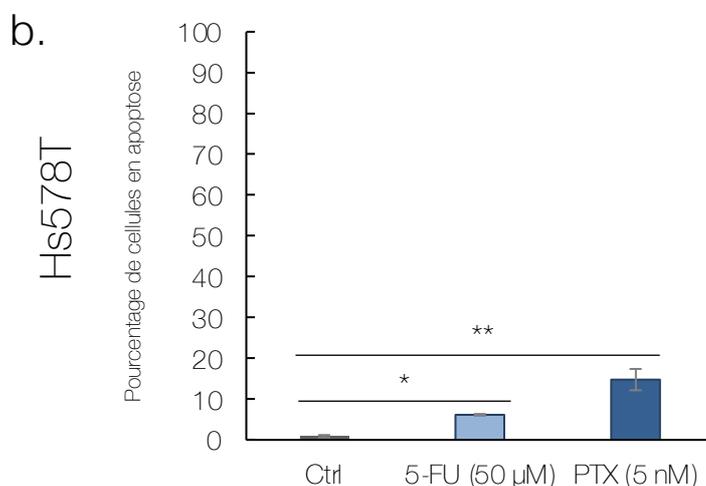
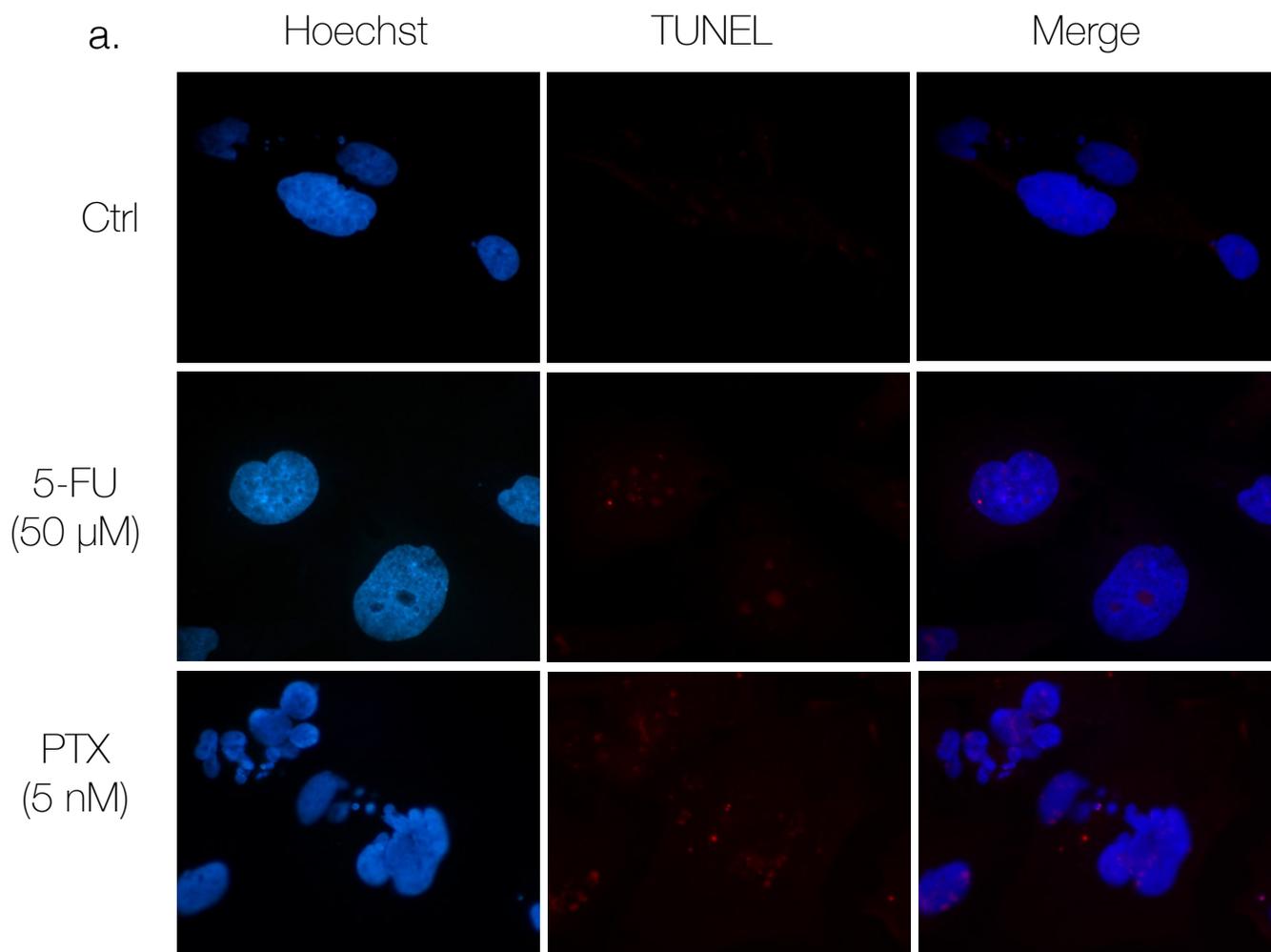


Figure 63 : Etude de la réponse pro-apoptotique des cellules Hs578T traitées au 5-FU et au PTX par la technique TUNEL

Les cellules de la lignée Hs578T ont été traitées pendant 72h au 5-FU (50 μM), et au PTX (5 nM). Les cellules contrôles (Ctrl) ont été exposées au solvant. L'apoptose a été analysée par un marquage TUNEL. Les noyaux sont marquée au Hoechst. **a.** Les photographies sont prises au grossissement x1000. **b.** Les cellules marqués au Hoechst et positives au marquage TUNEL ont été comptées pour déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques parmi la population cellulaire totale. 250 à 1000 cellules ont été comptées sur 4 champs différents pour chaque expérience au grossissement x400. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes ± l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$.

Nous avons ensuite comparé l'induction de l'apoptose terminale entre les différentes lignées à la dose de comparaison.

- **Le 5-FU à 50 μ M** induit une augmentation de 5,82 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale dans la lignée HCC1806 « claudin-1-high » alors qu'il n'induit aucune apoptose terminale dans les lignées « claudin-1-low ».
- **Le PTX à 5 nM** induit une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose terminale de 2,39 et 3,65 fois dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T respectivement et de 14,2 fois dans la lignée HCC1806.
- **La DOX à 86 nM** n'induit aucune augmentation du nombre de cellules en apoptose terminale dans la lignée MDA-MB-231, alors qu'une augmentation de 1,96 fois et de 5,57 fois sont observés dans la lignée Hs578T et HCC1806 respectivement.

Ainsi en réponse au FU, au PTX et à la DOX, l'apoptose est plus fortement induite dans les cellules HCC1806 que dans les lignées « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T.

c) Étude de l'apoptose par la technique de TUNEL

En parallèle de ces travaux, des expériences de TUNEL ont été réalisées pour confirmer l'induction de l'apoptose dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T traitées au 5-FU et au PTX. Ces lignées ont été traitées pendant 72 h à la dose de comparaison : 50 μ M de 5-FU et 5 nM de PTX. Les cellules ont ensuite été marquées par le kit TUNEL. Les cellules marquées au Hoechst et positives au marquage TUNEL ont été comptées pour déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques parmi la population cellulaire totale. Pour la lignée MDA-MB-231, nous observons 9 et 19 % de cellules apoptotiques en réponse au 5-FU et au PTX respectivement (**Figure 62**). Dans les cellules Hs578T, nous détectons 6 % et 15 % de cellules positives au marquage TUNEL après un traitement au 5-FU et au PTX respectivement (**Figure 63**). **Ainsi, le PTX induit significativement plus l'apoptose dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T que le 5-FU.**

Tableau 26 : Bilan de la caractérisation de la réponse des cellules TNBC en réponse aux différents agents de chimiothérapie

Les résultats des figures 57, 59 et 61 sont synthétisés dans le tableau ci-dessous.

		5-FU	PTX	DOX
EC ₅₀ déterminées par mesure du taux d'ATP (Figure 57)	MDA-MB-231	186 µM	18 nM	305 nM
	Hs578T	181 µM	5 nM	210 nM
	HCC1806	15,3 µM	3,7 nM	27,5 nM
Dose à partir de laquelle l'apoptose est induite (Western blot) (Figure 59)	MDA-MB-231	150 µM	2,5 nM	150 nM
	Hs578T	100 µM	2,5 nM	50 nM
	HCC1806	25 µM	1 nM	25 nM
Induction de l'apoptose terminale à la dose de comparaison (cytométrie en flux) (Figure 61)	MDA-MB-231	/	2,39 x	/
	Hs578T	/	3,65 x	1,96 x
	HCC1806	5,82 x	14,2 x	5,57 x

Pour conclure, ces travaux de caractérisation des cellules TNBC exposées au 5-FU, au PTX et à la DOX m'ont permis de montrer que les cellules HCC1806 « claudin-1-high » sont plus sensibles que les lignées MDA-MB-231 et Hs578T « claudin-1-low ». J'ai également pu montrer que l'apoptose est induite à des doses plus faibles d'agents de chimiothérapie et qu'elle est plus fortement induite à la dose de comparaison dans la lignée HCC1806 comparée aux deux lignées « claudin-1-low » pour ces trois agents (Tableau 26).

II. IMPLICATION DE LA CLAUDINE 1 DANS L'INDUCTION DE L'APOPTOSE EN REponse AUX DIFFERENTS AGENTS DE CHIMIOThERAPIE DANS LES LIGNEES TNBC

Dans le but de savoir si la claudine 1 est impliquée dans la sensibilité des cellules « claudin-1-high » HCC1806, son expression a été inhibée par ARN interférence. Les cellules ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre l'ARNm de la claudine 1 (1806^{siCLDN1}) ou avec un scRNA aléatoire (1806^{scRNA}). Puis, elles ont été traitées au 5-FU (50 µM) (**Figure 64**), au PTX (5 nM) (**Figure 65**) et à la DOX (86 nM) (**Figure 66**) pendant 72 h puisque ces doses induisent l'apoptose (**Figure 61**).

Le rôle de la claudine 1 a été analysé par trois méthodes :

- Le clivage des marqueurs apoptotiques PARP et caspase 7 ainsi que l'expression de la claudine 1 ont été analysés en western blot.
- La viabilité des cellules a été analysée par une mesure du taux d'ATP.
- La réponse apoptotique a été vérifiée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'annexine V.

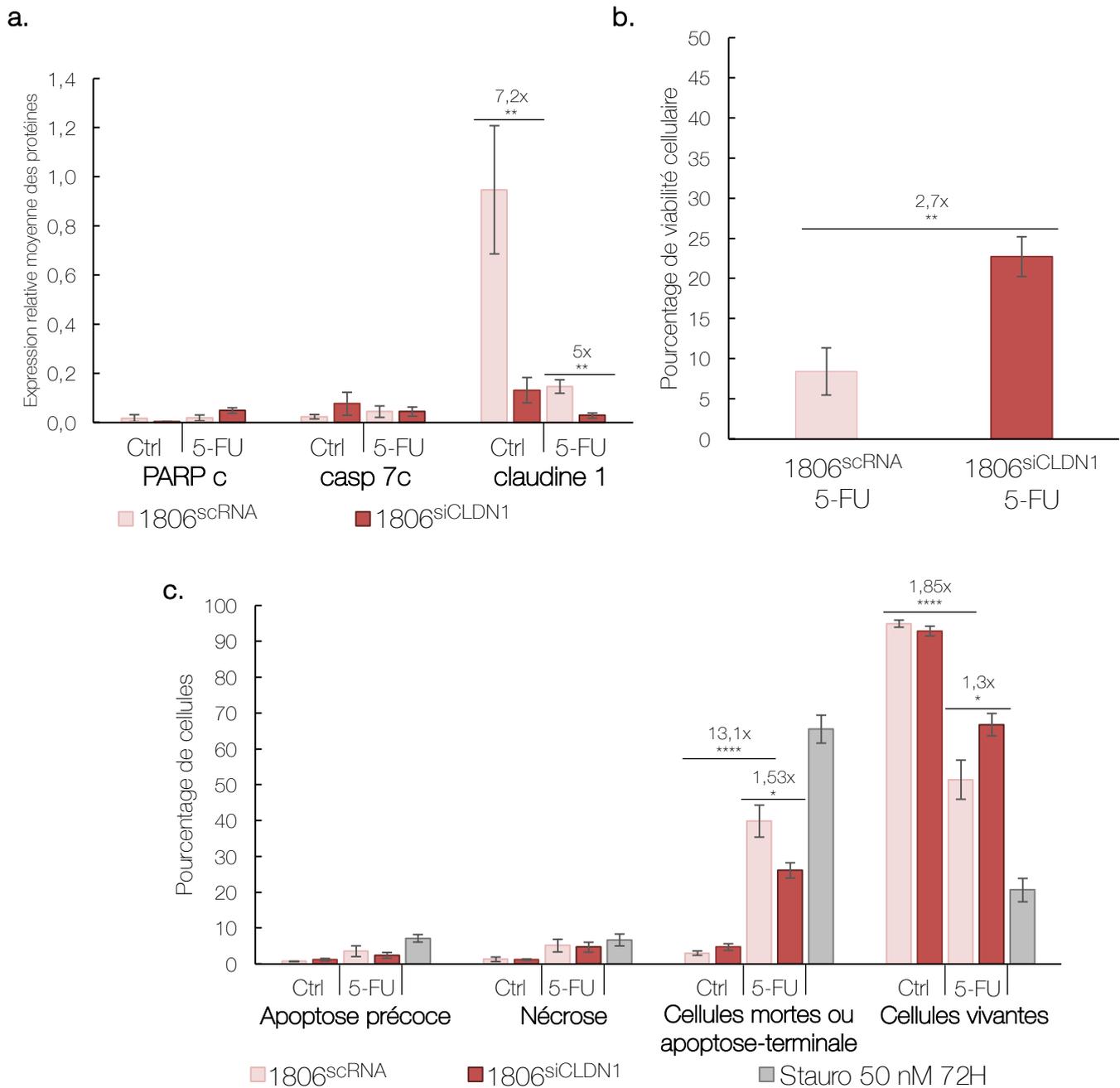


Figure 64 : Etude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-high » HCC1806 au 5-FU

La lignée HCC1806 a été transfectée avec un siRNA dirigé contre la claudine 1 (1806^{siCLDN1}) ou par un siRNA aléatoire (1806^{scRNA}). 7h après leur transfection, les cellules ont été traitées pendant 72h avec 50 μ M de 5-FU ou le solvant. **a.** L'apoptose a été analysée en Western-blot par l'étude des marqueurs PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (casp 7c). Le taux de claudine 1 a aussi été vérifié. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** La viabilité cellulaire a été déterminée par la mesure du taux d'ATP. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin exposé au solvant. **c.** Les cellules HCC1806 ont été co-marquées et analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale sont les cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne +/- SEM de 4 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey (**a.** et **c.**) ou un test de Student (**b.**) * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

1) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité de la lignée HCC1806 « claudin-1-high »

a) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au 5-FU

Par western blot, j'ai montré que l'expression de la claudine 1 est diminuée de 7,2 et 5 fois respectivement entre les cellules 1806^{scRNA} et 1806^{siCLDN1} contrôles et traitées au 5-FU. Quel que soit la condition, le 5-FU n'induit aucune augmentation significative en termes de clivage des marqueurs PARP et caspase 7 (**Figure 64a**). L'inhibition de l'expression de la claudine 1 dans les cellules 1806^{siCLDN1} traitées au 5-FU conduit à une augmentation significative de 2,7 fois du pourcentage de cellules viables (**Figure 64b**). Par cytométrie en flux, le 5-FU induit bien une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose terminale de 13,1 fois dans les cellules 1806^{scRNA}. Dans ces mêmes conditions, on note également une diminution du pourcentage de cellules vivantes de 1,85 fois. Lors d'un traitement au 5-FU, on constate une diminution de 1,53 fois du pourcentage de cellules 1806^{siCLDN1} en apoptose terminale et une augmentation de 1,3 fois du pourcentage de cellules 1806^{siCLDN1} vivantes (**Figure 64c**).

Ainsi, l'inhibition de l'expression de la claudine 1 par ARN interférence diminue l'apoptose et augmente la viabilité des cellules HCC1806 montrant que son expression est impliquée dans l'apoptose des cellules HCC1806 traitées au 5-FU.

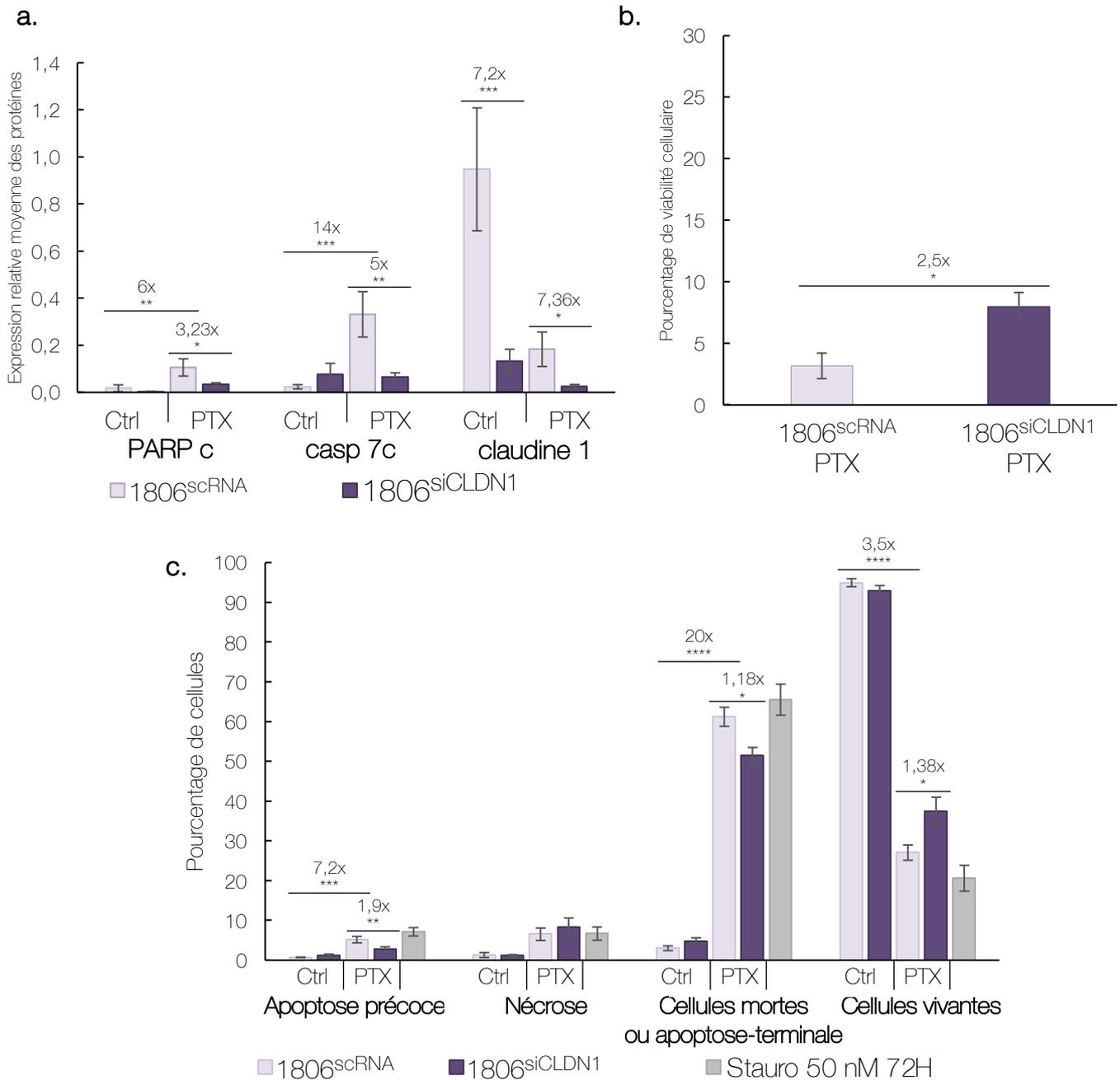


Figure 65 : Etude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-high » HCC1806 au PTX

La lignée HCC1806 a été transfectée avec un siRNA dirigé contre la claudine 1 (1806^{siCLDN1}) ou par un siRNA aléatoire (1806^{scrRNA}). 7h après leur transfection, les cellules ont été traitées pendant 72h avec 5 nM de PTX ou le solvant. **a.** L'apoptose a été analysée en Western-blot par l'étude des marqueurs PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (casp 7c). Le taux de claudine 1 a aussi été vérifié. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** La viabilité cellulaire a été déterminée par la mesure du taux d'ATP. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin exposé au solvant. **c.** Les cellules HCC1806 ont été co-marquées et analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale sont les cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne +/- SEM de 4 à 7 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey (**a.** et **c.**) ou un test de Student (**b.**) * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

b) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au PTX

Par western blot, j'ai montré que l'ARN interférence diminue significativement l'expression de la claudine 1 entre les cellules 1806^{scRNA} et 1806^{siCLDN1} de 7,2 et 7,36 fois dans les conditions contrôles et traitées au PTX respectivement. Dans les cellules 1806^{scRNA}, le PTX induit une augmentation significative de 6 et 14 fois du clivage des marqueurs PARP et caspase 7 par rapport aux cellules non traitées. Entre les cellules 1806^{scRNA} et 1806^{siCLDN1} traitées au PTX, on observe une diminution significative du clivage de PARP et la caspase 7 de 3,23 fois et 5 fois respectivement (**Figure 65a**). Par mesure de la viabilité des cellules, nous observons également une augmentation significative de 2,5 fois du pourcentage de cellules vivantes entre les cellules 1806^{scRNA} et 1806^{siCLDN1} traitées au PTX (**Figure 65b**). Enfin par cytométrie en flux, on observe que le PTX augmente de 7,2 et 20 fois le pourcentage de cellules en apoptose précoce et terminale dans les cellules 1806^{scRNA}. L'inhibition de l'expression de la claudine 1 dans les cellules 1806^{siCLDN1} traitées au PTX permet de diminuer significativement de 1,9 et 1,18 fois le pourcentage de cellules en apoptose précoce et tardive respectivement. Dans ces conditions, nous observons également une augmentation significative du pourcentage de cellules vivantes de 1,38 fois (**Figure 65c**).

In fine, lorsqu'elles expriment la claudine 1, les cellules HCC1806 sont plus apoptotiques sous l'effet du PTX démontrant ainsi que la claudine 1 est impliquée dans l'apoptose des cellules HCC1806 traitées au PTX.

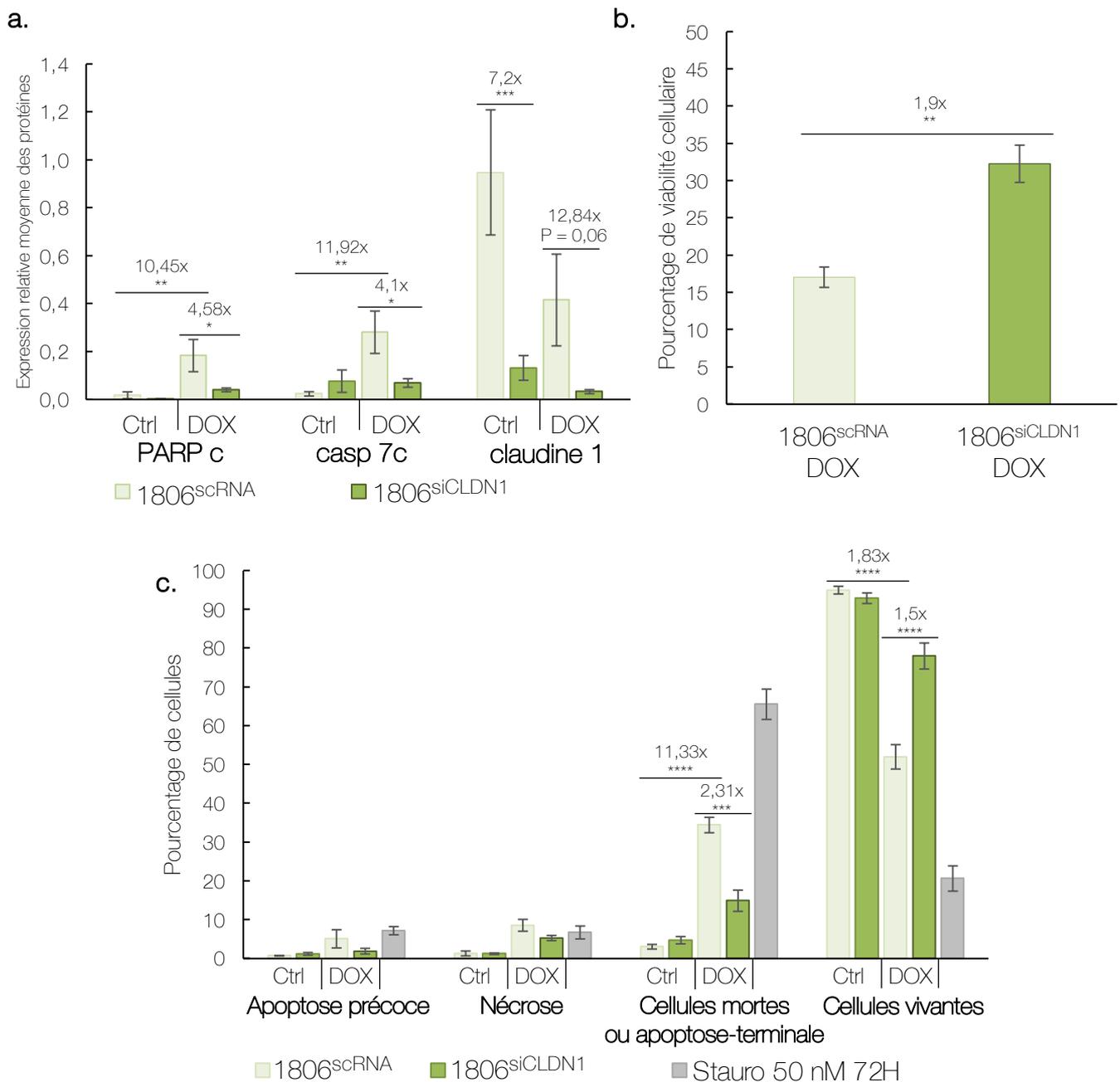


Figure 66 : Etude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-high » HCC1806 à la DOX

La lignée HCC1806 a été transfectée avec un siRNA dirigé contre la claudine 1 (1806^{siCLDN1}) ou par un siRNA aléatoire (1806^{scRNA}). 7h après leur transfection, les cellules ont été traitées pendant 72h avec 86 nM de DOX ou le solvant. **a.** L'apoptose a été analysée en Western-blot par l'étude des marqueurs PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (casp 7c). Le taux de claudine 1 a aussi été vérifié. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** La viabilité cellulaire a été déterminée par la mesure du taux d'ATP. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin exposé au solvant. **c.** Les cellules HCC1806 ont été co-marquées et analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale sont les cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne +/- SEM de 4 à 7 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey (**a.** et **c.**) ou un test de Student (**b.**) * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

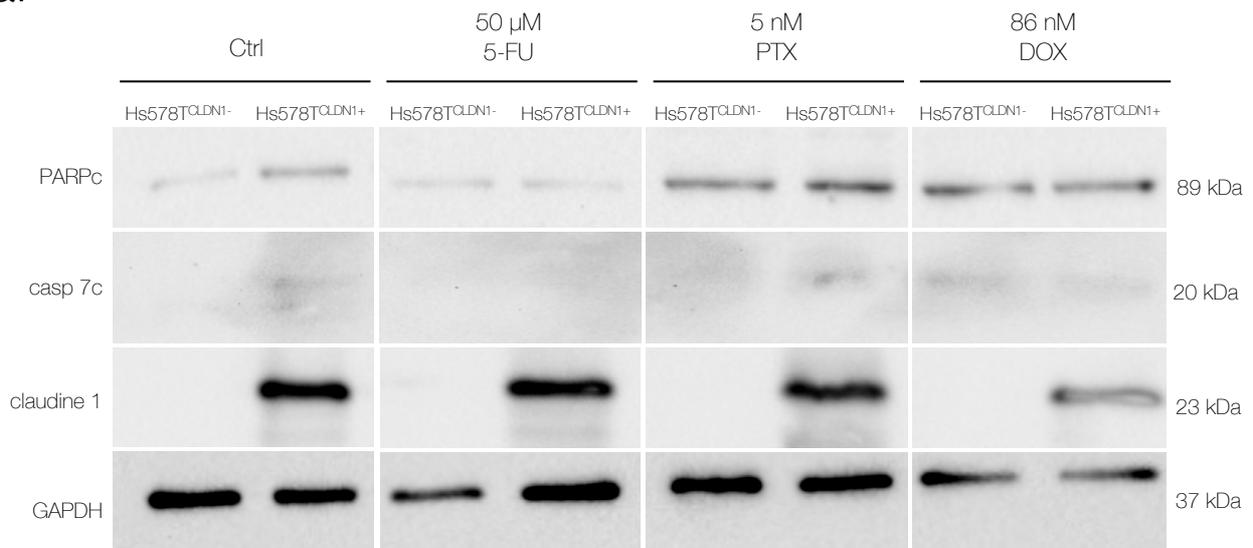
c) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité à la DOX

L'analyse des expériences de western blot montre que les cellules 1806^{siCLDN1} présentent une diminution de l'expression de la claudine 1 de 7,2 fois dans les conditions contrôles et une diminution ($p = 0,06$) lors d'un traitement à la DOX comparé aux cellules 1806^{scrRNA}. La DOX induit une augmentation significative de 10,45 fois et 11,92 fois des marqueurs PARP et caspase 7 clivés dans les cellules 1806^{scrRNA} que l'ARN interférence permet de diminuer de 4,58 fois et 4,1 fois respectivement dans les cellules 1806^{siCLDN1} (**Figure 66a**). On observe une augmentation de la viabilité cellulaire de 1,9 fois entre les cellules 1806^{scrRNA} et 1806^{siCLDN1} traitées à la DOX (**Figure 66b**). En accord avec les données précédentes, la DOX entraîne une augmentation de 11,33 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale et une diminution du pourcentage de cellules vivantes de 1,83 fois. Entre les cellules 1806^{scrRNA} et 1806^{siCLDN1} traitées à la DOX, on observe une diminution du pourcentage de cellules en apoptose terminale de 2,31 fois et une augmentation significative de 1,5 fois du pourcentage de cellules vivantes (**Figure 66c**).

Ainsi, l'inhibition de l'expression de la claudine 1 diminue l'apoptose et augmente la viabilité des cellules HCC1806 montrant que son expression est également impliquée dans l'apoptose des cellules HCC1806 traitées à la DOX.

L'ensemble de ces résultats montrent clairement que la claudine 1 est impliquée dans la sensibilité à l'apoptose induite par le 5-FU, le PTX et la DOX dans la lignée HCC1806 « claudin-1-high ».

a.



b.

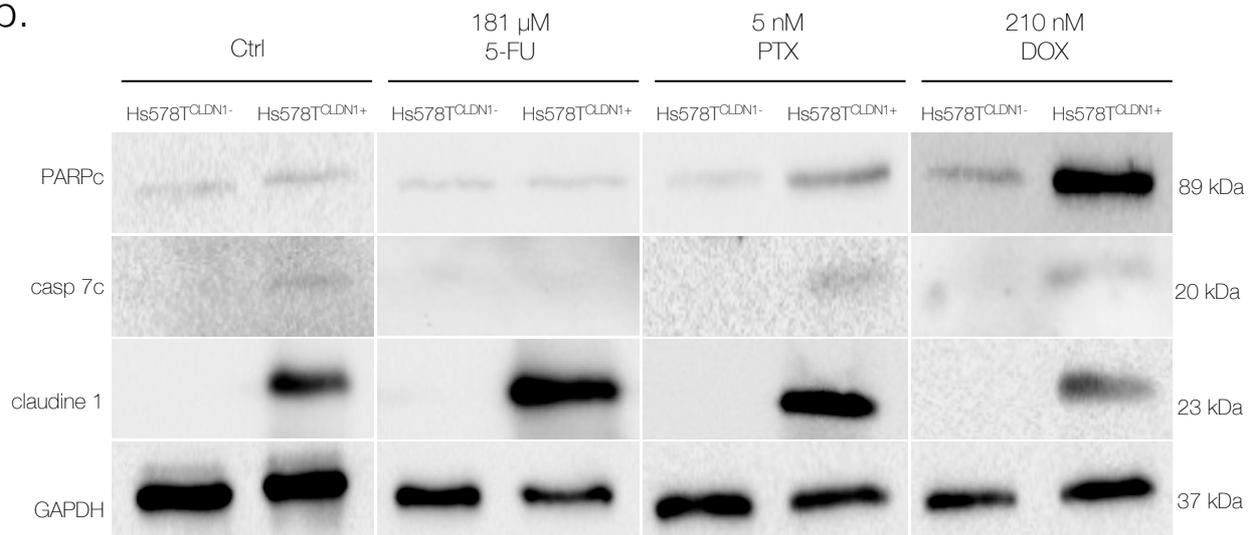


Figure 67 : Etude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 au 5-FU, au PTX et à la DOX

Les cellules Hs578T^{CLDN1-} et Hs578T^{CLDN1+} ont été traitées pendant 72h **a.** aux doses de comparaisons : 5-FU à 50 μ M, PTX à 5 nM et DOX à 86 nM ou au solvant (Ctrl) ou **b.** aux doses EC₅₀ : 5-FU à 181 μ M, PTX à 5 nM et DOX à 210 nM ou au solvant (Ctrl). L'expression de la claudine 1 et des marqueurs de l'apoptose, PARP clivé et caspase 7 clivée, ont été analysés par Western Blot. Figures représentatives de 3 à 7 expériences indépendantes.

2) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité des lignées « claudin-1-low »

Dans le but de démontrer l'implication de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-low » aux agents de chimiothérapie, deux approches expérimentales ont été utilisées :

- 1) L'utilisation de lignées stables surexprimant la claudine 1 quand la claudine 1 n'est pas exprimée.
- 2) L'inhibition de l'expression de la claudine 1 par ARN interférence lorsqu'elle est exprimée.

Ainsi, j'ai utilisé les lignées **MDA-MB-231** qui surexpriment stablement la claudine 1 (MDA231^{CLDN1+}) que j'ai traité au 5-FU puisqu'il n'induit pas l'expression de la claudine 1 dans cette lignée. Pour les traitements au PTX et à la DOX, induisant l'expression de la claudine 1, cette dernière a été inhibée par ARN interférence (MDA231^{siCDLN1}).

Aucun des agents de chimiothérapie étudiés n'induit l'expression de la claudine 1 dans la lignée **Hs578T**, c'est pourquoi, j'ai utilisé la lignée stable surexprimant la claudine 1 (Hs578T^{CLDN1+}) puis j'ai étudié sa sensibilité au 5-FU, au PTX et à la DOX. Ces lignées stables ont été établies en 2021 en collaboration avec les docteurs Catherine Tomasetto et Fabien Alpy du laboratoire IGBMC à Illkirch. Les cellules ont premièrement été traitées aux doses de comparaisons (50 μ M de 5-FU, 5 nM de PTX et 86 nM de DOX). Néanmoins, nous n'avons observé aucune différence dans clivage des marqueurs apoptotiques entre les cellules Hs578T^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1-} en réponse à ces doses de 5-FU et de DOX (**Figure 67a**). Nous avons donc décidé de poursuivre les expériences en utilisant les EC₅₀ de ces agents, puisqu'on observe pour la DOX une augmentation du clivage des marqueurs apoptotiques (**Figure 67b**).

La sensibilité des cellules a été mesurée après 72 h de traitement par deux ou trois techniques :

- L'analyse du clivage des marqueurs apoptotiques en western blot (PARPc et caspase 7c)

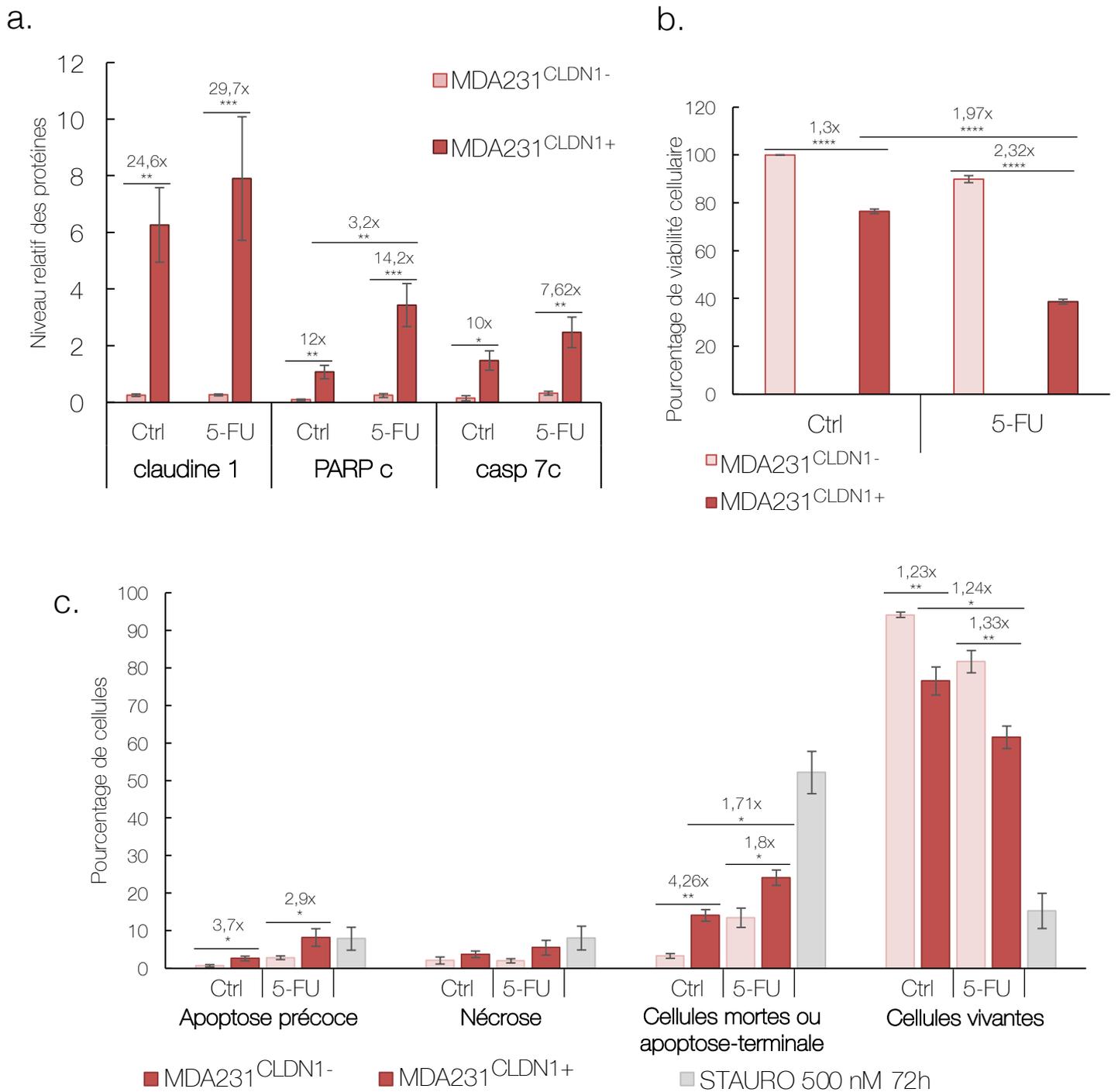


Figure 68 : Etude de la sensibilité des cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement la claudine 1 au 5-FU (50 μ M)

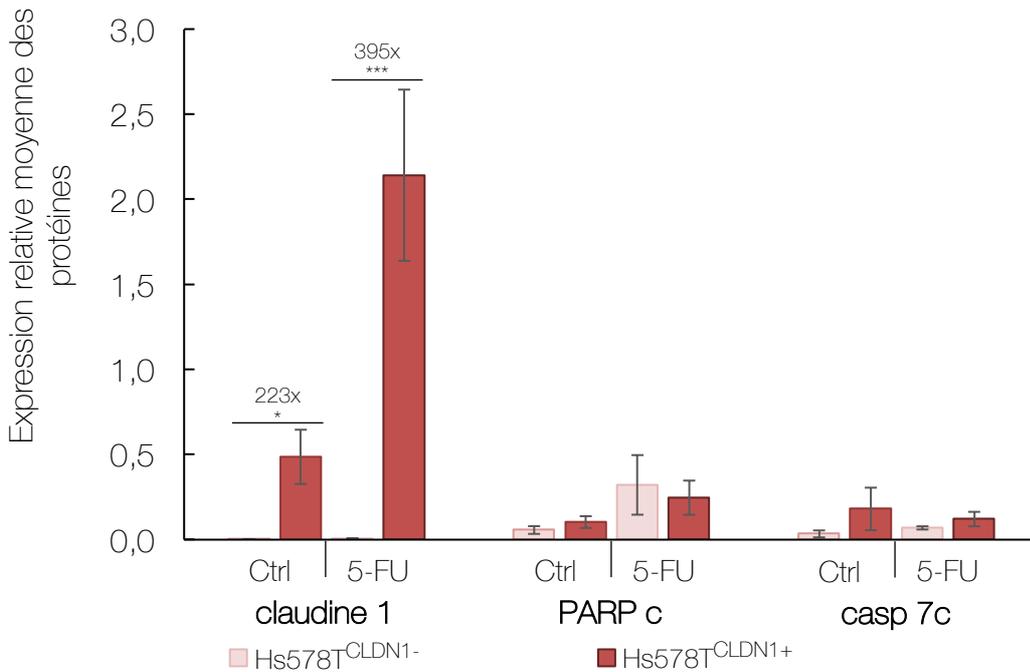
Les transfectants stables MDA-MB-231 qui contiennent le vecteur d'expression de la claudine 1 pcDNA3.1-CLDN1 (MDA231^{CLDN1+}) ou le vecteur vide pcDNA3.1 (MDA231^{CLDN1-}) ont été traités pendant 72h au 5-FU (50 μ M) ou au solvant (Ctrl). **a.** L'expression de la claudine 1 et des marqueurs de l'apoptose, PARP clivé et caspase 7 clivée, a été analysé par Western Blot et quantifié. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios des protéines d'intérêt / tubuline α . **b.** La viabilité cellulaire a été déterminée par la mesure du taux d'ATP. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin exposé au solvant. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes. **c.** Les transfectants stables MDA-MB-231 sont co-marquées avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et sont analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale sont les cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 5 à 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

- La mesure de la viabilité cellulaire par mesure du taux d'ATP
- L'analyse de l'apoptose des cellules marquées à l'annexine V/IP en cytométrie en flux.

a) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au 5-FU

Dans la lignée MDA-MB-231, le 5-FU à 50 μ M n'induit pas l'apoptose. Nous avons ainsi voulu savoir si la surexpression de la claudine 1 dans cette lignée pouvait les sensibiliser au 5-FU. Les cellules MDA231^{CLDN1+} expriment significativement plus la claudine 1 que les cellules MDA231^{CLDN1-}. Comme montré précédemment, l'expression de la claudine 1 seule induit une augmentation des formes clivées de PARP et de la caspase 7. Ainsi, les cellules MDA231^{CLDN1+} présentent une induction de 12 et 10 fois respectivement de PARPc et la caspase 7 clivée par rapport aux cellules contrôles MDA231^{CLDN1-}. Lors d'un traitement au 5-FU, on observe une augmentation des formes clivées de PARP et de la caspase 7 de 14,2 et 7,62 fois respectivement dans les cellules surexprimant la claudine 1. Cette augmentation de l'apoptose sous l'effet du 5-FU est lié à l'expression de la claudine 1 puisqu'on observe également une augmentation de 3,2 fois du marqueur PARP clivé entre les cellules MDA231^{CLDN1+} témoin et traitées au 5-FU (**Figure 68a**). La viabilité cellulaire diminue de 1,3 fois lorsque la claudine 1 est surexprimée entre les cellules contrôles non traitées. Le 5-FU induit une diminution de 2,32 fois du pourcentage de viabilité cellulaire entre les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+}. Cette diminution sous l'effet du 5-FU est liée à l'expression de la claudine 1 puisque nous observons également une diminution de 1,97 fois de la viabilité entre les cellules MDA231^{CLDN1+} contrôle et traitées au 5-FU (**Figure 68b**). En complément, l'analyse par cytométrie en flux montre que l'expression de la claudine 1 induit une augmentation de 3,7 et 4,26 fois des pourcentages de cellules en apoptose précoce et terminale respectivement ainsi qu'une diminution de 1,23 fois du pourcentage de cellules vivantes. Lorsque les cellules MDA231^{CLDN1+} sont traitées au 5-FU, l'expression de la claudine 1 induit une augmentation significative de 2,9 et 1,8 fois du pourcentage de cellules en apoptose précoce et terminale respectivement. Une diminution de 1,33 fois du pourcentage de cellules vivantes est également mesurée entre les cellules MDA231^{CLDN1+} et

a.



b.

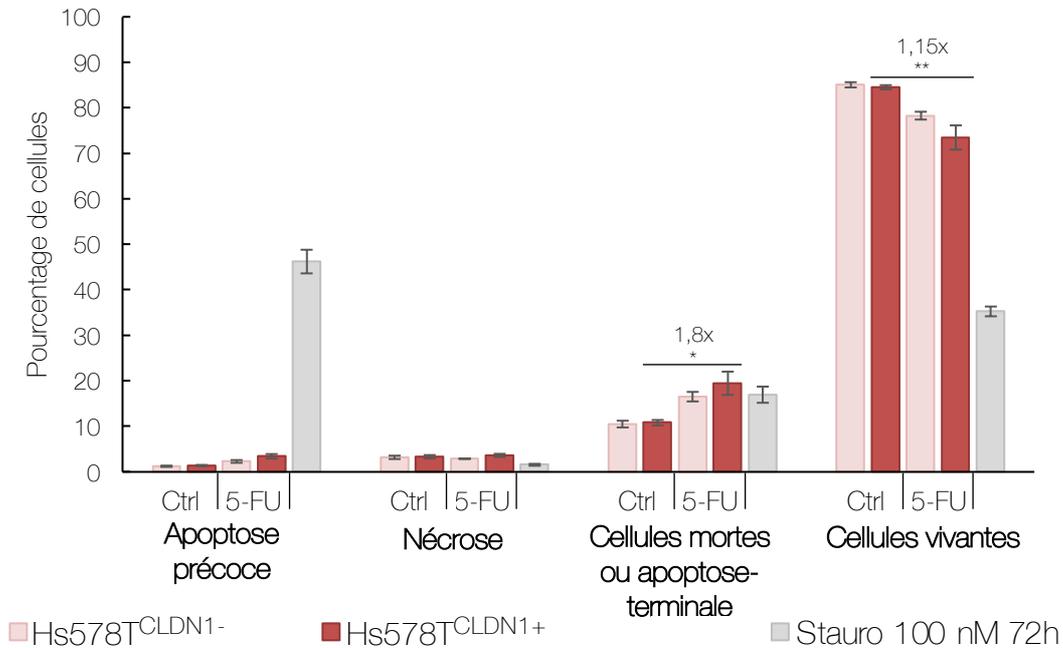


Figure 69 : Etude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 au 5-FU (181 μM)

Les transfectants stables Hs578T qui contiennent le vecteur d'expression de la claudine 1 pQCXIP-CLDN1 (Hs578T^{CLDN1+}) ou le vecteur vide pQCXIP (Hs578T^{CLDN1-}) ont été traités pendant 72h au 5-FU (181 μM) ou au solvant (Ctrl). **a.** L'expression de la claudine 1 et des marqueurs de l'apoptose, PARP clivé et caspase 7 clivée, a été analysée par Western Blot et quantifiée. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios des protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** Les transfectants stables Hs578T sont co-marqués avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et sont analysés par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale sont les cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes ± l'erreur standard à la moyenne de 5 à 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. *p < 0,0332, **p < 0,0021, ***p < 0,0002.

MDA231^{CLDN1-} traitées au 5-FU. Ces effets observés en réponse du 5-FU sont bien dû à l'expression de la claudine 1 puisqu'on observe une augmentation significative de 1,71 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale et une diminution de 1,24 fois des cellules vivantes entre les cellules MDA231^{CLDN1+} contrôle et traitées au 5-FU (**Figure 68c**). Ces résultats montrent que les cellules MDA-MB-231 qui surexpriment la claudine 1 sont plus sensibles au 5-FU que celles qui ne l'expriment pas. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'apoptose et une diminution de la viabilité cellulaire dans ces conditions. Ainsi, la claudine 1 joue un rôle dans la sensibilité au 5-FU des cellules MDA-MB-231.

Dans la lignée Hs578T, les cellules Hs578T^{CLDN1+} expriment significativement plus la claudine 1 que les cellules Hs578T^{CLDN1-}. En western blot, on observe une faible induction non significative des marqueurs apoptotiques dans les cellules Hs578T^{CLDN1+} surexprimant la claudine 1 comparé aux cellules Hs578T^{CLDN1-} (**Figure 69a**). De plus le traitement au 5-FU n'induit aucune augmentation et donc aucune différence du clivage des marqueurs apoptotiques (**Figure 69a**). Ces résultats sont confirmés par l'analyse des cellules marquées à l'annexine V en cytométrie en flux. L'expression de la claudine 1 n'induit pas d'apoptose dans les cellules Hs578T^{CLDN1+}. Sous l'effet du 5-FU, aucune différence n'est observée entre les cellules qui expriment la claudine 1 et celles qui ne l'expriment pas. Enfin, en réponse au 5-FU, la surexpression de la claudine 1 induit une augmentation de 1,8 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale et une diminution de 1,15 fois du pourcentage de cellules vivantes. Cependant, comme aucune différence n'est montrée entre les cellules Hs578T^{CLDN1-} et Hs578T^{CLDN1+} traitées au 5-FU, nous ne pouvons pas conclure que la claudine 1 joue un rôle dans la sensibilité des cellules Hs578T au 5-FU (**Figure 69b**). Ainsi l'expression de la claudine 1 ne semble pas être impliquée dans la sensibilisation des cellules Hs578T au 5-FU, suggérant un mécanisme d'action différent entre les deux lignées TNBC « claudin-1-low ».

Ces résultats montrent que l'expression de la claudine 1 sensibilise les cellules MDA-MB-231 au 5-FU mais pas les cellules Hs578T.

