

Université du Droit et de la Santé

Thèse de Doctorat de l'Université de Lille II

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE II

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée par

Audrey BOUILLEZ

**Implication de la mucine membranaire MUC1 dans la
progression tumorale rénale et identification de nouvelles
cibles thérapeutiques**

Thèse dirigée par le Docteur Michaël PERRAIS

soutenue le 14 mars 2014 devant le jury composé de :

Président : Mr le Professeur Xavier Leroy
Rapporteur : Mr le Professeur Bernard Mari
Rapporteur : Mr le Professeur Stéphane Richard

Je remercie pour l'honneur qu'ils me font :

Monsieur de Docteur Michaël Perrais, en acceptant de diriger ces travaux de thèse

Monsieur le Professeur Xavier Leroy, en acceptant de présider ce jury

Monsieur le Professeur Bernard Mari

Monsieur le Professeur Stéphane Richard, en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse

Le Conseil Régional du Nord-Pas de Calais et l'Inserm, en acceptant de financer ce travail.

TABLE DES MATIERES

Glossaire	5
Résumé (français)	8
Summary	10
INTRODUCTION	12
I. Les mucines	13
1. Les mucines secrétées	13
2. Les mucines membranaires	14
3. Les mucines « inclassables »	15
II. La mucine membranaire MUC1	15
1. Structure du gène <i>MUC1</i>	15
2. Régulation transcriptionnelle de <i>MUC1</i>	16
3. Epissage alternatif de <i>MUC1</i>	17
4. Régulation épigénétique de <i>MUC1</i>	18
5. Structure de la mucine membranaire MUC1	18
a) Domaine <i>N</i> -terminal de MUC1	19
b) Domaine <i>C</i> -terminal de MUC1	20
6. Clivage de MUC1 CT	21
7. Rôles de la mucine membranaire MUC1	21
8. Territoires d'expression de MUC1	22
III. MUC1 et cancer	22
1. Modification de l'expression de MUC1 dans les cellules tumorales	22
2. MUC1 et encombrement stérique	23
3. MUC1 et polarité cellulaire	25
4. Rôles des VNTR dans la signalisation intracellulaire	27

5. Clivage de MUC1 CT en conditions tumorales	27
6. MUC1 CT et voies de signalisation	28
a) MUC1 CT active la voie Wnt/ β -caténine/TCF/LEF	28
b) MUC1 CT régule la voie NF- κ B	30
c) MUC1 CT régule la voie p53	30
d) MUC1 CT active la voie des MAP Kinases	30
e) MUC1 CT stabilise le récepteur aux oestrogènes ER- α	31
f) MUC1 CT régule l'endocytose	32
g) MUC1 CT est impliquée dans la réponse immunitaire	32
h) MUC1 CT régule l'apoptose induite par le stress oxydatif	34
7. MUC1 et chimiorésistance	35
8. MUC1, une cible thérapeutique prometteuse	35
a) Vaccins anti-MUC1	35
b) Mise au point d'anticorps monoclonaux	36
c) Agents ciblant MUC1 CT	37
IV. Les reins	39
1. Fonction rénale	40
2. Les cancers du rein	40
a) Circonstances de découverte	41
b) Facteurs pronostiques classiques	41
c) Le grade de Fürhman	43
3. Causes	43
4. Voies moléculaires impliquées	44
5. Données épidémiologiques	45
6. Les traitements du cancer du rein	46
RESULTATS	50
Partie 1 : la localisation nucléaire de MUC1-C induit l'invasion des cellules de cRCC <i>via</i> un mécanisme sheddase/ γ -secrétase dépendant	51
Partie 2 : MUC1 induit la chimiorésistance des cellules de cRCC	62