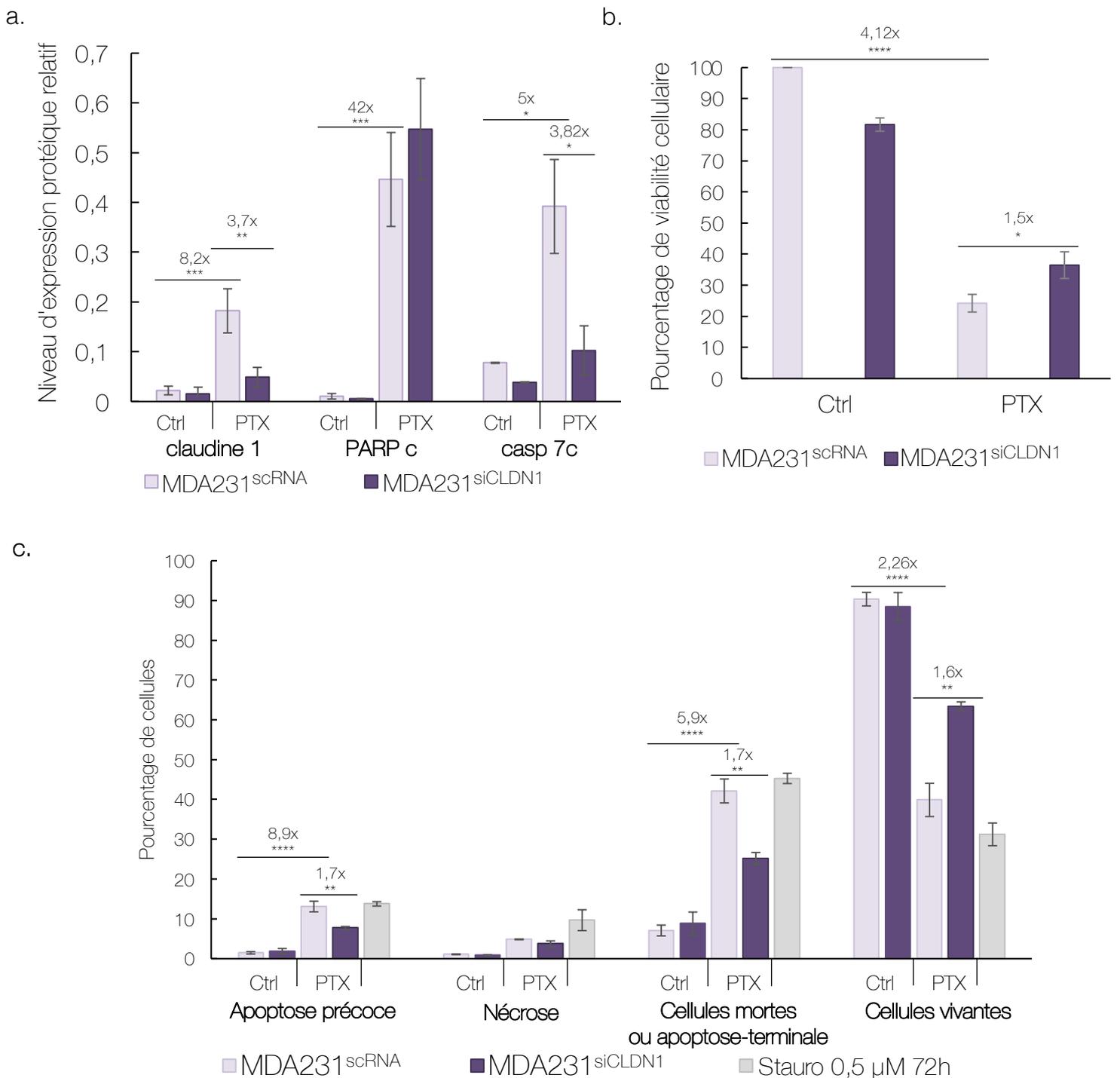


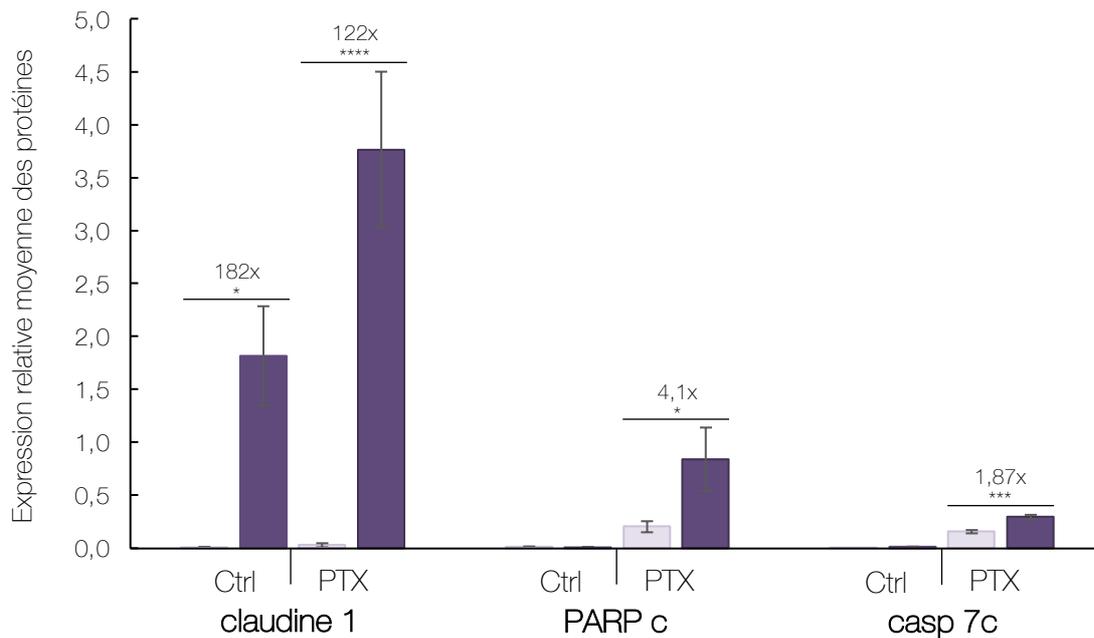
Figure 70 : Etude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 « claudin-1-low » au PTX

La lignée MDA-MB-231 a été transfectée avec un siRNA dirigé contre la claudine 1 siCLDN1 (MDA231^{siCLDN1}) ou avec un siRNA aléatoire scRNA (MDA231^{scRNA}). Les cellules ont ensuite été traitées pendant 72h au PTX à 5 nM ou avec le solvant (ctrl). **a.** L'apoptose a été analysée en Western-blot par l'étude des marqueurs PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (casp 7c). Le taux de claudine 1 a aussi été vérifié. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** La viabilité cellulaire a été déterminée par la mesure du taux d'ATP. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin exposé au solvant. **c.** Les cellules MDA-MB-231 ont été co-marquées avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et ont été analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale sont les cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm le SEM de 3 à 6 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

b) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité au PTX

Dans la lignée MDA-MB-231, le PTX induit une augmentation significative de l'expression de la claudine 1 de 8,2 fois que l'ARN interférence diminue de 3,7 fois. L'inhibition de la claudine 1 par ARN interférence permet de diminuer de 3,7 fois cette expression dans les cellules MDA231^{siCLDN1}. Comme attendu, le PTX induit l'apoptose des cellules MDA-MB-231 puisqu'on constate une augmentation significative des marqueurs apoptotiques PARP et caspase 7 clivés de 42 et 5 fois respectivement entre les cellules MDA231^{scRNA} contrôles et traitées. L'inhibition de l'expression de la claudine 1 conduit à une diminution de 3,82 fois du clivage de la caspase 7 entre les cellules MDA231^{scRNA} et MDA231^{siCLDN1} traitées au PTX. Dans ces conditions, aucune diminution du marqueur PARPc n'est détectée (**Figure 70a**). Le PTX induit une diminution du pourcentage de cellules viables de 4,12 fois dans les cellules MDA231^{scRNA}. L'inhibition de l'expression de la claudine 1 induit une augmentation de 1,5 fois du pourcentage de viabilité cellulaire entre les cellules MDA231^{scRNA} et MDA231^{siCLDN1} traitées au PTX (**Figure 70b**). Par cytométrie en flux, nous observons aussi que le PTX induit une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose précoce (8,9 fois) et en apoptose terminale (5,9 fois) ainsi qu'une diminution du pourcentage de cellules vivantes (2,26 fois) entre les cellules MDA231^{scRNA} contrôles et traitées. Les cellules transfectées avec le siCLDN1 et traitées au PTX présentent une diminution significative du pourcentage de cellules en apoptose précoce et terminale de 1,7 fois. On constate aussi une augmentation du pourcentage de cellules vivantes de 1,6 fois dans ces conditions (**Figure 70c**). **Sous l'effet du PTX, les cellules MDA-MB-231 qui expriment la claudine 1 sont donc plus sensibles à l'apoptose que celle qui ne l'expriment pas. Ces résultats montrent que la claudine 1 joue un rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231 traitées au PTX.**

a.



b.

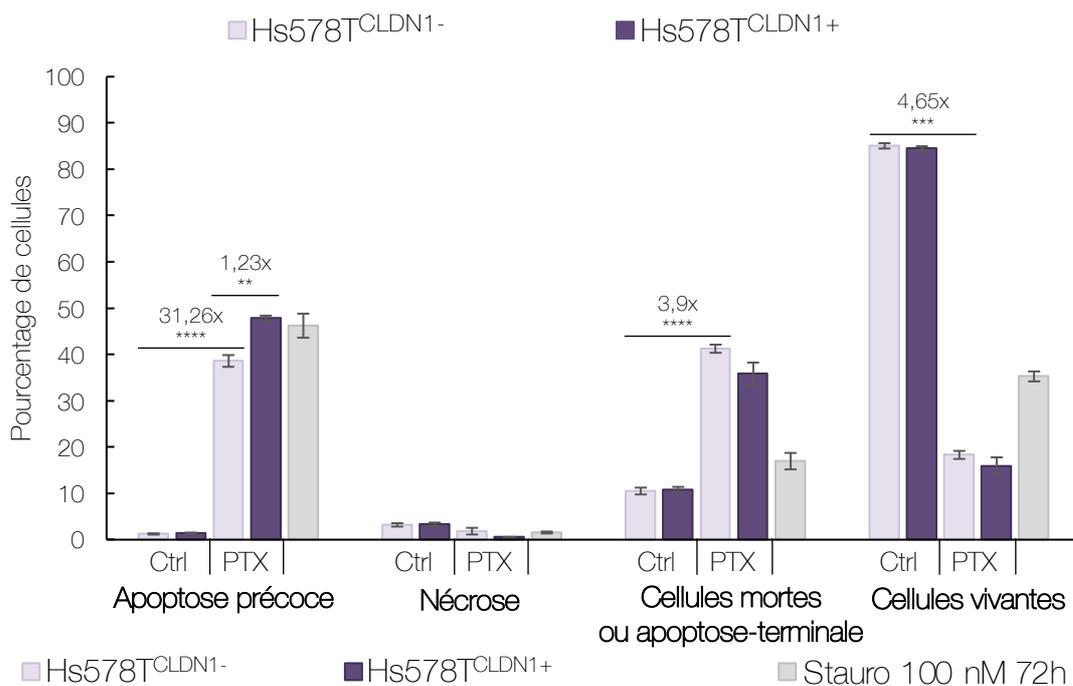


Figure 71 : Etude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 au PTX

Les transfectants stables Hs578T qui contiennent le vecteur d'expression de la claudine 1 pQCXIP-CLDN1 (Hs578T^{CLDN1+}) ou le vecteur vide pQCXIP (Hs578T^{CLDN1-}) ont été traités pendant 72h au PTX (5 nM) ou au solvant (Ctrl). **a.** L'expression de la claudine 1 et des marqueurs de l'apoptose, PARP clivé et caspase 7 clivée, a été analysée par Western Blot et quantifiée. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios des protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** Les transfectants stables Hs578T ont été co-marqués avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et ont été analysés par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale aux cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 5 à 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

Dans la lignée Hs578T, j'ai montré par western blot que la claudine 1 est significativement plus exprimée dans les cellules Hs578T^{CLDN1+} que dans cellules Hs578T^{CLDN1-}. Comme attendu, le PTX n'induit pas l'apoptose des cellules Hs578T^{CLDN1-} puisqu'on ne note aucune augmentation significative des marqueurs PARP et caspase 7 clivés. Le PTX induit l'apoptose des cellules Hs578T^{CLDN1+} avec une augmentation significative du clivage de PARP et de la caspase 7 de 4,1 et 1,87 fois respectivement par rapport aux cellules Hs578T^{CLDN1-} (**Figure 71a**). Les expériences de cytométrie en flux montrent que le PTX induit une augmentation significative de 31,26 et 3,9 fois respectivement des pourcentages de cellules en apoptose précoce et terminale et une diminution de 4,65 fois du pourcentage de cellules vivantes dans les cellules Hs578T^{CLDN1-}. De plus, on observe une augmentation significative de 1,23 fois du pourcentage de cellules en apoptose précoces entre les cellules Hs578T^{CLDN1-} et Hs578T^{CLDN1+} traitées au PTX (**Figure 71b**). Les cellules Hs578T exprimant la claudine 1 sont plus sensibles au PTX que celles qui ne l'expriment pas. Ces résultats montrent que l'expression de la claudine 1 augmente la sensibilité des cellules Hs578T au PTX.

Ainsi, l'ensemble de ces données confirme que la claudine 1 joue un rôle dans la sensibilité des lignées MDA-MB-231 et Hs578T traitées au PTX.

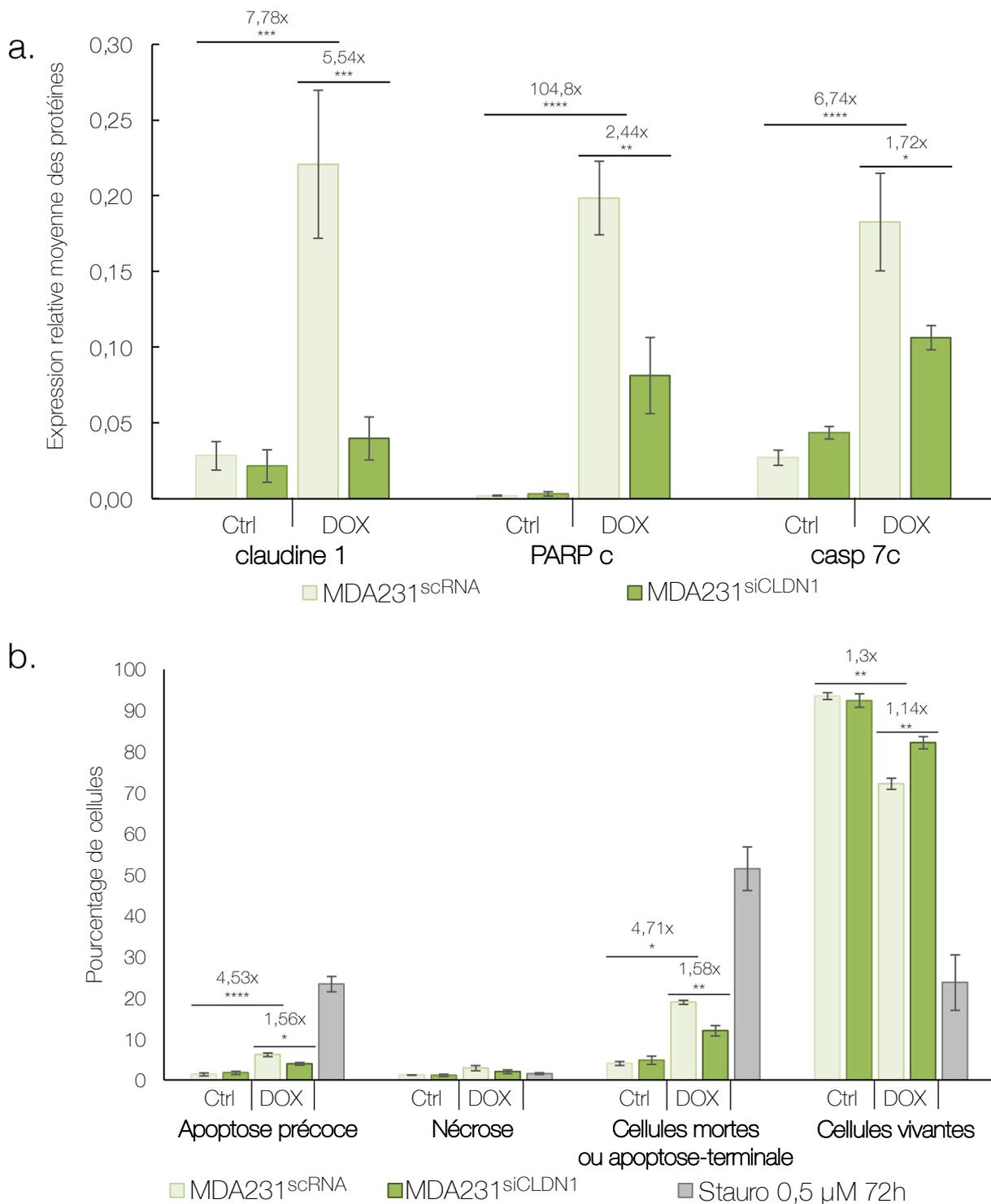


Figure 72 : Etude du rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 « claudin-1-low » à la DOX

La lignée MDA-MB-231 a été transfectée avec un siRNA dirigé contre la claudine 1 siCLDN1 (MDA231^{siCLDN1}) ou un siRNA aléatoire scRNA (MDA231^{scRNA}). 7h après leur transfection, les cellules ont été traitées pendant 72h au paclitaxel à la concentration de 86 nM de DOX ou au solvant (ctrl). **a.** L'apoptose a été analysée en Western-blot par l'étude des marqueurs PARP clivé (PARPc) et caspase 7 clivée (casp 7c). Le taux de claudine 1 a aussi été vérifié. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** Les cellules ont été co-marquées avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et ont été analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V. Les cellules en apoptose-terminale sont les cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm le SEM de 3 à 6 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

c) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité à la DOX

Dans la lignée MDA-MB-231, j'ai montré par western blot que la DOX induit une augmentation significative de l'expression de la claudine 1 de 7,78 fois dans les cellules MDA231^{scRNA} et que l'ARN interférence dans les cellules MDA231^{siCLDN1} diminue de 5,54 fois cette expression. Dans les cellules MDA231^{scRNA}, la DOX induit également une augmentation significative de PARP et de la caspase 7 clivés de 104,8 et 6,74 fois respectivement. Par ailleurs, entre les cellules MDA231^{scRNA} et MDA231^{siCLDN1} traitées à la DOX, les marqueurs PARP et caspase 7 clivés diminuent significativement de 2,44 et 1,72 fois respectivement (**Figure 72a**). Les expériences de cytométrie en flux confirment ces résultats. La DOX augmente de 4,53 et 4,71 fois les pourcentages de cellules MDA231^{scRNA} en apoptose précoce et terminale respectivement et diminue le pourcentage de cellules MDA231^{scRNA} vivantes de 1,3 fois. L'inhibition de l'expression de la claudine 1 dans les cellules MDA231^{siCLDN1} traitées à la DOX, atténue le pourcentage de cellules en apoptose précoce et terminale de 1,56 et 1,58 fois respectivement et augmente le pourcentage de cellules vivantes de 1,14 fois par rapport aux cellules MDA231^{siCLDN1} (**Figure 72b**). **Sous l'effet de la DOX, les cellules MDA-MB-231 qui expriment la claudine 1 sont également plus sensibles à l'apoptose que celles qui ne l'expriment pas. Ainsi, la claudine 1 est impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules MDA-MB-231 traitées à la DOX.**

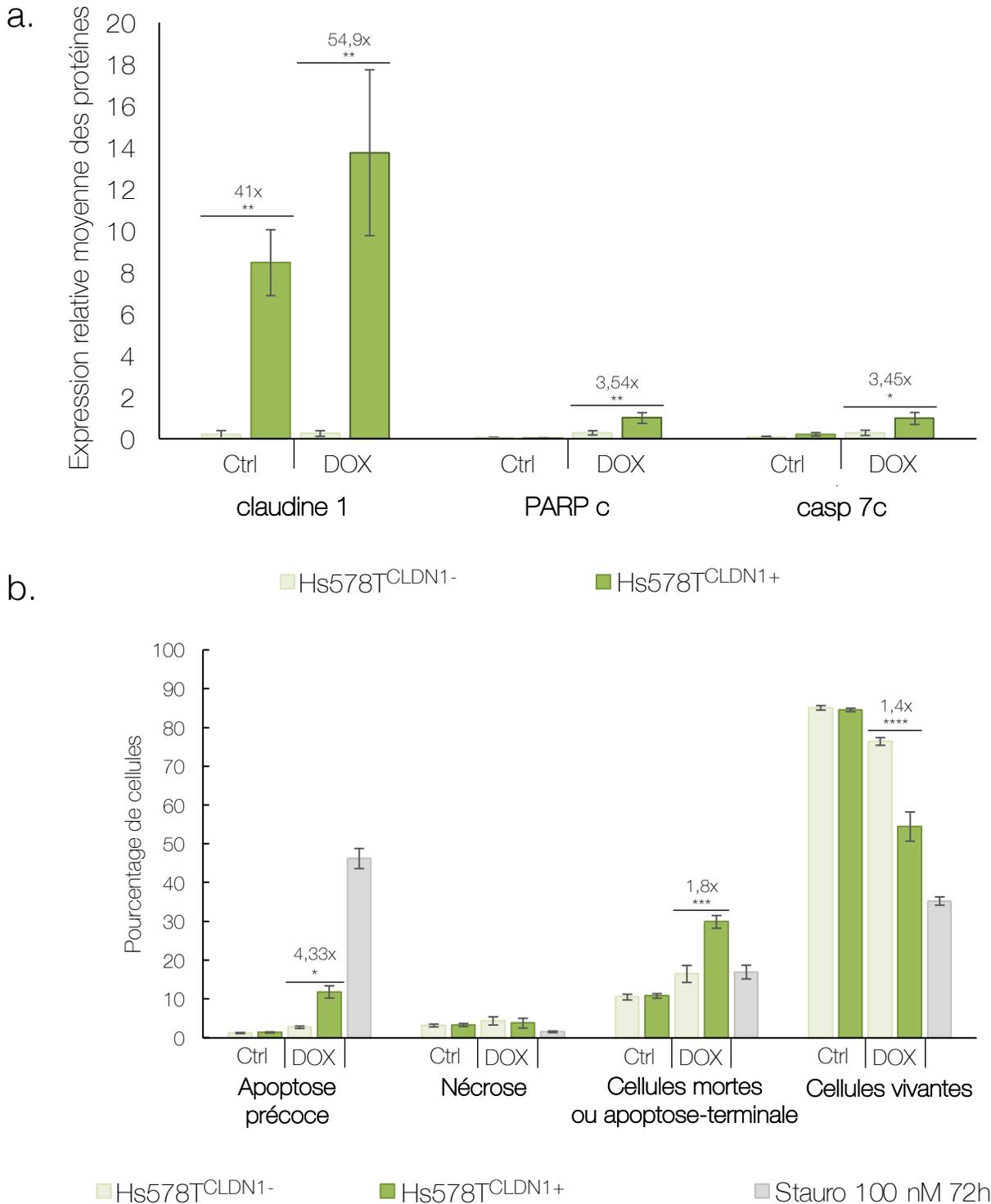


Figure 73 : Etude de la sensibilité des cellules Hs578T surexprimant stablement la claudine 1 à la DOX

Les transfectants stables Hs578T qui contiennent le vecteur d'expression de la claudine 1 pQCXIP-CLDN1 (Hs578T^{CLDN1+}) ou le vecteur vide pQCXIP (Hs578T^{CLDN1-}) ont été traités pendant 72h à la DOX à 210 nM ou solvant (Ctrl). **a.** L'expression de la claudine 1 et des marqueurs de l'apoptose, PARP clivé et caspase 7 clivée, a été analysée par Western Blot et quantifiée. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios des protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** Les transfectants stables Hs578T ont été co-marqués avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et ont été analysés par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V et les cellules en apoptose-terminale aux cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 5 à 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

Dans la lignée Hs578T, les cellules Hs578T^{CLDN1+} expriment significativement plus la claudine 1 que les cellules Hs578T^{CLDN1-}. En accord avec les résultats précédents, la DOX n'induit pas l'apoptose des cellules Hs578T^{CLDN1-} puisqu'aucun clivage de PARP et de la caspase 7 ne sont détectés. Ainsi lorsqu'elles sont traitées à la DOX, seule les cellules Hs578T^{CLDN1+} présentent un clivage des marqueurs apoptotiques avec une augmentation significative de 3,54 et 3,45 fois respectivement par rapport aux cellules Hs578T^{CLDN1-} (**Figure 73a**). Par la suite, j'ai confirmé ces résultats par cytométrie en flux. La DOX n'induit pas l'apoptose des cellules Hs578T^{CLDN1-} contrairement aux cellules Hs578T^{CLDN1+}. Sous l'effet de la DOX, nous observons ainsi une augmentation significative des cellules en état pro-apoptotique et en apoptose terminale de 4,33 et 1,8 fois dans les cellules Hs578T^{CLDN1+} par rapport aux cellules Hs578T^{CLDN1-}. Le pourcentage de cellules vivantes est aussi significativement diminué de 1,4 fois entre ces deux conditions (**Figure 73b**). Les cellules Hs578T qui expriment la claudine 1 sont donc plus sensibles à l'apoptose que celles qui ne l'expriment pas lorsqu'elles sont traitées à la DOX. L'expression de la claudine 1 sensibilise donc les cellules Hs578T à la DOX.

Ces résultats mettent en évidence que l'expression de la claudine 1 est aussi impliquée de la sensibilité des cellules MDA-MB-231 et Hs578T à la DOX.

Pour conclure cette partie, j'ai montré que l'expression de la claudine 1 permet d'augmenter la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au 5-FU et qu'elle est impliquée dans la sensibilité de ces cellules au PTX et à la DOX. J'ai également mis en évidence que l'expression de la claudine 1 permet d'augmenter la sensibilité des cellules Hs578T au PTX et à la DOX.

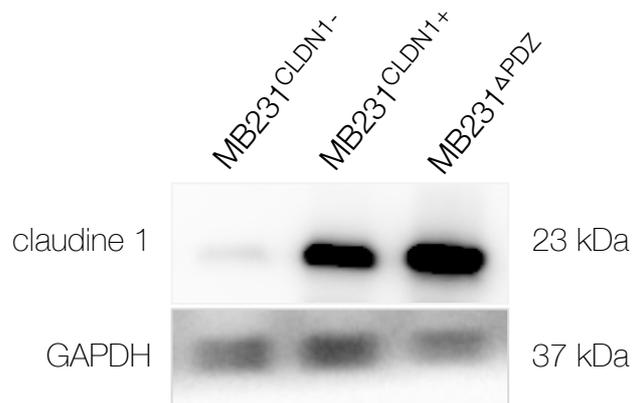


Figure 74 : Transfection transitoire des mutants de la claudine 1

La lignée MDA-MB-231 a été transfectée transitoirement avec les différentes constructions de la claudine 1 : le vecteur vide pcDNA3.1 (MDA231^{CLDN1-}); le vecteur contenant la claudine 1 *full length* pcDNA3.1-CLDN1 (MDA231^{CLDN1+}) et le vecteur contenant la claudine 1 déléetée du motif de liaison au domaine PDZ pcDNA3.1-PDZ (MDA231^{ΔPDZ}). La claudine 1 a été révélée avec l'anticorps dirigé contre la queue C-terminale de la claudine 1. L'anticorps reconnaît les deux formes CLDN1 *full length* et Δ PDZ.

III. IMPORTANCE DU MOTIF DE LIAISON AU DOMAINE PDZ DE LA CLAUDINE 1 DANS LA SENSIBILITÉ DES CELLULES MDA-MB-231 AU 5-FU

Nous supposons que la claudine 1 est impliquée dans la sensibilité aux agents de chimiothérapie en recrutant des protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose. Or, les principales protéines qui interagissent avec la claudine 1 le font *via* son motif de liaison au domaine PDZ. De ce fait, nous supposons que ce motif pourrait jouer un rôle important dans la sensibilité aux agents de chimiothérapie. C'est pourquoi, nous avons choisi de le déléter afin de vérifier son implication dans la sensibilité des cellules à la chimiothérapie. J'ai, ainsi mis au point le protocole de clonage et réalisé la construction du vecteur pcDNA3.1- Δ PDZ dans laquelle le motif PDZ KDYV de la claudine 1 est délété (Δ PDZ) ([Figure 53](#)). Le vecteur vide, la forme Δ PDZ et la forme *full length* de la claudine 1 ont été transfectés transitoirement dans les cellules MDA-MB-231 pendant 6h ([Figure 74](#)), puis ces cellules ont été traitées au 5-FU pendant 72 h. L'induction de l'apoptose en réponse au 5-FU a ensuite été réalisée par l'analyse des marqueurs apoptotiques par western blot ([Figure 75a](#)) et par l'analyse en cytométrie en flux des cellules marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium ([Figure 75b](#)). Dans cette lignée, seule la réponse au 5-FU a été étudiée puisque j'ai montré que le PTX et la DOX induisent l'expression de la claudine 1 ([Figure 60](#)).

Les cellules MDA231^{CLDN1+} et MDA231 ^{Δ PDZ} expriment significativement plus la claudine 1 que les cellules MDA231^{CLDN1-}. En absence de 5-FU, l'expression des différentes formes de la claudine 1 n'induit aucun clivage des marqueurs apoptotiques. Comme nous l'avons vu précédemment, le 5-FU induit une augmentation du clivage de PARP et de la caspase 7 de 3,21 et de 60 fois respectivement dans les cellules MDA231^{CLDN1+} surexprimant la claudine 1. Dans les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231 ^{Δ PDZ}, le 5-FU n'induit aucune augmentation du clivage des marqueurs PARP et caspase 7. Ainsi de manière intéressante, l'apoptose est significativement plus induite dans les cellules

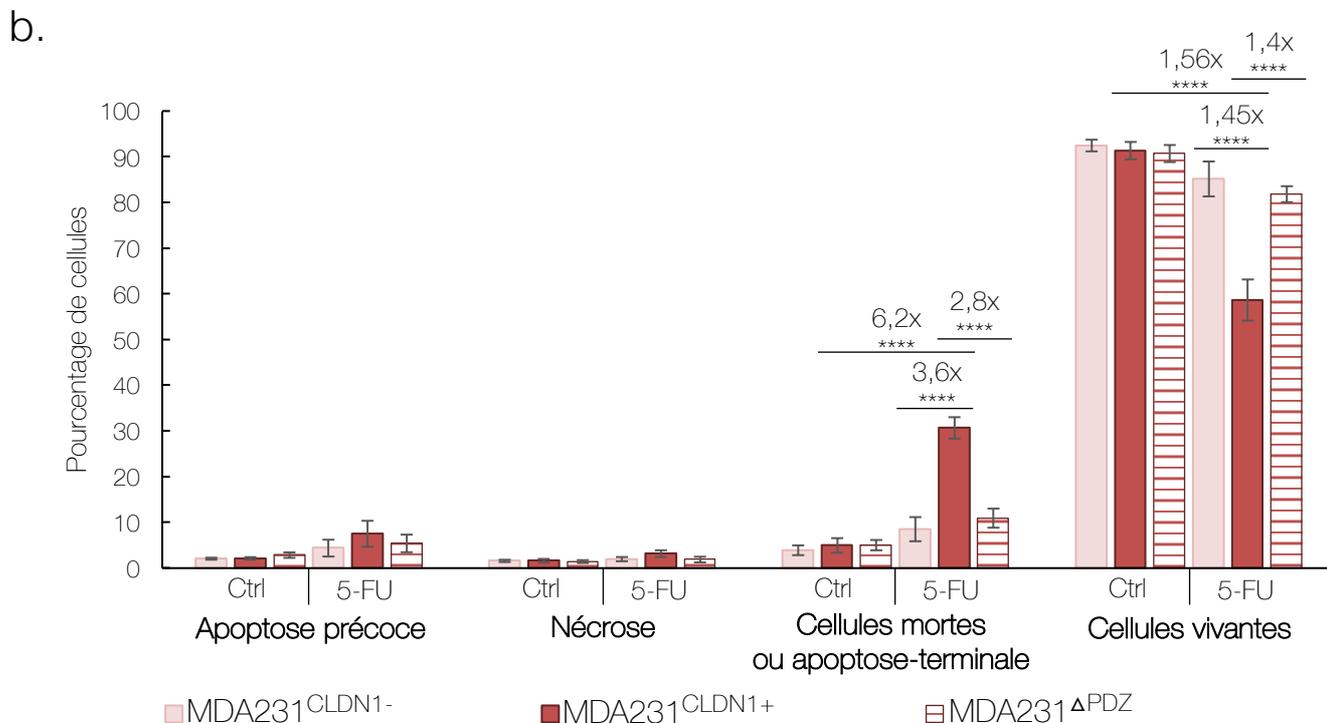
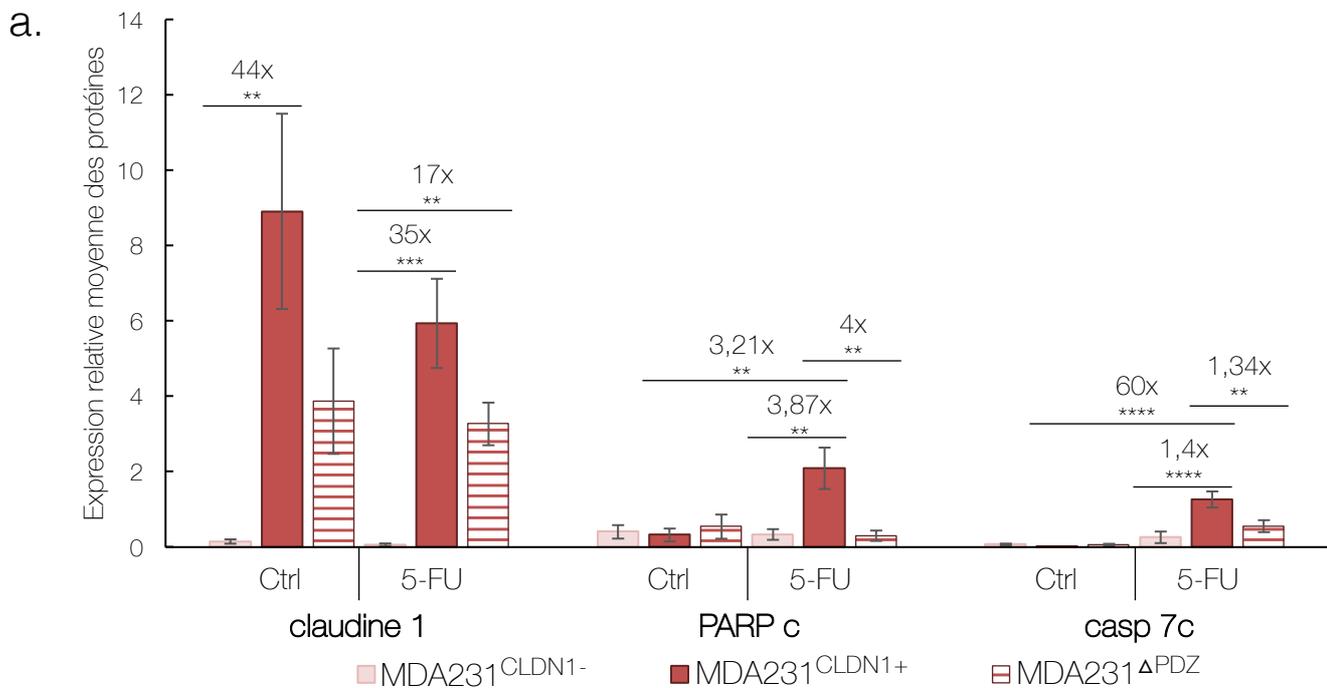


Figure 75 : Rôle du motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1 dans la sensibilité au 5-FU dans la lignée MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 a été transfectée transitoirement avec les différents vecteurs d'expression pcDNA3.1^{CLDN1- / CLDN1+ / ΔPDZ} pendant 6h. Les cellules ont par la suite été traitées pendant 72h avec le solvant DMSO ou le 5-FU (50 μM). **a.** L'expression de la claudine 1 et des marqueurs de l'apoptose, PARP clivé et caspase 7 clivée, a été analysée par Western Blot et quantifiée. Le niveau relatif d'expression des protéines correspond aux ratios des protéines d'intérêt / GAPDH. **b.** Les cellules ont été co-marquées avec de l'annexine V couplée au FITC et avec de l'iodure de propidium et ont été analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules pro-apoptotiques correspond aux cellules marquées à l'annexine V et les cellules en apoptose-terminale aux cellules co-marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes ± l'erreur standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. **p<0,0021, ***p<0,0002, ****p<0,0001.

MDA231^{CLDN1+} que dans les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{ΔPDZ} en réponse au 5-FU :

- On observe 3,87 et 1,4 fois plus de clivage de PARP et de la caspase 7 dans les cellules MDA231^{CLDN1+} que dans les cellules MDA231^{CLDN1-}.
- On observe 4 et 1,34 fois plus de clivage de PARP et de la caspase 7 dans les cellules MDA231^{CLDN1+} que dans les cellules MDA231^{ΔPDZ}.

Finalement sous l'effet du 5-FU, il n'existe pas de différences d'induction des marqueurs apoptotiques entre les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{ΔPDZ} (Figure 75a).

Comme nous l'avons déjà montré auparavant dans les cellules MDA-MB-231, l'expression de la claudine 1 les sensibilisent au 5-FU. La délétion du motif de liaison au domaine PDZ rend ces dernières insensibles au 5-FU.

J'ai ensuite vérifié ces résultats par cytométrie en flux. En l'absence de traitement au 5-FU, nous observons que l'expression des différentes formes de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 n'induit ni l'apoptose, ni la nécrose. Dans les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{ΔPDZ}, le 5-FU n'induit aucune augmentation du pourcentage de cellules en apoptose et aucune diminution du pourcentage de cellules vivantes. En accord avec les expériences de western blot, dans les cellules MDA231^{CLDN1+}, le 5-FU induit une augmentation de 6,2 fois du pourcentage de cellules en apoptose terminale et une diminution de 1,56 fois du pourcentage de cellules vivantes. De plus, en réponse au 5-FU, l'apoptose est significativement plus induite dans les cellules MDA231^{CLDN1+} que dans les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{ΔPDZ} :

- On observe 3,6 fois plus d'apoptose terminale et 1,45 fois moins de cellules vivantes dans les cellules MDA231^{CLDN1+} que dans les cellules MDA231^{CLDN1-}.
- On observe 2,8 fois plus d'apoptose terminale et 1,4 fois moins de cellules vivantes dans les cellules MDA231^{CLDN1+} que dans les cellules MDA231^{ΔPDZ}.

Finalement, sous l'effet du 5-FU, il n'existe pas de différences d'induction de l'apoptose et de pourcentage de cellules vivantes entre les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{ΔPDZ} (Figure 75b). Ainsi, le 5-FU induit l'apoptose des cellules surexprimant la claudine 1 mais ne l'induit pas dans les cellules qui surexpriment la claudine 1 délétée du motif de liaison

au domaine PDZ. Le motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1 joue donc un rôle important dans la sensibilité au 5-FU des cellules MDA-MB-231.

Pour conclure, la claudine 1 semble être une protéine clé dans la sensibilité à l'apoptose des cellules TNBC. Mes travaux ont mis en évidence que l'expression de la claudine 1 permet de sensibiliser les cellules TNBC aux agents de chimiothérapie et suggèrent que le motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1 est impliqué dans ce processus.

IV. CARACTERISATION DE LA REPOSE AUTOPHAGIQUE DES CELLULES TNBC « CLAUDIN-1-LOW »

Dans la partie précédente, j'ai montré que le 5-FU à l'EC₅₀ n'induit pas ou peu l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et Hs578T (**Figure 61**), pourtant à cette dose, leur viabilité cellulaire n'est que de 50 % (**Figure 57**). Une étude décrit que le 5-FU induit une réponse apoptotique non-optimale qui présente des caractéristiques d'autophagie, avec une augmentation des marqueurs LC3-II et Beclin 1 dans les cellules déficientes en p53 comme les cellules MDA-MB-231 et Hs578T (Akpinar et al., 2015). L'autophagie est un processus fortement décrit dans les cellules cancéreuses. Cependant son rôle est fortement débattu, pour certains auteurs l'autophagie engendrerait la mort des cellules cancéreuses, tandis que pour d'autres elle inhiberait l'apoptose et induirait ainsi la résistance des cellules aux traitements (K. Zheng et al., 2019). C'est pourquoi, nous avons décidé d'étudier l'induction de l'autophagie dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T traitées au 5-FU.

Les cellules MDA-MB-231 et Hs578T ont été traitées pendant 72 h au 5-FU ou à la rapamycine (2,5 µM), un inducteur de l'autophagie qui constitue le témoin positif des expériences. Elles ont ensuite été marquées à l'aide de la sonde CytoID sur cellules vivantes pour mettre en évidence les vésicules d'autophagolysosome caractéristiques du stade terminal de l'autophagie.

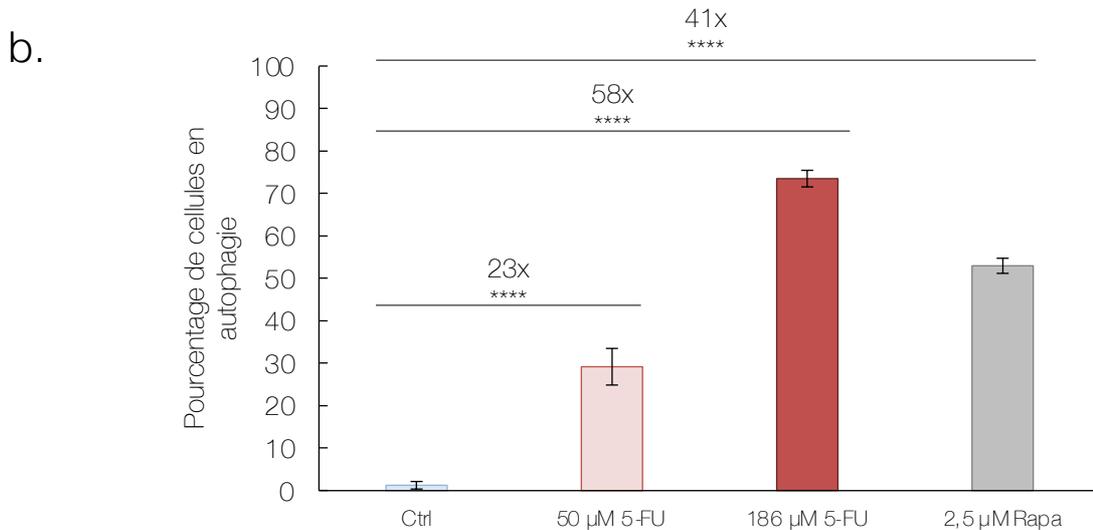
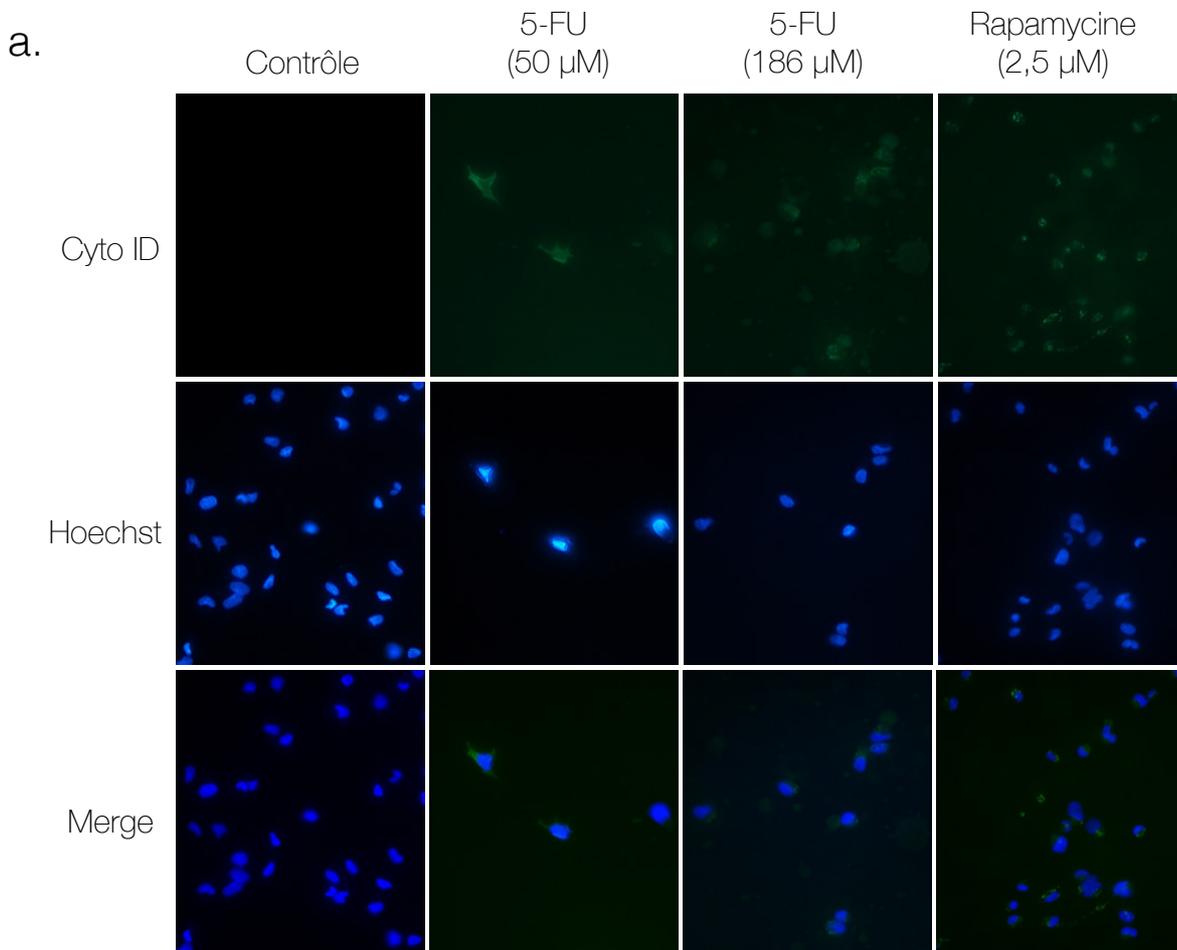


Figure 76 : Etude de la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU

La lignée MDA-MB-231 a été traitée pendant 72h au 5-FU à 50 μ M et 186 μ M. La rapamycine (2,5 μ M) est utilisée en témoin positif. Un marquage de l'autophagie a été réalisé à l'aide de la sonde CytolD couplée au FITC (Enzo) sur cellules vivantes. La sonde CytolD cible directement la forme LC3 II qui se trouve dans la membrane des vésicules d'autophagolysosomes. Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Le nombre total de cellules a été déterminé grâce au marquage Hoechst. **a.** Les photographies sont prises au grossissement x1000. **b.** Le pourcentage de cellules en autophagie a été déterminé par le ratio du nombre de cellules total sur le nombre de cellules positives au marquage CytolD. 250 à 1000 cellules ont été comptées sur 4 champs différents pour chaque expérience au grossissement x400. Le graphique représente la moyenne de 4 expériences indépendantes +/- SEM. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Dunnett. ****p<0,0001.

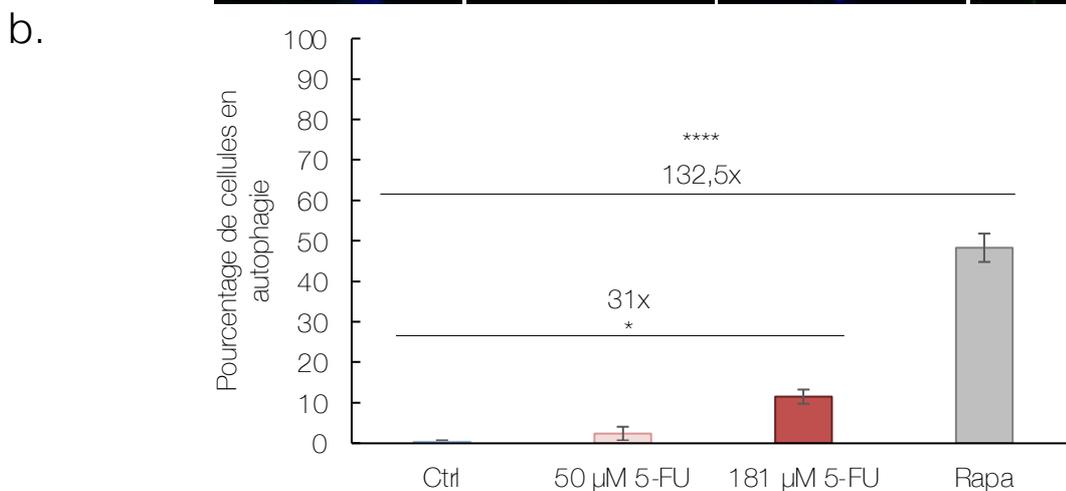
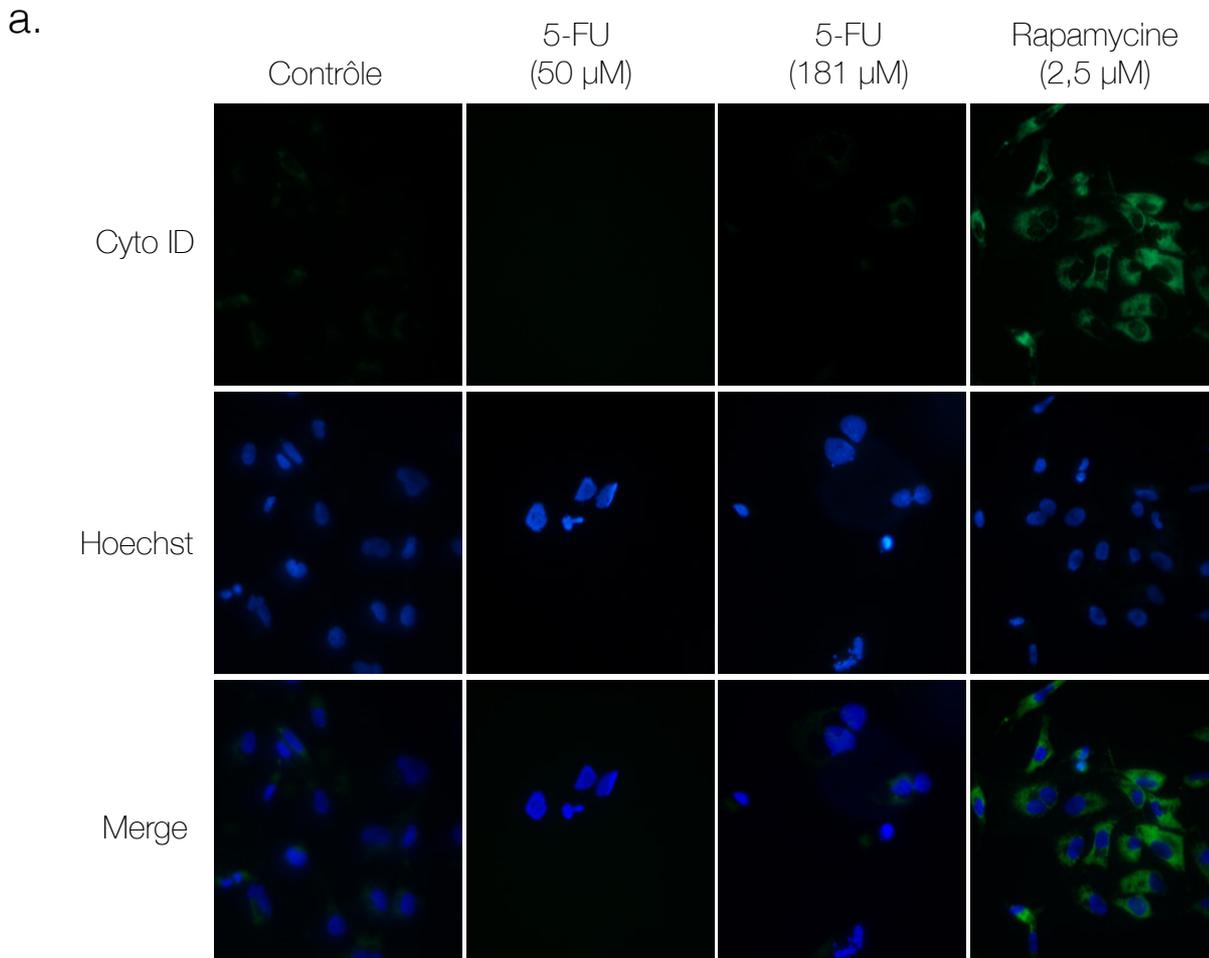


Figure 77 : Etude de la sensibilité à l'autophagie des cellules Hs578T en réponse au 5-FU

La lignée Hs578T a été traitée pendant 72h au 5-FU à 50 μ M et 181 μ M. La rapamycine (2,5 μ M) est utilisée en témoin positif. Un marquage de l'autophagie a été réalisé à l'aide de la sonde CytolD couplée au FITC (Enzo) sur cellules vivantes. La sonde CytolD cible directement la forme LC3 II qui se trouve dans la membrane des vésicules d'autophagolysosomes. Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Le nombre total de cellules a été déterminé grâce au marquage Hoechst. **a.** Les photographies sont prises au grossissement x1000. **b.** Le pourcentage de cellules en autophagie a été déterminé par le ratio du nombre de cellules total sur le nombre de cellules positives au marquage CytolD. 250 à 1000 cellules ont été comptées sur 4 champs différents pour chaque expérience au grossissement x400. Le graphique représente la moyenne de 4 expériences indépendantes +/- SEM. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Dunnett. * $p < 0,0332$, **** $p < 0,0001$.

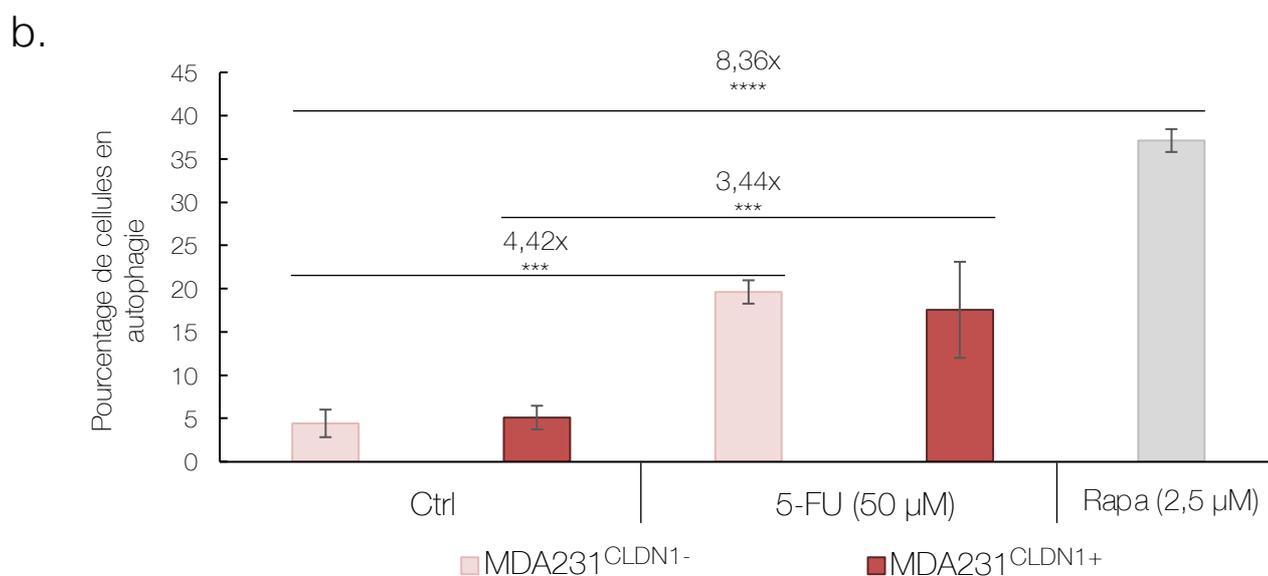
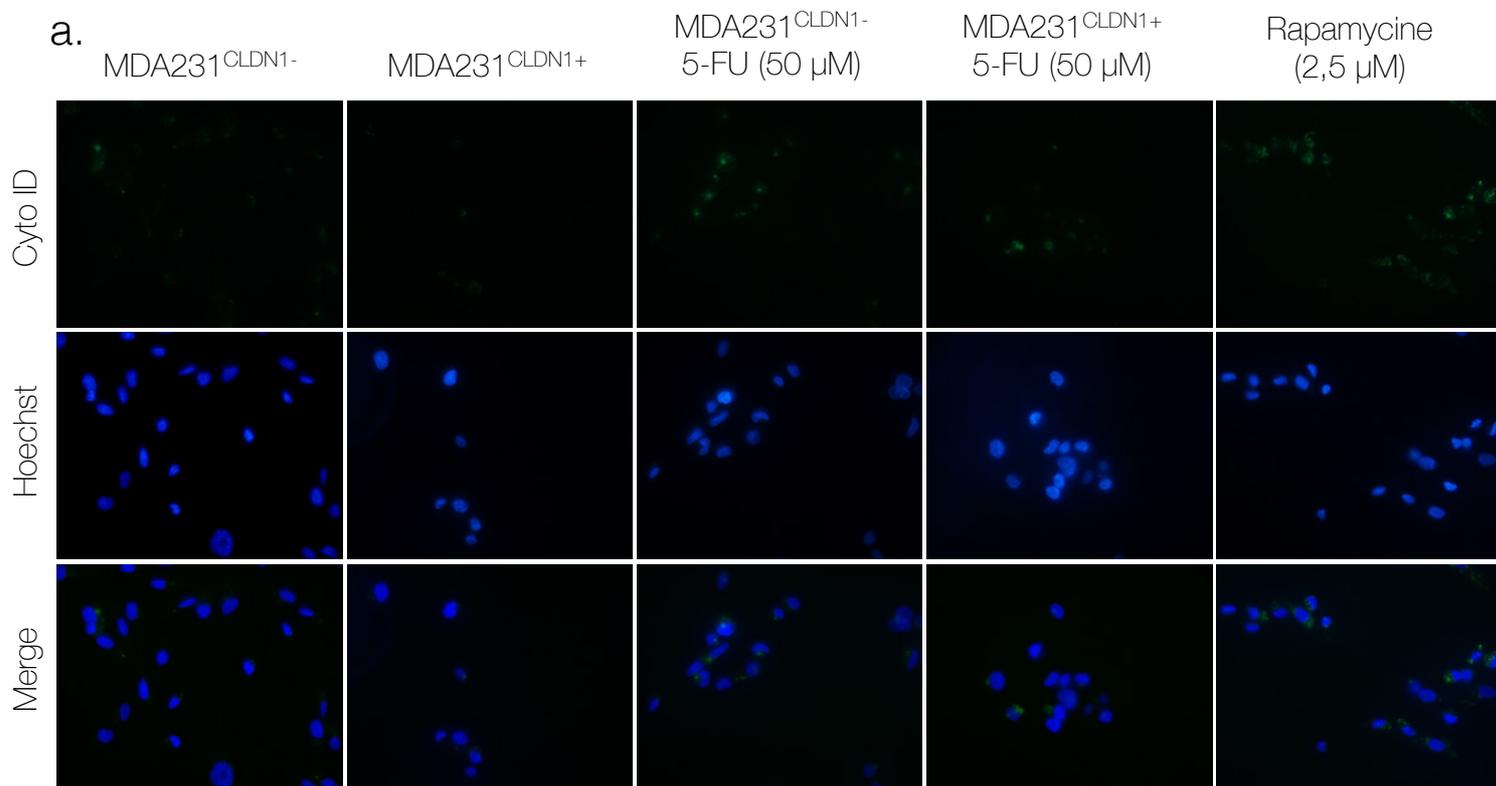


Figure 78 : étude du rôle de la claudine 1 de la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU

Les cellules MDA-MB-231^{CLDN1-} et MDA-MB-231^{CLDN1+} ont été traitées pendant 72h au 5-FU à 50 μ M ou avec le solvant. La rapamycine (2,5 μ M) est utilisée en témoin positif. Un marquage de l'autophagie a été réalisé à l'aide de la sonde CytolD couplée au FITC (Enzo) sur cellules vivantes. La sonde CytolD cible directement la forme LC3 II qui se trouve dans la membrane des vésicules d'autophagolysosomes. Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Le nombre total de cellules a été déterminé grâce au marquage Hoechst. **a.** Les photographies sont prises au grossissement x1000. **b.** Le pourcentage de cellules en autophagie a été déterminé par le ratio du nombre de cellules total sur le nombre de cellules positives au marquage CytolD. 250 à 1000 cellules ont été comptées sur 4 champs différents pour chaque expérience au grossissement x400. Le graphique représente la moyenne de 4 expériences indépendantes +/- SEM. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. ***p<0,0002, ****p<0,0001.

1) Étude de la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU

Dans la lignée MDA-MB-231, la rapamycine induit une augmentation du pourcentage de cellules en autophagie de 41 fois. Le 5-FU à 50 et 186 μM induit une augmentation significative de 23 et 58 fois respectivement (**Figure 76**). **Ces données montrent que le 5-FU induit le processus autophagique dans les cellules MDA-MB-231.**

2) Étude de la sensibilité à l'autophagie des cellules Hs578T en réponse au 5-FU

Dans la lignée Hs578T, la rapamycine induit également une augmentation significative de 132,5 fois de l'autophagie et le 5-FU à son EC_{50} (181 μM) induit une augmentation du pourcentage de cellules en autophagie de 31 fois. La concentration de 50 μM de 5-FU n'induit pas l'autophagie (**Figure 77**). **Ainsi le 5-FU à 181 μM induit l'autophagie dans la lignée Hs578T.**

3) Implication de la claudine 1 dans la sensibilité à l'autophagie des cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU.

Le 5-FU induit une augmentation de l'autophagie dans les cellules MDA-MB-231 (**Figure 76**). Comme l'expression de la claudine 1 sensibilise ces cellules à l'apoptose lorsqu'elles sont traitées au 5-FU, nous souhaitons savoir si l'expression de la claudine 1 pouvait également augmenter le processus autophagique dans ces conditions. J'ai ainsi traité les cellules MDA-MB-231 surexprimant ou non la claudine 1 (MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+}) au 5-FU à 50 μM et j'ai étudié la réponse autophagique. Aucune induction de l'autophagie n'est observée dans les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+} non traitées. Le 5-FU induit une augmentation significative de 4,42 et 3,44 fois du pourcentage de cellules en autophagie des cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+} respectivement. Enfin, aucune différence d'induction de l'autophagie n'est observée entre les cellules MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+} traitées au 5-FU (50 μM) montrant que la claudine 1 n'est pas impliquée dans ce processus (**Figure 78**). **Le 5-FU induit un processus**

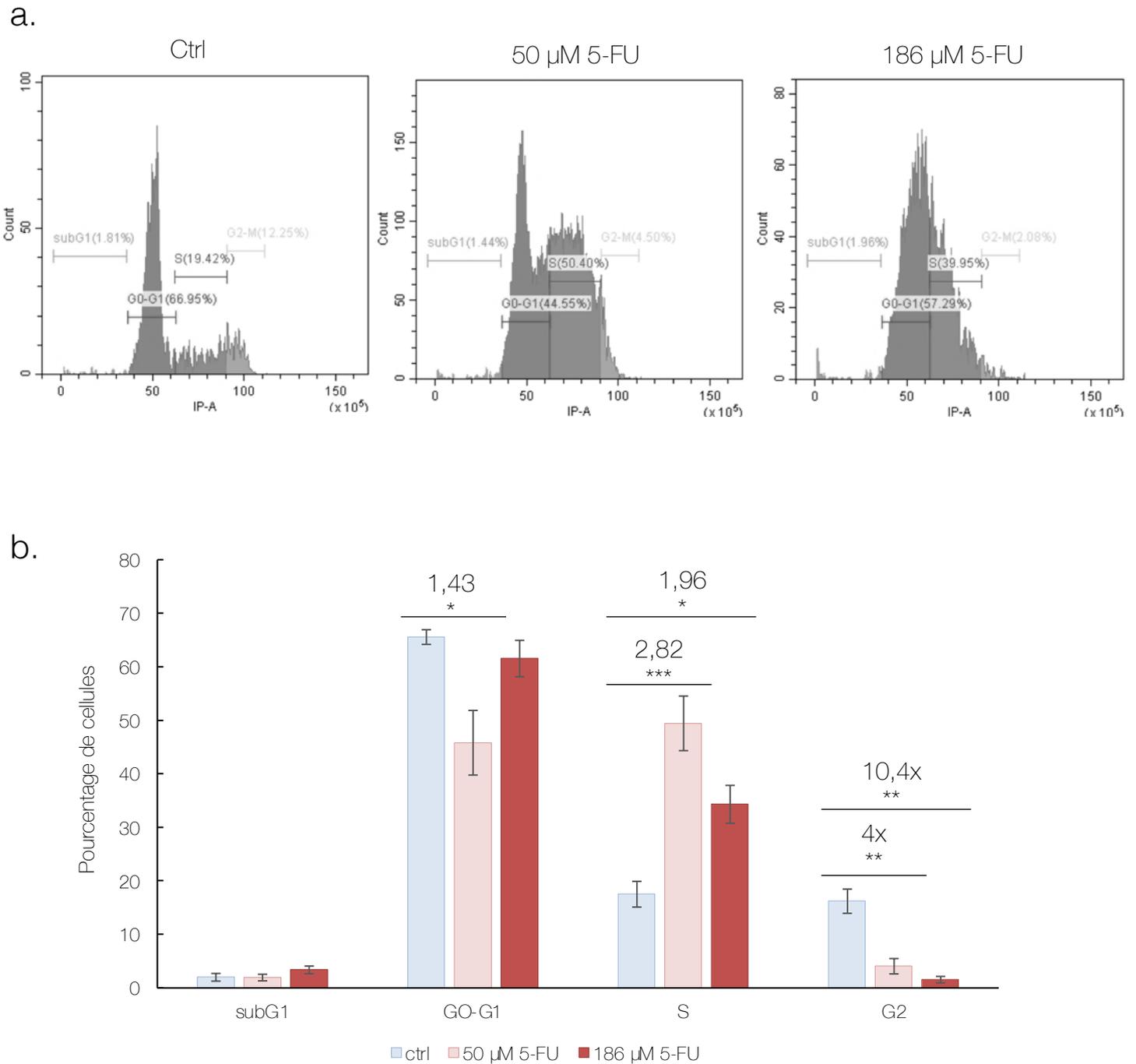


Figure 79 : Effet du 5-FU sur le cycle cellulaire dans la lignée MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 a été traitée pendant 72h au solvant DMSO ou au 5-FU à 50 μM et 186 μM. **a.** Les cellules ont ensuite été fixées à l'éthanol, marquées à l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux. **b.** Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes ± l'erreur standard à la moyenne de 4 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Tukey. *p<0,0332, **p<0,0021, ***p<0,0002.

autophagique dans les cellules MDA-MB-231 indépendamment du niveau d'expression de la claudine 1.

V. EFFETS DU 5-FU SUR LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES TNBC « CLAUDIN-1-LOW » MDA-MB-231

En plus d'être impliqué dans le processus autophagique, nous supposons que le 5-FU pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire dans la lignée MDA-MB-231. Le 5-FU est, en effet, un inhibiteur de la thymidilate synthase et donc de la synthèse des bases T de l'ADN (Longley et al., 2003). De plus, l'induction du processus autophagique dans les cellules cancéreuses est très souvent corrélée à un arrêt du cycle cellulaire (Mathiassen et al., 2017). Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées au 5-FU pendant 72 h à 50 et 186 μM . Les cellules ont ensuite été fixées et marquées à l'iodure de propidium puis analysées en cytométrie en flux (**Figure 79**). Le pourcentage de cellules en phase subG1 est faible et nous n'observons aucune différence entre les cellules contrôles ou traitées au 5-FU. Cette phase subG1 est caractéristique des cellules apoptotiques, par conséquent **ces résultats confirment que le 5-FU à 50 et 186 μM n'induit pas l'apoptose des cellules MDA-MB-231.** Le 5-FU à 50 μM induit une diminution significative de 1,43 fois du pourcentage de cellules en phase G0/G1. On observe également une augmentation du pourcentage de cellules en phase S de 2,82 et 1,96 fois à 50 et 186 μM de 5-FU respectivement. Enfin, le 5-FU induit à 50 et 186 μM une diminution de 4 et 10,4 fois du pourcentage de cellules de phase G2 respectivement. **Dans la lignée MDA-MB-231, le 5-FU induit l'accumulation des cellules en phase S et la diminution des cellules en phase G2 suggérant que le 5-FU induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S.**

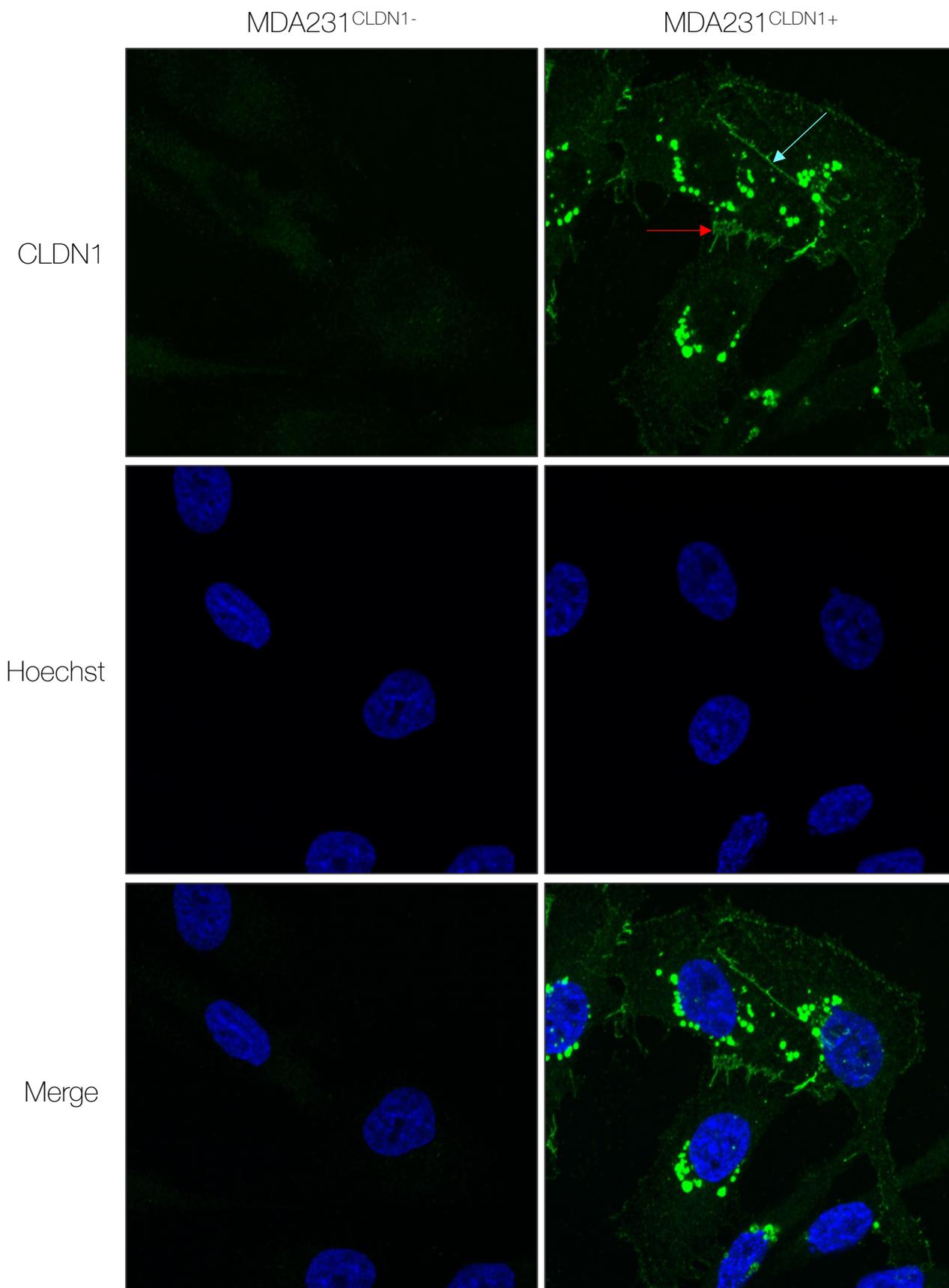
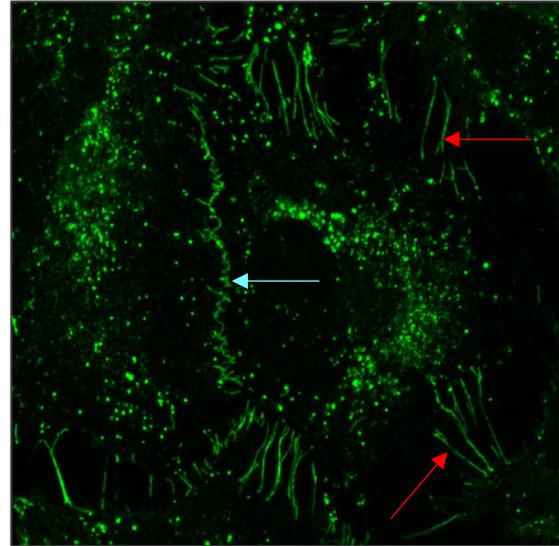
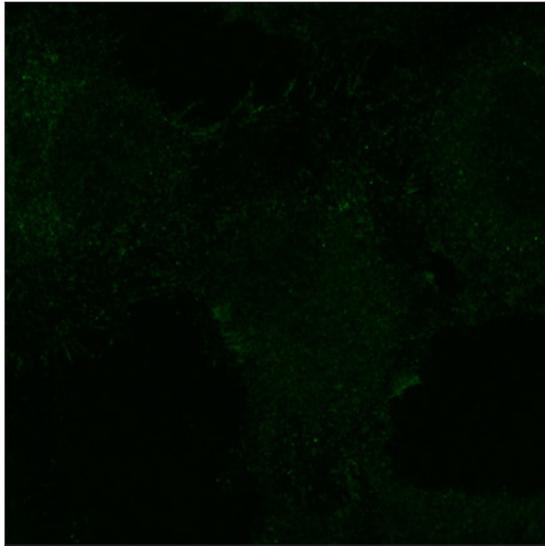


Figure 80 : Etude de la localisation de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231

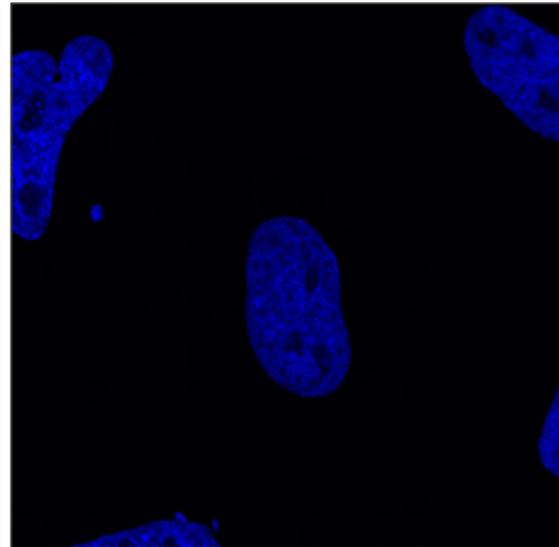
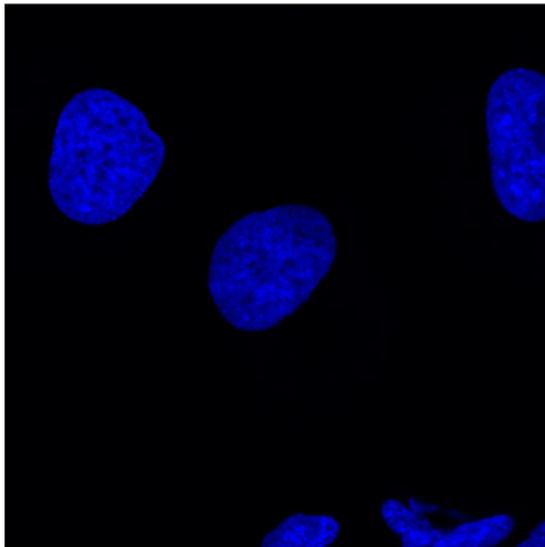
La localisation de la claudine 1 a été observée par immunocytofluorescence dans les lignées stables MDA-MB-231 (MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+}). Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les photographies ont été réalisées au microscope confocal au grossissement x1500. Les flèches rouges indiquent les prolongements cytoplasmiques et les flèches bleues indiquent le contact entre deux cellules. Les expériences ont été réalisées au sein du laboratoire IGBMC avec les docteurs Catherine Tomasetto et Fabien Alpy.

Hs578T^{CLDN1-}Hs578T^{CLDN1+}

CLDN1



Hoechst



Merge

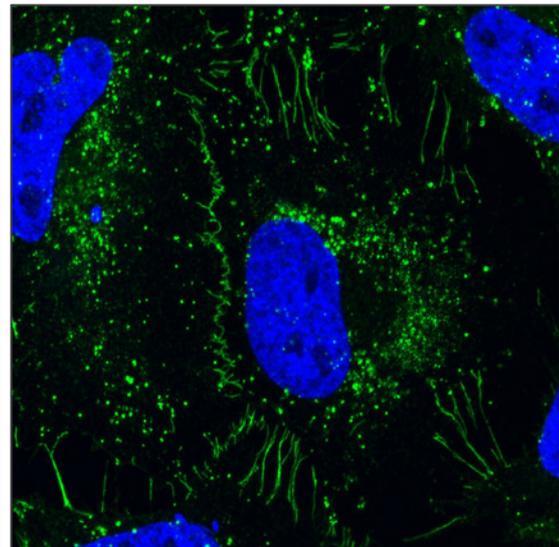
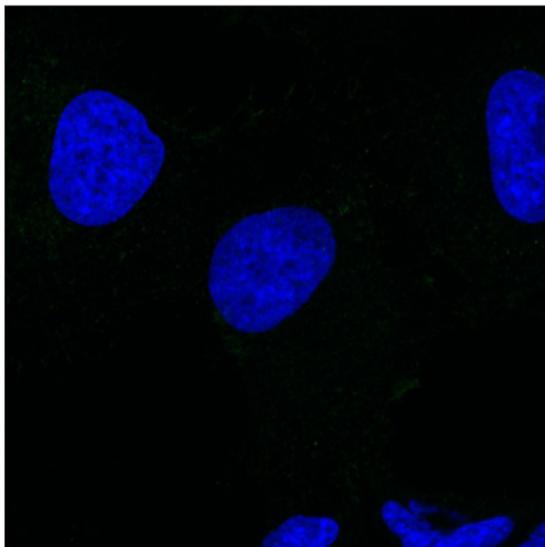


Figure 81 : Etude de la localisation de la claudine 1 dans les lignées stables Hs578T

La localisation de la claudine 1 a été observée par immunocytofluorescence dans les lignées stables Hs578T (Hs578T^{CLDN1-} et Hs578T^{CLDN1+}). Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les photographies ont été réalisées au microscope confocal au grossissement x1500. Les flèches rouges indiquent les prolongements cytoplasmiques et les flèches bleues indiquent le contact entre deux cellules. Les expériences ont été réalisées au sein du laboratoire IGBMC avec les docteurs Catherine Tomasetto et Fabien Alpy.

VI. LOCALISATION DE LA CLAUDINE 1 DANS LES CELLULES

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de ce manuscrit, plusieurs données de la littérature montrent que l'expression de la claudine 1 à la membrane plasmique induit l'apoptose des cellules tumorales mammaires. Ainsi, la localisation membranaire de la claudine 1 pourrait constituer un facteur important pour sensibiliser les cellules TNBC à l'apoptose. Dans ce contexte, nous avons initié l'étude de la localisation de la claudine 1 en réponse aux différents agents de chimiothérapie. Pour cette analyse, nous avons établi une collaboration avec les Docteurs Catherine Tomasetto et Fabien Alpy du laboratoire IGBMC d'Illkirch.

1) Caractérisation de la localisation de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T stables

Ces travaux ont débuté par la caractérisation de la localisation de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231 (**Figure 80**) et Hs578T (**Figure 81**) surexprimant ou pas la claudine 1. Comme attendu, aucune expression de la claudine 1 n'est observée dans les lignées MDA231^{CLDN1-} et Hs578T^{CLDN1-}. Les cellules MDA231^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1+} présentent un fort marquage pour la claudine 1. Ce marquage est plus intense au niveau de la zone de contact entre cellules où il se présente sous forme d'une ligne continue suggérant que la claudine 1 pourrait être membranaire. De plus, on observe que la claudine 1 est fortement exprimée dans les prolongements cytoplasmiques qui semblent joindre les cellules entre elles. Ces prolongements sont bien visibles dans les cellules Hs578T^{CLDN1+} du fait de leur grande taille. La claudine 1 est également cytoplasmique dans les deux lignées cellulaires. Le marquage cytoplasmique ponctiforme suggère qu'elle est contenue dans des vésicules. Ce marquage ponctiforme est plus marqué pour les cellules MDA231^{CLDN1+}.

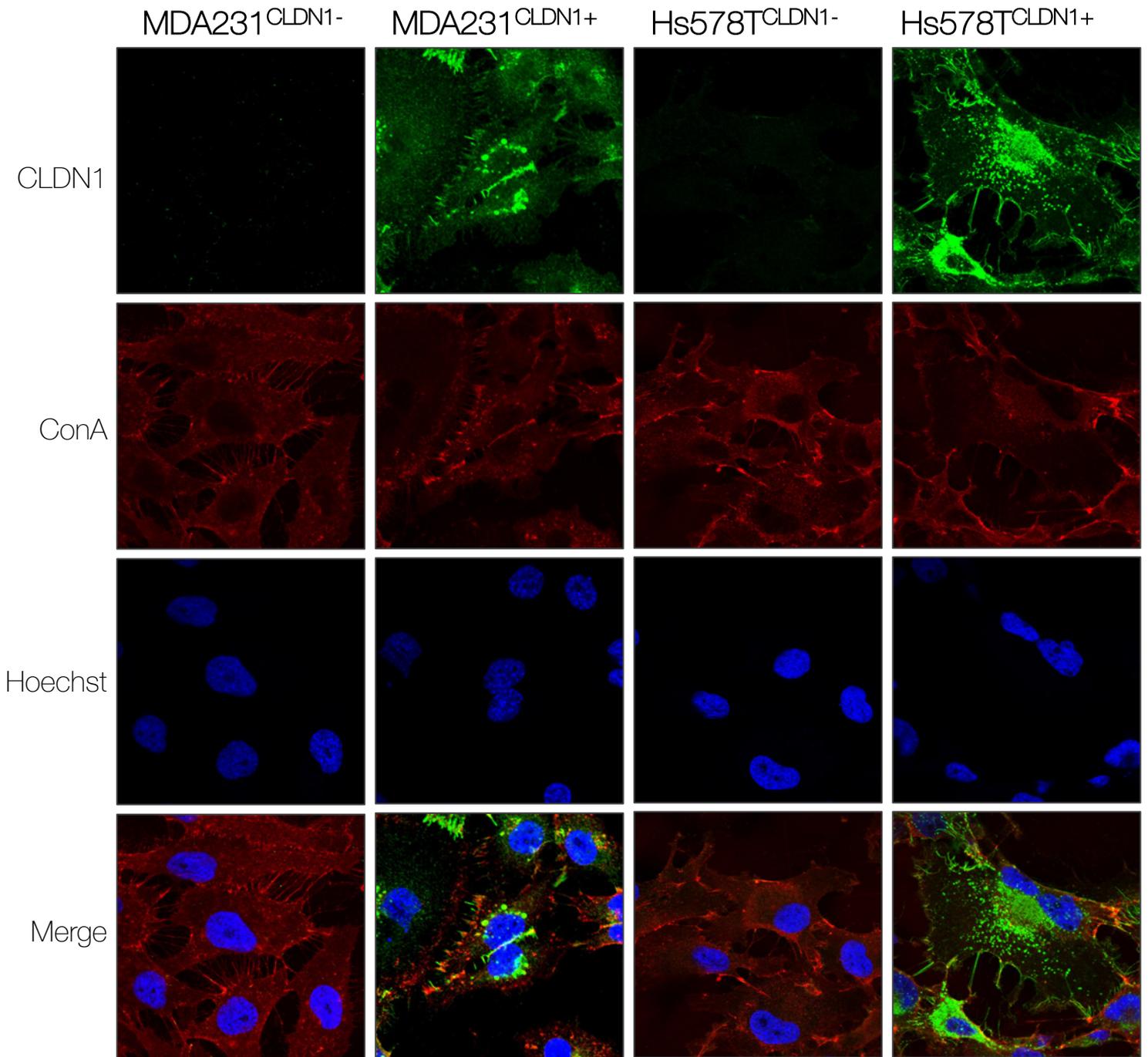


Figure 82 : Vérification de la localisation membranaire de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T

La localisation de la claudine 1 a été observée dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T (MDA231^{CLDN1-}, MDA231^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1-}, Hs578T^{CLDN1+}). Les cellules ont été incubées avec la concanavoline A puis fixées et immunomarquées avec un anticorps dirigé contre la claudine 1. Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les photographies ont été réalisées au microscope confocal au grossissement x1000. Les expériences ont été réalisées au sein du laboratoire IGBMC avec les docteurs Catherine Tomasetto et Fabien Alpy.

2) Étude de la localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules TNBC

Afin de confirmer la localisation membranaire de la claudine 1, nous avons utilisé la concanavaline A. La concanavaline A (conA) est une glycoprotéine de la famille des lectines qui se lie spécifiquement aux lipoprotéines membranaires et marque donc les membranes cellulaires. La concanavaline A a été incubée sur cellules vivantes puis les cellules ont été fixées et l'immunofluorescence a été réalisée pour analyser la localisation de la claudine 1.

a) Localisation membranaire de la claudine 1 dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T exprimant stablement la claudine 1

J'ai débuté ses travaux au sein du laboratoire IGBMC d'Illkirch avec les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T (**Figure 82**). Le marquage de la concanavaline A est légèrement cytoplasmique dans toutes les cellules. Cependant, on peut observer un marquage plus fort à la membrane plasmique des cellules. Dans les cellules MDA231^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1+}, nous observons la colocalisation de la claudine 1 avec la concanavaline A au niveau de la membrane plasmique confirmant qu'**une partie du marquage de la claudine 1 est bien membranaire**.

b) Localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules TNBC traitées aux agents de chimiothérapie

J'ai ainsi poursuivi l'étude de la localisation membranaire de la claudine 1 en réponse aux différents agents de chimiothérapie au laboratoire afin de déterminer s'il existe un lien entre la localisation membranaire de la claudine 1 et la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie. Ainsi, les lignées HCC1806 et MDA-MB-231 ont été traitées pendant 72 h avec 50 μ M de 5-FU, 5 nM de PTX et 86 nM de DOX. La concanavaline A a été incubée sur cellules vivantes puis les cellules ont été fixées et un marquage en immunofluorescence a été réalisée pour analyser la localisation de la claudine 1.

HCC1806

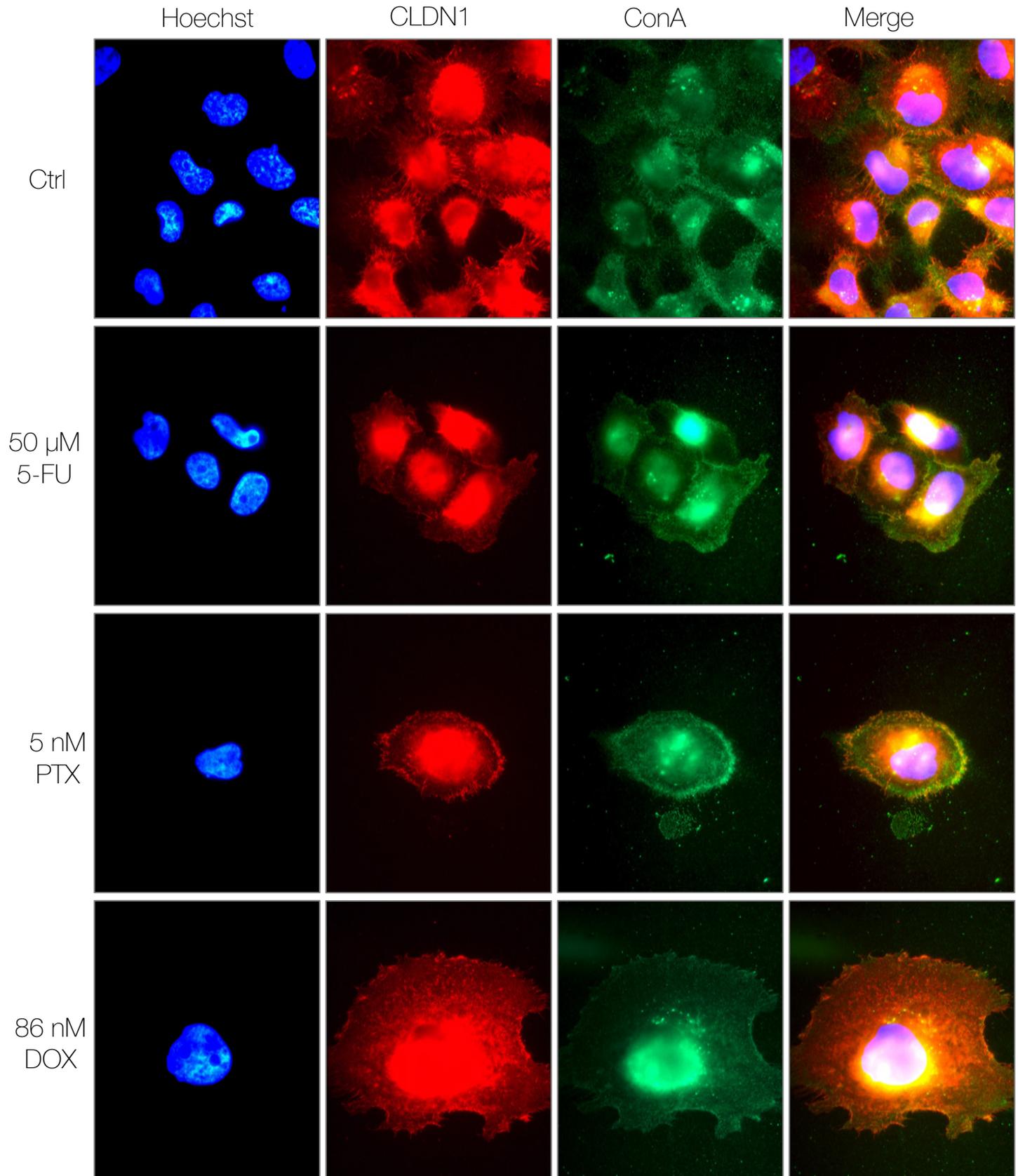


Figure 83 : Etude de la localisation membranaire de la claudine 1 dans la lignée HCC1806 traitée aux agents de chimiothérapie

Les cellules HCC1806 ont été traitées pendant 72h au 5-FU à 50 μ M, au PTX à 5 nM et à la DOX à 86 nM. Les cellules ont été incubées avec la concanavoline A puis fixées et immunomarquées avec un anticorps dirigé contre la claudine 1 pour étudier sa localisation. Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les photographies ont été réalisées au microscope à fluorescence au grossissement x1000.

i) Localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules HCC1806 traitées aux agents de chimiothérapie

Les cellules HCC1806 traitées et non traitées, la concanavoline A présente un marquage diffus mais localisé au niveau de la membrane plasmique. On observe également dans toutes les conditions un fort marquage perinucléaire de la claudine 1. Les cellules HCC1806 contrôles et traitées avec les différents agents de chimiothérapie présentent un fort marquage de la claudine 1 dans les prolongements cytoplasmiques mais également au niveau des contacts cellule-cellule. Ces prolongements sont plus nombreux et plus marqués dans les cellules contrôles. Dans les cellules contrôles, on observe la colocalisation de la claudine 1 avec la concanavoline A au niveau des prolongements cytoplasmiques tandis que dans les cellules traitées aux agents de chimiothérapie, cette colocalisation est plus intense au niveau de la membrane plasmique. Lors des traitements, nous observons la colocalisation de la claudine 1 avec la concanavoline A au niveau de la membrane plasmique (**Figure 83**). **Ces résultats confirment que la claudine 1 est localisée à membrane dans les cellules HCC1806 traitées aux trois agents de chimiothérapie.**

MDA-MB-231

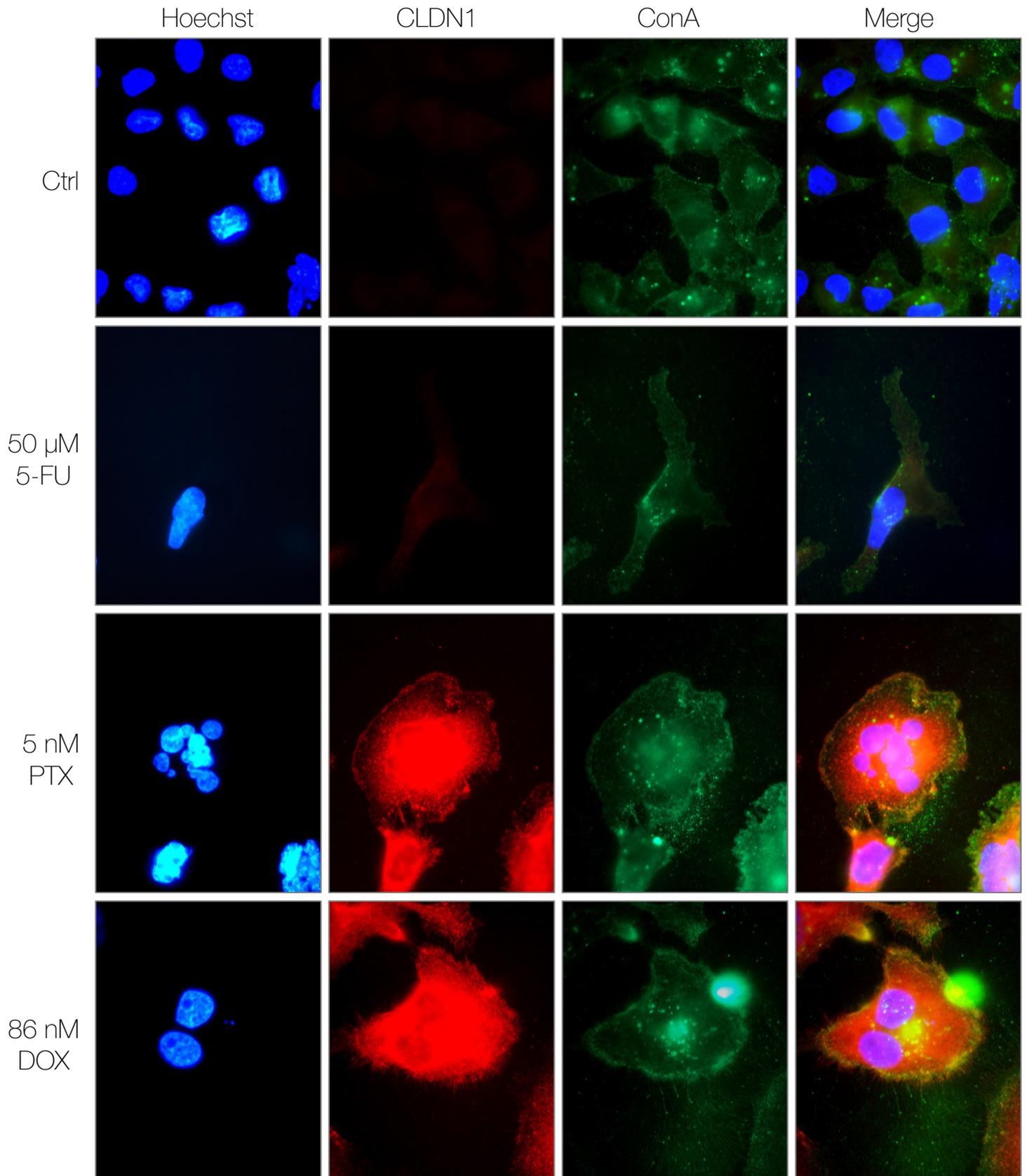


Figure 84 : Etude de la localisation membranaire de la claudine 1 dans la lignée MDA-MB-231 traitée aux agents de chimiothérapie

Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 72h au 5-FU à 50 μ M, au PTX à 5 nM et à la DOX à 86 nM. Les cellules ont été incubées avec la concanavaline A puis fixées et immunomarquées avec un anticorps dirigé contre la claudine 1 pour étudier sa localisation. Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les photographies ont été réalisées au microscope à fluorescence au grossissement x1000.

ii) Localisation membranaire de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 traitées aux agents de chimiothérapie

Dans la lignée MDA-MB-231 et pour toutes les conditions, le marquage de la concanavaline A est diffus mais reste cependant localisé au niveau de la membrane plasmique. Les cellules MDA-MB-231 contrôles n'expriment pas la claudine 1 et celles traitées au 5-FU l'expriment très faiblement. Les cellules MDA-MB-231 traitées au PTX et à la DOX présentent un fort marquage perinucléaire de la claudine 1. Dans ces conditions, nous observons également la colocalisation de la claudine 1 avec la concanavaline A au niveau de la membrane plasmique (**Figure 84**). **Ces résultats confirment que la claudine 1 est également localisée à membrane plasmique des cellules MDA-MB-231 traitées aux au PTX et à la DOX.**

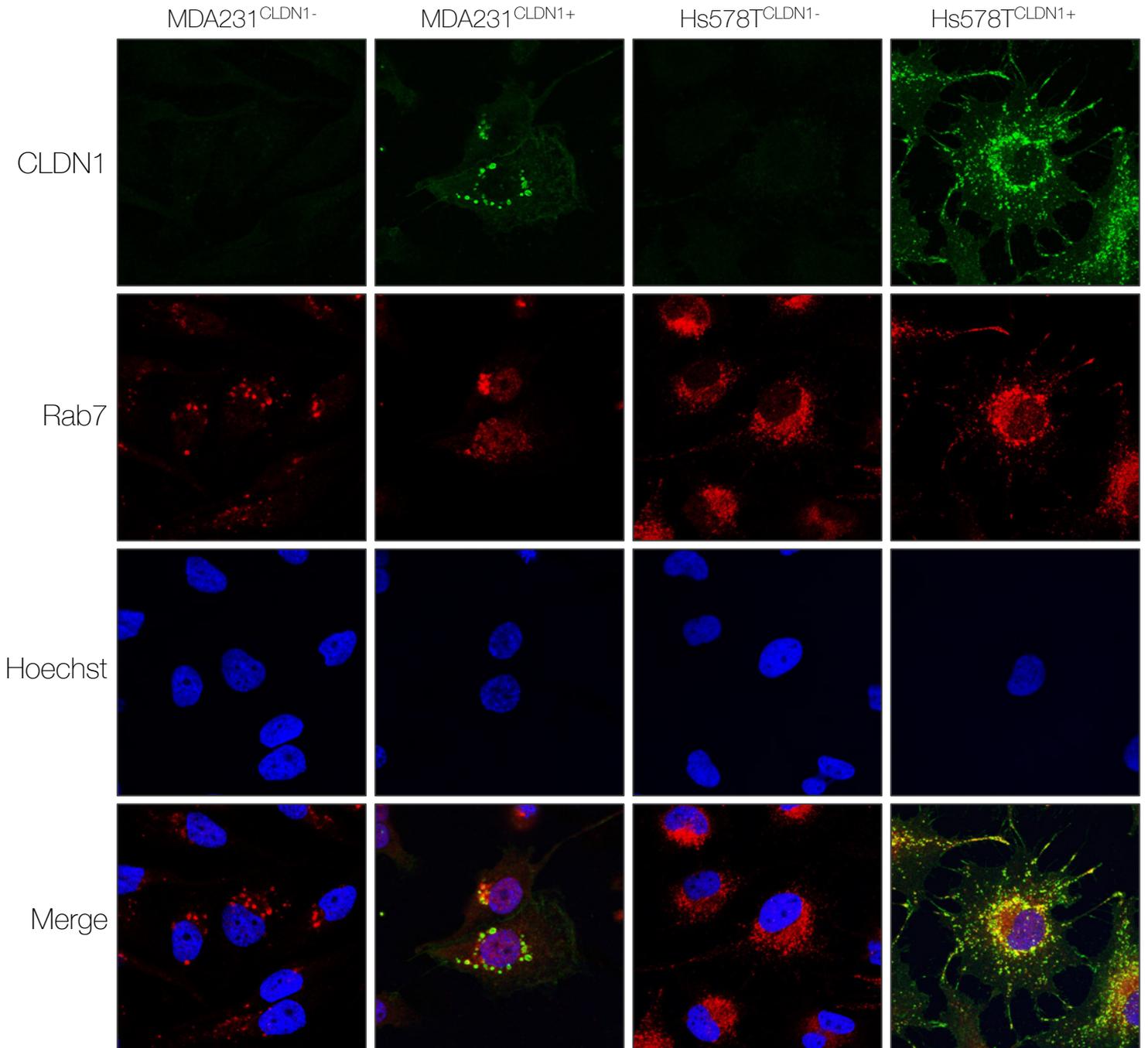


Figure 85 : Etude de la localisation cytoplasmique de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T

La localisation de la claudine 1 et de Rab7 a été observée par immunocytofluorescence dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T (MDA231^{CLDN1-}, MDA231^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1-}, Hs578T^{CLDN1+}). Les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les photographies ont été réalisées au microscope confocal au grossissement x1000. Les expériences ont été réalisées au sein du laboratoire IGBMC.

3) Localisation cytoplasmique de la claudine 1 dans les lignées stables MDA-MB-231 et Hs578T

Mes résultats mettent en évidence que la claudine 1 dans les lignées MDA231^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1+} n'est pas seulement exprimée à la membrane, mais elle est également contenue dans des vésicules cytoplasmiques. Comme nous l'avons vu dans la [partie introductive de ce manuscrit](#), lorsqu'elle est dans le cytoplasme, la claudine 1 peut être localisée et dégradée dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Günzel & Yu, 2013a; Shigetomi & Ikenouchi, 2018; Stamatovic et al., 2017b; Takahashi et al., 2009). Il a également été montré que la claudine 1 excédentaire, non incorporée à la membrane plasmique, est dégradée par protéolyse dans les lysosomes (Shigetomi & Ikenouchi, 2018; Takahashi et al., 2009). Dans le but de savoir si la claudine 1 cytoplasmique est internalisée dans les endosomes tardifs et les lysosomes, j'ai réalisé un marquage des cellules avec le marqueur Rab7. Ces expériences ont été réalisées au sein du laboratoire IGBMC en collaboration avec les Dr Catherine Tomasetto et Fabien Alpy qui ont développé l'anticorps anti-Rab7 (**Figure 85**).

Dans toutes les cellules, le marquage Rab7 est ponctiforme et indique la localisation des endosomes tardifs et des lysosomes. Dans les cellules MDA231^{CLDN1+} et Hs578T^{CLDN1+}, la claudine 1 semble être colocalisée avec le marqueur Rab7 dans le cytoplasme suggérant qu'elle serait localisée au moins en partie dans les endosomes tardifs et les lysosomes. **Nous pouvons ainsi supposer que la claudine 1 cytoplasmique est en partie dégradée au sein des lysosomes.**

Néanmoins, tout le marquage cytoplasmique de la claudine 1 n'est pas colocalisé avec celui de Rab7 suggérant que la claudine 1 pourrait être localisée dans d'autres endosomes.