DISCUSSION	65
PERSPECTIVES	75
MATERIEL ET METHODES	81
I. Culture cellulaire	82
1. Modèles cellulaires	82
2. Conditions de culture	82
II. Expériences de transfection	83
1. Transfections stables	83
2. Invalidation d'expression par technique de <i>si</i> ARN	83
3. Détermination de la concentration de la pression de sélection au G418	84
III. Traitement des cellules	84
1. Traitement au L685,458	84
2. Traitement au CP-2 et au GO-203	85
IV. Dosages biochimiques	85
1. Dosage de protéines	85
2. Dosage de l'activité luciférase	85
V. Western-Blot	86
1. Préparation des extraits cellulaires totaux	86
2. Réalisation de fractions protéiques nucléaires et cytoplasmiques	86
3. Western-Blot	89
VI. Etude de la viabilité et de la prolifération cellulaire	91
1. Test MTS/PMS	91
2. Numération cellulaire	91
VII. Expériences d'invasion en chambre de Boyden	92

VIII.	Expériences de migration cellulaire	93
	1. Wound healing assay	93
	2. Migration en chambre de Boyden	93
IX.	Etude de la croissance indépendante de l'ancrage	93
X.	Etude des propriétés d'adhérence	94
XI.	Etude des propriétés d'agrégation cellulaire	95
XII.	Tests de cytotoxicité	95
XIII.	Analyses moléculaires	96
	1. Extractions d'ARN	96
	2. RT-PCR	96
	a) Synthèse de l'ADNc	96
	b) Amplification de l'ADNc par PCR quantitative	96
	3. Analyse transcriptomique	97
XIV.	Expériences <i>in vivo</i>	98
XV.	Analyses statistiques	98
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99

GLOSSAIRE

ABCG2 : ATP-binding cassette sub-family G member 2

aPKC : Protéine kinase C atypique

ADAM : A disintegrin and metalloprotease

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AP : Protéine adaptatrice

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine tri-phosphate

BCA : Acide bicinchoninique

BSA : Sérum albumine bovine

CpG : Cytosine preceeding guanine

cRCC : Carcinome rénale à cellules claires

DAPI : Diamidino-4,6-phénylindol-2 dichlorhydrate

EDTA : Acide éthylènediaminotétraacétique

EGF : Epidermal Growth Factor

EPO : Erythropoïétine

ER α : Récepteur α aux oestrogènes

ErbB : Membre de la famille du récepteur de l'EGF

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β

GSTO2 : Glutathione S-transferase omega 2

G418 : Généticine

HRP : Peroxydase de Raifort

Hsp : Heat shock protein

ICAM : Intercellular adhesive molecule

IFN- γ : Interféron γ

IL : Interleukine

JNK : c-Jun *N*-Terminal Kinase

Kb : Kilobase

kDa : Kilos dalton

LEF1 : Leukocyte enhancing factor 1

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : Métalloprotéinase

MT1-MMP : Membrane type 1-matrix metalloproteinase

MUC1 CT : Queue cytoplasmique de MUC1

NF : Facteur nucléaire

Nup62 : Nucleoporine p62

PAR3/6 : Partitioning defective 3 homolog 3/6

Pb : Paire de bases

PCR : Polymérase Chain Reaction

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PFA : Paraformaldéhyde

PI3K : Phosphatidylinositol 3 phosphate

PKC δ : Proteine Kinase C δ

PMSF : Fluorure de phenylméthanesulfonyle

PSEN1 : Preseniline-1

RECIST : Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

ROS : Reactive oxygen species

RT : Reverse transcriptase

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SEA : Sea urchin sperm protein enterokinase and agrin

shRNA : *short hairpin* RNA

siARN : Interference de l'ARN

SH2 : Src homology 2

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SOS : Son Of Sevenless

Src : Steroid receptor coactivator

STAT : Signal transducers and activators of transcription

SVF : Sérum de veau foetal

TBST : Tampon tris salin Tween20

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TNM : Tumor Node Metastasis

TR : Répétitions en tandem

TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VHL : Von Hippel Lindau

VNTR : Variable Number Tandem Repeat

RESUME

Le carcinome rénal représente 5% des tumeurs de l'adulte et se développe au niveau des tubules rénaux. Le sous-type histologique majeur des cancers du rein est le carcinome rénal à cellules claires (cRCC). 90% des cRCC présentent une inactivation biallélique du gène suppresseur de tumeur de Von Hippel Lindau (*VHL*) induisant une activation constitutive de la voie de l'hypoxie *via* le facteur de transcription HIF1- α (Hypoxia Inducible Factor) qui contribue à la physiologie des tumeurs. Les cRCC sont des tumeurs à la fois radio- et chimiorésistantes, rendant la prise en charge thérapeutique des patients très difficile.