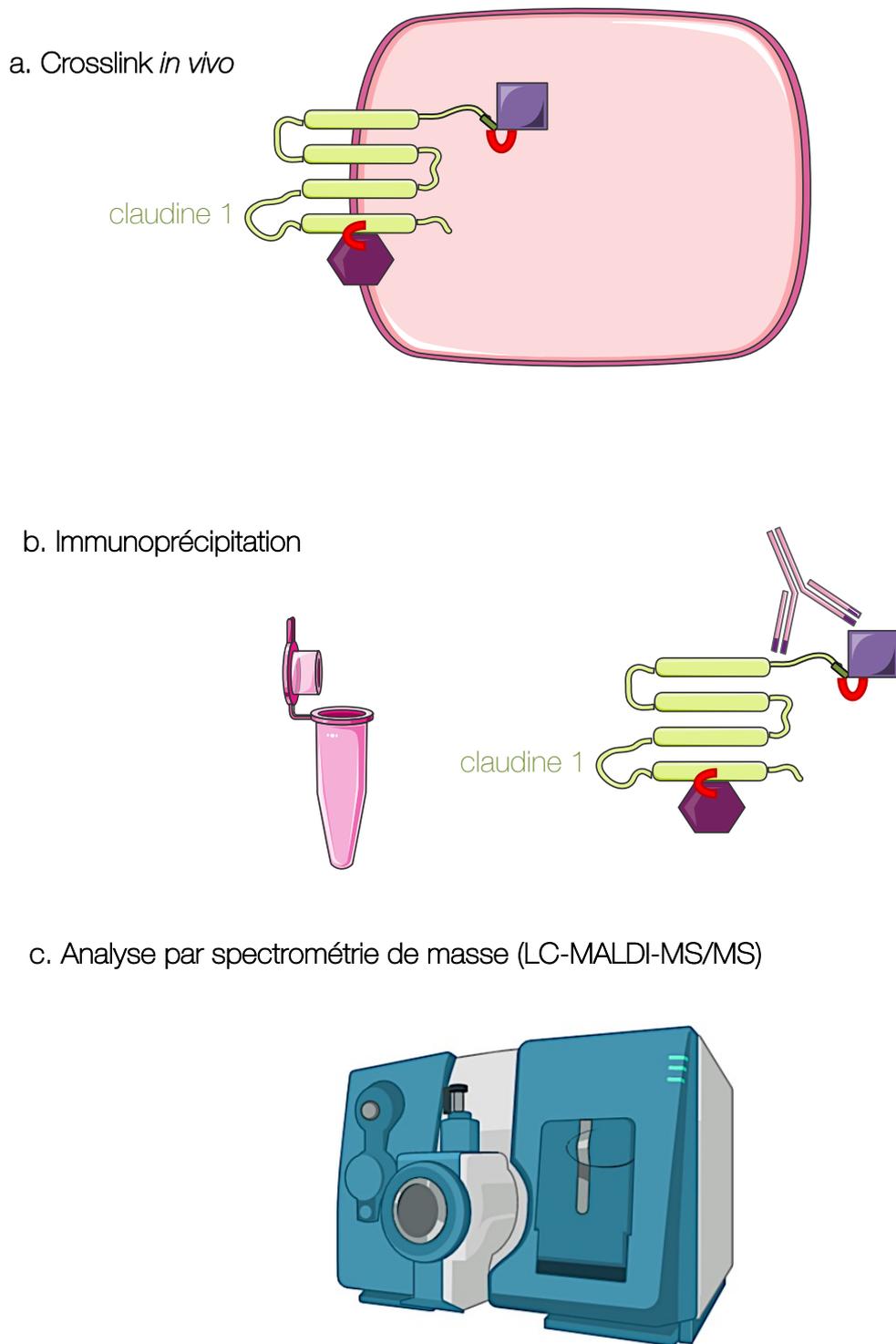


Figure 86 : Méthodologie d'identification des partenaires protéiques de la claudine 1

a. Les cellules seront incubées avec l'agent cross-linker DTME qui lie de manière covalente les cystéines proches. **b.** Les cellules seront ensuite lysées et immunoprécipitées avec l'anticorps anti-claudine 1. **c.** Les partenaires potentiels co-immunoprécipités seront ensuite analysés et identifiés par spectrométrie de masse (LC-MALDI-MS/MS). Ces travaux sont réalisés en collaboration avec les Dr Hortense Mazon et François Talfournier du laboratoire IMOPA à Nancy.

CHAPITRE 2 : LES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1 IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE DES CELLULES TNBC A LA CHIMIOOTHERAPIE.

Plusieurs études contradictoires suggèrent que la claudine 1 joue un rôle différent en fonction de sa localisation et de son interaction avec différents partenaires protéiques (J. Li, 2021). Dans les cellules cancéreuses mammaires, il a ainsi été montré qu'elle pourrait recruter le récepteur de mort FasR à la membrane et sensibiliser ces cellules aux agents de chimiothérapie (Fortier et al., 2013). Nous supposons donc que la claudine 1 pourrait interagir avec des protéines du récepteur de mort pour induire l'apoptose des cellules. Afin de déterminer son mode d'action dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 aux agents de chimiothérapie, il apparaît essentiel d'identifier clairement les partenaires avec qui elle interagit directement.

I. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'IDENTIFICATION DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1

La recherche de partenaires protéiques de la claudine 1 repose sur une méthodologie décrite par Kovalenko (**Figure 86**) (Kovalenko et al., 2007). Ce dernier a montré l'association de la tetraspanine CD9 avec la claudine 1 dans les cellules mammaires saines immortalisées MCF10A. Le protocole se présente en trois étapes :

- Le crosslink *in vivo* de la claudine 1 avec ses partenaires protéiques (**Figure 86a**)
- La co-immunoprécipitation de la claudine 1 liée à ses partenaires (**Figure 86b**)
- L'identification des partenaires protéiques par spectrométrie de masse (LC-MALDI-MS/MS) (**Figure 86c**)

Ces travaux sont réalisés en collaboration avec une équipe de biochimiste de l'équipe Enzymologie Moléculaire et Structurale du laboratoire IMOPA, les Dr Hortense Mazon et François Talfournier à Nancy.

La plupart des interactions protéines-protéines sont brèves. Le crosslink permet ainsi de stabiliser et de fixer les interactions protéiques pour permettre l'identification des

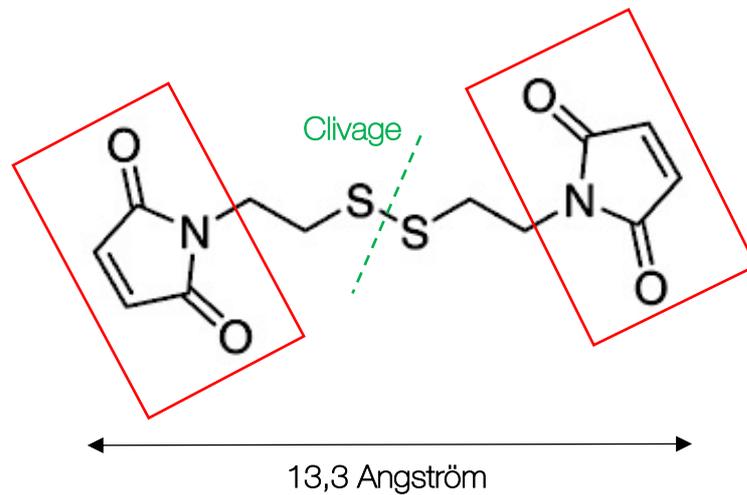


Figure 87 : Structure du DTME

Le DTME contient deux groupements maléimides à ces extrémités (encadré en rouge). Ces groupements sont très réactifs et sont capables de former des liaisons covalentes avec les cystéines de protéines très proches. Le DTME contient également une liaison disulfure qui relie les deux groupements maléimides et qui peut être clivée par des agents réducteurs comme le DTT. Le DTME présente une longueur de 13,3 angström.

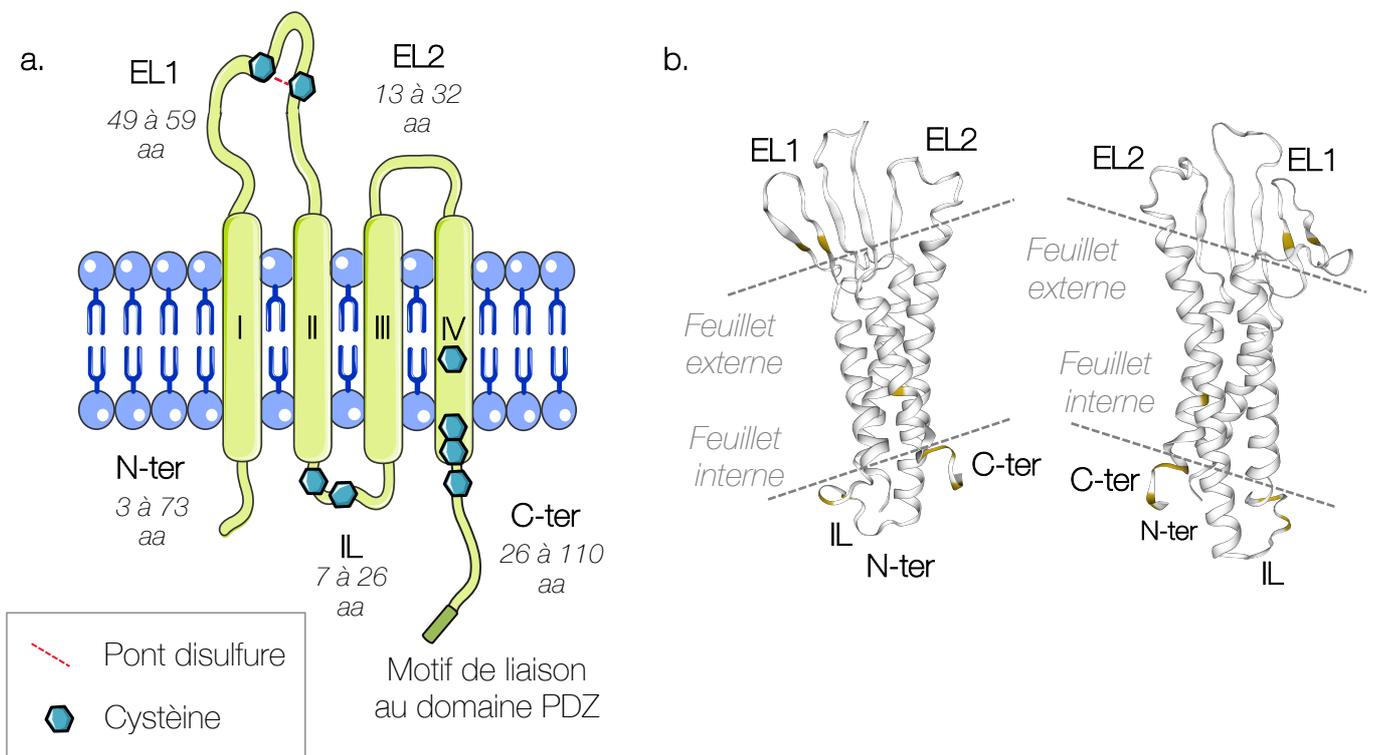


Figure 88 : Structure de la claudine 1 et localisation des cystéines

a. La claudine 1 possède 8 cystéines : deux au niveau de la boucle EL1, deux dans la boucle IL, trois dans le domaine transmembranaire IV et deux dans la queue C-terminale. **b.** Modélisation 3D swissmodel de la structure de la claudine 1 et localisation des cystéines en jaune.

interactions faibles ou transitoires entre les protéines. Le crosslink est une liaison qui relie deux séquences protéiques. Ces liaisons peuvent prendre la forme de liaisons covalentes ou de liaisons ioniques. Nous avons choisi d'utiliser le DTME, un agent de crosslink couramment utilisé pour explorer et caractériser les interactions protéiques. Il possède deux groupements maléimides à ces extrémités (**Figure 87**). Les groupements maléimides sont très réactifs et présentent une sélectivité très élevée pour les résidus de cystéines à pH 6,5-7,5. Les deux groupements maléimides sont liés par un pont disulfure (SH) qui forme le bras espaceur de l'agent crosslinker. Le DTME présente ainsi une longueur de 13,3 angströms. Le bras espaceur du DTME peut être clivé avec un agent réducteur tel que le dithiothréitol (DTT). Les protéines en interaction directe avec la claudine 1 peuvent ainsi être pontées par crosslink au niveau de leurs résidus cystéines accessibles situées à l'extérieur de la membrane plasmique avec un agent crosslinker. La claudine 1 possède 8 cystéines : deux dans la boucle EL1, deux dans la boucle IL, trois dans le domaine transmembranaire IV et une dans la queue C-terminale (**Figure 88**).

Pour la mise au point du crosslink *in vivo* (**Figure 89**), nous avons choisi de travailler avec les cellules MDA231^{CLDN1+} surexprimant la claudine 1, puisque son expression dans ces cellules induit leur apoptose. Les cellules MDA231^{CLDN1+} ont étéensemencées dans plusieurs flasques puis après 48h d'incubation à 37°C, les six flasques ont été rincées deux fois au PBS puis incubées avec le DTME pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Une flasque contrôles a été préparée et cinq concentrations de DTME différentes ont été testées 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM et 1 mM. La solution de DTME a ensuite été enlevée puis les cellules ont été incubées 10 minutes avec la solution de quenching dont le but est de saturer le DTME restant en ajoutant de la cystéine en excès sur les cellules.

Après l'incubation avec ou sans DTME, les cellules sont rincées au PBS à 4°C puis incubées avec 200 µL de tampon de lyse pendant 20 minutes à 4°C. J'ai également mis au point de la technique de lyse des cellules dans ces expériences : l'objectif étant d'ajouter le volume de tampon suffisant pour lyser les cellules sans trop diluer les

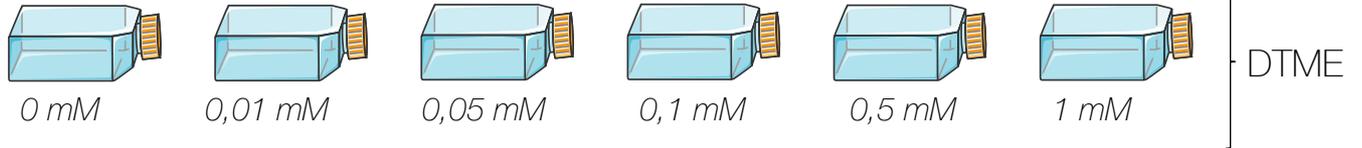
Jour 1

- ✓ Ensemencement des cellules MDA231^{CLDN1+} à $12,5 \cdot 10^5$ cellules/ flasque dans 5 mL



Jour 3

- ✓ Incubation avec DTME pendant 30 minutes



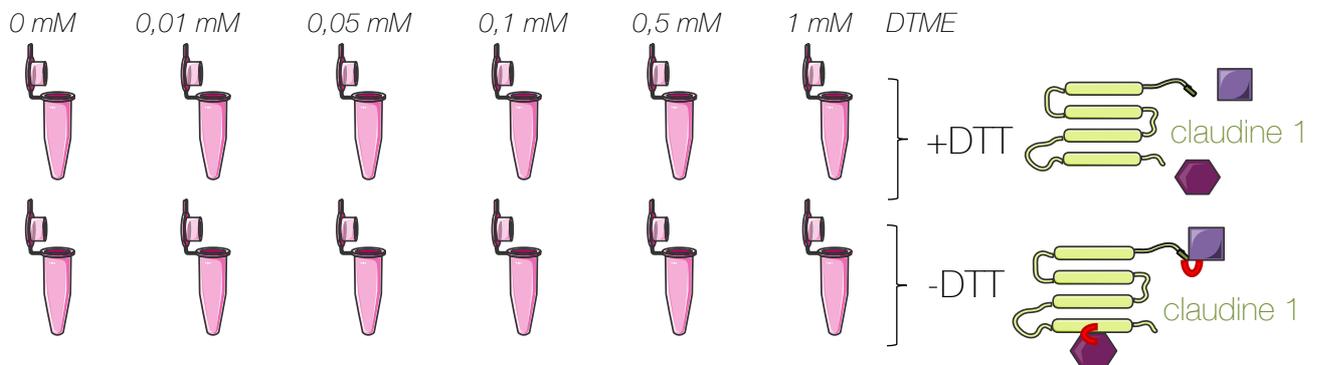
- ✓ Lyse des cellules 200 μ L RIPA pendant 20 min à 4°C
- ✓ Préparation des échantillons protéiques



- ✓ Dépôt de 50 μ g de protéines par tube en double



- ✓ Incubation avec ou sans DTT 50 mM pendant 15 minutes à 4°C



- ✓ Dépôt des échantillons sur deux gels de polyacrylamide
- ✓ **Résultats attendus :**

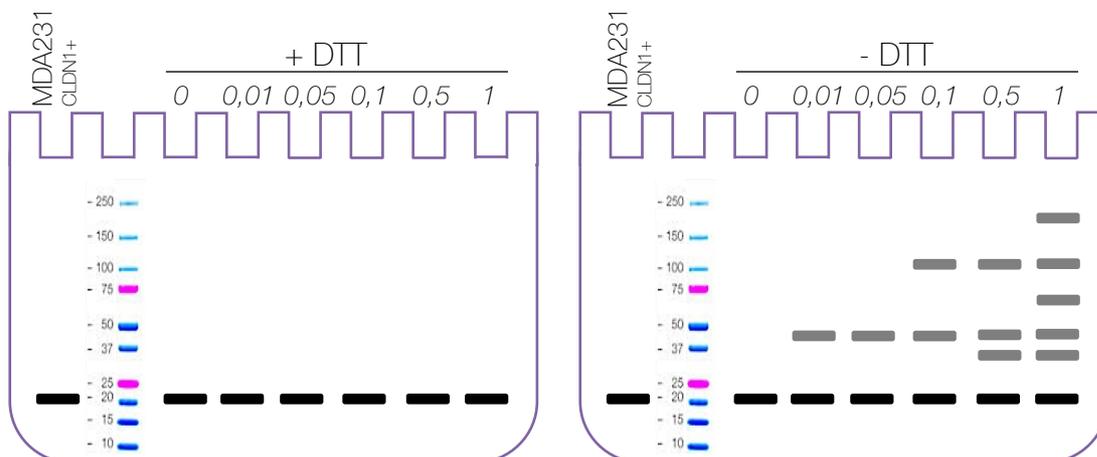


Figure 89 : Protocole de mise au point du crosslink *in vivo*

Les différentes étapes et conditions du protocole de crosslink *in vivo* sont détaillées.

protéines. J'ai ainsi testé différents tampons de lyse, ainsi que différents volumes et temps d'incubation. Le tampon de lyse retenu pour les expériences est le RIPA (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % acide déoxycholate, 0,1 % SDS). C'est un tampon doux qui permet de lyser les cellules tout en conservant les liaisons covalentes induites par le DTME. Le contenu de chaque flasque est collecté puis les tubes sont ensuite centrifugés à 14 000 g pendant 20 minutes à 4°C et les surnageants sont récupérés dans de nouveaux tubes. Afin de maximiser l'extraction des protéines, 20 µL de chaque surnageant est à nouveau ajouté dans les tubes de départ pour re-suspendre les culots cellulaires puis les tubes sont à nouveau incubés 20 minutes à 4°C. Ils sont ensuite centrifugés à nouveau à 14 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les surnageants sont ajoutés dans les nouveaux tubes. La re-suspension des culots cellulaires dans le tampon de lyse est réalisée jusqu'à 4 fois pour obtenir les conditions optimales d'extraction des protéines (**Figure 89**).

Les extraits protéiques sont dosés et pour chaque concentration de DTME, on prépare deux tubes avec 50 µg de protéines :

- Un tube est traité avec 50 mM de DTT pendant 15 minutes à 4°C. Cette étape a pour but de rompre les liaisons covalentes induite par le DTME.
- L'autre tube est le témoin et n'est pas traité au DTT. La claudine 1 reste donc liée à ses partenaires protéiques.

L'expression de la claudine 1 est ensuite analysée par western blot. Si les conditions de crosslink sont optimales, nous nous attendons à observer des résultats différents pour les conditions avec et sans DTT :

- Dans les conditions avec DTT, une seule bande sera observée à la taille de la claudine 1 (23 kDa) puisque les liaisons entre la claudine 1 et ses partenaires sont rompues sous l'effet du DTT.
- Dans les conditions sans DTT, nous nous attendons à observer plusieurs bandes à des poids moléculaires plus hauts que celui de la claudine 1 puisque cette dernière sera toujours reliée à son ou ses partenaires protéiques.

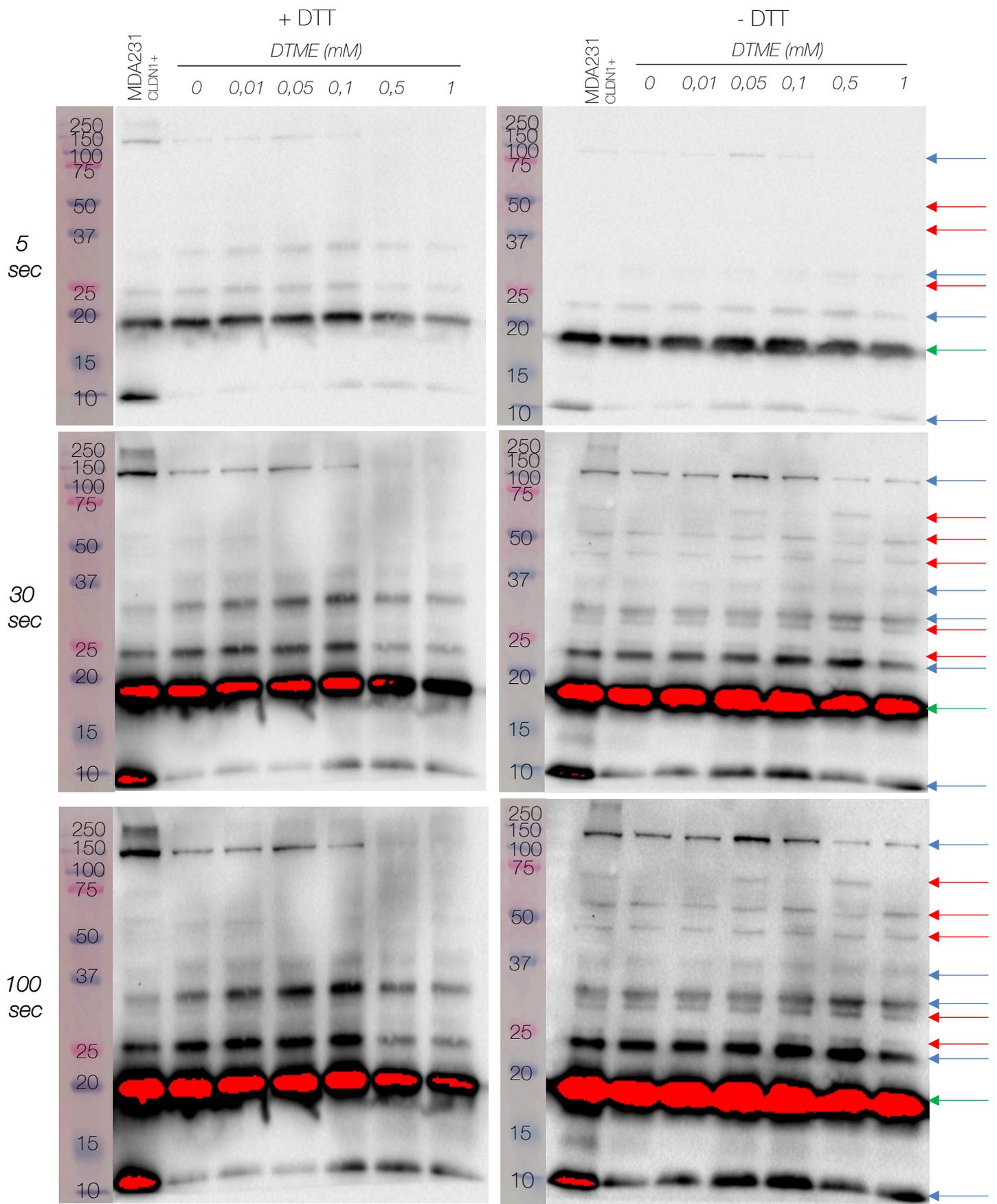


Figure 90 : Révélation des membranes immunomarquées avec l'anticorps dirigé contre la claudine 1
 Les 2 membranes avec et sans DTT ont été exposées à la chémoluminescence pendant 5, 30 et 100 secondes. Les protéines des cellules MDA231^{CLDN1+} ont été extraites et dénaturées et déposées avec le protocole classique décrit dans la partie matériel et méthode. Une photographie du marqueur de taille est alignée à gauche de chaque membrane. Les flèches vertes indiquent la présence de la claudine 1 native. Les flèches bleues indiquent la présence des bandes communes aux traitements avec et sans DTT. Les flèches rouges indiquent les bandes présentes uniquement sur la membrane sans DTT.

Nous comparons ainsi les marquages obtenus entre les conditions traitées ou non au DTT afin de discerner les bandes spécifiques obtenues grâce au DTME (**Figure 89**). Le dépôt protéique provenant des MDA231^{CLDN1+} extrait en conditions « classique » est un témoin qui permet aussi de visualiser les potentiels bandes aspécifiques sur les membranes.

Les membranes révélées par chimoluminescence présentent toutes la forme native de la claudine 1 pointée par la flèche verte (**Figure 90**). De nombreuses bandes aspécifiques sont également présentes sur les deux membranes (indiquées par des flèches bleues). On observe également la présence de bandes uniquement sur les membranes sans DTT. Ces bandes (pointées par les flèches rouges) pourraient indiquer la présence de la claudine 1 liée avec différents partenaires protéiques. Ces résultats sont encourageants et suggèrent que les conditions de crosslink testées dans ces expériences permettent de mettre en évidence la liaison de la claudine 1 avec ses protéines partenaires.

MDA-MB-231

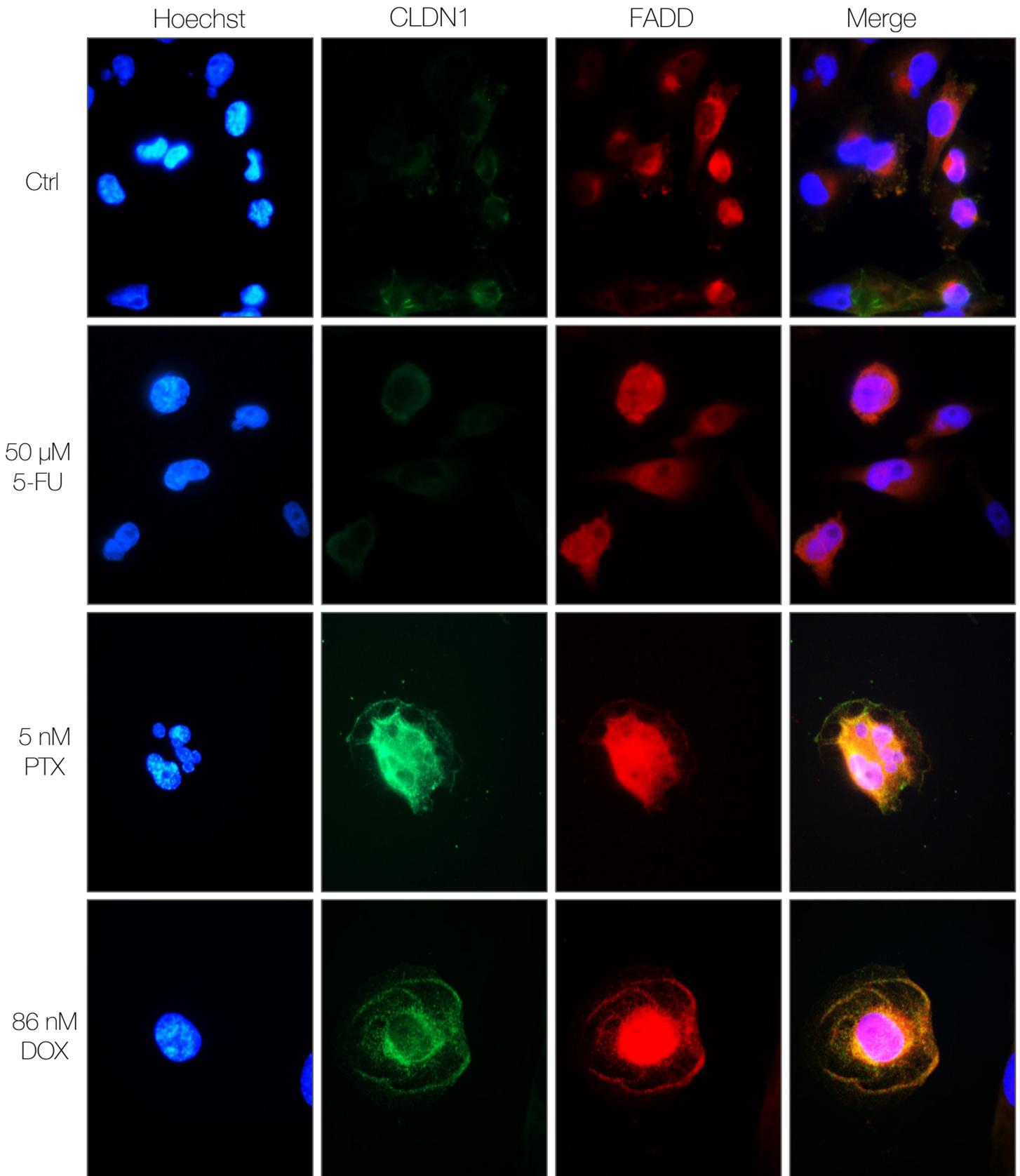


Figure 91 : Etude de la colocalisation de la claudine 1 et de FADD dans cellules MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 72h au 5-FU à 50 μ M, au PTX à 5 nM et à la DOX à 86 nM. La localisation de la claudine 1 et de FADD ont été observées par immunocytofluorescence et les noyaux ont été marqués au Hoechst. Les photographies ont été réalisées au microscope à fluorescence au grossissement x1000.

II. COLOCALISATION DE LA CLAUDINE 1 AVEC FADD

Mes résultats montrent que la claudine 1 est impliquée dans l'induction de l'apoptose de la lignée MDA-MB-231 traitées au 5-FU, au PTX et à la DOX. De plus, nous avons montré par immunofluorescence que la claudine 1 est en partie, localisée à la membrane dans ces conditions. Des études ont révélé que la claudine 1 peut être colocalisée avec le récepteur de mort FasR à la membrane plasmique lorsqu'elle est responsable de la mort des cellules (Fortier et al., 2013). FADD (Fas-associated protein with death domain) est une protéine adaptatrice qui relie les membres de la superfamille des récepteurs de mort, tels que FasR, aux procaspases 8 et 10 pour former le complexe de signalisation induisant l'apoptose (**Figure 45**). C'est pourquoi, l'étude de la colocalisation de la claudine 1 avec FADD a été étudiée dans la lignée MDA-MB-231 traitées au 5-FU (50 μ M), au PTX (5 nM) et à la DOX (86 nM) pendant 72 h.

Les cellules MDA-MB-231 contrôles et traitées au 5-FU n'expriment que très peu la claudine 1, ainsi aucun co-marquage de la claudine 1 et de FADD n'a pu être mis en évidence. Le PTX à 5 nM et la DOX à 86 nM induisent l'augmentation de l'expression de la claudine 1 comme nous l'avons observé en western blot ([Figure 48](#)). Dans ces conditions, on constate également la colocalisation de la claudine 1 et de FADD au niveau de la membrane plasmique (**Figure 91**). Ainsi, FADD et la claudine 1 semblent être colocalisés à la membrane plasmique lorsque les cellules MDA-MB-231 sont traitées au PTX et à la DOX.

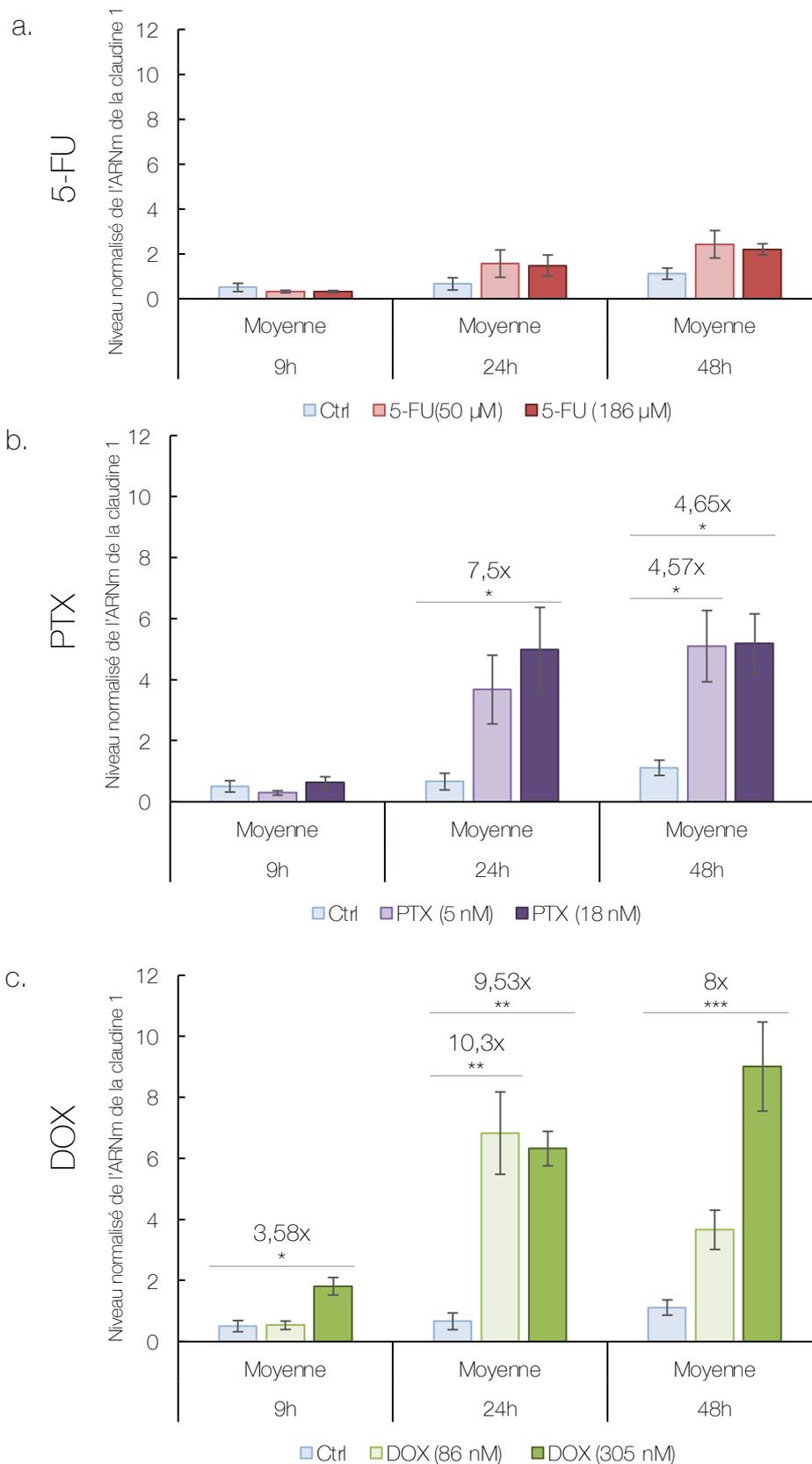


Figure 92 : Analyse de l'expression de l'ARNm de la claudine 1 par qPCR en réponse au 5-FU, au PTX et à la DOX dans la lignée MDA-MB-231

Les cellules de la lignée MDA-MB-231 ont été traitées pendant 9, 24 et 48h avec les 3 agents de chimiothérapie : **a.** 5-FU (50 et 186 μM), **b.** PTX (5 et 18 nM), **c.** DOX (86,2 et 305 nM). Les qPCR ont été réalisées avec des amorces spécifiques de la claudine 1. Les valeurs ont été normalisées avec les valeurs obtenues pour le gène de référence RPLPO par la méthode des ΔCT . Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 à 4 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Dunnett * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$.

CHAPITRE 3 : QUELS SONT LES FACTEURS CLES QUI STIMULENT L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1 ?

L'objectif de ce volet consiste à identifier les facteurs de transcription responsables de l'induction de l'expression de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 traitées par le PTX et la DOX.

I. ÉTUDE DU TRANSCRITS DE LA CLAUDINE 1 SOUS L'EFFET DES AGENTS DE CHIMIOThERAPIE

1) Lignée MDA-MB-231

Dans le but de vérifier que l'augmentation protéique de la claudine 1 observée en Western blot ([Figure 59](#)) est due à une augmentation de la transcription de son gène dans les cellules MDA-MB-231, des expériences de qPCR ont été réalisées. Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées au 5-FU (50 et 186 μ M), au PTX (5 et 18 nM) et à la DOX (86,2 et 305 nM) pendant 9, 24 et 48h, puis l'expression de la claudine 1 a été analysée par qPCR ([Figure 92](#)). Le 5-FU n'induit aucune augmentation significative du taux d'ARNm de la claudine 1 ([Figure 92a](#)), en cohérence avec nos données de western blot ([Figure 58](#)). Après 24 h de traitement à 18 nM de PTX, on constate une augmentation significative de 7,5 fois du taux de transcrits de la claudine 1. Une hausse significative ce de dernier de 4,57 et 4,65 fois est également notée après 48 h de traitement avec le PTX à 5 et 18 nM respectivement ([Figure 92b](#)) en accord avec l'augmentation de l'expression de la claudine 1 observée en western blot ([Figure 58](#)). Enfin, la DOX à 305 nM augmente significativement le taux de transcrits de la claudine 1 par rapport aux cellules contrôles de 3,58 fois après 9h de traitement ; de 9,53 fois après 24h de traitement et de 8 fois 48h de traitement. La dose de 86 nM entraine uniquement une augmentation du taux de transcrits de la claudine 1 de 10,3 fois à 24h de traitement ([Figure 92c](#)). Encore une fois, ces observations corroborent les résultats observés western blot ([Figure 58](#)). **Pour conclure, le PTX et la DOX induisent une augmentation significative de la transcription du gène de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231.**

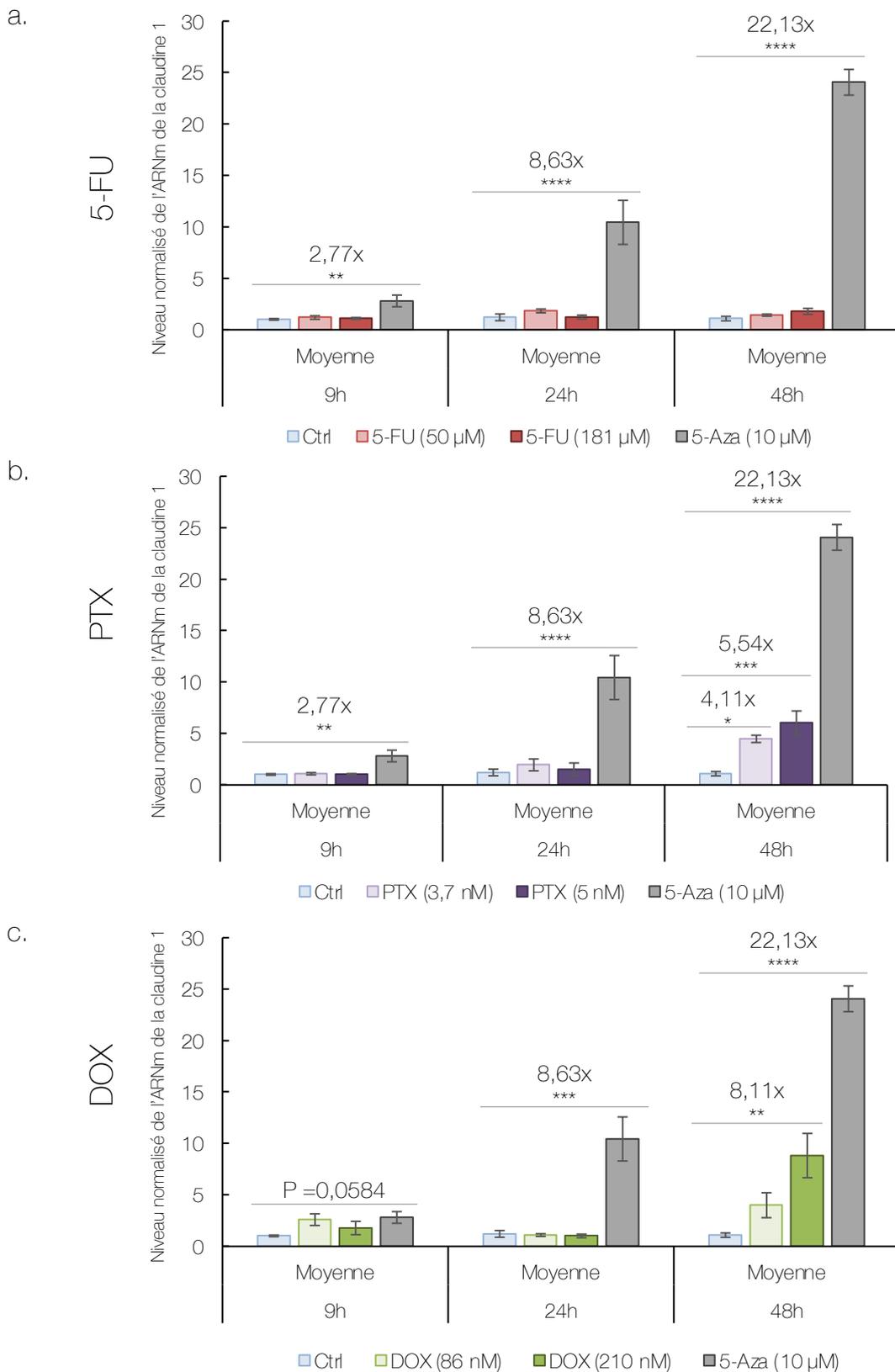


Figure 93 : Analyse de l'expression de l'ARNm de la claudine 1 par qPCR en réponse au 5-FU, au PTX et à la DOX dans la lignée Hs578T

Les cellules de la lignée Hs578T ont été traitées pendant 9, 24 et 48h par 3 agents de chimiothérapie : **a.** 5-FU (50 et 181 μM), **b.** PTX (3,7 et 5 nM), **c.** DOX (86,2 et 210 nM). Les cellules sont aussi traitées avec 10 μM de 5-aza pendant 72h comme témoins positif d'induction de la claudine 1. Les qPCR ont été réalisées avec des amorces spécifiques de la claudine 1. Les valeurs ont été normalisées avec les valeurs obtenues pour le gène de référence RPLPO par la méthode des $\Delta\Delta\text{CT}$. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne de 3 à 4 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Dunnett * $p < 0,0332$, ** $p < 0,0021$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

2) Lignée Hs578T

Les cellules Hs578T ont été traitées au 5-FU (50 et 181 μM), au PTX (3,7 et 5 nM), à la DOX (86 et 210 nM) et à la 5-aza (10 μM) pendant 9, 24 et 48h. L'analyse de l'expression de l'ARNm de la claudine 1 a ensuite été réalisée par qPCR. Comme aucun des agents de chimiothérapie n'induit l'expression de la claudine 1 en western blot ([Figure 48](#)), la 5-aza a été utilisée comme témoin positif pour ces expériences. La 5-aza induit l'augmentation du transcrite de la claudine 1 pour les traitements de 9h (2,77 fois), de 24 h (8,63 fois) et de 48 h (22,13 fois). Aucune augmentation de l'expression de l'ARNm de la claudine 1 n'est observée pour les traitements au 5-FU (**Figure 93a**) tandis que le PTX induit une augmentation significative de 4,11 et 5,54 fois à 3,7 et 5 nM respectivement après 48h de traitement (**Figure 93b**). Enfin, la DOX à 210 nM induit aussi une hausse significative de 8,11 fois du taux d'ARNm de la claudine 1 après 48h de traitement (**Figure 93c**). **Le PTX et la DOX semblent donc induire l'expression de l'ARNm de la claudine 1 bien que nous n'observions aucune augmentation significative de l'expression de la protéine en western blot.**

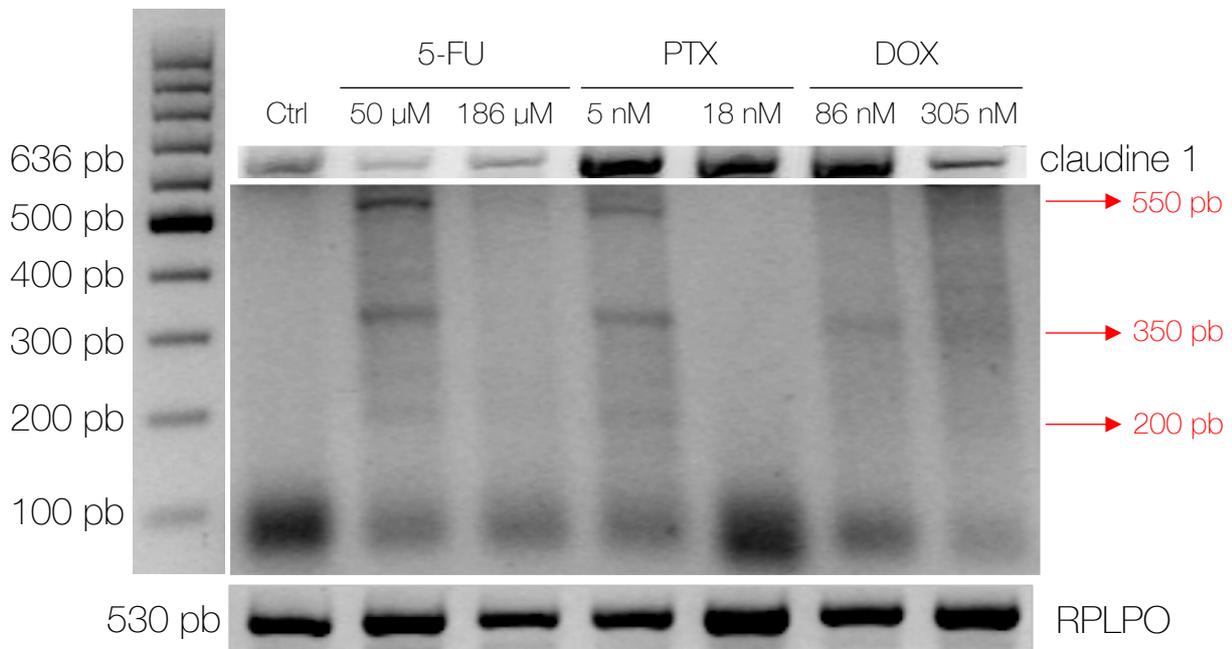


Figure 94 : Analyse de l'épissage alternatif de la claudine 1 en réponse aux agents de chimiothérapie dans la lignée MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 a été traitée pendant 72h au 5-FU à 50 et 186 μM , au PTX à 5 et 18 nM, et à la DOX à 86 et 305 nM. Les ARN totaux ont été extraits, rétrotranscrits et analysés par PCR (40 cycles). Le transcrits *full* length de la claudine 1 et différents fragments du transcrits de 550, 350 et 200 pb sont visibles sur le gel. RPLPO est le gène de référence.

3) Épissage alternatif

A la suite de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse d'un épissage alternatif de la claudine 1 induit par les agents de chimiothérapie. L'existence de ces formes épissées de la claudine 1 pourrait expliquer l'augmentation du transcrit de la claudine 1 dans la lignée Hs578T traitées au PTX et à la DOX. De même, ces formes épissées pourraient expliquer la légère expression de la claudine 1 induite par le 5-FU dans la lignée MDA-MB-231 constatée en immunofluorescence mais non détectée en western blot. L'équipe de Blanchard a mis en évidence des formes épissées de la claudine 1 de 615, 440, 362 et 217 pb ([Figure 14](#)) (Blanchard et al., 2016). Ainsi, les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 72 h au 5-FU (50 et 186 μ M), au PTX (5 et 18 nM), et à la DOX (86 et 305 nM). Par la suite, le couple d'amorces amplifiant toute la région codante de la claudine 1 a été utilisé pour les PCR (40 cycles) pour la recherche des formes épissées de la claudine 1 ([Figure 94](#)). Toutes les conditions présentent une expression de l'ARNm de la claudine 1 *full length* à 636 pb. Une forme de 550 pb est observée dans les conditions 50 μ M de 5-FU et 5 nM de PTX. Une forme à 350 pb est exprimée dans les conditions 50 μ M de 5-FU, 5 nM de PTX et 86 nM de DOX. Enfin une forme à 200 pb est retrouvée dans les conditions 50 μ M de 5-FU et 5 nM de PTX. Les fragments de 350 et 200 pb que nous avons amplifié sont relativement proches de ceux de 362 et 217 pb identifiés par l'équipe de Blanchard. Ces fragments pourraient ainsi correspondre à des formes épissées de la claudine 1 plus courtes que la forme *full length* induite par les agents de chimiothérapie.

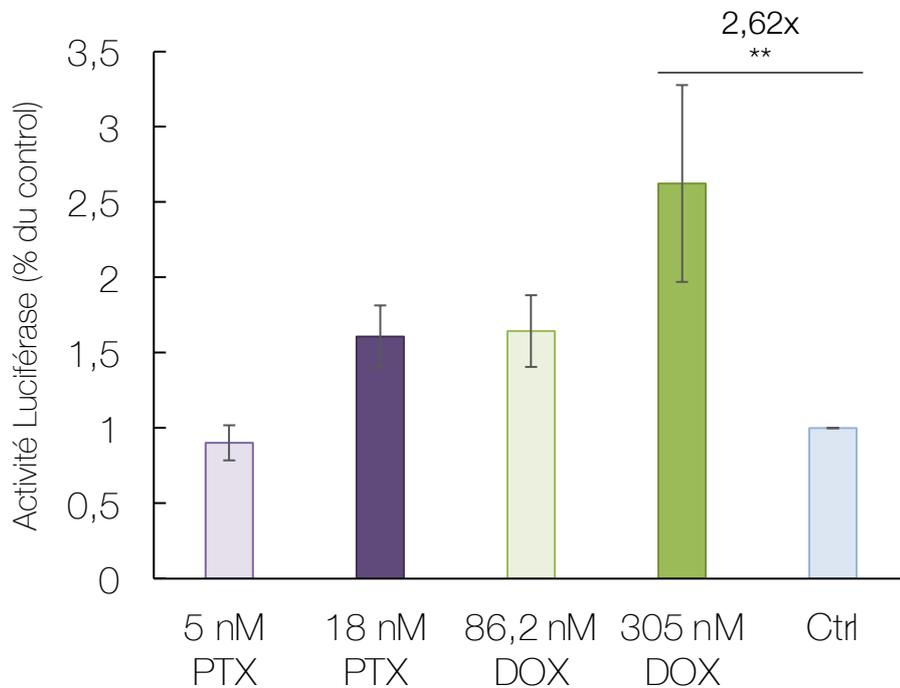


Figure 95 : Analyse de l'activité du promoteur de 1000 pb de la claudine 1 en réponse au PTX et à la DOX

La lignée MDA-MB-231 a été transfectée avec le vecteur pGL3 luciférase contenant le promoteur minimal de 1000 pb de la claudine 1 et un vecteur de contrôle de l'efficacité de transfection pRL-TK Renilla Luciférase. Les cellules ont été traitées pendant 48h au PTX (5 et 18 nM) et à la DOX (86 et 305 nM). L'activité luciférase a été mesurée à l'aide du kit Dual-Glo Luciferase Assay System. Les mesures de l'activité luciférase Firefly ont été normalisées à celles de l'activité Renilla. Les valeurs obtenues pour chaque traitement correspondent à la moyenne +/- SEM de 5 expériences indépendantes. Les statistiques ont été réalisées avec une analyse ANOVA et test post-hoc de Dunnett ** $p < 0,0021$.

II. ÉTUDE DE L'ACTIVITE DU PROMOTEUR DE 1000 PB DE LA CLAUDINE 1

L'objectif de ce volet consiste à identifier la région promotrice minimale responsable de l'induction de l'expression de la claudine 1 induite par le PTX et la DOX dans les cellules MDA-MB-231. Les données de la littérature montrent que le promoteur de la claudine 1 présente une activité située entre -1160 et +160 pb par rapport au TSS (Blanchard et al., 2016). Par conséquent, nous avons choisi d'étudier la région promotrice de 1000 pb. Une extraction d'ADN génomique a été réalisée, puis le fragment du promoteur de 1000 pb de la claudine 1 a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques. Enfin, le fragment obtenu a été inséré dans le plasmide pGL3-Basic Firefly Luciferase et cette construction a été validée par séquençage. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec la construction de 1000 pb et traitées pendant 48 h au PTX (5 et 18 nM) ou à la DOX (86 et 305 nM). Les mesures d'activité luciférase avec la construction de 1000 pb de la région promotrice du gène de la claudine 1 ont ensuite été réalisées (**Figure 95**). Nos résultats montrent que seule la DOX induit une augmentation significative de l'activité luciférase à 305 nM. Ces résultats sont cohérents avec nos résultats de qPCR. **Pour conclure, seule la DOX induit une activité du promoteur de 1000 pb du gène de la claudine 1. Le PTX n'augmente pas l'activité luciférase suggérant que la région de 1000 pb du promoteur de la claudine 1 n'est pas impliquée dans l'augmentation de son expression.**

III. ANALYSE BIOINFORMATIQUE DES SITES POTENTIELS SUR LE PROMOTEUR DE 1000 PB DE LA CLAUDINE 1

A la suite de ces résultats, des analyses bio-informatiques ont été réalisées pour trouver des facteurs de transcription susceptibles de se lier sur la région de 1000 pb du promoteur de la claudine 1. Nous avons commencé par utiliser la base de données JASPAR CORE (collection CORE, taxon vertébrés et espèce Homo sapiens). Les facteurs situés sur le brin positif avec un score > 0.98 ont été sélectionnés. Nous avons trouvé 29 facteurs de transcription possédant un ou plusieurs sites de liaison. Afin de conforter les résultats obtenus avec la banque de données JASPAR, nous avons également réalisé cette analyse avec la base de données TRANSFAC. Nous avons identifié 28 sites dont 10 sont

identiques à ceux caractérisés avec l'analyse JASPAR. Tous les facteurs identifiés par ces deux analyses bio-informatiques appartiennent à 9 grandes classes :

- Basic helix-loop-helix factor (bHLH),
- C2H2 zinc finger factors,
- Forkhead/winged helix factors,
- High-mobility group (HMG) domain factor,
- Homeodomain factors,
- Nuclear receptors with C4 zinc fingers,
- Others C4 zinc finger-type factors,
- SMAD/NF-1 DNA-binding domain factors,
- Ets-related factors.

Parmi les différents facteurs identifiés par JASPAR, 3 présentent des scores prédictifs élevés pour la région promotrice de 1000 bp : **Meis1** (-710) (Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1 Homolog), **Sox10** (-540) et **Ets1** (- 110) (Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1). Les recherches bibliographiques révèlent que ces 3 facteurs de transcription pourraient être pertinents pour notre étude.

- **Meis1** est un facteur de transcription à homéodomaine dont l'expression est réprimée dans les tumeurs mammaires. Une étude récente a montré que Meis1 se lie sur le promoteur de l'ARN long non codant SNORD3A et active sa transcription dans les cellules MDA-MB-231 ce qui augmente leur sensibilité au 5-FU (Luo et al., 2020). Ce facteur pourrait ainsi constituer un régulateur positif de la claudine 1.
- Le facteur de transcription **Sox10** est fortement exprimé dans 30 % des cellules TNBC (Al-Zahrani et al., 2018). De plus, dans les tumeurs mammaires, l'expression de Sox10 est associée aux tumeurs TNBC de haut grade fortement métastatiques (Jin et al., 2020).
- Le facteur **Ets1**, un membre de la famille Ets-related factors, régule l'expression des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Ce facteur est surexprimé dans des modèles de cellules MCF-7 résistantes à la DOX ou au PTX (Kars et al., 2010). Dans les cellules MDA-MB-231, l'inhibition de l'expression de

Ets1 par ARN interférence inhibe l'invasion cellulaire (Nazir et al., 2019). Ce facteur pourrait ainsi constituer un régulateur négatif de la claudine 1.

Parmi les 3 facteurs retenus par l'analyse JASPAR, seul le facteur **Ets1** a été retrouvé avec l'analyse TRANSFAC. Selon cette dernière analyse, deux autres facteurs de transcription semblent être pertinents : **CTCF** (CCCTC-Binding Factor Like) (-320) et **TFAP2 α** (Transcription factor AP-2-alpha) (-180). Ils possèdent un seul site de fixation sur la région promotrice de 1000 bp validé par des expériences de CHIP.

- **CTCF** est exprimé dans les cellules souches cancéreuses mammaires (CSCma) et une récente étude suggère que le ciblage de CTCF par immunothérapie permet d'éliminer les CSCs et de réduire les métastases (Loukinov, 2018). Ce facteur pourrait ainsi être un répresseur transcriptionnel de la claudine 1.
- Le facteur de transcription **TFAP2 α** est un membre de la famille des facteurs de transcription AP-2. Dans les tumeurs mammaires invasives, TFAP2 α est faiblement exprimé et semble jouer un rôle suppresseur de tumeur (Gee et al., 1999; J. Zhang et al., 2003). Il a été montré que la surexpression de TFAP2 α augmente la sensibilité des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine et qu'il joue donc un rôle dans la sensibilité de ces cellules à la chimiothérapie (Jonckheere et al., 2009).

Les cinq facteurs retenus avec les deux analyses bio-informatiques ne présentent aucun lien avec la claudine 1. Dans un premier temps, nous commencerons par vérifier s'il existe une corrélation entre leur expression et celle de la claudine 1 en réponse à la DOX. Pour les facteurs pertinents, nous vérifierons par mutagenèse dirigée et Chromatine immunoprécipitation s'ils peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression de la claudine 1 en réponse à la DOX.

DISCUSSION

Les tumeurs mammaires de type TNBC sont définies par l'absence des trois marqueurs ER, PR et HER. Elles constituent le sous-type tumoral mammaire le plus hétérogène (Rakha & Pareja, 2021). Les patients atteints de TNBC présentent le pronostic vital le moins favorable parmi tous les sous-types mammaires (Szymiczek et al., 2021) et leur prise en charge thérapeutique repose principalement sur la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie. En dépit de l'existence de différents traitements pour les TNBC, il a été montré que ces tumeurs deviennent rapidement insensibles voir résistantes aux traitements. Le manque de cibles thérapeutiques pour les patients atteints de TNBC constitue donc un obstacle majeur en cancérologie (S. Liu et al., 2005; Prat et al., 2010). De plus, il a été montré que 77% de ces tumeurs présentent une perte d'expression de la claudine 1, un constituant majeur des jonctions serrées (S. Lu et al., 2013). Dans ces tumeurs appelées TNBC « claudin-1-low », l'absence d'expression de la claudine 1 est corrélée à de plus fortes capacités métastatiques, à un fort taux de récurrence et à une moins bonne survie globale (F. Ma et al., 2014a). Ainsi les TNBC « claudin-1-low » sont de très mauvais pronostic et leur prise en charge thérapeutique est identique à celle des TNBC. Dans ce contexte, plusieurs travaux dont ceux de mon équipe ont mis en évidence que la claudine 1 pourrait être un suppresseur de tumeurs dans le cancer du sein (Blanchard et al., 2009; Gerhard et al., 2012; Krämer et al., 2000; S. Lu et al., 2013; Myal et al., 2010; Tokés et al., 2005; B. Zhou, Moodie, et al., 2015). En effet, la claudine 1 est impliquée dans l'inhibition de la TEM, de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Basu et al., 2017; Geoffroy et al., 2020; J. Li, 2021). La claudine 1 induit également l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires (Di Cello et al., 2013; Geoffroy et al., 2017; Hoevel et al., 2004) et joue un rôle dans la sensibilité des cellules cancéreuses à différents composés anticancéreux comme le cisplatine (Chiang et al., 2019b; Kwon, 2013; B. Zhou, Moodie, et al., 2015). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'expression de la claudine 1 pourrait permettre de sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives « claudin-1-low » à la chimiothérapie. **Au cours de ma thèse, j'ai principalement travaillé sur l'implication de la claudine 1 dans la**

sensibilité des cellules TNBC à la chimiothérapie. J'ai également débuté la recherche des partenaires protéiques de la claudine 1 qui expliqueraient son rôle dans la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie. Finalement j'ai initié l'étude des facteurs de transcription clés qui permettent la réexpression de la claudine 1 sous l'effet des agents de chimiothérapie.

I. L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1 PERMET DE SENSIBILISER LES CELLULES TNBC A LA CHIMIOOTHERAPIE

Pour étudier la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie, j'ai comparé 3 lignées TNBC présentant des niveaux différents d'expression de la claudine 1 :

- deux lignées « claudin-1-low » MDA-MB-231 et Hs578T qui n'expriment pas la claudine 1
- une lignée « claudin-1-high » HCC1806 qui exprime fortement la claudine 1

Mes travaux de thèse ont permis d'établir pour la première fois que **la lignée HCC1806 est plus sensible que les lignées MDA-MB-231 et Hs578T aux trois agents de chimiothérapie les plus couramment utilisés dans les combinaisons de chimiothérapie : le 5-FU, le PTX et la DOX.** Les lignées TNBC MDA-MB-231 et Hs578T sont connues pour être résistantes à la chimiothérapie (Fillmore & Kuperwasser, 2008; Sheridan et al., 2006). L'apoptose est, ainsi, 6,5 fois, 4 fois et 2,8 fois plus induite en réponse au 5-FU, au PTX et à la DOX respectivement dans la lignée HCC1806 qui exprime fortement la claudine 1 que dans les deux lignées « claudin-1-low ». Dans ce contexte, j'ai également montré que l'expression de la claudine 1 est corrélée à l'induction de l'apoptose dans la lignée MDA-MB-231 « claudin-1-low ». Ainsi le PTX et la DOX induisent l'expression de la claudine 1 ainsi que l'apoptose dans la lignée MDA-MB-231 tandis que le 5-FU n'induit aucun des deux. Ces résultats suggèrent que la claudine 1 pourrait jouer un rôle dans la sensibilité des cellules TNBC en réponse aux agents de chimiothérapie. Un faible niveau d'expression de la claudine 1 a déjà été associé à la résistance à la chimiothérapie dans des cellules cancéreuses de l'œsophage résistantes au PTX (X. Liu et al., 2021). Inversement, il a déjà été montré que l'expression de la claudine 1 augmente la sensibilité de cellules cancéreuses à différents composés anticancéreux comme le cisplatine, l'étoposide et la tamoxifène (Fortier et al., 2013; J.-E. Wu et al., 2020; B. Zhou, Blanchard,

et al., 2015). Cependant à ce jour, aucune étude n'est disponible sur la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie en fonction de l'expression de la claudine 1.

A la suite de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la claudine 1 pourrait être responsable des niveaux accrus d'apoptose observés dans la lignée HCC1806 et j'ai investigué son implication dans la sensibilité à l'apoptose de cette lignée. J'ai montré que l'inhibition de l'expression de la claudine 1 entraîne une moins forte sensibilité des cellules HCC1806 à l'apoptose induite par le 5-FU, le PTX et la DOX. **La claudine 1 est donc en partie impliquée dans l'entrée en apoptose des cellules HCC1806 traitées aux trois agents de chimiothérapie.** Cependant, elle n'est pas la seule responsable de l'induction de l'apoptose puisque lorsqu'elle est inhibée, le niveau d'apoptose n'est pas totalement réduit à celui des cellules non traitées.

Dans les cellules « claudin-1-low » MDA-MB-231, j'ai également mis en évidence que la claudine 1 est impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules traitées au PTX et à la DOX. Lorsque l'expression de la claudine 1 est inhibée par ARN interférence, les cellules MDA-MB-231 sont moins sensibles à l'apoptose induite par ces deux agents de chimiothérapie. De plus, comme pour les cellules HCC1806, la claudine 1 n'est pas seule responsable de l'induction de l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231. Les études de surexpression de la claudine 1 dans les cellules « claudin-1-low » confirment que **l'expression de la claudine 1 permet bien de sensibiliser les cellules MDA-MB-231 et Hs578T à la chimiothérapie.** Ainsi, j'ai montré que les cellules MDA-MB-231 exprimant stablement la claudine 1 sont plus sensibles au 5-FU que celles qui ne l'expriment pas. De même, j'ai montré que les cellules Hs578T qui expriment stablement la claudine 1 sont plus sensibles au PTX et à la DOX que celles qui ne l'expriment pas. L'ensemble de ces résultats apportent une contribution encourageante sur l'implication de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC à la chimiothérapie. Afin de poursuivre ce projet, il serait intéressant de confirmer la transposabilité de nos résultats dans un modèle animal. Dans ce but, la mise en place de xénogreffes de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non la claudine 1 (MDA231^{CLDN1-} et MDA231^{CLDN1+}) chez le modèle de souris SCID pourrait être envisagée. A la suite d'une période de développement de la tumeur (permettant d'attendre une taille de 50 mm³), un traitement au 5-FU serait

administré par voie intrapéritonéale, et une cinétique du volume des tumeurs pourrait être effectuée sur une période de 30 jours. Les résultats obtenus seraient comparés entre eux ainsi qu'aux valeurs observées dans des groupes contrôles « non traités ».

La claudine 1 n'est cependant pas connue pour être directement impliquée dans les processus apoptotiques. Nous supposons qu'elle pourrait recruter de potentiels protéines partenaires qui seraient impliquées dans l'induction de l'apoptose en réponse aux agents de chimiothérapie. Les travaux de Fortier soutiennent cette hypothèse puisqu'il a mis en évidence que la localisation membranaire de la claudine 1 inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique sFLIP et induit la colocalisation de FasR et de la claudine 1 à la membrane. Il suggère ainsi que la claudine 1 membranaire pourrait interagir avec les récepteurs de mort et induire l'apoptose *via* l'activation de la voie extrinsèque (Fortier et al., 2013). Comme d'autres équipes, nous supposons que sa localisation membranaire pourrait être essentielle pour son implication dans l'induction de l'apoptose (Di Cello et al., 2013; Hoevel et al., 2004). A partir de ces travaux, **j'ai montré que la claudine 1 est localisée à la membrane plasmique dans les cellules TNBC surexprimant la claudine 1 ou traitées au PTX et à la DOX.** Nous avons ensuite présumé qu'en raison de sa localisation membranaire, des protéines pourraient interagir avec elle au niveau de son motif de liaison au domaine PDZ. En effet, les partenaires protéiques de la claudine 1 les plus décrits aux jonctions serrées interagissent avec elle en se liant à son motif de liaison au domaine PDZ (Van Itallie & Anderson, 2013). J'ai ainsi mis en évidence que la délétion du motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 les rend insensibles au 5-FU alors que l'expression de la claudine 1 *full length* les sensibilisent à ce traitement. Ainsi, lorsque ce motif est délété, la réponse apoptotique des cellules reste similaire à celle des cellules ne surexprimant pas la claudine 1. **Ces résultats montrent que le motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1 joue un rôle primordial dans la sensibilité des cellules TNBC « claudin-1-low » MDA-MB-231 au 5-FU.** Afin de confirmer le rôle clé de ce motif dans les cellules TNBC « claudin-1-low », nous envisageons de surexprimer la forme délétée dans les cellules Hs578T et d'analyser la réponse apoptotique après un traitement au PTX et à la DOX.

II. LES PARTENAIRES PROTEIQUES DE LA CLAUDINE 1 IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE DES CELLULES TNBC A LA CHIMIOTHERAPIE.

Les résultats précédant suggèrent que le domaine PDZ est essentiel pour le recrutement des partenaires protéiques de la claudine 1 impliqués dans l'induction de l'apoptose en réponses aux agents de chimiothérapie. Par conséquent, afin de mieux comprendre et caractériser le rôle de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie, nous avons initié la recherche de ces partenaires protéiques. Cette analyse est basée sur les travaux de Kovalenko et se divise en trois étapes : le crosslink *in vivo*, l'immunoprécipitation de la claudine 1 avec ses partenaires et la détection des partenaires par spectrométrie de masse. Au cours de ma thèse, j'ai mis au point le protocole de crosslink *in vivo* avec le DTME sur les cellules MDA-MB-231 exprimant stablement la claudine 1. La mise au point de la technique de crosslink a permis de mettre en évidence la présence de la claudine 1 à des poids moléculaires plus élevés que 23 kDa qui pourraient indiquer la présence de complexes entre la claudine 1 et ses partenaires protéiques. Ces résultats sont encourageants, néanmoins, nous observons de nombreuses bandes aspécifiques sur le gel avec DTT. Ces expériences sont actuellement poursuivies au laboratoire avec un anticorps monoclonal dirigé contre la claudine 1 puisque j'ai montré au cours de ma thèse que ce dernier ne présente aucune bande aspécifique. Afin de valider la mise au point des conditions de crosslink, nous utiliserons les cellules MCF10A et nous réaliserons une co-immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonale dirigé contre la claudine 1 et le cluster de différenciation CD9 afin de retrouver le crosslink claudine 1-CD9 décrit dans les travaux de Kovalenko (Kovalenko et al., 2007). J'ai également déjà mis au point les conditions de western blot avec l'anticorps CD9 au cours de ma thèse. Si le crosslink ne donne pas de résultats avec le DTME, nous envisageons d'utiliser un autre agent crosslinker, le DSS (disuccinimidyl suberate). Le DSS est un agent crosslinker perméable aux membranes plasmiques qui forme des liaisons ester entre les groupements amines de lysines proches. La claudine 1 possède une lysine au niveau de son motif de liaison au domaine PDZ, deux au niveau de sa queue C-terminale, trois au niveau de sa boucle IL et une au niveau de la boucle EL1.

Cet agent de réticulation n'a pas été sélectionné dans un premier temps car il n'est pas clivable par le DTT. Lorsque l'étape de crosslink sera validée, la deuxième étape d'immunoprécipitation devra être mise en point avec l'anticorps dirigé contre la claudine 1 avant d'envisager une identification des protéines partenaires par spectrométrie de masse (LC-MALDI-MS/MS). Pour l'identification des partenaires de la claudine 1 impliqués dans la réponse apoptotique, les cellules MDA231^{CLDN1+} traitées au 5-FU seront utilisées puisque la surexpression de la claudine 1 sensibilise ces cellules à cet agent.

En parallèle de ces travaux, j'ai recherché dans les bases de données protéiques les partenaires de la claudine 1 déjà identifiés. Ainsi, les protéines PERP et RhoB sont impliquées dans l'induction de l'apoptose et ont été décrites comme des partenaires de la claudine 1 (Dobbin et al., 2005; Go et al., 2021; Ramaswamy et al., 2001). Il semble peu probable que PERP puisse être impliqué dans la sensibilité des cellules TNBC à la chimiothérapie puisqu'il ne possède pas de domaine PDZ ou de motif de liaison au domaine PDZ (Uniprot). De même, la protéine RhoB ne possède aucun domaine PDZ ou motif de liaison au domaine PDZ (Uniprot). En revanche, la banque de donnée Biogrid indique que RhoB possède 568 partenaires dont ZO1, ZO-2 et PATJ qui interagissent aussi avec la claudine 1 *via* leur domaine PDZ. RhoB, en tant que membre de la famille des Rho GTPases, est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire. Plusieurs auteurs ont montré que RhoB inhibe plusieurs voies de survie cellulaire en réponse à des traitements anticancéreux comme les voies ERK, PI3K et Akt (Y.-X. Chen et al., 2006; Z. Chen et al., 2000; Fritz & Kaina, 2001b; K. Jiang et al., 2004). Ainsi, RhoB s'avère être un puissant suppresseur de tumeur chez la souris nude en inhibant la croissance de tumeurs pancréatiques humaine (Z. Chen et al., 2000). De plus, RhoB serait un effecteur de mort ou un régulateur de signal de mort en réponse aux agents anticancéreux (J. Y. Kong & Rabkin, 2005; Liu Ax et al., 2001). RhoB est exprimé lors de stress génotoxiques (Fritz & Kaina, 2001a; Gerhard et al., 2005). Il est impliqué dans l'induction de l'apoptose consécutive au traitement des fibroblastes au PTX (Liu Ax et al., 2001) et aux traitements des cellules cancéreuses gastriques au 5-FU, à la DOX et au cisplatine (J. Zhou et al., 2011). Il joue aussi un rôle crucial dans la sensibilité à l'apoptose en réponse aux

inhibiteurs de farnesyltransferase dans des cellules de carcinome humaines et *in vivo* dans des modèles tumoraux murins. Les inhibiteurs de farnesyltransferase sont des anticancéreux en étude clinique pour le traitement des leucémies (Lebowitz et al., 1997; Liu Ax et al., 2001). RhoB est également crucial dans l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 traitées au cisplatine (Fallahi & Godini, 2019). Par conséquent, nous envisageons RhoB comme un candidat sérieux pour expliquer l'implication de la claudine 1 dans l'apoptose. Le niveau du transcrit de RhoB est très faible dans les cellules MDA-MB-231 (de Cremoux et al., 1994). Il pourrait donc être intéressant d'analyser son niveau d'expression dans les cellules TNBC en réponse aux agents de chimiothérapie. S'il est induit, l'inhibition de RhoB par ARN interférence pourrait également nous permettre de vérifier son implication dans la sensibilité des cellules TNBC à la chimiothérapie.

Les différentes banques de données ne font pas mention d'une interaction directe entre les effecteurs de l'apoptose extrinsèque et la claudine 1. Cependant, l'un des partenaires de la claudine 1, ZO-3, interagit avec FasL (Fas Ligand) (Biogrid). De plus, plusieurs travaux suggèrent que la claudine 1 pourrait être impliquée dans la voie extrinsèque de l'apoptose. En effet, une étude sur les cellules cancéreuses du pancréas PANC-1 a mis en évidence que la claudine 1 est responsable de l'apoptose induit par le TNF- α (Kondo et al., 2008). De plus, l'augmentation de FasR à la membrane plasmique apparaît lié à un mécanisme dépendant de la claudine 1 dans les cellules de carcinome de l'endomètre et dans carcinome hépatocellulaire humain HepG2 (Fortier et al., 2013). Dans ce sens, il a aussi été montré que la claudine 7 se lie au récepteur Fas et facilite sa liaison à FADD, activant ainsi la voie de signalisation des caspases. Cette étude montre également que, dans ces conditions, la claudine 7 interagit avec la claudine 1 et que cette dernière pourrait, ainsi contribuer à augmenter la chimiosensibilité des cellules d'adénocarcinome pulmonaires NCI-H522 au cisplatine (Hoggard et al., 2013). Ainsi, j'ai étudié la colocalisation de la claudine 1 avec FADD. Mes résultats semblent mettre en évidence la colocalisation de FADD avec la claudine 1 au niveau de la membrane plasmique dans les cellules MDA-MB-231 traitées au PTX et à la DOX. Ces résultats sont encourageants et suggèrent que FADD pourrait être un partenaire indirect de la claudine 1 impliqué dans la sensibilité à l'apoptose des cellules TNBC. Pour confirmer l'implication de FADD dans

la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie, nous inhiberons son expression par ARN interférence et vérifierons si les agents de chimiothérapie induisent toujours l'apoptose des cellules TNBC. L'analyse protéomique consécutive au crosslink pourrait également révéler son interaction avec la claudine 1 dans nos conditions expérimentales. Nous souhaitons également vérifier si la sensibilité à l'apoptose des cellules TNBC en réponse aux agents de chimiothérapie est liée à une activation de la voie extrinsèque. Ainsi, les formes clivées des caspases 8 et 10 pourront aussi être analysées par western blot.

Par ailleurs, ces expériences d'immunofluorescence montrent que FADD présente aussi une localisation cytoplasmique et nucléaire. Or il a été montré que FADD n'est pas localisé uniquement à la membrane plasmique et que sa phosphorylation régule sa localisation cytoplasmique. Selon sa localisation, FADD peut, ainsi, jouer des rôles différents : dans le cytoplasme, sa fonction est principalement d'induire l'apoptose alors que dans le noyau, il peut avoir un effet inverse et favoriser la survie des cellules (Gómez-Angelats & Cidlowski, 2003; Tourneur & Chiocchia, 2010). Si FADD se révèle être un partenaire de la claudine 1, l'étude de sa localisation par fractionnement cellulaire ainsi que l'étude de sa phosphorylation dans les cellules TNBC traitées aux agents de chimiothérapie pourrait permettre de suivre sa localisation en fonction du niveau d'expression de la claudine 1. Comme le suggèrent les travaux d'Hoggard, l'expression de la claudine 1 à la membrane plasmique pourrait ainsi permettre le recrutement et la stabilisation de FADD à la membrane plasmique ce qui augmenterait la sensibilité des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie (Hoggard et al., 2013).

III. INDUCTION D'AUTRES MECANISMES CELLULAIRES EN REponse AU 5-FU DANS LES LIGNEES MDA-MB-231 ET Hs578T « CLAUDIN-1-LOW »

Après un traitement au 5-FU, l'apoptose est induite dans les cellules MDA-MB-231 lorsque la claudine 1 est surexprimée. Cependant, en l'absence de claudine 1, les cellules sont résistantes au 5-FU et nous n'observons pas de réponse apoptotique. Or nous avons

montré qu'à la dose de 186 μM , la viabilité des cellules diminue de 50 %. Les résultats sont similaires dans la lignée Hs578T. Pour expliquer cette diminution de la viabilité cellulaire, nous avons étudié d'autres morts cellulaires que l'apoptose. Aucun processus nécrotique n'a été observé en cytométrie en flux dans les deux lignées « claudin-1-low » traitées au 5-FU. En revanche, j'ai mis en évidence que le 5-FU induit un processus autophagique dans les cellules MDA-MB-231 aux deux doses de 50 et 186 μM . Une légère augmentation de l'autophagie a également été mise en évidence après un traitement avec 181 μM de 5-FU dans les cellules Hs578T. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'il a été décrit que le 5-FU peut induire une réponse apoptotique non-optimale avec une faible induction des marqueurs apoptotiques dans les cellules déficientes en p53, comme les cellules MDA-MB-231 et Hs578T. Les cellules présentent alors une réponse autophagique, avec l'augmentation des marqueurs LC3-II et Beclin 1 (Akpinar et al., 2015; Yun & Lee, 2018). L'efficacité du 5-FU est ainsi limitée par l'autophagie qui entraîne une protection et la chimiorésistance dans diverses cellules cancéreuses du colon et de la vésicule biliaire (Yun & Lee, 2018). Le 5-FU induit également une réponse autophagique dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 (Lee et al., 2015; Puustinen et al., 2020). De plus, une étude suggère que les cellules MCF-7 pourraient également survivre au 5-FU *via* l'activation d'une autophagie protectrice (A. Zhang & Li, 2017). La claudine 1 ne semble pas être impliquée dans le processus autophagique induit par le 5-FU. Un traitement au 5-FU, n'induit, en effet, aucune différence d'induction de l'autophagie dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant la claudine 1 comparé aux cellules ne l'exprimant pas.

J'ai également étudié l'effet d'un traitement au 5-FU sur le cycle cellulaire dans la lignée MDA-MB-231 puisque le 5-FU est un inhibiteur de la thymidilate synthase. Dans les cellules MDA-MB-231, le 5-FU induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S aux doses de 50 et 186 μM . Ces résultats montrent que la baisse de la viabilité cellulaire observée dans les cellules MDA-MB-231 en réponse au 5-FU est en partie due à un arrêt du cycle cellulaire. Ces résultats corroborent ceux de la littérature qui montrent que le 5-FU induit un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules tumorales gastriques (AGS), du colon (HCT-116) et mammaire (MCF-7) (Johnson et al., 1997; D. S. Kim et al., 2020; C.-Z. Wang et

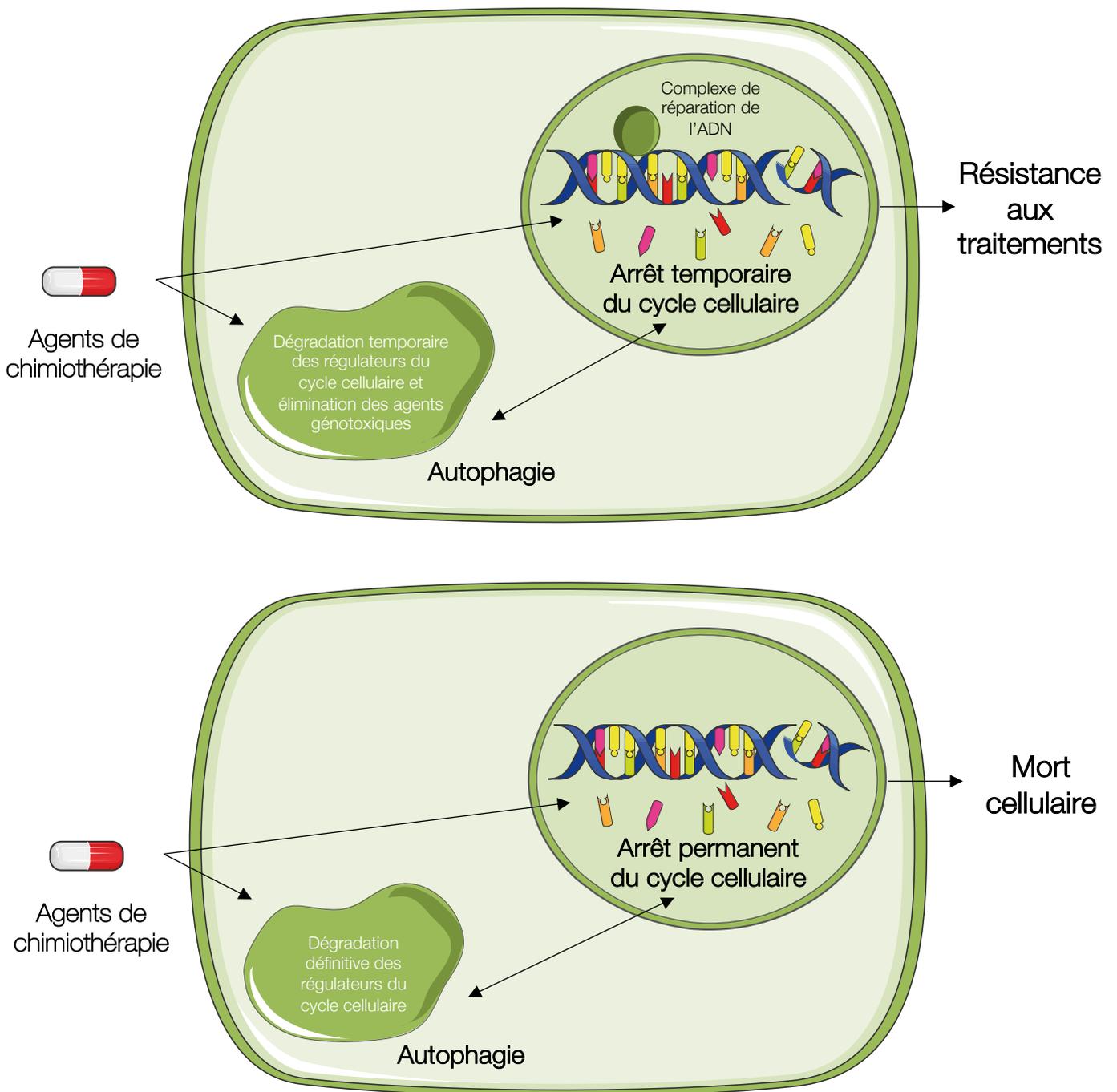


Figure 96 : L'autophagie régule l'arrêt du cycle cellulaire lors d'un traitement de chimiothérapie

a. Lors des dommages à l'ADN causés par des agents génotoxiques, l'autophagie est activée pour faciliter l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la progression ultérieure du cycle cellulaire grâce à la dégradation sélective des régulateurs du cycle cellulaire. **b.** Les agents de chimiothérapie peuvent aussi induire fortement l'autophagie pour dégrader les régulateurs du cycle cellulaire et provoquer un arrêt permanent du cycle cellulaire et la mort cellulaire par l'autophagie. *Adapté de Zheng et al.; 2019*

al., 2015; Yavari & Kooshesh, 2019). L'effet du 5-FU sur le cycle cellulaire des cellules Hs578T est actuellement en étude au laboratoire.

L'autophagie comme l'arrêt du cycle cellulaire, sont induits en réponse à un stress. Cependant, l'induction de ces processus dans les cellules cancéreuses peut mener soit à la résistance des cellules au traitement soit à leur mort cellulaire (**Figure 96**) (K. Zheng et al., 2019).

D'une part, il a été montré que ces processus jouent un rôle central dans la préservation de la viabilité cellulaire (Mathiassen et al., 2017). Lors de dommages à l'ADN causés par des agents génotoxiques, l'autophagie est activée pour faciliter l'arrêt du cycle cellulaire, permettre la réparation de l'ADN et la progression ultérieure du cycle cellulaire. Ainsi, l'induction de l'autophagie permet d'aider les cellules tumorales à échapper à la mort cellulaire induite par des dommages de l'ADN en éliminant les mitochondries pro-apoptotiques (K. Zheng et al., 2019). L'induction de l'autophagie et l'arrêt du cycle cellulaire constatés dans les lignées MDA-MB-231 et Hs578T traitées au 5-FU pourraient ainsi mettre en lumière le développement de mécanismes de résistances des cellules au traitement. D'autre part, il a également été décrit que les agents de chimiothérapie peuvent induire très fortement l'autophagie qui va alors dégrader les régulateurs du cycle cellulaire et provoquer un arrêt permanent du cycle cellulaire et la mort cellulaire par autophagie (K. Zheng et al., 2019). Ainsi, l'induction du processus autophagique et l'arrêt du cycle cellulaire dans ces deux lignées pourraient également expliquer la chute de viabilité cellulaire observée à l' EC_{50} du 5-FU et induire la mort des cellules.

La phosphorylation de JNK est un facteur crucial pour la mort cellulaire autophagique (Shimizu et al., 2014). Ainsi, l'analyse du niveau de phosphorylation de JNK dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T traitées au 5-FU pourrait nous permettre de déterminer si, dans ces conditions, les cellules développent des mécanismes de résistance au traitement ou si la mort autophagique est induite. De même, l'utilisation d'un inhibiteur de l'autophagie comme la Bafilomycin A1 dans ces conditions pourrait nous permettre de vérifier que la chute de viabilité cellulaire observée est dû à une mort des cellules par autophagie (Lenardo et al., 2009).

IV. LOCALISATION DE LA CLAUDINE 1

Au cours de ma thèse, j'ai montré que la localisation de la claudine 1 est en partie membranaire dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T qui l'expriment stablement. J'ai aussi observé la présence de la claudine 1 au niveau de vésicules cytoplasmiques, où elle est colocalisée avec le marqueur endosomal tardif et lysosomique Rab7. Ces résultats sont accords avec les données de la littérature qui indiquent que la claudine 1 excédentaire, non incorporée à la membrane plasmique, est colocalisée avec Rab7 et qu'elle est ubiquitinée et dégradée dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Shigetomi & Ikenouchi, 2018; Takahashi et al., 2009). Néanmoins, j'ai montré que toutes les vésicules ne sont pas co-marquées avec Rab7 suggérant que la claudine 1 n'est pas dirigée que vers la voie de dégradation. Il est décrit que dans de nombreuses cellules épithéliales, les marqueurs de jonctions serrées comme la claudine 1 et 2 sont constamment endocytées et recyclées à la membrane plasmique (Stamatovic et al., 2017a). Afin de vérifier si la claudine 1 est également localisée dans un endosome de recyclage, j'envisage de réaliser une immunofluorescence avec les marqueurs spécifiques Rab4 et Rab11.

La fonction cytoplasmique de la claudine 1 est encore mal connue, néanmoins la claudine 1 est fréquemment observée dans le cytoplasme de divers types de cellules tumorales du poumon et du colon. Récemment, l'équipe de Kim, a montré que la claudine 1 cytoplasmique pouvait être un régulateur de l'autophagie dans les cellules tumorales de l'utérus HeLa (J. Kim et al., 2018). Ainsi, dans nos conditions, la claudine 1 cytoplasmique pourrait également être impliquée dans d'autres processus que dégradation ou le recyclage.

V. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA CLAUDINE 1

Le PTX et la DOX induisent l'augmentation de la transcription du gène de la claudine 1 dès 24 et 9 h de traitement respectivement dans la lignée MDA-MB-231 et dès 48 h dans la lignée Hs578T. Nous avons aussi observé que le 5-FU, le PTX et la DOX induisent l'expression de transcrits plus courts que celui de la claudine 1 *full length*. Le clonage de ces fragments d'ADN obtenus par PCR et leur séquençage pourrait confirmer l'existence de formes épissées de la claudine 1 et de déterminer si ces formes ont déjà été identifiées

par l'équipes de Blanchard (Blanchard et al., 2016). Une étude récente a montré que la chimiothérapie néoadjuvante basée sur le PTX et la DOX, induit l'expression de la claudine 1 dans les tumeurs mammaires. Ces données soulignent que la chimiothérapie néoadjuvante peut ainsi modifier le profil moléculaire d'une tumeur mammaire et par conséquent sa chimiosensibilité (Skálová et al., 2019). Par ailleurs, les données cliniques révèlent que les taxanes et les anthracyclines sont les traitements les plus efficaces sur les TNBC (Bianchini et al., 2016; Hayes et al., 2007; Henderson et al., 2003; Mazouni et al., 2007).

Or, mes résultats montrent que le PTX et la DOX induisent l'expression de la claudine 1 dans la lignée « claudin-1-low » MDA-MB-231 et que la claudine 1 est impliquée dans la sensibilité des cellules à ces deux agents de chimiothérapie. Nous pouvons supposer que l'efficacité de ces traitements pourrait être liée à une induction de l'expression de la claudine 1 dans les tumeurs TNBC. Pour étayer cette hypothèse, nous envisageons d'analyser l'expression de la claudine 1 sur des échantillons de tumeurs TNBC avant et après chimiothérapie et d'analyser son expression en réponse aux différents traitements. Nous comparerons également la réponse des patients aux différents traitements en fonction du niveau d'expression de la claudine 1. Il est aussi nécessaire de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'expression de la claudine 1 puisqu'ils pourraient représenter un intérêt majeur pour sensibiliser les tumeurs TNBC à la chimiothérapie. Les mécanismes de régulation de la claudine 1 en réponse aux agents de chimiothérapie ne sont pas décrits dans la littérature. De ce fait, comprendre la régulation de ce gène est un point essentiel qui pourrait fournir des informations importantes sur les facteurs clés qui stimulent l'expression de la claudine 1 en réponse aux agents de chimiothérapie.

Nous avons commencé l'étude de l'activité du promoteur de 1000 pb de la claudine 1. Nous avons montré que seule la DOX induit son activation dans la lignée MDA-MB-231. L'expression de la claudine 1 semble donc être régulée différemment en réponse au PTX et à la DOX. Les régulateurs de l'expression de la claudine 1 en réponse au PTX pourraient être situés en amont de la région promotrice de 1000 pb. Ainsi, l'étude du promoteur de 3000 pb sera prochainement réalisée.

Facteurs activateurs	Zone de fixation sur le promoteur de la claudine 1 par rapport à l'ATG	Références
Sox9	-41	(Y. Ma et al., 2020)
P63	-280 à -245	(Lopardo et al., 2008)
TCF4	-689	(Miwa et al., 2001; Shiou et al., 2007)
NR3C1	-700 et -259	(G. Zheng et al., 2017)
Facteurs répresseurs	Zone de fixation sur le promoteur de la claudine 1 par rapport à l'ATG	Références
Snail	-59 et -35	(Martínez-Estrada et al., 2006)
bHLHE40	-470 à -298	(Q. Zheng et al., 2018)
STAT3	-941	(Y.-J. Chen et al., 2017)
Facteurs	Zone de fixation sur le promoteur de la claudine 1 par rapport à l'ATG	Banque de données
Meis1	-710	JASPAR
Sox10	-540	JASPAR
Ets1	-110	JASPAR
CTCFL	-320	TRANSFAC
TFAP2 α	-180	TRANSFAC

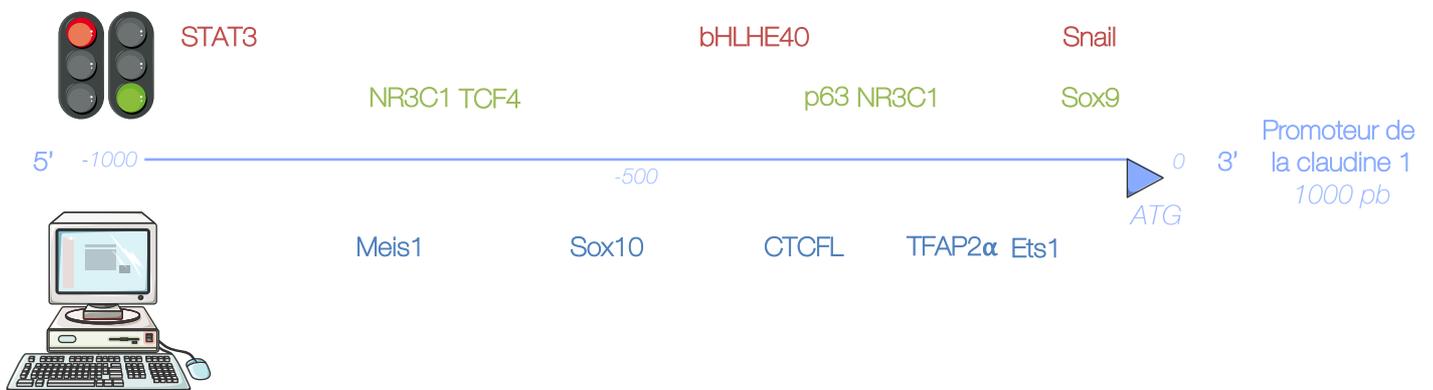


Figure 97 : Liste des facteurs de transcription du promoteur de 1000 pb de la claudine 1

Les différents facteurs de transcription se liant au promoteur de 1000 pb de la claudine 1 ont été listés selon les banques de données JASPAR CORE et TRANSFAC mais également avec les données de la littérature scientifique.

Une analyse bio-informatique de la séquence promotrice de 1000 bp avec les bases de données JASPAR et TRANSFAC nous a permis de retenir cinq facteurs candidats potentiels : **Meis1**, **Sox10**, **Ets1**, **CTCF** et **TFAP2 α** (Figure 97). Il n'existe aucune étude démontrant un lien entre la claudine 1, ces 5 facteurs et la DOX. Comme nous l'avons vue dans la [partie introductive de ce manuscrit](#), la littérature scientifique nous a également permis d'identifier 17 autres facteurs qui régulent l'expression de la claudine 1 au niveau transcriptionnel et qui se fixent sur sa séquence promotrice de 1000 pb :

- 11 de ces facteurs sont des activateurs transcriptionnels : NR3C1 (G. Zheng et al., 2017), NF κ Bp65 (Fortier et al., 2013), les facteurs Cdx 1 et 2, GATA4 (Bhat et al., 2012), P63 (Lopardo et al., 2008), HIF1 α et HIF2 α (Saeedi et al., 2015), TCF4 (Miwa et al., 2001; Shiou et al., 2007), SP-1/BRM (H.-B. Wang et al., 2012; Y. Yang et al., 2019) et Sox9 (Y. Ma et al., 2020).
- 6 de ces facteurs sont des répresseurs transcriptionnels : Snail et Slug (Martínez-Estrada et al., 2006), RON (K. Zhang et al., 2008), Smad 4 (Shiou et al., 2007), STAT3 (Y.-J. Chen et al., 2017) et bHLHE40 (Q. Zheng et al., 2018).

Parmi ces derniers, sept présentent un fort intérêt pour notre étude d'après la littérature. Le facteur **NR3C1** est faiblement exprimé dans les tumeurs mammaires résistantes à la DOX (C.-F. Jiang et al., 2021). Le facteur **p63** est fortement exprimé sous l'effet de la DOX dans les cellules d'hépatocarcinome Hep3B (Petitjean et al., 2008). La DOX induit une augmentation de l'expression du facteur **TCF4** dans les cellules épithéliales intestinales (de Koning et al., 2007) et du facteur **Sox9** dans les cellules intestinales de Paneth (King et al., 2013). Par ailleurs, le facteur **Snail** est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 résistantes à la DOX, alors qu'il l'est faiblement dans les cellules MCF-7 qui y sont sensibles (X. Yang et al., 2021). De même, **STAT3** est plus fortement exprimé dans les cellules cancéreuses de la vessie T24 résistantes à la DOX que dans les cellules T24 qui y sont sensibles (Lin et al., 2021). Finalement, le facteur **bHLHE40** est 5 fois plus exprimé dans les cellules MDA-MB-231 résistantes à la DOX que dans les cellules MDA-MB-231 qui y sont sensibles (Marinello et al., 2019). Dans un premier temps, nous vérifierons donc s'il existe une corrélation entre l'expression des facteurs **Meis1**, **Sox10**, **Ets1**, **CTCF**, **TFAP2 α** , **NR3C1**, **p63**, **TCF4**, **Sox9**, **Snail**, **STAT3**, **bHLHE40** et celle de la claudine 1 par PCR et en Western blot en réponse à la DOX. Pour les facteurs pertinents, nous vérifierons ensuite par mutagenèse dirigée et chromatine-

immunoprécipitation s'ils peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression de la claudine 1 en réponse à la DOX. Si aucun de ces facteurs n'est responsable de l'activation du promoteur de la claudine 1 dans les cellules MDA-MB-231 traitées à la DOX, nous envisageons également d'étudier la méthylation du promoteur de la claudine 1. En effet, il a été montré que le promoteur de la claudine 1 est [fortement méthylé](#) dans les tumeurs mammaires et qu'un traitement à la 5-aza, un agent déméthylant, induit l'expression de cette dernière dans les cellules tumorales mammaires (Di Cello et al., 2013).

Dans le but d'envisager l'expression de la claudine 1 comme une piste thérapeutique, l'identification de ses régulateurs transcriptionnels constitue une étape clé de ce projet. A terme, la compréhension des mécanismes qui permettent l'expression de la claudine 1 dans les TNBC « claudin-1-low » pourrait être à l'origine de nouvelles stratégies de traitement qui amélioreraient la prise en charge de ces tumeurs très agressives.

VI. CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ma thèse confirment l'implication de la claudine 1 dans la sensibilité des tumeurs triple-négatives « claudin-1-high » HCC1806 au 5-FU, au PTX et à la DOX. L'expression de la claudine 1 dans les cellules TNBC « claudin-1-low » MDA-MB-231 permet également de les sensibiliser ces cellules aux trois agents de chimiothérapie et de sensibiliser les cellules Hs578T au PTX et à la DOX. L'identification des partenaires protéiques de la claudine 1 est essentielle afin de comprendre son implication dans la sensibilité aux agents de chimiothérapie. Par ailleurs, la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de la claudine 1 constitue une étape clé de ce projet qui permettrait d'envisager l'expression de la claudine 1 comme une potentielle piste de traitement dans les tumeurs triple-négatives « claudin-1-low ».

Mes travaux semblent rejoindre ceux obtenus par l'équipe de Wu qui propose la claudine 1 comme marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie dans un autre type de cancer que sont les adénocarcinomes pulmonaires (J.-E. Wu et al., 2020). Ainsi à terme, la prise en charge thérapeutique des patients TNBC pourrait être améliorée *via* l'utilisation de la claudine 1 comme marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie. A plus long terme, cette étude pourrait également permettre d'établir de nouveaux protocoles traitements visant à induire l'expression de la claudine 1 dans les TNBC pour ainsi augmenter leur sensibilité à la chimiothérapie.

RESULTATS ANNEXES ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

I. RESULTATS ANNEXES

Au cours de ma thèse, j'ai également contribué à la finalisation d'un article scientifique que nous avons soumis dans le journal *Breast Cancer Research and Treatment* et pour lequel nous sommes en révision.

1) Introduction

Le laboratoire s'intéresse aux dérivés de la troglitazone (TGZ) comme composés prometteurs pour le traitement du cancer mammaire. La troglitazone (TGZ) est un composé synthétique de la famille des thiazolidinediones (TZD), qui a été initialement utilisé comme agent antidiabétique. La TGZ possède aussi une activité anticancéreuse, néanmoins elle présente des effets hépatotoxiques ce qui limite son développement. Au sein du laboratoire, d'autres dérivés de TGZ ont été développés 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 en culture primaire comparé au composé parent, la TGZ (Salamone *et al.*, 2012 ; Bordessa *et al.*, 2014). Mon laboratoire a mis en évidence 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). Au cours de sa thèse, Marine Geoffroy a étudié les mécanismes d'action de la Δ 2-TGZ et de l'AB186 dans les cellules cancéreuses mammaires. J'ai participé à la finalisation de cet article.

2) Principaux résultats

Nous avons montré que l'AB186 et la Δ 2-TGZ induisent une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques dans les cellules MDA-MB-231 dès 24 h de traitement. De manière intéressante, les deux composés n'induisent pas l'apoptose des cellules saines immortalisées MCF10A. Des mesures d'impédance ont ensuite été

réalisées afin de suivre en temps réel l'effet des composés sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Les traitements avec la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 induisent des variations d'impédance à des temps précoces dès 2h et 4h respectivement. Ces variations d'impédance peuvent être liées à trois facteurs : des changements de morphologie, de prolifération et de migration. Des analyses par immunofluorescence montrent que des changements de la morphologie et de la taille des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 sont observés en réponse à la $\Delta 2$ -TGZ et à l'AB186. Nos résultats montrent aussi que la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 inhibent les capacités migratoires des cellules MDA-MB-231 et Hs578T dès 6h de traitement. L'ensemble de ces résultats pourraient s'expliquer par l'interaction de nos composés avec les protéines du cytosquelette. Nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse sur puce qui a révélé que l'AB186 se lie à 94 protéines dont 6 protéines du cytosquelette : la γ -actine, la β -tubuline, la filamine-A, l' α -tubuline, la moesine et la taline. Par un essai de pull-down, nous avons validé que l'AB186 se lie à l' α -tubuline dans les cellules MDA-MB-231 et Hs578T. La morphologie des microtubules a été examinée dans les cellules MDA-MB-231 par immunofluorescence. On observe un élargissement et une stabilisation du réseau d' α -tubuline dépendant de la concentration en AB186 dans ces cellules. Nos données montrent que l'AB186 joue un rôle dans la polymérisation de l' α -tubuline en microtubules.