Nos recherches consistaient à étudier les rôles de la mucine membranaire MUC1 dans la progression tumorale rénale et ce, en utilisant différentes constructions : MUC1FL (pleine longueur), Δ TR (délétée des répétitions en tandem) et Δ CT (délétée de la queue cytoplasmique). Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire montraient que la surexpression de MUC1 observée dans les cRCC était associée au statut métastatique des patients et marquait un mauvais pronostic. Cette surexpression de MUC1 est également impliquée dans la voie de l'hypoxie, voie majeure de la carcinogenèse rénale. Le premier objectif de l'étude était donc de déterminer les effets de la surexpression de MUC1 sur les propriétés des cellules de cRCC. Nous montrons ainsi que le domaine extracellulaire de MUC1 ainsi que sa queue cytoplasmique sont impliqués dans l'augmentation des capacités migratoires et de la viabilité des cellules cancéreuses rénales et qu'elle leur confère une résistance à l'anoïkis et diminuent les propriétés d'agrégation des cellules tumorales. Nous montrons également que MUC1 est impliquée dans la chimiorésistance des

cRCC en induisant l'expression de gènes de chimiorésistance comme *ABCG2* et *GSTO2*. Nous montrons par ailleurs que les propriétés invasives des cellules de cRCC sont exclusivement liées à MUC1 CT. Le deuxième objectif de l'étude était d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine du clivage de MUC1 CT. En utilisant différentes stratégies (*siARN*, inhibiteurs pharmacologiques et peptides), nous montrons pour la première fois que la sheddase ADAM10 et la gamma secrétase sont nécessaires à la délocalisation nucléaire de MUC1-C, permettant ainsi l'augmentation des propriétés invasives des cellules de cRCC. Enfin, nous montrons que la surexpression de MUC1 augmente l'expression protéique d'ADAM10/17, suggérant une boucle de régulation positive existant en conditions pathologiques.

En conclusion, notre étude souligne le rôle de MUC1 dans la progression tumorale rénale et montre que la localisation nucléaire de MUC1-C est à l'origine de l'acquisition d'un phénotype invasif et chimiorésistant *via* l'action des sheddases ADAM10/17 et de la gamma secrétase. MUC1 apparaît alors comme une cible thérapeutique potentielle intéressante dans la prise en charge des cRCC.

SUMMARY

Renal cell carcinoma corresponds to 5% of all adult malignancies and originates from renal tubules. The main histologic subtype is represented by clear renal cell carcinoma. Ninety percent of cRCC present a biallelic inactivation of the von Hippel Lindau (VHL) tumor suppressor gene resulting in constitutive activation of hypoxia signaling pathway *via* the Hypoxia Inducible Factor (HIF) -1 transcription factor that contributes to the physiology of tumours. cRCC is typically highly resistant to conventional systemic therapies.

Our work aimed to study the roles of the membrane-bound mucin MUC1 in renal tumor progression, using different constructions: MUC1FL (Full-length), Δ TR (deleted of tandem repeats) and Δ CT (deleted of cytoplasmic tail).

MUC1 is overexpressed in renal cell carcinoma with correlation to prognosis and has been implicated in the hypoxic pathway, the main renal carcinogenetic pathway. In this context, we assessed the effects of MUC1 overexpression on renal cancer cells properties. Using *sh*RNA strategy and/or different MUC1 constructs, we found that MUC1-extracellular domain and MUC1 CT are both involved in increase of migration, cell viability, resistance to anoikis and to decrease of cell aggregation in cancer cells. We also showed that MUC1 is involved in cRCC chemoresistance by inducing chemoresistance genes expression like *ABCG2* and *GSTO2*. Invasiveness depends only on MUC1 CT. Then, by using *si*RNA strategy and/or pharmacological inhibitors or peptides, we showed that the sheddases ADAM10 and the gamma-secretase are necessary for MUC1 C-terminal subunit (MUC1-C) nuclear location and increase of invasion property. Finally, MUC1 overexpression increases ADAM10/17 protein

expression suggesting a positive regulatory loop. In conclusion, we report that MUC1 acts in renal cancer progression and MUC1-C nuclear localization is driving invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. MUC1 appears as a therapeutic target by blocking MUC1 cleavage or nuclear translocation by using pharmacological approach and peptide strategies.