3) Conclusions

En conclusion, nous avons déterminé que la $\Delta 2$ -TGZ et l'AB186 sont de puissants agents pro-apoptotiques dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231. De plus, l'AB186 induit ces effets à des doses plus faibles que la $\Delta 2$ -TGZ. Nous avons en outre caractérisé les modifications précoces de la morphologie cellulaire ainsi que l'inhibition de la migration cellulaire induits par ces traitements. Nous avons identifié pour la première fois des cibles cytosquelettiques de l'AB186 comme la α -tubuline qui pourraient expliquer les changements morphologiques précoces et l'inhibition de la migration. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'AB186 pourrait être une molécule prometteuse pour le traitement des TNBC.



Article

AB186 Inhibits Migration of Triple-Negative Breast Cancer Cells and Interacts with α -Tubulin

Marine Geoffroy ¹, Marine Lemesle ¹, Alexandra Kleinclaus ¹, Sabine Mazerbourg ¹, Levy Batista ¹, Muriel Barberi-Heyob ¹, Thierry Bastogne ¹, Wilfrid Boireau ², Alain Rouleau ², Dorian Dupommier ³, Michel Boisbrun ³, Corinne Comoy ³, Stéphane Flament ¹, Isabelle Grillier-Vuissoz ^{1,†} and Sandra Kuntz ^{1,*,†}

¹ CNRS, CRAN, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; mgeoffroy@genethon.fr (M.G.); marine.lemesle@univ-lorraine.fr (M.L.); alexandra.kleinclaus@univ-lorraine.fr (A.K.); sabine.mazerbourg@univ-lorraine.fr (S.M.); levy.batista@univ-lorraine.fr (L.B.); muriel.barberi@univ-lorraine.fr (M.B.-H.); thierry.bastogne@univ-lorraine.fr (T.B.); stephane.flament@univ-lorraine.fr (S.F.); isabelle.grillier-vuissoz@univ-lorraine.fr (I.G.-V.)

² FEMTO-ST Institute, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, F-25030 Besançon, France; wboireau@femto-st.fr (W.B.); alain.rouleau@femto-st.fr (A.R.)

³ CNRS, L2CM, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; d.dupommier@gmail.com (D.D.); michel.boisbrun@univ-lorraine.fr (M.B.); corinne.comoy@univ-lorraine.fr (C.C.)

* Correspondence: sandra.kuntz@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-(0)3-72-74-51-86

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Breast cancer is one of the leading causes of cancer-related death among females worldwide. A major challenge is to develop innovative therapy in order to treat breast cancer subtypes resistant to current treatment. In the present study, we examined the effects of two Troglitazone derivatives Δ 2-TGZ and AB186. Previous studies showed that both compounds induce apoptosis, nevertheless AB186 was a more potent agent. The kinetic of cellular events was investigated by real-time cell analysis system (RTCA) in MCF-7 (hormone dependent) and MDA-MB-231 (triple negative) breast cancer (TNBC) cells, followed by cell morphology analysis by immuno-localization. Both compounds induced a rapid modification of both impedance-based signals and cellular morphology. This process was associated with an inhibition of cell migration measured by wound healing and transwell assays in TNBC MDA-MB-231 and Hs578T cells. In order to identify cytoplasmic targets of AB186, we performed surface plasmon resonance (SPR) and pull-down analyses. Subsequently, 6 cytoskeleton components were identified as potential targets. We further validated α -tubulin as one of the direct targets of AB186. In conclusion, our results suggested that AB186 could be promising to develop novel therapeutic strategies to treat aggressive forms of breast cancer such as TNBC.

Keywords: breast cancer; troglitazone derivatives; apoptosis; cytoskeleton; tubulin; cell migration



Citation: Geoffroy, M.; Lemesle, M.; Kleinclaus, A.; Mazerbourg, S.; Batista, L.; Barberi-Heyob, M.; Bastogne, T.; Boireau, W.; Rouleau, A.; Dupommier, D.; et al. AB186 Inhibits Migration of Triple-Negative Breast Cancer Cells and Interacts with α -Tubulin. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6859. <https://doi.org/10.3390/ijms23126859>

Academic Editor: Filippo Acconcia

Received: 25 May 2022

Accepted: 17 June 2022

Published: 20 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer is one of the leading causes of cancer-related death among females worldwide [1]. Breast tumors are classified by the presence of three molecular markers: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), that allow targeted therapy beside chemotherapy [2]. Nevertheless, the effects of therapeutic agents are limited by de novo or acquired resistance and they often cannot avoid the metastatic spread [3,4]. Triple-negative breast cancer (TNBC) subtype (ER α -, PR-, HER2-) presents the worst prognosis due to its highly invasive nature and relatively low response to therapeutics [5]. Therefore, there is an urgent need to develop alternative therapeutics.

Troglitazone (TGZ) is a synthetic compound of the thiazolidinediones (TZDs) family, such as rosiglitazone (RGZ) and pioglitazone (PGZ), used as antidiabetic agents. TZDs also display anti-tumoral activity not only in vitro but also in vivo [6,7]. 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. Their anticancer properties were renewed by a phase II trial on chronic myeloid leukemia. This study provided evidence that in combination with imatinib, PGZ improved the erosion of the cancer stem cells pool [8,9]. Similarly, a clinical study indicated that efatutazone (another TZD derivative) associated with paclitaxel could be effective in anaplastic thyroid carcinoma [10]. More recently, Ronen et al. showed that RGZ in combination with MEK inhibitors enhanced epithelial differentiation and adipogenesis of breast cancer cells both in vitro and in vivo [11]. Unfortunately, the majority of TZDs were withdrawn from the market because of their side effects, especially severe hepatic toxicity for TGZ [12]. In this context, our team developed new TGZ derivatives that are more potent and less toxic for the liver. We synthesized the already known $\Delta 2$ -troglitazone ($\Delta 2$ -TGZ) and also the original molecule AB186 (Figure 1) [13–15]. Both derivatives possess a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring of TGZ abrogating the PPAR γ agonist activity [16–19]. In addition to $\Delta 2$ -TGZ, AB186 is deoxygenated on the chromane moiety and holds at this position an aminoalkyl chain, both inducing higher efficiency to inhibit cell proliferation of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 [14].

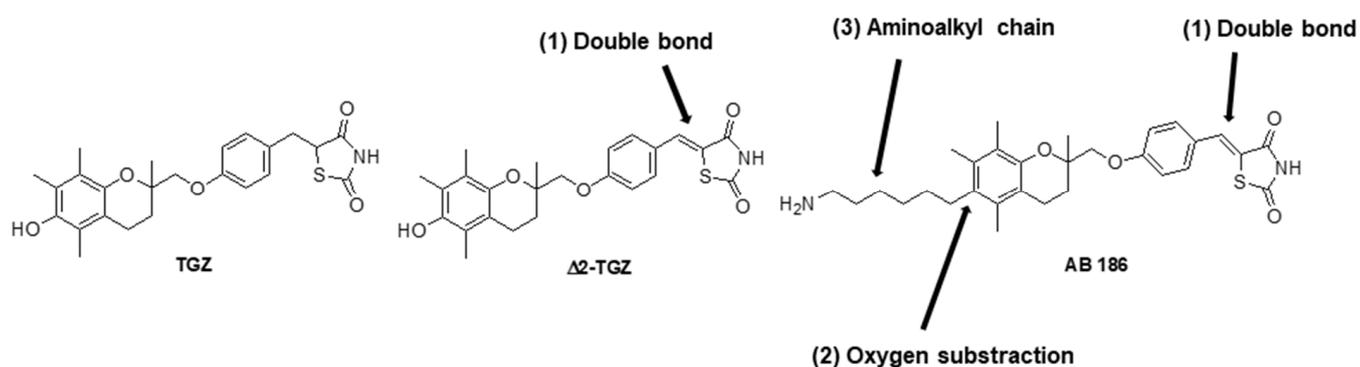


Figure 1. Structures of TGZ, $\Delta 2$ -TGZ and AB186 compounds. $\Delta 2$ -TGZ and AB186 are derived from the original TGZ and both of them possess a double bond (1) adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring. AB186 also presents a deoxygenation of the chromane heterocycle (2) and a hydrophobic moiety (3).

Previously, we have demonstrated that compared to TGZ, $\Delta 2$ -TGZ and AB186 exhibit a lower toxicity toward human non-malignant hepatocytes in primary culture and an improved anti-proliferative activity on breast cancer cell lines [13,14]. We showed that $\Delta 2$ -TGZ induced apoptosis in luminal cells MCF-7 and in MDA-MB-231 and Hs578T TNBC cells [20,21]. In the present study, we aimed to better understand the mechanism of action of $\Delta 2$ -TGZ and AB186. We observed a stronger pro-apoptotic effect of AB186 compared to $\Delta 2$ -TGZ in breast cancer cells and interestingly no effect in the non-tumoral MCF-10A cells after 24 h of treatment. Then, we analyzed the dynamic response to $\Delta 2$ -TGZ and AB186 using a real-time cell analysis on MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Surprisingly, we observed an early modification of impedance-based signal correlated with cell morphology modifications between 2 and 4 h. These events were followed by cell migration inhibition in MDA-MB-231 and Hs578T TNBC cells at 6 h. These data suggested interactions with cytoskeleton proteins. In order to identify the targets of AB186, we performed surface plasmon resonance (SPR) analysis that comforted this hypothesis. We identified six targets from the cytoskeleton: γ -actin, β -tubulin, filamin-A, α -tubulin, moesin, talin. Finally, pull-down assays in MDA-MB-231 and Hs578T and in vitro tubulin polymerization assays highlighted the binding of AB186 to α -tubulin.

2. Results

2.1. AB186 Is a More Potent Inducer of Apoptosis Compared to Δ 2-TGZ in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells and Is Ineffective in the Non-Malignant MCF-10A

AB186 is a new TGZ derivative which possesses, in addition to the double bond adjoining the thiazolidine-2,4-dione ring as in Δ 2-TGZ, a deoxygenation of the chromane heterocycle and a hydrophobic aminoalkyl moiety (Figure 1).

In a previous study, we demonstrated that Δ 2-TGZ induced apoptosis after 24 h of treatment in MDA-MB-231 breast cancer cells but not in non-tumorigenic mammary cells MCF-10A [21]. We exposed these cells to 4 μ M of AB186, a dose that was just above the cell viability IC₅₀ that we previously measured in MDA-MB-231 [14]. AB186 also led significantly to the apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells but not of MCF-10A cells (Figure 2). After 24 h of exposure, 4 μ M of AB186 induced 44% of apoptotic cells while 20 μ M of Δ 2-TGZ was required to obtain 32% of apoptotic cells. Likewise, after 48 h of treatment, Δ 2-TGZ and AB186 induced 51% and 55% of apoptotic cells respectively. Thus, AB186 (4 μ M) induced a higher or similar apoptosis rate at a five-fold lower dose compared to Δ 2-TGZ (20 μ M) in these breast cancer cells.

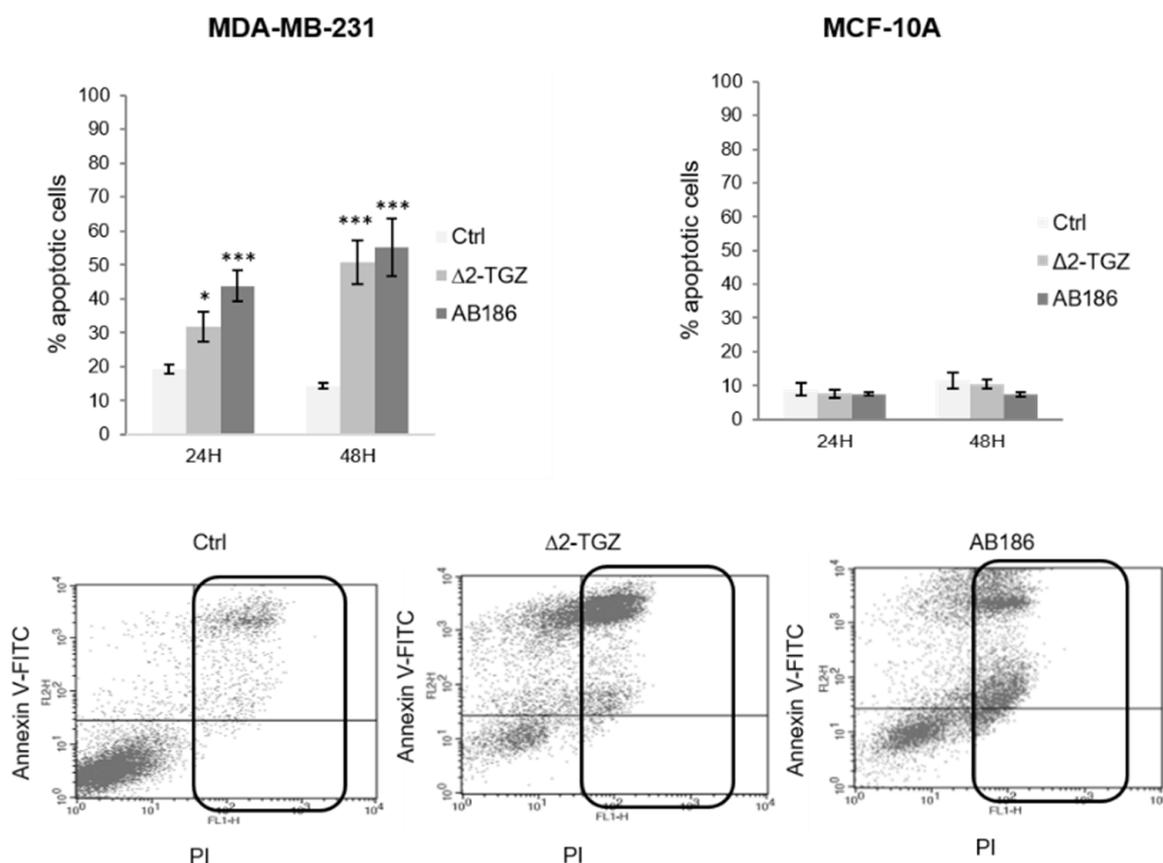


Figure 2. AB186 induces apoptosis in MDA-MB-231 TNBC cells. After treatment for 24 and 48 h with DMSO (Ctrl), 20 μ M of Δ 2-TGZ or 4 μ M of AB186, MDA-MB-231 and MCF-10A cells were co-stained with FITC-Annexin V/PI and analyzed by FACS. The percentage of total apoptotic cells corresponds to Annexin V positive cells and Annexin V/PI positive cells (dot plot of MDA-MB-231 cells exposed to 48 h of treatment). The values represent the means \pm SEM of three to six different experiments. ANOVA test with Bonferroni post-hoc was used to determine significant difference from control cells, where * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

2.2. Variations of Impedance Occur Early after Δ 2-TGZ and AB186 Treatment in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

In order to investigate the kinetics of events leading to the anticancer effect of Δ 2-TGZ and AB186, we performed a real-time cell analysis (RTCA) allowing the measurement of

impedance-based signals. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were exposed to $\Delta 2$ -TGZ (25 μM and 20 μM respectively) or AB186 (5 μM and 4 μM respectively). In both control cells, the Cell Index (CI) value increased progressively until the end of the experiment to reach 2.4 and 1.9 in MCF-7 and MDA-MB-231 respectively (Figure 3). In both cell lines, kinetics showed a rapid and transient increase of CI after $\Delta 2$ -TGZ and AB186 exposure compared to control cells. Finally, after 24 h, the CI decreased to reach a value equal or below those measured at the beginning of the treatment.

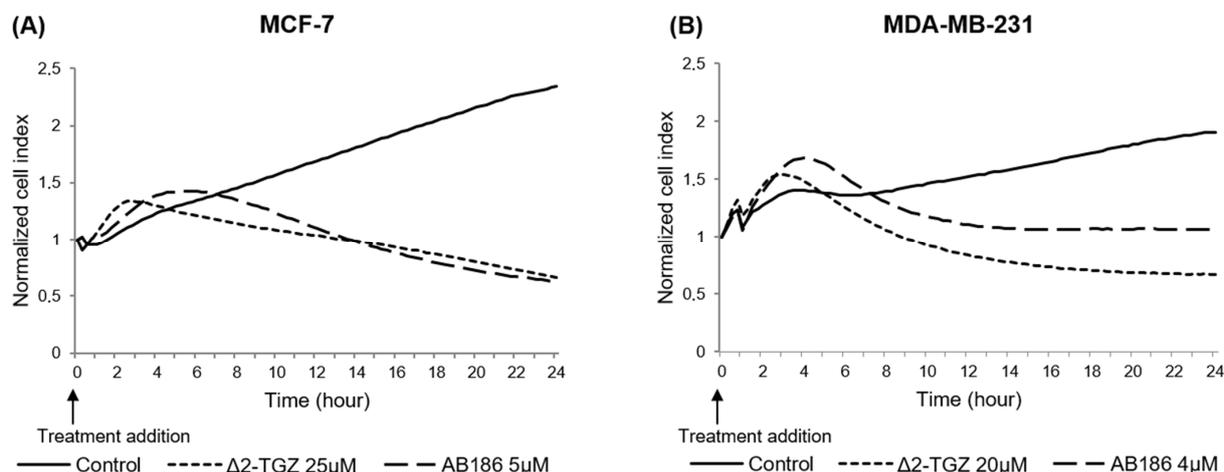


Figure 3. Kinetics of real-time impedance changes in response to TGZ derivatives in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells were grown during 29 h and then were exposed (treatment addition) to $\Delta 2$ -TGZ (25 μM and 20 μM respectively) or AB186 (5 μM and 4 μM respectively). Control cells were treated with DMSO. Cell index was monitored during 24 h after treatment addition. Reported data are the means of three independent experiments.

In order to better correlate the impedance modifications to a biological effect, we determined the time of maximal difference of CI between control and treated cells (Table 1). In MCF-7 cells, this key time point was observed at 1 h 55 min \pm 8 min and 4 h \pm 75 min in response to $\Delta 2$ -TGZ and AB186 respectively (Figure 3A, Table 1). In MDA-MB-231 cells, the CI reached a maximal difference at 1 h 50 min \pm 5 min and 3 h 55 min \pm 13 min after $\Delta 2$ -TGZ and AB186 exposure respectively (Table 1).

Table 1. 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.

Cell Line	Experiment	Time of CI Maximal Difference		Time of CI below Control	
		$\Delta 2$ -TGZ/Control	AB186/Control	$\Delta 2$ -TGZ	AB186
MCF-7	1	2 h	2 h 45 min	6 h	4 h 30 min
	2	1 h 45 min	4 h	3 h 30 min	6 h 45 min
	3	2h	5 h 15 min	3 h 45 min	9 h 30 min
	Mean \pm SD	1 h 55 min \pm 8 min	4 h \pm 75 min	4 h 25 min \pm 82 min	6 h 55 min \pm 150 min
MDA-MB-231	1	1 h 45 min	3 h 30 min	5 h	7 h 15 min
	2	1 h 45 min	4 h	3 h 45 min	7 h
	3	2 h	4 h 15 min	5 h 45 min	8 h 15 min
	Mean \pm SD	1 h 50 min \pm 5min	3 h 55 min \pm 13 min	4 h 50 min \pm 60 min	7 h 30 min \pm 40 min

These data showed that early modifications induced by both compounds occurred long before the apoptotic process, and could be a signature of cell morphology modification.

2.3. $\Delta 2$ -TGZ and AB186 Induce Early Morphological Changes in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

In order to test this hypothesis, we analyzed by immunofluorescence the morphology of MCF-7 and MDA-MB-231 cells using three cytoskeletal components: actin, α -tubulin, and vimentin after 2 h 30 min, 4 h 30 min, 8 h 30 min, or 10 h 30 min of treatment. The control MCF-7 cells displayed a cobblestone-like phenotype with strong cell–cell adhesion (Figure 4A). In response to $\Delta 2$ -TGZ and AB186, MCF-7 cell morphology was altered by changes in cell shape and size (Figure 4B,C). We observed some elongated cells around 4 h 30 min of exposure to $\Delta 2$ -TGZ and AB186 and some shrunken cells with condensed chromatin after 8 h 30 min of treatment. At 10 h 30 min of treatment, almost all cells were shrunken.

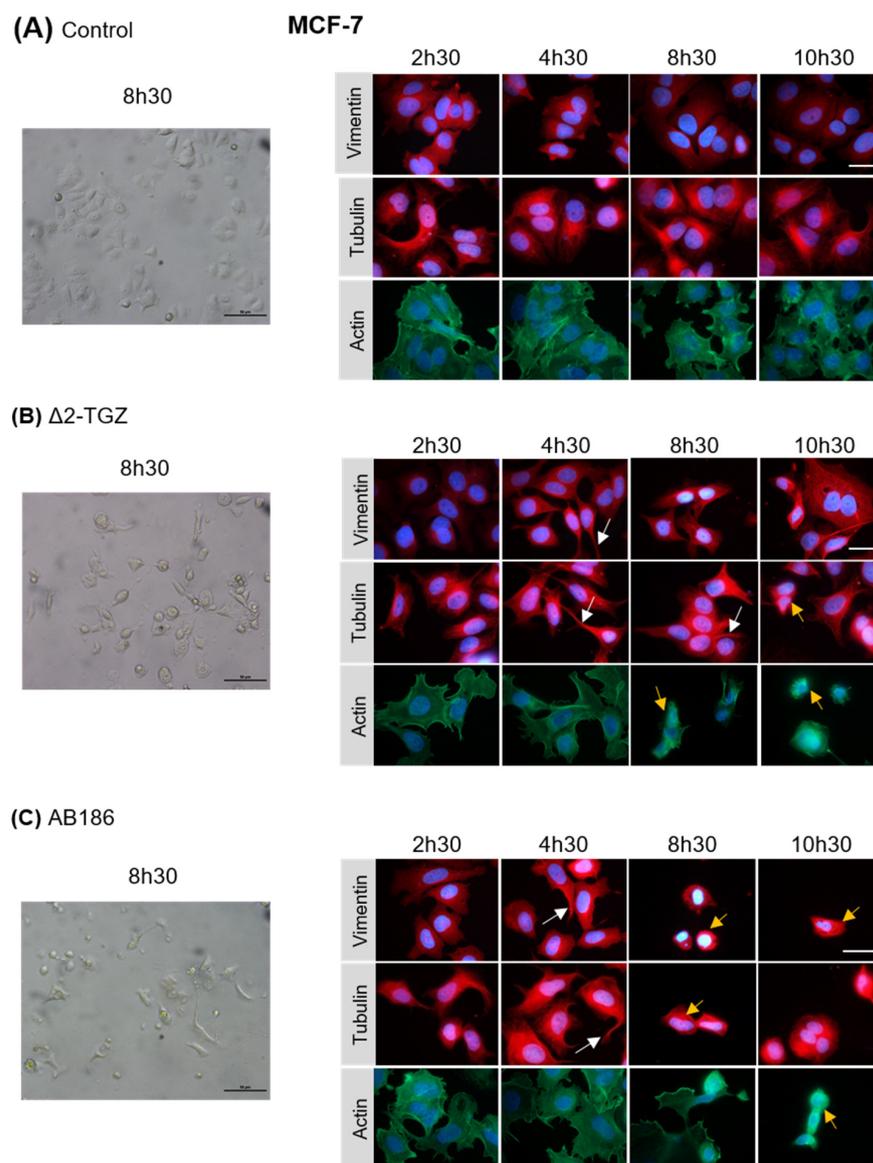


Figure 4. TGZ derivatives alter MCF-7 morphology. MCF-7 cells were treated with DMSO as control (A), 25 μM of $\Delta 2$ -TGZ (B) or 5 μM of AB186 (C) during 2 h 30 min, 4 h 30 min, 8 h 30 min, and 10 h 30 min. Then, cells were subjected to immunofluorescence analysis and stained with antibodies against vimentin, α -tubulin, and actin. Cell nuclei were labelled with Hoechst dye. Bright field pictures of control and treated cells are also shown after 8 h 30 min. $\Delta 2$ -TGZ and AB186 led to a disruption of cell–cell contact compared to untreated cells. Elongated cells (white arrows) and some shrunken cells (yellow arrows) were observed. Bar represent 50 μm .

Control MDA-MB-231 cells displayed a fibroblast-like morphology with a pronounced cellular scattering (Figure 5A). In response to $\Delta 2$ -TGZ and AB186, MDA-MB-231 cell morphology was also altered with elongated cells harboring an unorganized actin network from 2 h 30 min of treatment (Figure 5B,C). As observed in MCF-7 cells, both treatments led to shrunken cells from 8 h 30 min exposure in MDA-MB-231 cells.

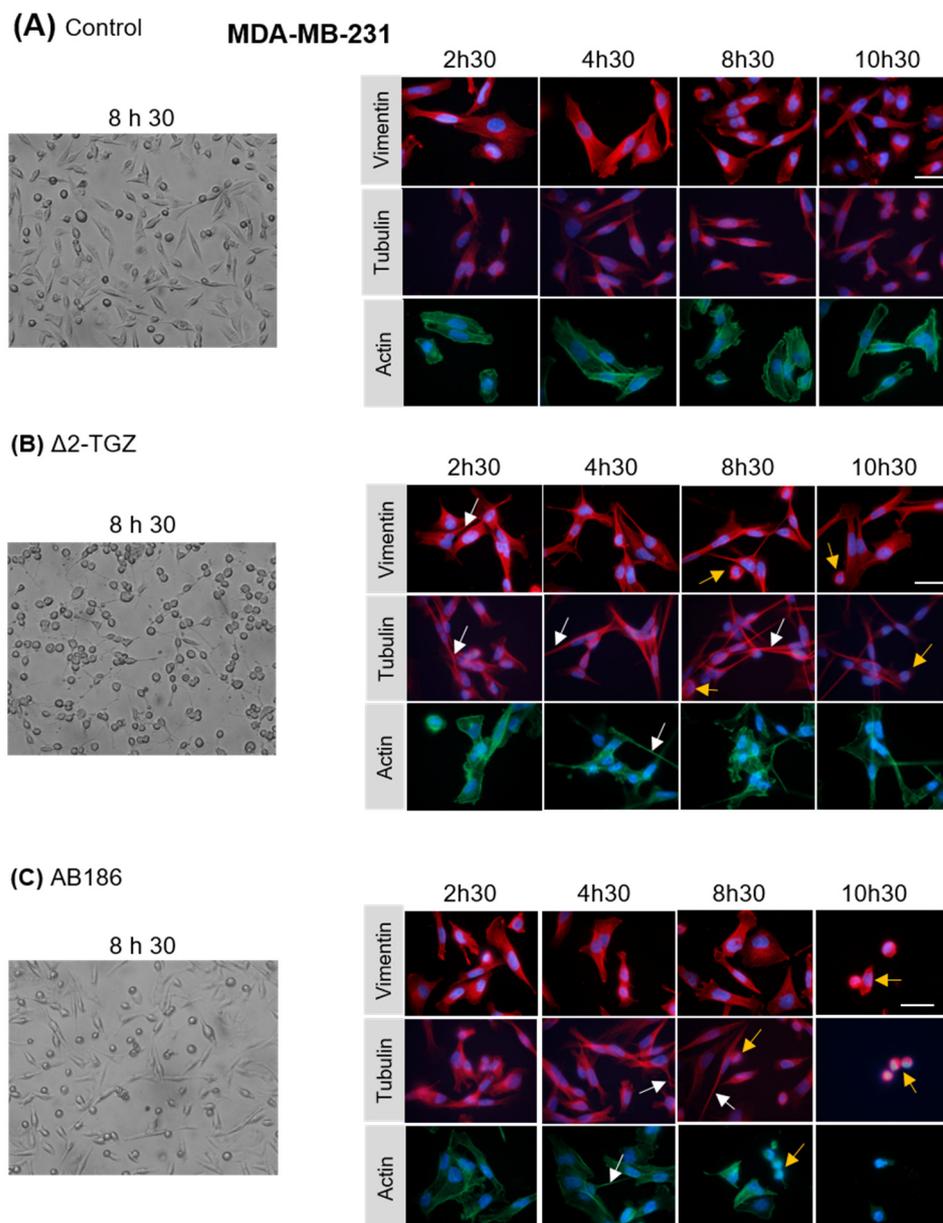


Figure 5. TGZ derivatives alter MDA-MB-231 morphology. MDA-MB-231 cells were treated with DMSO as control (A), 20 μ M of $\Delta 2$ -TGZ (B) or 4 μ M of AB186 (C) during 2 h 30 min, 4 h 30 min, 8 h 30 min and 10 h 30 min. Then, cells were subjected to immunofluorescence analysis and stained with antibodies raised against vimentin, α -tubulin and actin. Cell nuclei were labelled with Hoechst dye. Bright field pictures of control and treated cells are also shown after 8 h 30 min. Elongated cells (white arrows) and some shrunken cells (yellow arrows) were observed. Bar represents 50 μ m.

Altogether these data confirmed early alterations of the cell morphology, before 4 h 30 min, in agreement with changes in the impedance-based cell signal.

2.4. $\Delta 2$ -TGZ and AB186 Inhibit Migration Properties of Two Highly Metastatic TNBC Cell Lines: MDA-MB-231 and Hs578T

The modifications of cell shape and the disruption of cytoskeleton induced by $\Delta 2$ -TGZ and AB186 suggested that these compounds could modify the migration potency of the cells. Indeed, it is well described that cytoskeleton modifications can influence cell migration properties [22]. To determine whether $\Delta 2$ -TGZ and AB186 could affect cell migration, we performed migration assays on MDA-MB-231 and Hs578T, two TNBC cell lines with highly metastatic properties. First, both cells were exposed to TGZ derivatives and wound healing assay was performed after 3, 6, and 12 h of treatment. We observed a significant wound healing inhibition at 6 h of exposure to $\Delta 2$ -TGZ and AB186 in MDA-MB-231 cells (Figure 6A). In Hs578T cells, we also observed an inhibition of wound healing that was significant at 6 h and 12 h of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment respectively. Then, we confirmed these results using the transwell assay after 9 h of exposure to the TGZ derivatives. In MDA-MB-231 cells, the number of migrated cells exhibited a significant decrease of 27.16% and 34.70% after $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment, respectively, compared to control cells (Figure 6B). In the same way, $\Delta 2$ -TGZ and AB186 reduced significantly the migration by 41.11% and 49.33% respectively in Hs578T cells compared to control cells.

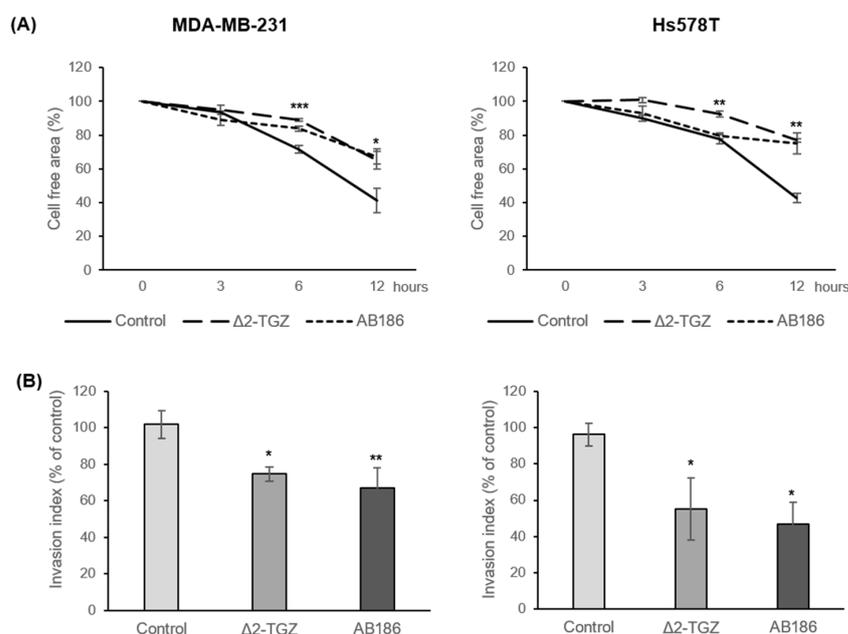


Figure 6. TGZ derivatives alter migration properties of MDA-MB-231 and Hs578T cells. MDA-MB-231 and Hs578T cells were exposed to DMSO as control, or 20 μ M of $\Delta 2$ -TGZ or 4 μ M of AB186 and subjected to wound healing (A) or transwell migration (B) assays. (A) Cell free area was measured after 3 h, 6 h, and 12 h of TGZ derivatives exposure. Each wound healing corresponds to the mean of three different areas. (B) Cells were seeded in the upper chamber of Transwell membranes and treated with $\Delta 2$ -TGZ or AB186 for 9 h. Graphs represent the average of the migrated cells number in the lower chamber. Reported data are the means of three or six experiments. Analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc test was used to determine significant difference of migration from control cells, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

2.5. AB186 Acts through Its Binding to α -Tubulin

Early morphological changes mediated by TGZ derivatives could be explained by the interaction between the drug and the cytoskeleton. In order to determine the localization of AB186 in the cell, we exposed MDA-MB-231 cells to rhodamine-labelled AB186 (ABRhod) for 1 or 6 h (Figure 7). No staining was observed in the nucleus, the signal was diffused after 1 h and concentrated in the cytoplasm after 6 h. These results suggest a cytoplasmic target for AB 186.

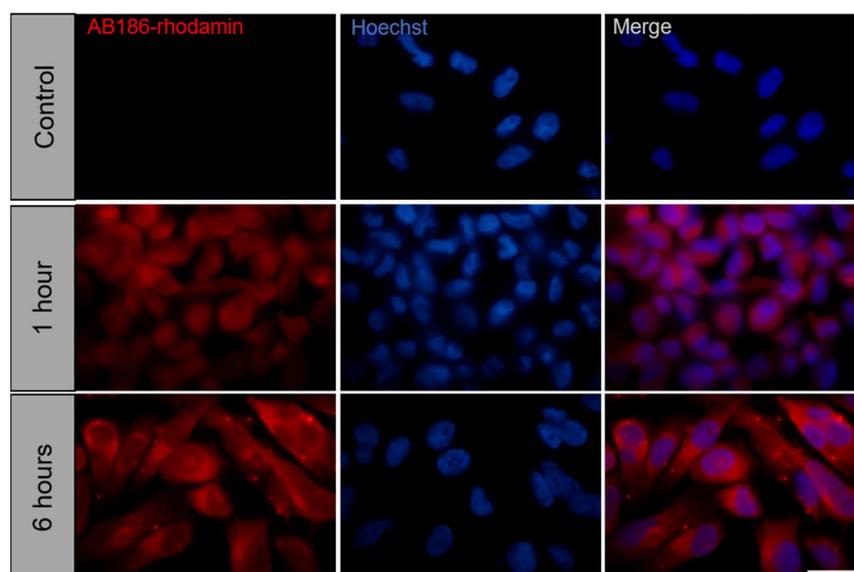


Figure 7. Rhodamin-labelled AB186 localizes in the cytoplasm of MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were exposed to 3 μ M of Rhodamin-labelled AB186 during 1 or 6 h. Control cells were exposed to the unlabeled compound. Cells were fixed with paraformaldehyde and cell nuclei were labelled with Hoechst dye. Bar represents 50 μ m.

To identify direct cytoplasmic targets of AB186, a SPR binding analysis was performed using MDA-MB-231 cytoplasmic extracts and AB186 immobilized on sensor chips [23]. On-Chip mass spectrometry analysis revealed that AB186 could bind to 94 proteins including 6 cytoskeletal proteins, belonging to the similar GO pathways “structural molecule activity” (GO.0005198) and “structural constituent of cytoskeleton” (GO.0005200): γ -actin, β -tubulin, filamin-A, α -tubulin, moesin and talin (Table 2).

Table 2. Cytoskeleton proteins identified by MS analysis using the Proteome Discoverer software. Corresponding peptides were obtained after biochemical treatments of the captured cytoplasmic proteins from MDA-MB-231 breast cancer cells on AB186-hybridized SPR chip. # Peptides: number of different peptides corresponding to a unique protein. Mascot Score: statistical score based on the probability that the peptides from the sample match those in the selected protein database.

Protein	UniProt ID	# Peptides	Mascot Score
Actin	ACTG1	8	316.4
Tubulin beta chain	TUBB	8	144.9
Filamin-A	FLNA	7	82.8
Tubulin alpha chain	TUBA1C	4	75.6
Moesin	MSN	4	65.9
Talin-1	TLN1	8	55.3

By pull-down assay, we validated that biotinylated AB186 (ABBio) binds to α -tubulin in MDA-MB-231 and Hs578T cells while the interaction between AB186 and β -actin was observed only in MDA-MB-231 cells (Figure 8A). No clear interaction was confirmed with moesin and talin. In addition, AB186 promotes tubulin polymerization into microtubules in vitro. Indeed, tubulin polymerization started earlier compared to the control condition (Figure 8B). AB186 displayed a different profile compared to paclitaxel, well-known to promote microtubule assembly and affect microtubule dynamics. In the presence of AB186, the accumulation of polymerized tubulin started later than in the presence of paclitaxel. The morphology of microtubules was then examined in breast cancer cells by immunofluorescence microscopy (Figure 8C). At room temperature (RT), AB186 induced a

dose-dependent enlargement of tubulin network, with elongated microtubules. By contrast, after paclitaxel treatment microtubules were more condensed and reorganized into thick ring-like bundles near the nucleus. Experiments were also performed at 4 °C since cold treatment is known to induce depolymerization of microtubules [24]. As expected, in control cells, the microtubule network was altered by cold treatment. In the presence of paclitaxel, control treatment, no network remodeling was observed between RT and 4 °C conditions. Interestingly, AB186 treatment induced a dose-dependent stabilization of the network compared to control cells, suggesting an active role on the microtubule through binding to α -tubulin (Figure 8C).

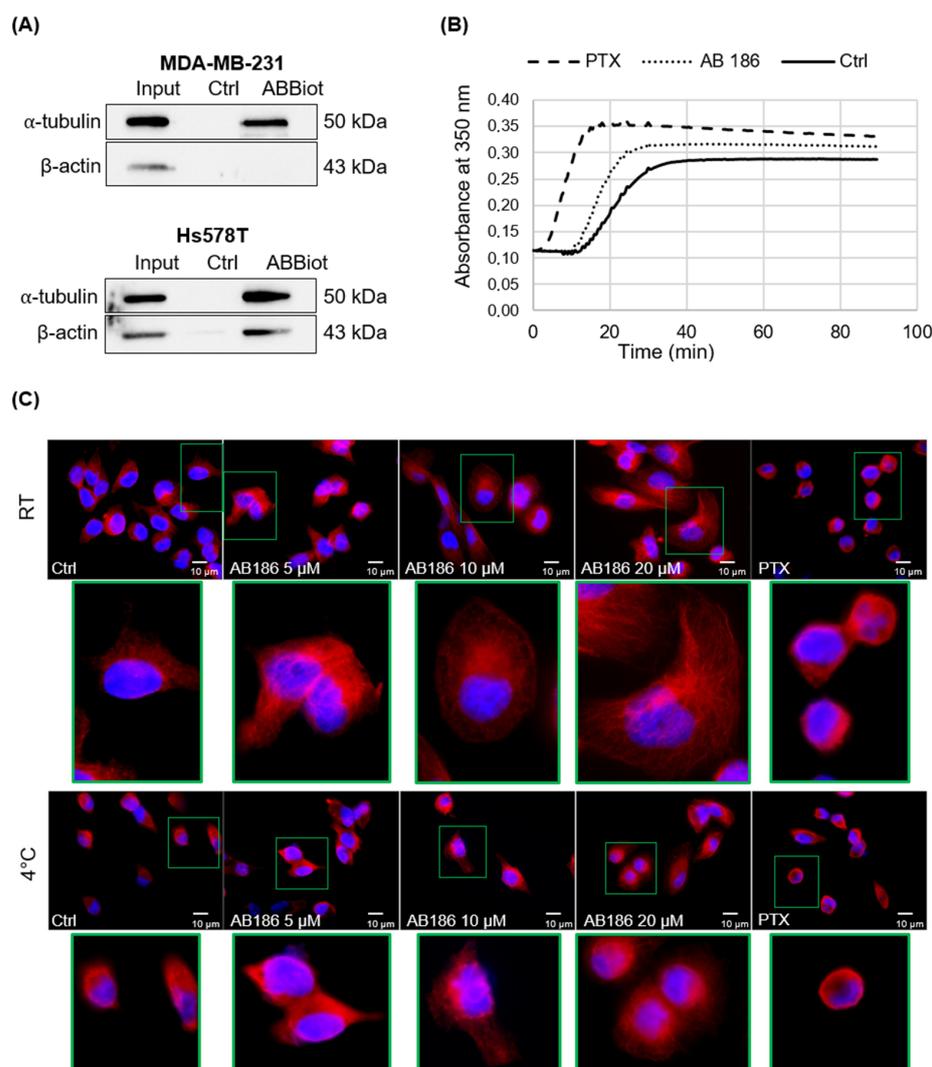


Figure 8. AB186 directly targets the microtubule cytoskeleton. **(A)** MDA-MB-231 and Hs578T cells lysate were incubated with the microbeads and biotinylated AB186 (AB186) for 40 min or in absence of AB186 (Ctrl). Precipitated proteins were then subjected to western blot analysis. Western blot analysis was performed using anti- α -tubulin and anti- β -actin antibodies. Input corresponds to the total lysate before pull-down assay. **(B)** In vitro tubulin polymerization assay was performed. β -tubulin was exposed to DMSO (Ctrl), AB186 (5 μ M), or paclitaxel (10 μ M). GTP was added to initiate the reaction. The tubulin polymerization rate was monitored for 90 min at 37 °C and measured by absorbance at 350 nm. **(C)** MDA-MB-231 cells were treated with DMSO (Ctrl), AB186 (5, 10 or 20 μ M), or paclitaxel (PTX) (5 μ M) for 15 min at room temperature (RT) or 4 °C. Then, cells were subjected to immunofluorescence analysis after staining with antibodies raised against α -tubulin. Cell nuclei were labelled with Hoechst dye. Representative high-resolution image focusing on one single cell in each group present a 6X magnification. Bar represents 10 μ m.

3. Discussion

The chemo-resistance of TNBC tumors highlights the urgent need to develop new drugs in order to stretch the range of chemotherapy drugs to fight the acquired resistances. Here, we studied two TGZ derivatives, $\Delta 2$ -TGZ and AB186, that we have previously shown to inhibit cell growth and to induce breast cancer cell death [14,20]. Interestingly, AB186 is a more potent inhibitor of TNBC cell proliferation than efatutazone, a TZD used in combination with chemotherapy drug to treat cancer [14,25]. Our aim was to better understand the mechanism of action of these two derivatives.

In order to investigate the kinetic of events leading to anti-cancerous effect of $\Delta 2$ -TGZ and AB186, we measured cell impedance in real time. The profiles obtained from RTCA suggested a rapid modification of the cell morphology occurring between 2 and 4 h of treatment with these compounds in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. We then showed an inhibition of MDA-MB-231 and Hs578T cell migration as soon as 6 h of treatment by $\Delta 2$ -TGZ or AB186. These results were consistent with the fact that TZDs have been reported to inhibit cancer cell motility in vitro and in vivo [26]. Several studies have shown that the inhibition of cell migration by TGZ was associated with the modification of cell morphology [27–29]. PK-1 (pancreas), ES-2 (ovary), and MDA-MB-231 (breast) cancer cells were smaller and their shape was modified to a spindle-shaped morphology. In PK-1 cells, the morphological changes induced by TGZ required a remodeling of actin network cells where TGZ inhibited lamellipodia formation and actin polymerization [27,28]. Likewise, in ES-2 cells, TGZ reduced the number of focal adhesions related to actin stress fibers decrease [29]. Moreover, TGZ reduced cell adhesion and spreading of MDA-MB-231 after 1 h of treatment on fibronectin coated-plates [28]. In our study, we also observed changes in cell shape and size. At early time, cells stretched and formed cytoplasmic extensions, followed by a round shape after 10 h 30 of treatment suggesting cell death. These changes were associated with reorganization of tubulin and actin networks.

Using proteomic analyses, we identified six potential cytoskeleton targets of AB186: γ -actin, β -tubulin, filamin-A, α -tubulin, moesin, and talin. Pull-down assays performed on MDA-MB-231 and Hs578T confirmed the binding of AB186 to α -tubulin. In vitro polymerization assays suggested that AB186 stimulated tubulin polymerization into microtubules. Immunofluorescence analysis showed a rapid enlargement and elongation of tubulin network, in agreement with the early maximal difference of CI measured by impedance analysis. This enlargement could result in stronger adhesion properties as previously observed [30]. It remains unclear at present how AB186 exerts its effect on microtubule assembly and stability. It could act as a tubulin stabilizer by a different process than that of paclitaxel. One may suggest that it could work similarly to Mdp3, a microtubule-binding protein that regulates microtubule assembly and stability [31]. Our results corroborate a previous study suggesting that TZDs could act as cytoskeleton binding molecules [32]. The exact consequences of AB186 interaction with α -tubulin need to be investigated.

In conclusion, we determined that AB186 was a potent pro-apoptotic agent in breast cancer cells. We further characterized early modifications of cell morphology followed by the inhibition of cell migration after $\Delta 2$ -TGZ and AB186 treatment. We identified for the first-time cytoskeleton targets, including α -tubulin, for AB186 that could explain the early morphological changes and migration inhibition and maybe apoptosis. Indeed, if microtubule alterations affect mitosis duration, this could lead to apoptosis [33]. Overall, these data suggest that AB186 could be a promising TZD molecule for TNBC treatment regarding its anti-migratory and pro-apoptotic properties. In order to comfort our hypothesis, this study needs to be extended in vivo by xenograft experiments on mice model.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

The synthesis of $\Delta 2$ -TGZ and AB186 were performed as previously described [13,14]. In stock solutions, both compounds were dissolved at 50 mM in DMSO. The synthesis of biotinylated and rhodamine-linked AB186 compounds are described in supplementary data

(Supplementary Data-S1). The human breast cancer and the non-tumorigenic human breast epithelial cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Molsheim, Strasbourg). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), DMEM/F12, RPMI Medium 1640 (RPMI), Trypsin-EDTA, and PBS were purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France). Ethanol (EtOH), dimethylsulfoxide (DMSO), fetal calf serum (FCS), horse serum, human epidermal growth factor (hEGF), L-glutamine, bovine insulin, hydrocortisone and cholera toxin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

4.2. Methods

4.2.1. Cell Culture and Treatment

MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were cultured at 37 °C under 5% CO₂ in phenol red DMEM and RPMI respectively, supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Hs578T cells were grown in DMEM 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 Δ2-TGZ and AB186 in 1% FCS containing medium.

4.2.2. Flow Cytometry

MDA-MB-231 (4×10^5 cells/well) and MCF-10A (1.5×10^5 cells/well) cells were seeded in 6-well plates and treated with DMSO (vehicle), 20 µM of Δ2-TGZ, or 4 µM of AB186 for 24 h or 48 h. Then, flow cytometry analyses were performed as described previously [21].

4.2.3. Real-Time Impedance-Based Cell Analysis

MCF-7 (8×10^3 cells/well) and MDA-MB-231 (4×10^3 cells/well) cells were seeded into 96-wells microelectronic standard E-plate and grown for 29 h before exposure to DMSO, Δ2-TGZ, or AB186. MCF-7 and MDA-MB-231 cells attachment, proliferation, and size variations were monitored in real-time and measured as impedance using the xCELLigence system (Real Time Cell Analyzer Single Plate (RTCA SPH) system) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) [34]. Cell index (CI) is an arbitrary unit representing the result of the impedance induced by adherent cells to the electron flow. CI was calculated as follows: $CI = (\text{impedance at time point } n - \text{impedance in the absence of cells}) / \text{nominal impedance value}$. 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. Impedance measurements were performed every 15 min.

4.2.4. Immunofluorescence

MCF-7 (4×10^4 cells/well) and MDA-MB-231 (8×10^4 cells/well) were seeded in 24-well plates on coverslips and treated with Δ2-TGZ or AB186 for different times. Then, immunofluorescence experiments were performed as described previously [21]. Polymeric F-actin filaments were labelled with Phalloïdin conjugated to Alexa Fluor 488 (A12379, Thermofisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) diluted to 1:30. Microtubules and intermediate filaments were labelled with α-tubulin (GTX102079, GeneTex, Letchworth Garden City, England) and vimentin (MAB1633, Chemicon, Nürnberg, Germany) antibodies, respectively, diluted to 1:250. MDA-MB-231 (3×10^5 cells/well) were also seeded in 12-well plates on coverslips and exposed to 3 µM of rhodamine-labelled AB186 (ABRhod) or unlabeled compound (Control) during 1 and 6 h. Then, cells were fixed with 4% of paraformaldehyde and nuclei were labelled with Hoechst. Fluorescence labeling was observed under an Eclipse 80i microscope and images were collected using NIS-Elements Basic Research software, 4.20.00 (Nikon, Champigny sur Marne, France).

4.2.5. 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 pipette tip through the cell monolayer and cells were treated with $\Delta 2$ -TGZ or AB186 for 0, 3, 6, or 12 h. Wound closure was observed as previously described [35].

4.2.6. Migration Assay

MDA-MB-231 (13,750 cells/well) and Hs578T (13,750 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 $\Delta 2$ -TGZ or AB186 in medium supplemented with 1% FCS. The upper chamber of insert containing cells was placed into the lower chamber supplemented with 10% FCS as chemoattractant. After 9 h of treatment, the migrating cells were analyzed as described previously [35].

4.2.7. SPR Binding Analysis

Cytoplasmic proteins of MDA-MB-231 cells were extracted using the ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit following manufacturer instructions (Merk Millipore). The cytoplasmic fraction was filtrated through a 0.2 μ m microspin Costar at 10,000 $\times g$ for 7 min at 4 $^{\circ}$ C. Proteins were diluted to 5 μ g/mL with PBS 1X before Surface Plasmon Resonance analysis on AB186 hybridized chips (Supplementary Data-S2).

4.2.8. Pull down Assay

Pull-down assay was performed with Dynabeads M-280 Streptavidin (Life Technologies, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 50 mM of biotinylated AB186 were fixed to the microbeads during 20 min at room temperature under agitation. Then, the microbeads were washed three times with 0.1% Triton X-100 in PBS buffer and 400 μ g of proteins was added for 40 min at 4 $^{\circ}$ C under agitation. For the control, proteins were incubated with the microbeads without biotinylated AB186. After washing, proteins were re-suspended in lysis buffer while the beads were removed with a magnet and the protein was subjected to Western blot as described previously [21]. The antibodies raised against β -actin (SC-1615, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) and α -tubulin (GTX102079, GeneTex, Letchworth Garden City, England) were diluted at 1:5000 and 1:4000 respectively.

4.2.9. Tubulin Polymerization Assay

The effect of AB186 on tubulin assembly was measured using the In Vitro Tubulin Polymerization Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Millipore, Molsheim, France). Briefly, polymerization reactions occur in 70 μ L final volume of 1 \times polymerization buffer (PB)-GTP (1mM final), of which 60 μ L is the 60 μ M tubulin and 10 μ L is the test substance AB186 (5 μ M) or paclitaxel (PTX) (10 μ M) or DMSO (control). Tubulin assembly was measured by spectrophotometry every 30 s at 350 nm for 90 min at 37 $^{\circ}$ C.

4.2.10. Statistical Analysis

The results of each experiment are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of three to six different experiments. Statistical differences 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, Chicago, IL, USA).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23126859/s1>.

Author Contributions: M.G. was responsible for designing the study, performing the experiments, analyzing the data and writing, reviewing and editing the manuscript. M.L. was responsible for performing experiments, review and editing the manuscript. A.K. for performing experiments, analyzing the data. S.K. and I.G.-V. were responsible for the conceptualization and supervision,

designing the experiments, analyzing the data, writing, reviewing, and editing the manuscript. L.B. and T.B. were responsible for the statistical analysis of the cell impedance time responses. M.B.-H. contributed by her experience in impedance-based signals and cellular morphology. D.D. designed and performed the synthetic procedures for the preparation of tagged AB186 derivatives, and reviewed the manuscript. M.B. designed the synthetic procedures for the preparation of tagged AB186 derivatives, wrote the corresponding experimental data, designed and performed the in vitro tubulin polymerization assay, wrote the corresponding experimental data, and reviewed the manuscript. C.C. designed the synthetic procedures for the preparation of tagged AB186 derivatives, wrote the corresponding experimental data, and reviewed the manuscript. S.M. contributed to the follow up of the SPR experiments and analyzed the data, wrote the corresponding experimental data, and reviewed the manuscript. W.B. and A.R. designed and performed the SPR binding experiments and reviewed the manuscript. S.F. designed experiments related to the microscopical study of changes in tubulin network, he reviewed and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants of the “Université de Lorraine”, the “Conseil Régional du Grand Est”, “Cancéropôle Est” and the “Ligue Contre le Cancer” (9FI13522TMJG). Marine Geoffroy, Marine Lemesle and Dorian Dupommier were recipients of a PhD grant of the “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Elodie Cortelazzo-Polisini and Arnaud Risler from L2CM laboratory for the realization of the in vitro tubulin polymerization assay.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Parise, C.A.; Caggiano, V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *J. Cancer Epidemiol.* **2014**, *2014*, 469251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**, *365*, 1687–1717. [[CrossRef](#)]
4. Nahta, R.; Esteva, F.J. HER2 therapy: Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.* **2006**, *8*, 215. [[CrossRef](#)]
5. Abramson, V.G.; Lehmann, B.D.; Ballinger, T.J.; Pietenpol, J.A. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer* **2015**, *121*, 8–16. [[CrossRef](#)]
6. Mazerbourg, S.; Kuntz, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Berthe, A.; Geoffroy, M.; Flament, S.; Bordessa, A.; Boisbrun, M. Reprofiting of Troglitazone Towards More Active and Less Toxic Derivatives: A New Hope for Cancer Treatment? *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2115–2124. [[CrossRef](#)]
7. Fröhlich, E.; Wahl, R. Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 845340. [[CrossRef](#)]
8. Prost, S.; Relouzat, F.; Spentchian, M.; Ouzegdouh, Y.; Saliba, J.; Massonnet, G.; Beressi, J.-P.; Verhoeyen, E.; Ragueneau, V.; Maneglier, B.; et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature* **2015**, *525*, 380–383. [[CrossRef](#)]
9. Rousselot, P.; Prost, S.; Guilhot, J.; Roy, L.; Etienne, G.; Legros, L.; Charbonnier, A.; Coiteux, V.; Cony-Makhoul, P.; Huguet, F.; et al. Pioglitazone together with imatinib in chronic myeloid leukemia: A proof of concept study. *Cancer* **2017**, *123*, 1791–1799. [[CrossRef](#)]
10. Smallridge, R.C.; Copland, J.A.; Brose, M.S.; Wadsworth, J.T.; Houvras, Y.; Menefee, M.E.; Bible, K.C.; Shah, M.H.; Gramza, A.W.; Klopffer, J.P.; et al. Efatutazone, an oral PPAR- γ agonist, in combination with paclitaxel in anaplastic thyroid cancer: Results of a multicenter phase 1 trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 2392–2400. [[CrossRef](#)]
11. Ishay-Ronen, D.; Diepenbruck, M.; Kalathur, R.K.R.; Sugiyama, N.; Tiede, S.; Ivanek, R.; Bantug, G.; Morini, M.F.; Wang, J.; Hess, C.; et al. Gain Fat—Lose Metastasis: Converting Invasive Breast Cancer Cells into Adipocytes Inhibits Cancer Metastasis. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 17–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chojkier, M. Troglitazone and liver injury: In search of answers. *Hepatology* **2005**, *41*, 237–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Salamone, S.; Colin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Flament, S.; Martin, H.; Richert, L.; Chapleur, Y.; Boisbrun, M. Synthesis of new troglitazone derivatives: Anti-proliferative activity in breast cancer cell lines and preliminary toxicological study. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 206–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bordessa, A.; Colin, C.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Husson, G.; Vo, M.; Flament, S.; Martin, H.; Chapleur, Y.; et al. Optimization of troglitazone derivatives as potent anti-proliferative agents: Towards more active and less toxic compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 129–140. [[CrossRef](#)]
15. Huang, J.-W.; Shiau, C.-W.; Yang, J.; Wang, D.-S.; Chiu, H.-C.; Chen, C.-S.; Chen, A.C.-Y. Development of Small-Molecule Cyclin D1-Ablative Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4684–4689. [[CrossRef](#)]
16. Shiau, C.-W.; Yang, C.-C.; Kulp, S.K.; Chen, K.-F.; Chen, C.-S.; Huang, J.-W.; Chen, C.-S. Thiazolidinediones Mediate Apoptosis in Prostate Cancer Cells in Part through Inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 Functions Independently of PPARgamma. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1561–1569. [[CrossRef](#)]
17. Lecomte, J.; Flament, S.; Salamone, S.; Boisbrun, M.; Mazerbourg, S.; Chapleur, Y.; Grillier-Vuissoz, I. 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.* **2008**, *112*, 437–451. [[CrossRef](#)]
18. Yang, C.-C.; Ku, C.-Y.; Wei, S.; Shiau, C.-W.; Chen, C.-S.; Pinzone, J.J.; Ringel, M.D.; Chen, C.-S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma-Independent Repression of Prostate-Specific Antigen Expression by Thiazolidinediones in Prostate Cancer Cells. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 1564–1570. [[CrossRef](#)]
19. 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*, 101–110. [[CrossRef](#)]
20. Colin-Cassin, C.; Yao, X.; Cerella, C.; Chbicheb, S.; Kuntz, S.; Mazerbourg, S.; Boisbrun, M.; Chapleur, Y.; Diederich, M.; Flament, S.; et al. PPAR γ -inactive Δ 2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54*, 393–404. [[CrossRef](#)]
21. Geoffroy, M.; Kleinclaus, A.; Grandemange, S.; Hupont, S.; Boisbrun, M.; Flament, S.; Kuntz, S. Pro-apoptotic effect of Δ 2-TGZ in “claudin-1-low” triple-negative breast cancer cells: Involvement of claudin-1. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *165*, 517–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fife, C.M.; McCarroll, J.A.; Kavallaris, M. Movers and shakers: Cells cytoskeleton in cancer metastasis. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 5507–5523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rouleau, A.; El Osta, M.; Lucchi, G.; Ducoroy, P.; Boireau, W. Immuno-MALDI-MS in Human Plasma and On-Chip Biomarker Characterizations at the Femtomole Level. *Sensors* **2012**, *12*, 15119–15132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Luo, Y.; Zeng, R.R.; Guo, Q.; Xu, J.; Sun, X.; Wang, L. Identifying a novel anticancer agent with microtubule-stabilizing effects through computational cell-based bioactivity prediction models and bioassays. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1519–1530. [[CrossRef](#)]
25. Colin, C.; Meyer, M.; Cerella, C.; Kleinclaus, A.; Monard, G.; Boisbrun, M.; Diederich, M.; Flament, S.; Grillier-Vuissoz, I.; Kuntz, S. Biotinylation enhances the anticancer effects of 15d-PGJ2 against breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 1991–2000. [[CrossRef](#)]
26. Blanquicett, C.; Roman, J.; Hart, C.M. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther.* **2008**, *6*, 25–34.
27. Okumura, T.; Motomura, W.; Nagamine, M.; Tanno, S.; Sawamukai, M.; Takahashi, N.; Kohgo, Y. Inhibition of cell invasion and morphological change by troglitazone in human pancreatic cancer cells. *J. Gastroenterol.* **2004**, *39*, 461–468. [[CrossRef](#)]
28. Wang, P.; Chou, F.; Porchia, L.; Saji, M.; Pinzone, J.J. Troglitazone inhibits cell migration, adhesion, and spreading by modulating cytoskeletal rearrangement in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* **2008**, *47*, 905–915. [[CrossRef](#)]
29. Yang, Y.-C.; Ho, T.-C.; Chen, S.-L.; Lai, H.-Y.; Wu, J.-Y.; Tsao, Y.-P. Inhibition of cell motility by troglitazone in human ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer* **2007**, *7*, 216. [[CrossRef](#)]
30. Folkman, J.; Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* **1978**, *273*, 345–349. [[CrossRef](#)]
31. Sun, X.; Shi, X.; Liu, M.; Li, D.; Zhang, L.; Liu, X.; Zhou, J. Mdp3 is a novel microtubule-binding protein that regulates microtubule assembly and stability. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 3929–3937. [[CrossRef](#)]
32. Russu, W.A. Thiazolidinedione anti-cancer activity: Is inhibition of microtubule assembly implicated? *Med. Hypotheses* **2007**, *68*, 343–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Matson, D.R.; Stukenberg, T. Spindle Poisons and Cell Fate: A Tale of Two Pathways. *Mol. Interv.* **2011**, *11*, 141–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lehtimäki, J.; Hakala, M.; Lappalainen, P. Actin Filament Structures in Migrating Cells. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**, *235*, 123–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Geoffroy, M.; Kleinclaus, A.; Kuntz, S.; Grillier-Vuissoz, I. Claudin 1 inhibits cell migration and increases intercellular adhesion in triple-negative breast cancer cell line. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 7643–7653. [[CrossRef](#)]

II. ARTICLE SCIENTIFIQUE BASE SUR MES RESULTATS

Un article scientifique basé sur mes résultats est en cours de finalisation et sera très prochainement soumis au journal *Cancers*. Ce dernier rapporte une partie des travaux décrit dans le chapitre 1 de mes résultats : [L'expression de la claudine 1 permet-elle de sensibiliser les cellules TNBC à la chimiothérapie ?](#)

Il est articulé autour des trois premiers axes de ce chapitre :

- Caractérisation de la réponse apoptotique des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie
- Implication de la claudine 1 dans l'induction de l'apoptose en réponse aux différents agents de chimiothérapie dans les lignées TNBC
- Importance du motif de liaison au domaine PDZ de la claudine 1 dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 au 5-FU

BIBLIOGRAPHIE

- Adamsky, K., Arnold, K., Sabanay, H., & Peles, E. (2003). Junctional protein MAGI-3 interacts with receptor tyrosine phosphatase β (RPTP β) and tyrosine-phosphorylated proteins. *Journal of Cell Science*, 116(7), 1279–1289. <https://doi.org/10.1242/jcs.00302>
- Aijaz, S., D'Atri, F., Citi, S., Balda, M. S., & Matter, K. (2005). Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition. *Developmental Cell*, 8(5), 777–786. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.003>
- Akpınar, B., Bracht, E. V., Reijnders, D., Safarikova, B., Jelinkova, I., Grandien, A., Vaculova, A. H., Zhivotovsky, B., & Olsson, M. (2015). 5-Fluorouracil-induced RNA stress engages a TRAIL-DISC-dependent apoptosis axis facilitated by p53. *Oncotarget*, 6(41). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6030>
- Alessandrini, F., Pezzè, L., & Ciribilli, Y. (2017). LAMPs: Shedding light on cancer biology. *Seminars in Oncology*, 44(4), 239–253. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.10.013>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Allison, K. H. (2012). Molecular Pathology of Breast Cancer: What a Pathologist Needs to Know. *American Journal of Clinical Pathology*, 138(6), 770–780. <https://doi.org/10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO>
- Al-Zahrani, K. N., Cook, D. P., Vanderhyden, B. C., & Sabourin, L. A. (2018). Assessing the efficacy of androgen receptor and Sox10 as independent markers of the triple-negative breast cancer subtype by transcriptome profiling. *Oncotarget*, 9(70), 33348–33359. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26072>
- Amasheh, M., Fromm, A., Krug, S. M., Amasheh, S., Andres, S., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J.-D. (2010). TNF α -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NF κ B signaling. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 23), 4145–4155. <https://doi.org/10.1242/jcs.070896>
- Andre, F., Job, B., Dessen, P., Tordai, A., Michiels, S., Liedtke, C., Richon, C., Yan, K., Wang, B., Vassal, G., Delaloge, S., Hortobagyi, G. N., Symmans, W. F., Lazar, V., & Puztai, L. (2009). Molecular

- characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(2), 441–451. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1791>
- Angelow, S., Ahlstrom, R., & Yu, A. S. L. (2008). Biology of claudins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295(4), F867–F876. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90264.2008>
- Anothaisintawee, T., Wiratkapun, C., Lerdsitthichai, P., Kasamesup, V., Wongwaisayawan, S., Srinakaran, J., Hirunpat, S., Woodtichartpreecha, P., Boonlikit, S., Teerawattananon, Y., & Thakkinstian, A. (2013). Risk Factors of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asia Pacific Journal of Public Health*, 25(5), 368–387. <https://doi.org/10.1177/1010539513488795>
- Asaka, M., Hirase, T., Hashimoto-Komatsu, A., & Node, K. (2011). Rab5a-mediated localization of claudin-1 is regulated by proteasomes in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300(1), C87-96. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00565.2010>
- Asghar, U. S., Barr, A. R., Cutts, R., Beaney, M., Babina, I., Sampath, D., Giltane, J., Lacap, J. A., Crocker, L., Young, A., Pearson, A., Herrera-Abreu, M. T., Bakal, C., & Turner, N. C. (2017). Single-Cell Dynamics Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(18), 5561–5572. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0369>
- Baker, O. J., Camden, J. M., Redman, R. S., Jones, J. E., Seye, C. I., Erb, L., & Weisman, G. A. (2008). Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma alter tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 295(5), C1191-1201. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00144.2008>
- Balda, M. S., & Matter, K. (2000). Transmembrane proteins of tight junctions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11(4), 281–289. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0177>
- Balko, J. M., Giltane, J. M., Wang, K., Schwarz, L. J., Young, C. D., Cook, R. S., Owens, P., Sanders, M. E., Kuba, M. G., Sánchez, V., Kurupi, R., Moore, P. D., Pinto, J. A., Doimi, F. D., Gómez, H., Horiuchi, D., Goga, A., Lehmann, B. D., Bauer, J. A., ... Arteaga, C. L. (2014). Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discovery*, 4(2), 232–245. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0286>

- Bareche, Y., Venet, D., Ignatiadis, M., Aftimos, P., Piccart, M., Rothe, F., & Sotiriou, C. (2018). Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(4), 895–902. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy024>
- Barnard, M. E., Boeke, C. E., & Tamimi, R. M. (2015). Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1856(1), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.002>
- Basu, M., Sengupta, I., Khan, M. W., Srivastava, D. K., Chakrabarti, P., Roy, S., & Das, C. (2017). Dual histone reader ZMYND8 inhibits cancer cell invasion by positively regulating epithelial genes—PubMed. 11(19), 1919–1934. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170223>
- Bauer, H. C., Traweger, A., Zweimueller-Mayer, J., Lehner, C., Tempfer, H., Krizbai, I., Wilhelm, I., & Bauer, H. (2011). New aspects of the molecular constituents of tissue barriers. *Journal of Neural Transmission*, 118(1), 7–21. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0484-6>
- Berry, D. A., Cirincione, C., Henderson, I. C., Citron, M. L., Budman, D. R., Goldstein, L. J., Martino, S., Perez, E. A., Muss, H. B., Norton, L., Hudis, C., & Winer, E. P. (2006). Estrogen-Receptor Status and Outcomes of Modern Chemotherapy for Patients With Node-Positive Breast Cancer. *JAMA*, 295(14), 1658. <https://doi.org/10.1001/jama.295.14.1658>
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., & Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *International Journal of Cancer*, 123(1), 236–240. <https://doi.org/10.1002/ijc.23518>
- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., & González-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 292(1), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.08.007>
- Betterman, K. L., Paquet-Fifield, S., Asselin-Labat, M.-L., Visvader, J. E., Butler, L. M., Stacker, S. A., Achen, M. G., & Harvey, N. L. (2012). Remodeling of the Lymphatic Vasculature during Mouse Mammary Gland Morphogenesis Is Mediated via Epithelial-Derived Lymphangiogenic Stimuli. *The American Journal of Pathology*, 181(6), 2225–2238. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.035>

- Bhat, A. A., Ahmad, R., Uppada, S. B., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2016). Claudin-1 promotes TNF- α -induced epithelial-mesenchymal transition and migration in colorectal adenocarcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 349(1), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.10.005>
- Bhat, A. A., Sharma, A., Pope, J., Krishnan, M., Washington, M. K., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2012). Caudal Homeobox Protein Cdx-2 Cooperates with Wnt Pathway to Regulate Claudin-1 Expression in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037174>
- Bhat, A. A., Syed, N., Therachiyil, L., Nisar, S., Hashem, S., Macha, M. A., Yadav, S. K., Krishnankutty, R., Muralitharan, S., Al-Naemi, H., Bagga, P., Reddy, R., Dhawan, P., Akobeng, A., Uddin, S., Frenneaux, M. P., El-Rifai, W., & Haris, M. (2020). Claudin-1, A Double-Edged Sword in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 569. <https://doi.org/10.3390/ijms21020569>
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(11), 674–690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
- Blanchard, A. A., Skliris, G. P., Watson, P. H., Murphy, L. C., Penner, C., Tomes, L., Young, T. L., Leygue, E., & Myal, Y. (2009). Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 454(6), 647–656. <https://doi.org/10.1007/s00428-009-0770-6>
- Blanchard, A. A., Zelinski, T., Xie, J., Cooper, S., Penner, C., Leygue, E., & Myal, Y. (2016). Identification of Claudin 1 Transcript Variants in Human Invasive Breast Cancer. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163387>
- Bluming, A. Z. (2012). Breast cancer following diethylstilbestrol exposure in utero: A tragedy? *European Journal of Epidemiology*, 27(4), 317–318; author reply 318.
- Bonander, N., Jamshad, M., Oberthür, D., Clare, M., Barwell, J., Hu, K., Farquhar, M. J., Stamataki, Z., Harris, H. J., Dierks, K., Dafforn, T. R., Betzel, C., McKeating, J. A., & Bill, R. M. (2013). Production, Purification and Characterization of Recombinant, Full-Length Human Claudin-1. *PLoS ONE*, 8(5), e64517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064517>
- Brewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2005). Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process.

- FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 19(8), 923–933. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3260com>
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913–917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>
- Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(7), 1688–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
- Butt, A. M., Khan, I. B., Hussain, M., Idress, M., Lu, J., & 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. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 1359–1369. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0870-7>
- Byrne, C., Webb, P. M., Jacobs, T. W., Peiro, G., Schnitt, S. J., Connolly, J. L., Willett, W. C., & Colditz, G. A. (2002). Alcohol consumption and incidence of benign breast disease. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 11(11), 1369–1374.
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., & Reeves, W. J. (1974). Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions 2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 53(3), 661–674. <https://doi.org/10.1093/jnci/53.3.661>
- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L., & Perou, C. M. (2007). The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2329–2334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>
- Chaffer, C. L., San Juan, B. P., Lim, E., & Weinberg, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 35(4), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9648-7>

- Chang, T. L., Ito, K., Ko, T. K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yeoh, K. G., Fukamachi, H., & Ito, Y. (2010). Claudin-1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 138(1), 255-265.e1-3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.044>
- Charpin, C., Tavassoli, F., Secq, V., Giusiano, S., Villeret, J., Garcia, S., Birnbaum, D., Bonnier, P., Lavaut, M.-N., Boubli, L., Carcopino, X., & Iovanna, J. (2012). Validation of an immunohistochemical signature predictive of 8-year outcome for patients with breast carcinoma. *International Journal of Cancer*, 131(3), E236-243. <https://doi.org/10.1002/ijc.27371>
- Che, P., Tang, H., & Li, Q. (2013). The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology*, 446(1–2), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.009>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chen, M. B., Whisler, J. A., Jeon, J. S., & Kamm, R. D. (2013). Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 5(10), 1262–1271. <https://doi.org/10.1039/c3ib40149a>
- Chen, Y.-J., You, M.-L., Chong, Q.-Y., Pandey, V., Zhuang, Q.-S., Liu, D.-X., Ma, L., Zhu, T., & 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), E1274. <https://doi.org/10.3390/ijms18061274>
- Chen, Y.-X., Li, Z.-B., Diao, F., Cao, D.-M., Fu, C.-C., & Lu, J. (2006). Up-regulation of RhoB by glucocorticoids and its effects on the cell proliferation and NF-kappaB transcriptional activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 101(4–5), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.06.030>
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J., & Sebt, S. M. (2000). Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 17974–17978. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000145200>

- Chiang, S.-K., Chang, W.-C., Chen, S.-E., & Chang, L.-C. (2019a). DOCK1 Regulates Growth and Motility through the RRP1B-Claudin-1 Pathway in Claudin-Low Breast Cancer Cells. *Cancers*, 11(11), E1762. <https://doi.org/10.3390/cancers11111762>
- Chiang, S.-K., Chang, W.-C., Chen, S.-E., & Chang, L.-C. (2019b). DOCK1 Regulates Growth and Motility through the RRP1B-Claudin-1 Pathway in Claudin-Low Breast Cancer Cells. *Cancers*, 11(11), E1762. <https://doi.org/10.3390/cancers11111762>
- Chifflet, S., & Hernández, J. A. (2012). The plasma membrane potential and the organization of the actin cytoskeleton of epithelial cells. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 121424. <https://doi.org/10.1155/2012/121424>
- 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., Tsai, T.-R., Ho, S.-Y., Jian, T.-Y., Wu, H.-Y., Chen, P.-R., Lin, N.-C., Huang, H.-T., Yang, T.-L., Pai, C.-Y., ... Huang, H.-D. (2016). miRTarBase 2016: Updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D239–D247. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1258>
- Chung, J., Grant, R. I., Kaplan, D. R., & Irwin, M. S. (2011). Special AT-rich Binding Protein-2 (SATB2) Differentially Affects Disease-causing p63 Mutant Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40671–40680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271189>
- Citalán-Madrid, A. F., García-Ponce, A., Vargas-Robles, H., Betanzos, A., & Schnoor, M. (2013). Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms. *Tissue Barriers*, 1(5), e26938. <https://doi.org/10.4161/tisb.26938>
- Citron, M. L., Berry, D. A., Cirincione, C., Hudis, C., Winer, E. P., Gradishar, W. J., Davidson, N. E., Martino, S., Livingston, R., Ingle, J. N., Perez, E. A., Carpenter, J., Hurd, D., Holland, J. F., Smith, B. L., Sartor, C. I., Leung, E. H., Abrams, J., Schilsky, R. L., ... Norton, L. (2003). Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: First report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(8), 1431–1439. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.09.081>

- Cochrane, D. R., Howe, E. N., Spoelstra, N. S., & Richer, J. K. (2010). Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers. *Journal of Oncology*, 2010, 821717. <https://doi.org/10.1155/2010/821717>
- Colditz, G. A., Kaphingst, K. A., Hankinson, S. E., & Rosner, B. (2012). Family history and risk of breast cancer: Nurses' health study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(3), 1097–1104. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-1985-9>
- Colegio, O. R., Van Itallie, C., Rahner, C., & Anderson, J. M. (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284(6), C1346-1354. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00547.2002>
- 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). PPAR γ -inactive Δ 2-troglitazone independently triggers ER stress and apoptosis in breast cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 54(5), 393–404. <https://doi.org/10.1002/mc.22109>
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2001). Familial breast cancer: Collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet*, 358(9291), 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06524-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06524-2)
- Compton, C. (2020). Cancer Initiation, Promotion, and Progression and the Acquisition of Key Behavioral Traits. In C. Compton, *Cancer: The Enemy from Within* (pp. 25–48). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40651-6_2
- Connolly, D. T. (1991). Vascular permeability factor: A unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry*, 47(3), 219–223. <https://doi.org/10.1002/jcb.240470306>
- Cording, J., Berg, J., Käding, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J. K., Milatz, S., Günzel, D., Wolburg, H., Piontek, J., Huber, O., & Blasig, I. E. (2012). Tight junctions: Claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *Journal of Cell Science*, jcs.114306. <https://doi.org/10.1242/jcs.114306>

- Coyne, C. B., Gambling, T. M., Boucher, R. C., Carson, J. L., & Johnson, L. G. (2003). Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(5), L1166–L1178. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00182.2003>
- 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., Fan, C., Zhang, X., He, X., Pavlick, A., Gutierrez, M. C., Renshaw, L., Larionov, A. A., Faratian, D., Hilsenbeck, S. G., ... Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13820–13825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905718106>
- Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv*, 472(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>
- Cukierman, L., Meertens, L., Bertaux, C., Kajumo, F., & Dragic, T. (2009). Residues in a Highly Conserved Claudin-1 Motif Are Required for Hepatitis C Virus Entry and Mediate the Formation of Cell-Cell Contacts. *Journal of Virology*, 83(11), 5477–5484. <https://doi.org/10.1128/JVI.02262-08>
- Da Costa, D., Agathangelou, A., Perry, T., Weston, V., Petermann, E., Zlatanou, A., Oldreive, C., Wei, W., Stewart, G., Longman, J., Smith, E., Kearns, P., Knapp, S., & Stankovic, T. (2013). BET inhibition as a single or combined therapeutic approach in primary paediatric B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Cancer Journal*, 3(7), e126. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.24>
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, 5(10), 2929–2943.
- Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*, 7(10), 1281–1294. <https://doi.org/10.7150/jca.13141>
- Darb-Esfahani, S., Loibl, S., Müller, B. M., Roller, M., Denkert, C., Komor, M., Schlüns, K., Blohmer, J. U., Budczies, J., Gerber, B., Noske, A., du Bois, A., Weichert, W., Jackisch, C., Dietel, M., Richter, K., Kaufmann, M., & von Minckwitz, G. (2009). Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: Role of steroid hormone and HER2 receptor expression

- in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Research: BCR*, 11(5), R69. <https://doi.org/10.1186/bcr2363>
- Daugherty, B. L., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J. D., & Koval, M. (2007). Regulation of Heterotypic Claudin Compatibility. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30005–30013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703547200>
- Davis, C., Harris, H. J., Hu, K., Drummer, H. E., McKeating, J. A., Mullins, J. G. L., & Balfe, P. (2012). In silico directed mutagenesis identifies the CD81/claudin-1 hepatitis C virus receptor interface: Modelling the CD81/claudin-1 receptor for HCV. *Cellular Microbiology*, 14(12), 1892–1903. <https://doi.org/10.1111/cmi.12008>
- de Cremoux, P., Gauville, C., Closson, V., Linares, G., Calvo, F., Tavitian, A., & Olofsson, B. (1994). EGF modulation of the ras-related rhoB gene expression in human breast-cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 59(3), 408–415. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590320>
- de Koning, B. A. E., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Pieters, R., Büller, H. A., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. C. (2007). Alterations in epithelial and mesenchymal intestinal gene expression during doxorubicin-induced mucositis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(8), 1814–1825. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9174-5>
- DeCosse, J. J., Gossens, C., Kuzma, J. F., & Unsworth, B. R. (1975). Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(4), 913–922.
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., & von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *Lancet (London, England)*, 389(10087), 2430–2442. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0)
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Di Cello, F., Cope, L., Li, H., Jeschke, J., Wang, W., Baylin, S. B., & 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(7), e68630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068630>

- Diehn, M., Cho, R. W., Lobo, N. A., Kalisky, T., Dorie, M. J., Kulp, A. N., Qian, D., Lam, J. S., Ailles, L. E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M. J., Wapnir, I., Dirbas, F. M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S. K., ... Clarke, M. F. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 458(7239), 780–783. <https://doi.org/10.1038/nature07733>
- Ding, L., Gu, H., Xiong, X., Ao, H., Cao, J., Lin, W., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2019). MicroRNAs Involved in Carcinogenesis, Prognosis, Therapeutic Resistance and Applications in Human Triple-Negative Breast Cancer. *Cells*, 8(12), E1492. <https://doi.org/10.3390/cells8121492>
- Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., Cao, J., & Chen, Y.-H. (2012). Inflammation and Disruption of the Mucosal Architecture in Claudin-7-Deficient Mice. *Gastroenterology*, 142(2), 305–315. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.025>
- DiTommaso, T., Hb, P., H, S., P, K., Po, H., & Im, S. (2014). Keratin 76 is required for tight junction function and maintenance of the skin barrier. *PLoS Genetics*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004706>
- Dobbin, K. K., Beer, D. G., Meyerson, M., Yeatman, T. J., Gerald, W. L., Jacobson, J. W., Conley, B., Buetow, K. H., Heiskanen, M., Simon, R. M., Minna, J. D., Girard, L., Misek, D. E., Taylor, J. M. G., Hanash, S., Naoki, K., Hayes, D. N., Ladd-Acosta, C., Enkemann, S. A., ... Giordano, T. J. (2005). Interlaboratory comparability study of cancer gene expression analysis using oligonucleotide microarrays. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(2 Pt 1), 565–572.
- Dogterom, M., & Koenderink, G. H. (2019). Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(1), 38–54. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0067-1>
- Dossus, L., Boutron-Ruault, M.-C., Kaaks, R., Gram, I. T., Vilier, A., Fervers, B., Manjer, J., Tjonneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Chang-Claude, J., Boeing, H., Steffen, A., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Sarantopoulou, M., Palli, D., Berrino, F., Tumino, R., ... Clavel-Chapelon, F. (2014). Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: Results from the EPIC cohort. *International Journal of Cancer*, 134(8), 1871–1888. <https://doi.org/10.1002/ijc.28508>

- Du, Y.-L., Liang, Y., Cao, Y., Liu, L., Li, J., & Shi, G.-Q. (2021). LncRNA XIST Promotes Migration and Invasion of Papillary Thyroid Cancer Cell by Modulating MiR-101-3p/CLDN1 Axis. *Biochemical Genetics*, 59(2), 437–452. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-09985-8>
- Duchatelet, S., Boyden, L. M., Ishida-Yamamoto, A., Zhou, J., Guibbal, L., Hu, R., Lim, Y. H., Bole-Feysot, C., Nitschké, P., Santos-Simarro, F., de Lucas, R., Milstone, L. M., Goldenstern, V., Helfrich, Y. R., Attardi, L. D., Lifton, R. P., Choate, K. A., & Hovnanian, A. (2019). Mutations in PERP cause dominant and recessive keratoderma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 139(2), 380–390. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.026>
- Duffy, H. S., John, G. R., Lee, S. C., Brosnan, C. F., & Spray, D. C. (2000). Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(23), RC114.
- Dukes, J. D., Fish, L., Richardson, J. D., Blaikley, E., Burns, S., Caunt, C. J., Chalmers, A. D., & Whitley, P. (2011). Functional ESCRT machinery is required for constitutive recycling of claudin-1 and maintenance of polarity in vertebrate epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(17), 3192–3205. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0343>
- Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698–707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
- Etzrodt, V., Idowu, T. O., Schenk, H., Seeliger, B., Prasse, A., Thamm, K., Pape, T., Müller-Deile, J., van Meurs, M., Thum, T., Garg, A., Geffers, R., Stahl, K., Parikh, S. M., Haller, H., & David, S. (2021). Role of endothelial microRNA 155 on capillary leakage in systemic inflammation. *Critical Care (London, England)*, 25(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03500-0>
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherner, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., & Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137), 801–805. <https://doi.org/10.1038/nature05654>
- Fallahi, H., & Godini, R. (2019). System-level responses to cisplatin in pro-apoptotic stages of breast cancer MCF-7 cell line. *Computational Biology and Chemistry*, 83, 107155. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.107155>

- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M. B., Jackson, S. P., Smith, G. C. M., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. *Journal of Cell Biology*, 17(2), 375–412. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.2.375>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research: BCR*, 10(2), R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V., & Gao, D. (2015). EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527(7579), 472–476. <https://doi.org/10.1038/nature15748>
- Fortier, A.-M., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11555–11571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428920>
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
- Franke, W. W., Heid, H., Zimbelmann, R., Kuhn, C., Winter-Simanowski, S., Dörflinger, Y., Grund, C., & Rickelt, S. (2013). Transmembrane protein PERP is a component of tessellate junctions and of other junctional and non-junctional plasma membrane regions in diverse epithelial and epithelium-

- derived cells. *Cell and Tissue Research*, 353(1), 99–115. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1645-3>
- Frigo, S., Malina, C., & Mathelin, C. (2012). [Prenatal diethylstilbestrol exposure and breast cancer]. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 40(12), 784–786. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2012.09.005>
- Fritz, G., & Kaina, B. (2001a). Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic Acids Research*, 29(3), 792–798.
- Fritz, G., & Kaina, B. (2001b). Ras-related GTPase Rhob represses NF-kappaB signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3115–3122. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005058200>
- Fujibe, M., Chiba, H., Kojima, T., Soma, T., Wada, T., Yamashita, T., & Sawada, N. (2004). Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Experimental Cell Research*, 295(1), 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.014>
- Fujita, H., Chalubinski, M., Rhyner, C., Indermitte, P., Meyer, N., Ferstl, R., Treis, A., Gomez, E., Akkaya, A., O'Mahony, L., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2011). Claudin-1 expression in airway smooth muscle exacerbates airway remodeling in asthmatic subjects. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(6), 1612-1621.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.039>
- Fukasawa, M. (2014). [Claudin 1 as a target for anti-hepatitis C virus strategy]. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 134(5), 635–640. <https://doi.org/10.1248/yakushi.14-00006-4>
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1539–1550. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1539>
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., & Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 156(6), 1099–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>

- 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. *The Journal of Cell Biology*, 143(2), 391–401. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.2.391>
- Furuse, M., Sasaki, H., & Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *The Journal of Cell Biology*, 147(4), 891–903.
- Gautier Defossez, Sandra Le Guyader-Peyrou Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Marc Colonna, Emmanuelle Dantony Patricia Delafosse, Florence Molinié Anne-Sophie Woronoff Anne-Marie Bouvier Nadine Bossard, Laurent Remontet, & Alain Monnereau. (2019). Tumeurs solides—Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018—Juillet 2019. Santé publique France, Institut national du cancer. <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Rapport-Volume-1-Tumeurs-solides-Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018-juillet-2019>
- Gazdar, A. F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H. T., Wistuba, I. I., Tomlinson, G., Tonk, V., Ashfaq, R., Leitch, A. M., Minna, J. D., & Shay, J. W. (1998). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer*, 78(6), 766–774. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19981209\)78:6<766::aid-ijc15>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19981209)78:6<766::aid-ijc15>3.0.co;2-l)
- Gee, J. M., Robertson, J. F., Ellis, I. O., Nicholson, R. I., & Hurst, H. C. (1999). Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *The Journal of Pathology*, 189(4), 514–520. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199912\)189:4<514::AID-PATH463>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199912)189:4<514::AID-PATH463>3.0.CO;2-9)
- Geoffroy, M., Kleinclauss, A., Grandemange, S., Hupont, S., Boisbrun, M., Flament, S., Grillier-Vuissoz, I., & 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 Research and Treatment*, 165(3), 517–527. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4378-2>
- Geoffroy, M., Kleinclauss, A., Kuntz, S., & Grillier-Vuissoz, I. (2020). Claudin 1 inhibits cell migration and increases intercellular adhesion in triple-negative breast cancer cell line. *Molecular Biology Reports*, 47(10), 7643–7653. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05835-3>

- Gerhard, R., Ricardo, S., Albergaria, A., Gomes, M., Silva, A. R., Logullo, Â. F., Cameselle-Teijeiro, J. F., Paredes, J., & Schmitt, F. (2012). Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *The Breast*, 21(3), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.03.001>
- Gerhard, R., Tatge, H., Genth, H., Thum, T., Borlak, J., Fritz, G., & Just, I. (2005). Clostridium difficile Toxin A Induces Expression of the Stress-induced Early Gene Product RhoB. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1499–1505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406014200>
- Ghebeh, H., Mohammed, S., Al-Omair, A., Qattan, A., Lehe, C., Al-Qudaihi, G., Elkum, N., Alshabanah, M., Bin Amer, S., Tulbah, A., Ajarim, D., Al-Tweigeri, T., & Dermime, S. (2006). The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: Correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 8(3), 190–198. <https://doi.org/10.1593/neo.05733>
- Gilead Sciences. (2021). An International, Multi-Center, Open-Label, Randomized, Phase III Trial of Sacituzumab Govitecan Versus Treatment of Physician Choice in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Who Received at Least Two Prior Treatments (Clinical Trial Registration No. NCT02574455). [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02574455). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02574455>
- Gluz, O., Nitz, U. A., Harbeck, N., Ting, E., Kates, R., Herr, A., Lindemann, W., Jackisch, C., Berdel, W. E., Kirchner, H., Metzner, B., Werner, F., Schütt, G., Frick, M., Poremba, C., Diallo-Danebrock, R., Mohrmann, S., & West German Study Group. (2008). Triple-negative high-risk breast cancer derives particular benefit from dose intensification of adjuvant chemotherapy: Results of WSG AM-01 trial. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 19(5), 861–870. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm551>
- Go, C. D., Knight, J. D. R., Rajasekharan, A., Rathod, B., Hesketh, G. G., Abe, K. T., Youn, J.-Y., Samavarchi-Tehrani, P., Zhang, H., Zhu, L. Y., Popiel, E., Lambert, J.-P., Coyaud, É., Cheung, S. W. T., Rajendran, D., Wong, C. J., Antonicka, H., Pelletier, L., Palazzo, A. F., ... Gingras, A.-C. (2021). A proximity-dependent biotinylation map of a human cell. *Nature*, 595(7865), 120–124. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03592-2>
- Gómez-Angelats, M., & Cidlowski, J. A. (2003). Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death and Differentiation*, 10(7), 791–797. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401237>

- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., & Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81(1), 1–44. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(02\)00037-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(02)00037-8)
- González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 729–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>
- Gowrikumar, S., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2019). Role of Claudin Proteins in Regulating Cancer Stem Cells and Chemoresistance-Potential Implication in Disease Prognosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 53. <https://doi.org/10.3390/ijms21010053>
- Grände, M., Franzen, A., Karlsson, J.-O., Ericson, L. E., Heldin, N.-E., & 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. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 22), 4227–4236. <https://doi.org/10.1242/jcs.00091>
- Gregor, M. F., Misch, E. S., Yang, L., Hummasti, S., Inouye, K. E., Lee, A.-H., Bierie, B., & Hotamisligil, G. S. (2013). The Role of Adipocyte XBP1 in Metabolic Regulation during Lactation. *Cell Reports*, 3(5), 1430–1439. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.042>
- Guarino, M., Rubino, B., & Ballabio, gianmario. (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*, 39(3), 305–318. <https://doi.org/10.1080/00313020701329914>
- Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A., & Citi, S. (2008). The cytoplasmic plaque of tight junctions: A scaffolding and signalling center. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 601–613. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.032>
- Gunasinghe, N. P. A. D., Wells, A., Thompson, E. W., & Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 31(3–4), 469–478. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9377-5>
- Günzel, D., & Fromm, M. (2012). Claudins and Other Tight Junction Proteins. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1819–1852). American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110045>
- Günzel, D., & Yu, A. S. L. (2013a). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), 525–569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>

- Günzel, D., & Yu, A. S. L. (2013b). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), 525–569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Gupta, I. R., & Ryan, A. K. (2010). Claudins: Unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clinical Genetics*, 77(4), 314–325. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01397.x>
- Hackett, A. J., Smith, H. S., Springer, E. L., Owens, R. B., Nelson-Rees, W. A., Riggs, J. L., & Gardner, M. B. (1977). Two Syngeneic Cell Lines from Human Breast Tissue: The Aneuploid Mammary Epithelial (Hs578T) and the Diploid Myoepithelial (Hs578Bst) Cell Lines 2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 58(6), 1795–1806. <https://doi.org/10.1093/jnci/58.6.1795>
- Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M., & Smahi, A. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: A tight junction disease. *Gastroenterology*, 127(5), 1386–1390. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.07.022>
- Halford, S., Spencer, P., Greenwood, J., Winton, H., Hunt, D. M., & Adamson, P. (2000). Assignment of claudin-1 (CLDN1) to human chromosome 3q28—>q29 with somatic cell hybrids. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88(3–4), 217. <https://doi.org/10.1159/000015553>
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., & Tsukita, S. (2002). Multi-PDZ Domain Protein 1 (MUPP1) Is Concentrated at Tight Junctions through Its Possible Interaction with Claudin-1 and Junctional Adhesion Molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 455–461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109005200>
- Han, W., Jung, E.-M., Cho, J., Lee, J. W., Hwang, K.-T., Yang, S.-J., Kang, J. J., Bae, J.-Y., Jeon, Y. K., Park, I.-A., Nicolau, M., Jeffrey, S. S., & Noh, D.-Y. (2008). DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 47(6), 490–499. <https://doi.org/10.1002/gcc.20550>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G. L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., Mee, C. J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., Balfe, P., & McKeating, J. A. (2010). Claudin Association with CD81

- Defines Hepatitis C Virus Entry. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 21092–21102.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104836>
- Hassiotou, F., & Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*, 26(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
- Hayes, D. F., Thor, A. D., Dressler, L. G., Weaver, D., Edgerton, S., Cowan, D., Broadwater, G., Goldstein, L. J., Martino, S., Ingle, J. N., Henderson, I. C., Norton, L., Winer, E. P., Hudis, C. A., Ellis, M. J., Berry, D. A., & Cancer and Leukemia Group B (CALGB) Investigators. (2007). HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 357(15), 1496–1506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa071167>
- He, K., Wu, G., Li, W.-X., Guan, D., Lv, W., Gong, M., Ye, S., & Lu, A. (2017). A transcriptomic study of myogenic differentiation under the overexpression of PPAR γ by RNA-Seq. *Scientific Reports*, 7, 15308. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14275-2>
- Henderson, I. C., Berry, D. A., Demetri, G. D., Cirrincione, C. T., Goldstein, L. J., Martino, S., Ingle, J. N., Cooper, M. R., Hayes, D. F., Tkaczuk, K. H., Fleming, G., Holland, J. F., Duggan, D. B., Carpenter, J. T., Frei, E., Schilsky, R. L., Wood, W. C., Muss, H. B., & Norton, L. (2003). Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(6), 976–983. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.063>
- Hennessy, B. T., Gonzalez-Angulo, A.-M., Stenke-Hale, K., Gilcrease, M. Z., Krishnamurthy, S., Lee, J.-S., Fridlyand, J., Sahin, A., Agarwal, R., Joy, C., Liu, W., Stivers, D., Baggerly, K., Carey, M., Lluch, A., Monteagudo, C., He, X., Weigman, V., Fan, C., ... Mills, G. B. (2009). Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. *Cancer Research*, 69(10), 4116–4124. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3441>
- Herbst, R. S., Soria, J.-C., Kowanzetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., Sosman, J. A., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Gettinger, S. N., Kohrt, H. E. K., Horn, L., Lawrence, D. P., Rost, S., Leabman, M., Xiao, Y., Mokatrin, A., Koeppen, H., Hegde, P. S., ... Hodi, F. S. (2014). Predictive

- correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515(7528), 563–567. <https://doi.org/10.1038/nature14011>
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., ... Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, 8(5), R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76>
- Heylmann, D., Bauer, M., Becker, H., van Gool, S., Bacher, N., Steinbrink, K., & Kaina, B. (2013). Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells Are Sensitive to Low Dose Cyclophosphamide: Implications for the Immune Response. *PLoS ONE*, 8(12), e83384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083384>
- Hoevel, T., Macek, R., Swisshelm, K., & Kubbies, M. (2004). Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *International Journal of Cancer*, 108(3), 374–383. <https://doi.org/10.1002/ijc.11571>
- Hoggard, J., Fan, J., Lu, Z., Lu, Q., Sutton, L., & Chen, Y.-H. (2013). Claudin-7 increases chemosensitivity to cisplatin through the upregulation of caspase pathway in human NCI-H522 lung cancer cells. *Cancer Science*, 104(5), 611–618. <https://doi.org/10.1111/cas.12135>
- Hou, J., Wang, Z., Xu, H., Yang, L., Yu, X., Yang, Z., Deng, Y., Meng, J., Feng, Y., Guo, X., & Yang, G. (2015). Stanniocalcin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/claudin-1-mediated signaling. *PloS One*, 10(4), e0122179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122179>
- Hovey, R. C., Goldhar, A. S., Baffi, J., & Vonderhaar, B. K. (2001). Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Epithelial and Stromal Cells during Mouse Mammary Gland Development. *Molecular Endocrinology*, 15(5), 819–831. <https://doi.org/10.1210/mend.15.5.0635>
- Howard, B. A., & Lu, P. (2014). Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 25–26, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.004>
- Huerta, M., Muñoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramírez, L., Recillas-Targa, F., González-Mariscal, L., & López-Bayghen, E. (2007). Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12), 4826–4836. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-02-0109>

- Hulka, B. S. (1996). Epidemiology of susceptibility to breast cancer. *Progress in Clinical and Biological Research*, 395, 159–174.
- Hunter, K. W., Crawford, N. P., & Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research*, 10(S1), S2. <https://doi.org/10.1186/bcr1988>
- Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2008). Loss of Occludin Affects Tricellular Localization of Tricellulin. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), 4687–4693. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0530>
- Ikeyama, S., Koyama, M., Yamaoko, M., Sasada, R., & Miyake, M. (1993). Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(5), 1231–1237. <https://doi.org/10.1084/jem.177.5.1231>
- Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D., & Bissell, M. J. (2015). Mammary gland development: Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, 142(6), 1028–1042. <https://doi.org/10.1242/dev.087643>
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of Cell Biology*, 147(6), 1351–1363.
- Ivanov, A. I., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2004). The epithelium in inflammatory bowel disease: Potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption. *Novartis Foundation Symposium*, 263, 115–124; discussion 124-132, 211–218.
- Jang, Y., & Seo, S. H. (2020). Gene expression pattern differences in primary human pulmonary epithelial cells infected with MERS-CoV or SARS-CoV-2. *Archives of Virology*, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04730-3>
- Jiang, C.-F., Xie, Y.-X., Qian, Y.-C., Wang, M., Liu, L.-Z., Shu, Y.-Q., Bai, X.-M., & Jiang, B.-H. (2021). TBX15/miR-152/KIF2C pathway regulates breast cancer doxorubicin resistance via promoting PKM2 ubiquitination. *Cancer Cell International*, 21, 542. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02235-w>
- Jiang, K., Sun, J., Cheng, J., Djeu, J. Y., Wei, S., & Sebti, S. (2004). Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5565–5576. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5565-5576.2004>

- Jin, L., Qin, C., Qi, X., Hong, T., Yang, X., & Zhu, X. (2020). Clinicopathological significance of Sox10 expression in triple-negative breast carcinoma. *Translational Cancer Research*, 9(9). <https://doi.org/10.21037/tcr-20-2634>
- Johnson, K. R., Wang, L., Miller, M. C., Willingham, M. C., & Fan, W. (1997). 5-Fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumor cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 3(10), 1739–1745.
- Jonckheere, N., Fauquette, V., Stechly, L., Saint-Laurent, N., Aubert, S., Susini, C., Huet, G., Porchet, N., Van Seuning, I., & Pigny, P. (2009). Tumour growth and resistance to gemcitabine of pancreatic cancer cells are decreased by AP-2alpha overexpression. *British Journal of Cancer*, 101(4), 637–644. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605190>
- Jung, Y.-S., Jun, S., Kim, M. J., Lee, S. H., Suh, H. N., Lien, E. M., Jung, H.-Y., Lee, S., Zhang, J., Yang, J.-I., Ji, H., Wu, J. Y., Wang, W., Miller, R. K., Chen, J., McCrea, P. D., Kopetz, S., & Park, J.-I. (2018). TMEM9 promotes intestinal tumorigenesis through vacuolar-ATPase-activated Wnt/ β -catenin signalling. *Nature Cell Biology*, 20(12), 1421–1433. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0219-8>
- Karn, T., Jiang, T., Hatzis, C., Sanger, N., El-Balat, A., Rody, A., Holtrich, U., Becker, S., Bianchini, G., & Pusztai, L. (2017). Association Between Genomic Metrics and Immune Infiltration in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncology*, 3(12), 1707–1711. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2140>
- Kars, M. D., Işeri, O. D., & Gunduz, U. (2010). Drug resistant breast cancer cells overexpress ETS1 gene. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 64(7), 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.01.008>
- Kavanagh, E., Buchert, M., Tsapara, A., Choquet, A., Balda, M. S., Hollande, F., & Matter, K. (2006). Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 24), 5098–5105. <https://doi.org/10.1242/jcs.03297>
- Kim, D. S., Min, K., & Lee, S. K. (2020). Cell Cycle Dysregulation Is Associated With 5-Fluorouracil Resistance in Gastric Cancer Cells. *Anticancer Research*, 40(6), 3247–3254. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14306>

- Kim, J., Choi, S., Kim, J. O., & Kim, K. K. (2018). Autophagy-mediated upregulation of cytoplasmic claudin 1 stimulates the degradation of SQSTM1/p62 under starvation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.017>
- Kim, S., Kim, D. H., Lee, W., Lee, Y.-M., Choi, S.-Y., & Han, K. (2020). The nature of triple-negative breast cancer classification and antitumoral strategies. *Genomics & Informatics*, 18(4), e35. <https://doi.org/10.5808/GI.2020.18.4.e35>
- Kim, S.-S., Kim, C. H., Kim, J. W., Kung, H. C., Park, T. W., Shin, Y. S., Kim, J. D., Ryu, S., Kim, W.-J., Choi, Y. H., & Song, K. S. (2017). Airborne particulate matter increases MUC5AC expression by downregulating Claudin-1 expression in human airway cells. *BMB Reports*, 50(10), 516–521. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.10.100>
- King, S. L., Mohiuddin, J. J., & Dekaney, C. M. (2013). Paneth cells expand from newly created and preexisting cells during repair after doxorubicin-induced damage. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(2), G151–G162. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00441.2012>
- Kingston, B., Cutts, R. J., Bye, H., Beaney, M., Walsh-Crestani, G., Hrebien, S., Swift, C., Kilburn, L. S., Kernaghan, S., Moretti, L., Wilkinson, K., Wardley, A. M., Macpherson, I. R., Baird, R. D., Roylance, R., Reis-Filho, J. S., Hubank, M., Faull, I., Banks, K. C., ... Turner, N. C. (2021). Genomic profile of advanced breast cancer in circulating tumour DNA. *Nature Communications*, 12(1), 2423. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22605-2>
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., & Reinecker, H.-C. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*, 118(6), 1001–1011. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)70351-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(00)70351-9)
- Kischel, P., Bellahcene, A., Deux, B., Lamour, V., Dobson, R., DE Pauw, E., Clezardin, P., & Castronovo, V. (2012). Overexpression of CD9 in human breast cancer cells promotes the development of bone metastases. *Anticancer Research*, 32(12), 5211–5220.
- Knight, J. F., Lesurf, R., Zhao, H., Pinnaduwa, D., Davis, R. R., Saleh, S. M. I., Zuo, D., Naujokas, M. A., Chughtai, N., Herschkowitz, J. I., Prat, A., Mulligan, A. M., Muller, W. J., Cardiff, R. D., Gregg, J. P., Andrulis, I. L., Hallett, M. T., & Park, M. (2013). Met synergizes with p53 loss to induce mammary tumors that possess features of claudin-low breast cancer. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America, 110(14), E1301-1310.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1210353110>
- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J. E., ... Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70.
<https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Kojima, T., Takano, K., Yamamoto, T., Murata, M., Son, S., Imamura, M., Yamaguchi, H., Osanai, M., Chiba, H., Himi, T., & Sawada, N. (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 International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 28(4), 534–545. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01631.x>
- Kondo, J., Sato, F., Kusumi, T., Liu, Y., Motonari, O., Sato, T., & Kijima, H. (2008). Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor-alpha in human pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 22(5), 645–649.
- Kong, J. Y., & Rabkin, S. W. (2005). The association between RhoB and caspase-2: Changes with lovastatin-induced apoptosis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 83(5), 608–619. <https://doi.org/10.1139/o05-066>
- Kong, X., Li, G., Yuan, Y., He, Y., Wu, X., Zhang, W., Wu, Z., Chen, T., Wu, W., Lobie, P. E., & Zhu, T. (2012). MicroRNA-7 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via targeting FAK expression. *PloS One*, 7(8), e41523.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041523>
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., & Echard, A. (2006). Rab35 Regulates an Endocytic Recycling Pathway Essential for the Terminal Steps of Cytokinesis. *Current Biology*, 16(17), 1719–1725. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.020>
- Kovalenko, O. V., Yang, X. H., & Hemler, M. E. (2007). A Novel Cysteine Cross-linking Method Reveals a Direct Association between Claudin-1 and Tetraspanin CD9. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(11), 1855–1867. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700183-MCP200>