INTRODUCTION

I. Les mucines

Les mucines sont de volumineuses O-glycoprotéines composant le mucus, véritable barrière protectrice des épithélia. En formant un gel très hydraté, composé à 95% d'eau, elles piègent les toxines et les pathogènes présents dans la lumière épithéliale. Les fonctions et la régulation de la formation de ce complexe hydrophilique sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que l'asthme ou encore le cancer (Porchet and Aubert 2004).

Depuis 1987, 21 mucines ont été identifiées et sont classiquement réparties en trois sous-familles :

1. Les mucines secrétées

Les mucines secrétées dites «vraies mucines» regroupent MUC2, MUC5AC, MUC5B (Figure 1) et MUC6. Elles sont codées par quatre gènes localisés au sein d'un cluster sur le chromosome 11 en p15.5 (Pigny *et al.* 1996). Ces apomucines secrétées sont majoritairement exprimées par les cellules épithéliales spécialisées dans le stockage et la sécrétion apicale des vésicules de mucus. En effet, MUC2 et MUC5AC sont retrouvées au niveau des cellules caliciformes tandis que MUC5B et MUC6 sont exprimées par les glandes muqueuses (Porchet and Aubert 2004). Les gènes codant ces mucines présentent de nombreuses homologues de structure, un nombre d'exons et une localisation d'introns ainsi que des jonctions intron/exon comparables suggérant qu'ils seraient issus d'un gène ancestral commun (Desseyn *et al.* 1998).

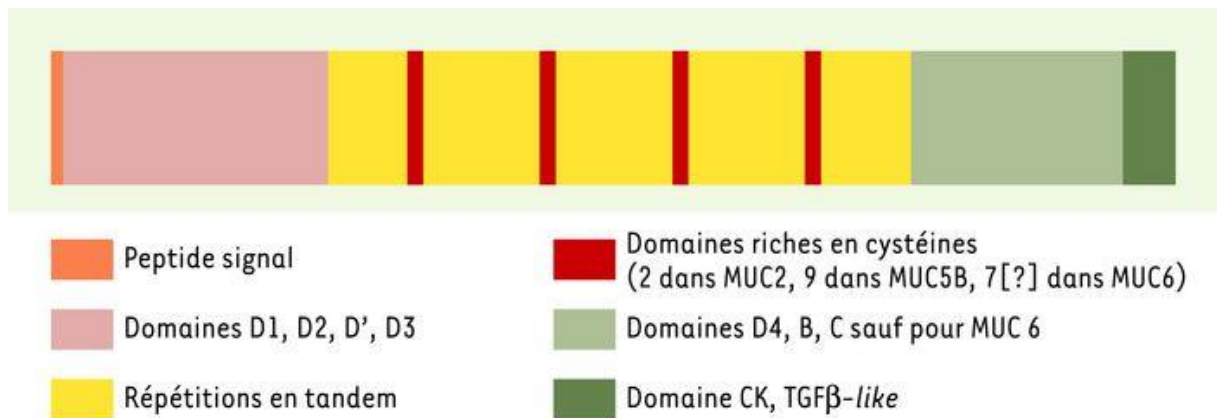


Figure 1 : Représentation schématique d'une mucine sécrétée d'après Nicole Porchet et Jean-Pierre Aubert, 2004.