- Kovalski, J. R., Bhaduri, A., Zehnder, A. M., Neela, P. H., Che, Y., Wozniak, G. G., & Khavari, P. A. (2019). The Functional Proximal Proteome of Oncogenic Ras Includes mTORC2. *Molecular Cell*, 73(4), 830–844.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.001>
- Krämer, F., White, K., Kubbies, M., Swisshelm, K., & Weber, B. H. F. (2000). Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Human Genetics*, 107(3), 249–256. <https://doi.org/10.1007/s004390000375>
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., & Blasig, I. E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 631–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.10.018>
- Kreike, B., van Kouwenhove, M., Horlings, H., Weigelt, B., Peterse, H., Bartelink, H., & van de Vijver, M. J. (2007). Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Research: BCR*, 9(5), R65. <https://doi.org/10.1186/bcr1771>
- Kulawiec, M., Safina, A., Desouki, M. M., Still, I., Matsui, S.-I., Bakin, A., & Singh, K. K. (2008). Tumorigenic transformation of human breast epithelial cells induced by mitochondrial DNA depletion. *Cancer Biology & Therapy*, 7(11), 1732–1743. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.11.6729>
- Kumar, A., Golani, A., & Kumar, L. D. (2020). EMT in breast cancer metastasis: An interplay of microRNAs, signaling pathways and circulating tumor cells. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 25, 979–1010.
- Kwon, M. (2013). Emerging Roles of Claudins in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18148–18180. <https://doi.org/10.3390/ijms140918148>
- Lal-Nag, M., & Morin, P. J. (2009). The claudins. *Genome Biology*, 10(8), 235. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-8-235>
- Laurent, E. M. N., Sofianatos, Y., Komarova, A., Gimeno, J.-P., Tehrani, P. S., Kim, D.-K., Abdouni, H., Duhamel, M., Cassonnet, P., Knapp, J. J., Kuang, D., Chawla, A., Sheykhkarimli, D., Rayhan, A., Li, R., Pogoutse, O., Hill, D. E., Calderwood, M. A., Falter-Braun, P., ... Coyaud, E. (2020). Global BioID-based SARS-CoV-2 proteins proximal interactome unveils novel ties between viral polypeptides and host factors involved in multiple COVID19-associated mechanisms (p. 2020.08.28.272955). <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.272955>

- Lebowitz, P. F., Sakamuro, D., & Prendergast, G. C. (1997). Farnesyl transferase inhibitors induce apoptosis of Ras-transformed cells denied substratum attachment. *Cancer Research*, 57(4), 708–713.
- Lee, W.-Y., Hsu, K.-F., Chiang, T.-A., & Chen, C.-J. (2015). Phellinus linteus extract induces autophagy and synergizes with 5-fluorouracil to inhibit breast cancer cell growth. *Nutrition and Cancer*, 67(2), 275–284. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.989374>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Schafer, J. M., Pendleton, C. S., Tang, L., Johnson, K. C., Chen, X., Balko, J. M., Gómez, H., Arteaga, C. L., Mills, G. B., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2014). PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(4), 406. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0406-x>
- Lehmann, B. D., & Pietenpol, J. A. (2014). Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple negative breast cancer subtypes. *The Journal of Pathology*, 232(2), 142–150. <https://doi.org/10.1002/path.4280>
- Lehmann, B. D., & Pietenpol, J. A. (2015). Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer. *The Breast*, 24, S36–S40. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.009>
- Lenardo, M. J., McPhee, C. K., & Yu, L. (2009). Autophagic cell death. *Methods in Enzymology*, 453, 17–31. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04002-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04002-0)
- Li, J. (2021). Context-Dependent Roles of Claudins in Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, 11, 676781. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.676781>
- Li, J., Zhuo, M., Pei, L., & Yu, A. S. L. (2013). Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22790–22797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484238>
- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S. G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G. C., Wong, H., Rosen, J., & Chang, J. C. (2008). Intrinsic Resistance of

- Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 100(9), 672–679. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn123>
- 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., Li, M., & Gao, P. (2017). Overexpression of TMPRSS4 promotes tumor proliferation and aggressiveness in breast cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(4), 927–935. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2893>
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennesy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Puzstai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(8), 1275–1281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>
- Liévano, S., Alarcón, L., Chávez-Munguía, B., & González-Mariscal, L. (2006). Endothelia of term human placentae display diminished expression of tight junction proteins during preeclampsia. *Cell and Tissue Research*, 324, 433–448. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0135-7>
- Lim E, Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D. E., Ward, T., Partanen, A., Feleppa, F., Huschtscha, L. I., Thorne, H. J., Fox, S. B., Yan, M., French, J. D., Brown, M. A., Smyth, G. K., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine*, 15(8), 907–913. <https://doi.org/10.1038/nm.2000>
- Lim, T. S., Vedula, S. R. K., Hunziker, W., & Lim, C. T. (2008). Kinetics of adhesion mediated by extracellular loops of claudin-2 as revealed by single-molecule force spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 381(3), 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.009>
- Lin, W., Sun, J., Sadahira, T., Xu, N., Wada, K., Liu, C., Araki, M., Xu, A., Watanabe, M., Nasu, Y., & Huang, P. (2021). Discovery and Validation of Nitroxoline as a Novel STAT3 Inhibitor in Drug-resistant Urothelial Bladder Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 17(12), 3255–3267. <https://doi.org/10.7150/ijbs.63125>
- Liu Ax, null, Cerniglia, G. J., Bernhard, E. J., & Prendergast, G. C. (2001). RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America, 98(11), 6192–6197.
<https://doi.org/10.1073/pnas.111137198>
- Liu, F., Gu, L.-N., Shan, B.-E., Geng, C.-Z., & Sang, M.-X. (2016). Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update (Review). *Oncology Letters*, 12(6), 4869–4876.
<https://doi.org/10.3892/ol.2016.5369>
- Liu, F., Koval, M., Ranganathan, S., Fanayan, S., Hancock, W. S., Lundberg, E. K., Beavis, R. C., Lane, L., Duek, P., McQuade, L., Kelleher, N. L., & Baker, M. S. (2016). Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 339–359.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00769>
- Liu, H., Bai, L., Huang, L., Ning, N., Li, L., Li, Y., Dong, X., Du, Q., Xia, M., Chen, Y., Zhao, L., Li, Y., Meng, Q., Wang, J., Duan, Y., Ming, J., Yuan, A. Q., & Yang, X.-P. (2021). Bispecific antibody targeting TROP2xCD3 suppresses tumor growth of triple negative breast cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(10), e003468. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003468>
- Liu, S., Dontu, G., & Wicha, M. S. (2005). Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research*, 7(3), 86. <https://doi.org/10.1186/bcr1021>
- Liu, X., He, M., Li, L., Wang, X., Han, S., Zhao, J., Dong, Y., Ahmad, M., Li, L., Zhang, X., Huo, J., Liu, Y., Pan, C., & Wang, C. (2021). EMT and Cancer Cell Stemness Associated With Chemotherapeutic Resistance in Esophageal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 672222.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672222>
- Liu, Y., Miao, Y., Wang, J., Lin, X., Wang, L., Xu, H.-T., & 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. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(4), 855–860.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1279>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lopardo, T., Lo Iacono, N., Marinari, B., Giustizieri, M. L., Cyr, D. G., Merlo, G., Crosti, F., Costanzo, A., & Guerrini, L. (2008). Claudin-1 is a p63 target gene with a crucial role in epithelial development. *PloS One*, 3(7), e2715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002715>

- Loukinov, D. (2018). Targeting CTCFL/BORIS for the immunotherapy of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 67(12), 1955–1965. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2251-8>
- Lu, S., Singh, K., Mangray, S., Tavares, R., Noble, L., Resnick, M. B., & Yakirevich, E. (2013). Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: Correlation with the molecular subtype. *Modern Pathology*, 26(4), 485–495. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.187>
- Lu, Z., Ding, L., Hong, H., Hoggard, J., Lu, Q., & Chen, Y.-H. (2011). Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 317(13), 1935–1946. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.019>
- Luck, K., Kim, D.-K., Lambourne, L., Spirohn, K., Begg, B. E., Bian, W., Brignall, R., Cafarelli, T., Campos-Laborie, F. J., Charlotiaux, B., Choi, D., Coté, A. G., Daley, M., Deimling, S., Desbuleux, A., Dricot, A., Gebbia, M., Hardy, M. F., Kishore, N., ... Calderwood, M. A. (2020). A reference map of the human binary protein interactome. *Nature*, 580(7803), 402–408. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2188-x>
- Luo, L., Zhang, J., Tang, H., Zhai, D., Huang, D., Ling, L., Wang, X., Liu, T., Zhang, Q., Zhang, Z., He, Z., & Zheng, G. (2020). LncRNA SNORD3A specifically sensitizes breast cancer cells to 5-FU by sponging miR-185-5p to enhance UMPS expression. *Cell Death & Disease*, 11(5), 329. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2557-2>
- Luu, T., Chung, C., & Somlo, G. (2011). Combining emerging agents in advanced breast cancer. *The Oncologist*, 16(6), 760–771. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0345>
- Lynch, R. D., Francis, S. A., McCarthy, K. M., Casas, E., Thiele, C., & Schneeberger, E. E. (2007). Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. *Experimental Cell Research*, 313(12), 2597–2610. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.05.009>
- Lyons, T. G., & Traina, T. A. (2019). Emerging Novel Therapeutics in Triple-Negative Breast Cancer. In A. Ahmad (Ed.), *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance* (Vol. 1152, pp. 377–399). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_20
- Ma, D., Jiang, Y.-Z., Liu, X.-Y., Liu, Y.-R., & Shao, Z.-M. (2017). Clinical and molecular relevance of mutant-allele tumor heterogeneity in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 162(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4113-z>

- Ma, F., Ding, X., Fan, Y., Ying, J., Zheng, S., Lu, N., & Xu, B. (2014a). A CLDN1-Negative Phenotype Predicts Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112765>
- Ma, F., Ding, X., Fan, Y., Ying, J., Zheng, S., Lu, N., & Xu, B. (2014b). A CLDN1-Negative Phenotype Predicts Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS ONE*, 9(11), e112765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112765>
- Ma, Y., Shepherd, J., Zhao, D., Bollu, L. R., Tahaney, W. M., Hill, J., Zhang, Y., Mazumdar, A., & Brown, P. H. (2020). SOX9 Is Essential for Triple-Negative Breast Cancer Cell Survival and Metastasis. *Molecular Cancer Research: MCR*, 18(12), 1825–1838. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0311>
- Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 533–557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Madaras, L., Balint, N., Gyorffy, B., Tokes, A.-M., Barshack, I., Yosepovich, A., Friedman, E., Paluch-Shimon, S., Zippel, D., Baghy, K., Timar, J., Kovalszky, I., Kulka, J., & Szasz, A. M. (2016). BRCA Mutation-Related and Claudin-Low Breast Cancer: Blood Relatives or Stepsisters. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 83(1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000439135>
- Madu, C. O., Wang, S., Madu, C. O., & Lu, Y. (2020). Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *Journal of Cancer*, 11(15), 4474–4494. <https://doi.org/10.7150/jca.44313>
- Mahati, S., Xiao, L., Yang, Y., Mao, R., & Bao, Y. (2017). MiR-29a suppresses growth and migration of hepatocellular carcinoma by regulating CLDN1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(3), 732–737. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.110>
- Mallini, P., Lennard, T., Kirby, J., & Meeson, A. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition: What is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 40(3), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.008>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. Ng., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008).

- The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Manjunath, M., & Choudhary, B. (2021). Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies. *Oncology Letters*, 22(1), 512. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12773>
- Mao, S., Zheng, S., Lu, Z., Wang, X., Wang, Y., Zhang, G., Xu, H., Huang, J., Lei, Y., Liu, C., Sun, N., & He, J. (2021). Exosomal miR-375-3p breaks vascular barrier and promotes small cell lung cancer metastasis by targeting claudin-1. *Translational Lung Cancer Research*, 10(7), 3155–3172. <https://doi.org/10.21037/tlcr-21-356>
- Marinello, P. C., Panis, C., Silva, T. N. X., Binato, R., Abdelhay, E., Rodrigues, J. A., Mencialha, A. L., Lopes, N. M. D., Luiz, R. C., Cecchini, R., & Cecchini, A. L. (2019). Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. *Scientific Reports*, 9, 5864. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42357-w>
- Martin, T. A., Mason, M. D., & Jiang, W. G. (2011). Tight junctions in cancer metastasis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 16, 898–936. <https://doi.org/10.2741/3726>
- Martínez-Estrada, O. M., Cullerés, A., Soriano, F. X., Peinado, H., Bolós, V., Martínez, F. O., Reina, M., Cano, A., Fabre, M., & Vilaró, S. (2006). The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells ¹. *Biochemical Journal*, 394(2), 449–457. <https://doi.org/10.1042/BJ20050591>
- Masoud, V., & Pagès, G. (2017). Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World Journal of Clinical Oncology*, 8(2), 120–134. <https://doi.org/10.5306/wjco.v8.i2.120>
- Mathiassen, S. G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2017). Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Frontiers in Oncology*, 7, 51. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00051>
- Matsuda, M., Kubo, A., Furuse, M., & Tsukita, S. (2004). A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 7), 1247–1257. <https://doi.org/10.1242/jcs.00972>

- Mattern, J., Roghi, C. S., Hurtz, M., Knäuper, V., Edwards, D. R., & Poghosyan, Z. (2019). ADAM15 mediates upregulation of Claudin-1 expression in breast cancer cells. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49021-3>
- Mazouni, C., Kau, S.-W., Frye, D., Andre, F., Kuerer, H. M., Buchholz, T. A., Symmans, W. F., Anderson, K., Hess, K. R., Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi, G. N., Buzdar, A. U., & Puzstai, L. (2007). Inclusion of taxanes, particularly weekly paclitaxel, in preoperative chemotherapy improves pathologic complete response rate in estrogen receptor-positive breast cancers. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 18(5), 874–880. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm008>
- McTiernan, A. (2003). Behavioral Risk Factors in Breast Cancer: Can Risk Be Modified? *The Oncologist*, 8(4), 326–334. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-4-326>
- Meredith, A.-M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729–741. <https://doi.org/10.1111/jphp.12539>
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., & Massagué, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436(7050), 518–524. <https://doi.org/10.1038/nature03799>
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—Elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Mittendorf, E. A., Philips, A. V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Akcakanat, A., Chawla, A., Curran, M., Hwu, P., Sharma, P., Litton, J. K., Molldrem, J. J., & Alatrash, G. (2014). PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Immunology Research*, 2(4), 361–370. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0127>
- Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niiikawa, N., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. (2001). Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncology Research*, 12(11–12), 469–476. <https://doi.org/10.3727/096504001108747477>

- Miyamori, H., Takino, T., Kobayashi, Y., Tokai, H., Itoh, Y., Seiki, M., & Sato, H. (2001). Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28204–28211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103083200>
- Moasser, M. M. (2007). The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45), 6469–6487. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>
- Morin, P. J. (2005). Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Research*, 65(21), 9603–9606. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2782>
- 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. *International Journal of Molecular Medicine*, 20(2), 139–143.
- Mrsny, R. J., Brown, G. T., Gerner-Smidt, K., Buret, A. G., Meddings, J. B., Quan, C., Koval, M., & Nusrat, A. (2008). A Key Claudin Extracellular Loop Domain is Critical for Epithelial Barrier Integrity. *The American Journal of Pathology*, 172(4), 905–915. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070698>
- Mueller, C., Haymond, A., Davis, J. B., Williams, A., & Espina, V. (2018). Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Review of Proteomics*, 15(2), 131–152. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1421071>
- Myal, Y., Leygue, E., & Blanchard, A. A. (2010). Claudin 1 in Breast Tumorigenesis: Revelation of a Possible Novel “Claudin High” Subset of Breast Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2010/956897>
- Nakatsukasa, M., Kawasaki, S., Yamasaki, K., Fukuoka, H., Matsuda, A., Tsujikawa, M., Tanioka, H., Nagata-Takaoka, M., Hamuro, J., & Kinoshita, S. (2010). Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: Implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1344–1355. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100149>
- Nassar, A., Khor, A., Radhakrishnan, R., Radhakrishnan, A., & Cohen, C. (2014). Correlation of HER2 overexpression with gene amplification and its relation to chromosome 17 aneuploidy: A 5-year experience with invasive ductal and lobular carcinomas. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(9), 6254–6261.

- Nazir, S. U., Kumar, R., Singh, A., Khan, A., Tanwar, P., Tripathi, R., Mehrotra, R., & Hussain, S. (2019). Breast cancer invasion and progression by MMP-9 through Ets-1 transcription factor. *Gene*, 711, 143952. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143952>
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S., Smid, M., Brinkman, A. B., Morganella, S., Aure, M. R., Lingjærde, O. C., Langerød, A., Ringnér, M., ... Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47–54. <https://doi.org/10.1038/nature17676>
- Nita-Lazar, M., Rebustini, I., Walker, J., & Kukuruzinska, M. A. (2010). Hypoglycosylated E-cadherin promotes the assembly of tight junctions through the recruitment of PP2A to adherens junctions. *Experimental Cell Research*, 316(11), 1871–1884. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.008>
- Norum, J. H., Andersen, K., & Sørli, T. (2014). Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. *The British Journal of Surgery*, 101(8), 925–938. <https://doi.org/10.1002/bjs.9562>
- Nowosad, A., Jeannot, P., Callot, C., Creff, J., Perchey, R. T., Joffre, C., Codogno, P., Manenti, S., & Besson, A. (2020). P27 controls Ragulator and mTOR activity in amino acid-deprived cells to regulate the autophagy-lysosomal pathway and coordinate cell cycle and cell growth. *Nature Cell Biology*, 22(9), 1076–1090. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0554-4>
- Otani, T., & Furuse, M. (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology*, 30(10), 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>
- Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C., & Bazzoni, G. (2008). Structural organization of the tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 646–659. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.004>
- Patterson, R. E., Cadmus, L. A., Emond, J. A., & Pierce, J. P. (2010). Physical activity, diet, adiposity and female breast cancer prognosis: A review of the epidemiologic literature. *Maturitas*, 66(1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.01.004>
- Pei, D., Shu, X., Gassama-Diagne, A., & Thiery, J. P. (2019). Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming. *Nature Cell Biology*, 21(1), 44–53. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0195-z>

- Peng, Z., Su, P., Yang, Y., Yao, X., Zhang, Y., Jin, F., & Yang, B. (2020). Identification of CTLA-4 associated with tumor microenvironment and competing interactions in triple negative breast cancer by co-expression network analysis. *Journal of Cancer*, 11(21), 6365–6375. <https://doi.org/10.7150/jca.46301>
- Perou, C. M., Sørlie, 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., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Petitjean, A., Ruptier, C., Tribollet, V., Hautefeuille, A., Chardon, F., Cavard, C., Puisieux, A., Hainaut, P., & Caron de Fromentel, C. (2008). Properties of the six isoforms of p63: P53-like regulation in response to genotoxic stress and cross talk with DeltaNp73. *Carcinogenesis*, 29(2), 273–281. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm258>
- Pfeiffer, F., Schäfer, J., Lyck, R., Makrides, V., Brunner, S., Schaeren-Wiemers, N., Deutsch, U., & Engelhardt, B. (2011). Claudin-1 induced sealing of blood–brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica*, 122(5), 601. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0883-2>
- Piontek, J., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., Yu, D., Turner, J. R., Gehring, C., Rahn, H.-P., Wolburg, H., & Blasig, I. E. (2011). Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(23), 3903–3918. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0680-z>
- Poliak, S., Matlis, S., Ullmer, C., Scherer, S. S., & Peles, E. (2002). Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *The Journal of Cell Biology*, 159(2), 361–372. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207050>
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: Origins and evolution. *Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3155–3163. <https://doi.org/10.1172/JCI33295>
- Polyak, K., & Kalluri, R. (2010). The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), a003244–a003244. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003244>

- Poritz, L. S., Harris, L. R., Kelly, A. A., & Koltun, W. A. (2011). Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(10), 2802–2809. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1688-9>
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(5). <https://doi.org/10.1186/bcr2635>
- Prat, A., & Perou, C. M. (2009). Mammary development meets cancer genomics. *Nature Medicine*, 15(8), 842–844. <https://doi.org/10.1038/nm0809-842>
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5(1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
- Price, M. G., Davis, C. F., Deng, F., & Burgess, D. L. (2005). The α -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. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19711–19720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500623200>
- Puustinen, P., Keldsbo, A., Corcelle-Termeau, E., Ngoei, K., Sønder, S. L., Farkas, T., Kaae Andersen, K., Oakhill, J. S., & Jäättelä, M. (2020). DNA-dependent protein kinase regulates lysosomal AMP-dependent protein kinase activation and autophagy. *Autophagy*, 16(10), 1871–1888. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1710430>
- Pyo, J.-S., Kim, N. Y., & Cho, W. J. (2019). Prognostic Role of Claudin-1 Immunohistochemistry in Malignant Solid Tumors: A Meta-Analysis. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 53(3), 173–179. <https://doi.org/10.4132/jptm.2019.02.03>
- Rakha, E. A., & Pareja, F. G. (2021). New Advances in Molecular Breast Cancer Pathology. *Seminars in Cancer Biology*, 72, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.03.014>
- Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2008). Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review. *Journal of Clinical Oncology*, 26(15), 2568–2581. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1748>
- Raleigh, D. R., Marchiando, A. M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., & Turner, J. R. (2010). Tight Junction–associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Molecular Biology of the Cell*, 21(7), 1200–1213. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-08-0734>

- Ramaswamy, S., Tamayo, P., Rifkin, R., Mukherjee, S., Yeang, C. H., Angelo, M., Ladd, C., Reich, M., Latulippe, E., Mesirov, J. P., Poggio, T., Gerald, W., Loda, M., Lander, E. S., & Golub, T. R. (2001). Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15149–15154. <https://doi.org/10.1073/pnas.211566398>
- Rappa, G., Green, T. M., Karbanová, J., Corbeil, D., & Loricó, A. (2015). Tetraspanin CD9 determines invasiveness and tumorigenicity of human breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(10), 7970–7991. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3419>
- Rodgers, K. M., Udesky, J. O., Rudel, R. A., & Brody, J. G. (2018). Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environmental Research*, 160, 152–182. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.045>
- Rodríguez-Pinilla, S. M., Sarrió, D., Honrado, E., Hardisson, D., Calero, F., Benitez, J., & Palacios, J. (2006). Prognostic Significance of Basal-Like Phenotype and Fascin Expression in Node-Negative Invasive Breast Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1533–1539. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2281>
- Roh, M. H., Liu, C.-J., Laurinec, S., & Margolis, B. (2002). The Carboxyl Terminus of Zona Occludens-3 Binds and Recruits a Mammalian Homologue of Discs Lost to Tight Junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27501–27509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201177200>
- Romagnolo, D. F., Daniels, K. D., Grunwald, J. T., Ramos, S. A., Propper, C. R., & Selmin, O. I. (2016). Epigenetics of breast cancer: Modifying role of environmental and bioactive food compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(6), 1310–1329. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201501063>
- Ruffer, C. (2004). The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *European Journal of Cell Biology*, 83(4), 135–144. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00366>
- 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., Campbell, E. L., Kuhn, K. A., Furuta, G. T., Colgan, S. P., & Glover, L. E. (2015). HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity. *Molecular Biology of the Cell*, 26(12), 2252–2262. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1194>

- Sakakura, T., Suzuki, Y., & Shiurba, R. (2013). Mammary Stroma in Development and Carcinogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 18(2), 189–197. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9281-9>
- Samocha, A., Doh, H., Kessenbrock, K., & Roose, J. P. (2019). Unraveling Heterogeneity in Epithelial Cell Fates of the Mammary Gland and Breast Cancer. *Cancers*, 11(10), 1423. <https://doi.org/10.3390/cancers11101423>
- Sawaki, M., Shien, T., & Iwata, H. (2019). TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 49(3), 228–231. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy182>
- Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A., & IMpassion130 Trial Investigators. (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(22), 2108–2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809615>
- Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., ... O'Shaughnessy, J. (2020). Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(9), 810–821. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910549>
- Schmid, P., Salgado, R., Park, Y. H., Muñoz-Couselo, E., Kim, S. B., Sohn, J., Im, S.-A., Foukakis, T., Kuemmel, S., Dent, R., Yin, L., Wang, A., Tryfonidis, K., Karantza, V., Cortés, J., & Loi, S. (2020). Pembrolizumab plus chemotherapy as neoadjuvant treatment of high-risk, early-stage triple-negative breast cancer: Results from the phase 1b open-label, multicohort KEYNOTE-173 study. *Annals of Oncology*, 31(5), 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.01.072>
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: A multifunctional complex. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 286(6), C1213–1228. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
- Schneider, B. P., Winer, E. P., Foulkes, W. D., Garber, J., Perou, C. M., Richardson, A., Sledge, G. W., & Carey, L. A. (2008). Triple-negative breast cancer: Risk factors to potential targets. *Clinical Cancer*

- Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 14(24), 8010–8018. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1208>
- Scully, O. J., Bay, B.-H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 9(5), 311–320.
- Shafei, A., Matbouly, M., Mostafa, E., Al Sannat, S., Abdelrahman, M., Lewis, B., Muhammad, B., Mohamed, S., & Mostafa, R. M. (2018). Stop eating plastic, molecular signaling of bisphenol A in breast cancer. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 23624–23630. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2540-y>
- Sharma, A., Bhat, A. A., Krishnan, M., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2013). Trichostatin-A modulates claudin-1 mRNA stability through the modulation of Hu antigen R and tristetraprolin in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 34(11), 2610–2621. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt207>
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., Goulet, R., Badve, S., & Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: An early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research*, 8(5), R59. <https://doi.org/10.1186/bcr1610>
- Shi, J., Barakat, M., Chen, D., & Chen, L. (2018). Bicellular Tight Junctions and Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3862. <https://doi.org/10.3390/ijms19123862>
- Shigetomi, K., & Ikenouchi, J. (2018). Regulation of the epithelial barrier by post-translational modifications of tight junction membrane proteins. *Journal of Biochemistry*, 163(4), 265–272. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx077>
- Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., & Arakawa, S. (2014). Autophagic Cell Death and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 3145–3153. <https://doi.org/10.3390/ijms15023145>
- Shin, K., Straight, S., & Margolis, B. (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 168(5), 705–711. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408064>
- Shiou, S.-R., Singh, A. B., Moorthy, K., Datta, P. K., Washington, M. K., Beauchamp, R. D., & Dhawan, P. (2007). Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent

- manner in colon cancer cells. *Cancer Research*, 67(4), 1571–1579. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1680>
- Shvartsur, A., & Bonavida, B. (2015). Trop2 and its overexpression in cancers: Regulation and clinical/therapeutic implications. *Genes & Cancer*, 6(3–4), 84–105. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.40>
- Simske, J. S. (2013). Claudins reign. *Tissue Barriers*, 1(3), e25502. <https://doi.org/10.4161/tisb.25502>
- Singh, A. B., & Harris, R. C. (2004). Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(5), 3543–3552. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308682200>
- Singh, A. B., Sharma, A., & Dhawan, P. (2012). Claudin-1 expression confers resistance to anoikis in colon cancer cells in a Src-dependent manner. *Carcinogenesis*, 33(12), 2538–2547. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs275>
- Skálová, H., Hájková, N., Majerová, B., Bártů, M., Povýšil, C., & Tichá, I. (2019). Impact of chemotherapy on the expression of claudins and cadherins in invasive breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(4), 3014–3024. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7930>
- Smith, B. N., & Bhowmick, N. A. (2016). Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), E17. <https://doi.org/10.3390/jcm5020017>
- Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Yaun, S.-S., van den Brandt, P. A., Folsom, A. R., Goldbohm, R. A., Graham, S., Holmberg, L., Howe, G. R., Marshall, J. R., Miller, A. B., Potter, J. D., Speizer, F. E., Willett, W. C., Wolk, A., & Hunter, D. J. (1998). Alcohol and Breast Cancer in Women: A Pooled Analysis of Cohort Studies. *JAMA*, 279(7), 535. <https://doi.org/10.1001/jama.279.7.535>
- Soliman, N. A., & Yussif, S. M. (2016). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biology & Medicine*, 13(4), 496–504. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066>
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., & Jeffrey, S. S. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., & Geisler, S. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression datasets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>
- Spadaro, D., Tapia, R., Jond, L., Sudol, M., Fanning, A. S., & Citi, S. (2014). ZO Proteins Redundantly Regulate the Transcription Factor DbpA/ZONAB. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22500–22511. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556449>
- Srougi, M. C., & BurrIDGE, K. (2011). The Nuclear Guanine Nucleotide Exchange Factors Ect2 and Net1 Regulate RhoB-Mediated Cell Death after DNA Damage. *PLoS ONE*, 6(2), e17108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017108>
- Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Sladojevic, N., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2017a). Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397(1), 54–65. <https://doi.org/10.1111/nyas.13346>
- Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Sladojevic, N., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2017b). Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling: Endocytic sorting of tight junction proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397(1), 54–65. <https://doi.org/10.1111/nyas.13346>
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksöz, E., Droege, A., Krobitsch, S., ... Wanker, E. E. (2005). A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome. *Cell*, 122(6), 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.029>
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H. I., & Eaves, C. J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 439(7079), 993–997. <https://doi.org/10.1038/nature04496>

- Stukalov, A., Girault, V., Grass, V., Karayel, O., Bergant, V., Urban, C., Haas, D. A., Huang, Y., Oubraham, L., Wang, A., Hamad, M. S., Piras, A., Hansen, F. M., Tanzer, M. C., Paron, I., Zinzula, L., Engleitner, T., Reinecke, M., Lavacca, T. M., ... Pichlmair, A. (2021). Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Nature*, 594(7862), 246–252. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03493-4>
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., Tsukita, S., Nureki, O., & Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6181), 304–307. <https://doi.org/10.1126/science.1248571>
- Suzuki, H., Tani, K., & Fujiyoshi, Y. (2017). Crystal structures of claudins: Insights into their intermolecular interactions: Crystal structures of claudins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397(1), 25–34. <https://doi.org/10.1111/nyas.13371>
- Swisshelm, K., Machl, A., Planitzer, S., Robertson, R., Kubbies, M., & 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(2), 285–295. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00553-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00553-8)
- Syn, N. L., Teng, M. W. L., Mok, T. S. K., & Soo, R. A. (2017). De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncology*, 18(12), e731–e741. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30607-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30607-1)
- Szasz, A. M., Tokes, A. M., Micsinai, M., Krenacs, T., Jakab, Cs., Lukacs, L., Nemeth, Zs., Baranyai, Zs., Dede, K., Madaras, L., & Kulka, J. (2011). Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 28(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s10585-010-9357-5>
- Szymiczek, A., Lone, A., & Akbari, M. R. (2021). Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical Genetics*, 99(5), 613–637. <https://doi.org/10.1111/cge.13900>
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems: Doxorubicin cell and molecular biological activity. *Journal*

- of Pharmacy and Pharmacology, 65(2), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
- Takahashi, S., Iwamoto, N., Sasaki, H., Ohashi, M., Oda, Y., Tsukita, S., & Furuse, M. (2009). The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *Journal of Cell Science*, 122(7), 985–994. <https://doi.org/10.1242/jcs.040055>
- Tan, D. S. P., Marchió, C., Jones, R. L., Savage, K., Smith, I. E., Dowsett, M., & Reis-Filho, J. S. (2008). Triple negative breast cancer: Molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111(1), 27–44. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9756-8>
- Tanaka, M., Kamata, R., & Sakai, R. (2005). Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *The EMBO Journal*, 24(21), 3700–3711. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600831>
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T. T., Gupta, P. B., Evans, K. W., Hollier, B. G., Ram, P. T., Lander, E. S., Rosen, J. M., Weinberg, R. A., & Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15449–15454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004900107>
- Tedelind, S., Ericson, L. E., Karlsson, J. O., & Nilsson, M. (2003). Interferon-gamma down-regulates claudin-1 and impairs the epithelial barrier function in primary cultured human thyrocytes. *European Journal of Endocrinology*, 149(3), 215–221. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1490215>
- Tevaarwerk, A. J., Gray, R. J., Schneider, B. P., Smith, M. L., Wagner, L. I., Fetting, J. H., Davidson, N., Goldstein, L. J., Miller, K. D., & Sparano, J. A. (2013). Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: Little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer*, 119(6), 1140–1148. <https://doi.org/10.1002/cncr.27819>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>

- Tokés, A.-M., Kulka, J., Paku, S., Szik, A., Páska, C., Novák, P. K., Szilák, L., Kiss, A., Bögi, K., & Schaff, Z. (2005). Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: A research study. *Breast Cancer Research: BCR*, 7(2), R296-305. <https://doi.org/10.1186/bcr983>
- Tournaire, M. (2009). Exposition au DES et cancer du sein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 38(8), 696–697. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2009.09.014>
- Tourneur, L., & Chiocchia, G. (2010). FADD: A regulator of life and death. *Trends in Immunology*, 31(7), 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.005>
- Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I. A., Weiger, T. M., Bauer, H.-C., & Bauer, H. (2003). The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2692–2700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206821200>
- Treps, L., & Gavard, J. (2015). L'angiogenèse tumorale—Quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences*, 31(11), 989–995. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111013>
- Trerotola, M., Li, J., Alberti, S., & Languino, L. R. (2012). Trop-2 inhibits prostate cancer cell adhesion to fibronectin through the β 1 integrin-RACK1 axis. *Journal of Cellular Physiology*, 227(11), 3670–3677. <https://doi.org/10.1002/jcp.24074>
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000232>
- Tsuda, H., Takarabe, T., Hasegawa, F., Fukutomi, T., & Hirohashi, S. (2000). Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(2), 197–202. <https://doi.org/10.1097/00000478-200002000-00005>
- Tsukita, S., Tanaka, H., & Tamura, A. (2019). The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.008>
- Tu, Y., Wu, W., Guo, Y., Lu, F., Xu, D., Li, X., Zhao, Y., & He, L. (2020). Upregulation of hsa-miR-31-3p induced by ultraviolet affects keratinocytes permeability barrier by targeting CLDN1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 532(4), 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.113>

- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A. N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A. J., Grogan, T. R., Mateus, C., Tomasic, G., ... Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528), 568–571. <https://doi.org/10.1038/nature13954>
- Turksen, K. (2004). Barriers built on claudins. *Journal of Cell Science*, 117(12), 2435–2447. <https://doi.org/10.1242/jcs.01235>
- Turner, N., Lambros, M. B., Horlings, H. M., Pearson, A., Sharpe, R., Natrajan, R., Geyer, F. C., van Kouwenhove, M., Kreike, B., Mackay, A., Ashworth, A., van de Vijver, M. J., & Reis-Filho, J. S. (2010). Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene*, 29(14), 2013–2023. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.489>
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell*, 126(4), 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.043>
- Utoguchi, N., Mizuguchi, H., Saeki, K., Ikeda, K., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., & Mayumi, T. (1995). Tumor-conditioned medium increases macromolecular permeability of endothelial cell monolayer. *Cancer Letters*, 89(1), 7–14. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)90151-5](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)90151-5)
- Van Acker, T., Tavernier, J., & Peelman, F. (2019). The Small GTPase Arf6: An Overview of Its Mechanisms of Action and of Its Role in Host–Pathogen Interactions and Innate Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2209. <https://doi.org/10.3390/ijms20092209>
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). CLAUDINS AND EPITHELIAL PARACELLULAR TRANSPORT. *Annual Review of Physiology*, 68(1), 403–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2013). Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers*, 1(3), e25247. <https://doi.org/10.4161/tisb.25247>

- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.011>
- Van Itallie, C. M., Gambling, T. M., Carson, J. L., & Anderson, J. M. (2005). Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *Journal of Cell Science*, 118(7), 1427–1436. <https://doi.org/10.1242/jcs.01735>
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R., & Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2786>
- Visvader, J. E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & Development*, 23(22), 2563–2577. <https://doi.org/10.1101/gad.1849509>
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–322. <https://doi.org/10.1038/nature09781>
- von Minckwitz, G., Untch, M., Blohmer, J.-U., Costa, S. D., Eidtmann, H., Fasching, P. A., Gerber, B., Eiermann, W., Hilfrich, J., Huober, J., Jackisch, C., Kaufmann, M., Konecny, G. E., Denkert, C., Nekljudova, V., Mehta, K., & Loibl, S. (2012). Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(15), 1796–1804. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.8595>
- Wang, C.-Z., Zhang, Z., Wan, J.-Y., Zhang, C.-F., Anderson, S., He, X., Yu, C., He, T.-C., Qi, L.-W., & Yuan, C.-S. (2015). Protopanaxadiol, an Active Ginseng Metabolite, Significantly Enhances the Effects of Fluorouracil on Colon Cancer. *Nutrients*, 7, 799–814. <https://doi.org/10.3390/nu7020799>
- Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., & Liu, Y.-C. (2012). Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(12), 3126–3135. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2259-4>
- Wang, J., Huo, K., Ma, L., Tang, L., Li, D., Huang, X., Yuan, Y., Li, C., Wang, W., Guan, W., Chen, H., Jin, C., Wei, J., Zhang, W., Yang, Y., Liu, Q., Zhou, Y., Zhang, C., Wu, Z., ... Yang, X. (2011). Toward an understanding of the protein interaction network of the human liver. *Molecular Systems Biology*, 7, 536. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.67>

- Watson, C. J., Hoare, C. J., Garrod, D. R., Carlson, G. L., & Warhurst, G. (2005). Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 22), 5221–5230. <https://doi.org/10.1242/jcs.02630>
- Wei, W., Wu, B.-J., Wu, Y., Tong, Z.-T., Zhong, F., & Hu, C.-Y. (2021). Association between long-term ambient air pollution exposure and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14903-5>
- Wei, X., Jia, Z.-S., Lian, J.-Q., Zhang, Y., Li, J., Ma, L., Ye, L., Wang, J.-P., Pan, L., Wang, P.-Z., & Bai, X.-F. (2009). Inhibition of hepatitis C virus infection by interferon-gamma through downregulating claudin-1. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(3), 171–178. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0040>
- Wen, H., Watry, D. D., Marcondes, M. C. G., & Fox, H. S. (2004). Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: Role of the first extracellular domain of claudin-5. *Molecular and Cellular Biology*, 24(19), 8408–8417. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8408-8417.2004>
- Wu, C.-J., Lu, M., Feng, X., Nakato, G., & Udey, M. C. (2020). Matriptase Cleaves EpCAM and TROP2 in Keratinocytes, Destabilizing Both Proteins and Associated Claudins. *Cells*, 9(4), E1027. <https://doi.org/10.3390/cells9041027>
- Wu, C.-J., Mannan, P., Lu, M., & Udey, M. C. (2013). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) regulates claudin dynamics and tight junctions. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 12253–12268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457499>
- Wu, J.-E., Wu, Y.-Y., Tung, C.-H., Tsai, Y.-T., Chen, H.-Y., Chen, Y.-L., & Hong, T.-M. (2020). DNA methylation maintains the CLDN1-EPHB6-SLUG axis to enhance chemotherapeutic efficacy and inhibit lung cancer progression. *Theranostics*, 10(19), 8903–8923. <https://doi.org/10.7150/thno.45785>
- Wu, Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q., & Lasky, L. A. (2000). Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated

- guanylate kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21477–21485.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M909741199>
- Xiang, X., Deng, Z., Zhuang, X., Ju, S., Mu, J., Jiang, H., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2012). Grhl2 Determines the Epithelial Phenotype of Breast Cancers and Promotes Tumor Progression. *PLOS ONE*, 7(12), e50781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050781>
- Xiao, H., Verdier-Pinard, P., Fernandez-Fuentes, N., Burd, B., Angeletti, R., Fiser, A., Horwitz, S. B., & Orr, G. A. (2006). Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10166–10173.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0603704103>
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., & Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434(7031), 338–345. <https://doi.org/10.1038/nature03441>
- Yang, X., Shang, P., Yu, B., Jin, Q., Liao, J., Wang, L., Ji, J., & Guo, X. (2021). Combination therapy with miR34a and doxorubicin synergistically inhibits Dox-resistant breast cancer progression via down-regulation of Snail through suppressing Notch/NF- κ B and RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 11(9), 2819–2834. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.06.003>
- Yang, X., Wang, H., & Jiao, B. (2017). Mammary gland stem cells and their application in breast cancer. *Oncotarget*, 8(6), 10675–10691. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12893>
- Yang, Y., Liu, L., Fang, M., Bai, H., & Xu, Y. (2019). The chromatin remodeling protein BRM regulates the transcription of tight junction proteins: Implication in breast cancer metastasis. *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(5), 547–556.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.03.002>
- Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., & Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *Journal of Cell Biology*, 203(4), 605–614. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304194>
- Yao, R., Natsume, Y., & Noda, T. (2004). MAGI-3 is involved in the regulation of the JNK signaling pathway as a scaffold protein for frizzled and Ltap. *Oncogene*, 23(36), 6023–6030.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207817>

- Yates, L. R., Knappskog, S., Wedge, D., Farmery, J. H. R., Gonzalez, S., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Van Loo, P., Haugland, H. K., Lilleng, P. K., Gundem, G., Gerstung, M., Pappaemmanuil, E., Gazinska, P., Bhosle, S. G., Jones, D., Raine, K., Mudie, L., Latimer, C., ... Campbell, P. J. (2017). Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell*, 32(2), 169-184.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.005>
- Yavari, K., & Kooshesh, L. (2019). Deuterium Depleted Water Inhibits the Proliferation of Human MCF7 Breast Cancer Cell Lines by Inducing Cell Cycle Arrest. *Nutrition and Cancer*, 71(6), 1019–1029. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1595048>
- Yi, H., Li, Y., Tan, Y., Fu, S., Tang, F., & Deng, X. (2021). Immune Checkpoint Inhibition for Triple-Negative Breast Cancer: Current Landscape and Future Perspectives. *Frontiers in Oncology*, 11, 648139. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.648139>
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2010). Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Molecular Cancer Research*, 8(5), 629–642. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0139>
- Yin, P., Li, Y., & Zhang, L. (2017). Sec24C-Dependent Transport of Claudin-1 Regulates Hepatitis C Virus Entry. *Journal of Virology*, 91(18). <https://doi.org/10.1128/JVI.00629-17>
- Yoda, S., Soejima, K., Hamamoto, J., Yasuda, H., Nakayama, S., Satomi, R., Terai, H., Ikemura, S., Sato, T., Naoki, K., & Betsuyaku, T. (2014). Claudin-1 is a novel target of miR-375 in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 85(3), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.06.009>
- Yu, D., & Turner, J. R. (2008). Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: The role of membrane traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.027>
- Yun, C. W., & Lee, S. H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3466. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>
- Zahraoui, A. (2004). Les jonctions serrées: Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. *Médecine/Sciences*, 20(5), 580–585. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004205580>
- Zhang, A., & Li, J. (2017). Crocetin shifts autophagic cell survival to death of breast cancer cells in chemotherapy. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317694536. <https://doi.org/10.1177/1010428317694536>

- Zhang, D., Zheng, Q., Wang, C., Zhao, N., Liu, Y., & Wang, E. (2020). BHLHE41 suppresses MCF-7 cell invasion via MAPK/JNK pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(7), 4001–4010. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15033>
- Zhang, J., Brewer, S., Huang, J., & Williams, T. (2003). Overexpression of transcription factor AP-2alpha suppresses mammary gland growth and morphogenesis. *Developmental Biology*, 256(1), 127–145. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00119-7)
- Zhang, K., Yao, H.-P., & 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(3), 552–559. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn003>
- Zheng, G., Victor Fon, G., Meixner, W., Creekmore, A., Zong, Y., K Dame, M., Colacino, J., Dedhia, P. H., Hong, S., & Wiley, J. W. (2017). Chronic stress and intestinal barrier dysfunction: Glucocorticoid receptor and transcription repressor HES1 regulate tight junction protein Claudin-1 promoter. *Scientific Reports*, 7(1), 4502. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04755-w>
- Zheng, K., He, Z., Kitazato, K., & Wang, Y. (2019). Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. *Theranostics*, 9(1), 104–125. <https://doi.org/10.7150/thno.30308>
- Zheng, Q., Wang, C., Wang, L., Zhang, D., Liu, N., Ming, X., Zhou, H., Guli, Q., & Liu, Y. (2018). Interaction with SP1, but not binding to the E-box motifs, is responsible for BHLHE40/DEC1-induced transcriptional suppression of CLDN1 and cell invasion in MCF-7 cells. *Molecular Carcinogenesis*, 57(9), 1116–1129. <https://doi.org/10.1002/mc.22829>
- Zhong, W., Zhao, Y., McClain, C. J., Kang, Y. J., & Zhou, Z. (2010). Inactivation of hepatocyte nuclear factor-4 α mediates alcohol-induced downregulation of intestinal tight junction proteins. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(3), G643–G651. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00515.2009>
- 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 Investigation*, 33(9), 429–439. <https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1060996>
- Zhou, B., Moodie, A., Blanchard, A., Leygue, E., & Myal, Y. (2015). Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights. *Journal of Clinical Medicine*, 4(12), 1960–1976. <https://doi.org/10.3390/jcm4121952>

- Zhou, J., Zhu, Y., Zhang, G., Liu, N., Sun, L., Liu, M., Qiu, M., Luo, D., Tang, Q., Liao, Z., Zheng, Y., & Bi, F. (2011). A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *International Journal of Cancer*, 128(5), 1057–1068. <https://doi.org/10.1002/ijc.25445>
- Zhou, Q., Costinean, S., Croce, C. M., Brasier, A. R., Merwat, S., Larson, S. A., Basra, S., & Verne, G. N. (2015). MicroRNA 29 targets nuclear factor- κ B-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability. *Gastroenterology*, 148(1), 158-169.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.037>
- Zhu, J., Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, W., Fan, L., Wang, L., Liu, Y., Liu, S., Guo, Y., Wang, Y., Yi, J., Yan, Q., Wang, Z., & Huang, G. (2016). MicroRNA-142-5p contributes to Hashimoto's thyroiditis by targeting CLDN1. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0917-6>
- Zhu, Y., Wang, W., Yuan, T., Fu, L., Zhou, L., Lin, G., Zhao, S., Zhou, H., Wu, G., & Wang, J. (2017). MicroRNA-29a mediates the impairment of intestinal epithelial integrity induced by intrauterine growth restriction in pig. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(5), G434–G442. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00020.2017>
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9), 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>

Résumé : La claudine 1 : une piste pour sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires triple-négatives à la chimiothérapie

Les tumeurs mammaires triple-négatives (TNBC) représentent 20 % des cancers du sein et leur traitement constitue un enjeu majeur en cancérologie puisque peu de thérapies ciblées efficaces sont actuellement disponibles pour les patients. Parmi les TNBC, 77% n'expriment pas la claudine 1 (une protéine des jonctions serrées) et sont appelées tumeurs « claudin-1-low ». Ces dernières présentent un risque accru de récurrences, d'importantes capacités métastatiques ainsi qu'une forte résistance à la chimiothérapie. Bien que le rôle de la claudine 1 dans le cancer du sein ne soit pas clairement défini, elle pourrait être un suppresseur de tumeur. Dans ce contexte, mon laboratoire a pu montrer que son expression induisait l'apoptose de deux lignées cellulaires TNBC « claudin-1-low » : les MDA-MB-231 et les Hs578T. Les travaux établis au cours de ma thèse ont démontré qu'au sein des TNBC, les cellules HCC1806 exprimant la claudine 1 présentent une plus forte sensibilité que les cellules MDA-MB-231 et Hs578T à trois agents de chimiothérapie couramment utilisés en clinique dans le traitement des tumeurs mammaires : le 5-FU, le paclitaxel et la doxorubicine. Les résultats obtenus soulignent également l'implication de la claudine 1 dans cette sensibilité, et que son expression sensibilise les lignées TNBC « claudin-1-low » aux agents de chimiothérapie. Dans le but de comprendre son implication dans ce processus, la recherche de ses partenaires protéiques, ainsi que l'identification des régulateurs clés de son expression ont été initiés. L'ensemble des travaux effectués au cours de cette thèse pourrait permettre d'établir la claudine 1 comme marqueur pronostic de réponse à la chimiothérapie. A plus long terme, ces travaux pourraient aussi orienter la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques permettant l'expression de la claudine 1 dans les TNBC et ainsi augmenter leur sensibilité à la chimiothérapie.

Mots clés : Cancer du sein, chimiothérapie, claudine 1, sensibilité, apoptose, biomarqueur

Abstract: Claudin-1: a way to sensitize triple-negative breast cancer cells to chemotherapy

Triple-negative breast cancer (TNBC) represents 20% of breast tumors and their treatment is a major issue in oncology because only few effective targeted therapies are currently available to treat them. Among TNBCs, 77% of them do not express the claudin-1 (a tight junction protein) and are referred as "claudin-1-low" tumor. These tumors have a higher recurrence risk, higher metastatic capacities, and bigger resistance to chemotherapy. Although claudin-1 role in breast cancer is not clearly defined, several studies suggest that it may be a tumor suppressor. Recent data from my laboratory confirm this hypothesis since claudin-1 expression induces apoptosis of two TNBC "claudin-1-low" cell lines: MDA-MB-231 and Hs578T. The works established during my thesis demonstrate that the HCC1806 TNBC cell line, which expresses the claudin-1, is more sensitive than the MDA-MB-231 and Hs578T cells to three chemotherapy agents commonly used in breast tumors treatment: 5-FU, paclitaxel and doxorubicin. The results obtained also underline the claudin-1 involvement in this sensitivity, and that its expression sensitizes "claudin-1-low" TNBC cells to chemotherapeutic agents. In order to understand its involvement in this process, the search for its protein partners, as well as the identification of key regulators of its expression have been initiated. All the work carried out during this thesis could allow the claudin-1 establishment as a prognostic chemotherapy response marker. In the future, this work could also guide the search for new therapeutic targets allowing the claudin-1 expression in TNBC and thus increase their sensitivity to chemotherapy.

Key words : Breast cancer, chemotherapy, claudin-1, sensitivity, apoptosis, biomarker