2. Les mucines membranaires

La famille des mucines membranaires se compose de MUC3A, MUC3B, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC17, MUC20 et les deux mucines les mieux caractérisées d'un point de vue structural et fonctionnel, MUC1 et MUC4 (Hattrup and Gendler 2008) (Figure 2). Les mucines membranaires sont particulièrement concentrées dans le mucus, contribuant à ses fonctions rhéologiques (Porchet and Aubert 2004). Elles sont exprimées au pôle apical des cellules épithéliales non spécialisées de l'organisme et participent comme les mucines secrétées à la protection des épithélia. Leur conformation rigide et étirée (jusqu'à 500 nm pour MUC1 et jusqu'à 2 000 nm pour MUC4) contribuerait à maintenir ouvertes les lumières canalaire et serait impliquée dans la déstabilisation des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extra-cellulaire (fonction d'anti-adhérence), favorisant ainsi la mobilité cellulaire et la progression tumorale (Devine and McKenzie 1992, Patton *et al.* 1995).

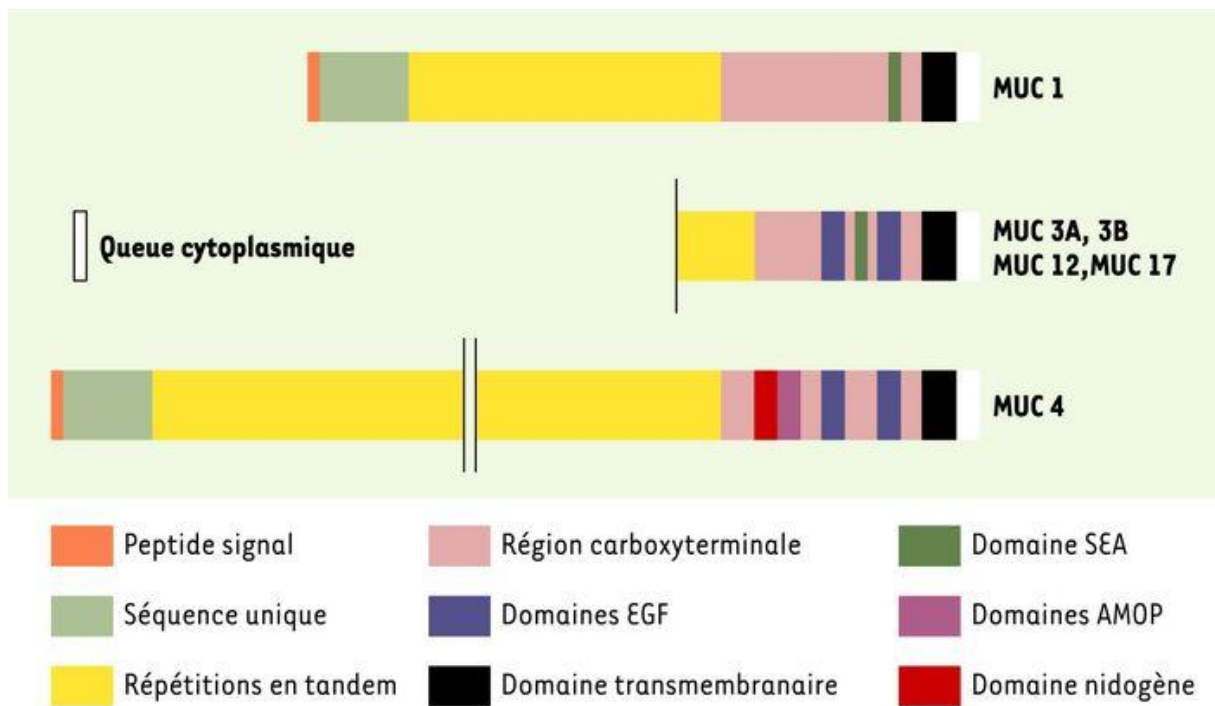


Figure 2 : Représentations schématiques des mucines membranaires d'après Nicole Porchet et Jean-Pierre Aubert, 2004

3. Les mucines dites « inclassables »

Les mucines inclassables ne participent pas à proprement parler à la formation du gel de mucus. Ce groupe se compose de *MUC7*, qui code une glycoprotéine sécrétée uniquement par les cellules séreuses des glandes salivaires et bronchiques. La mucine *MUC8* n'est toujours pas caractérisée à ce jour (Porchet and Aubert 2004). *MUC9* code pour l'oviductine, petite protéine exprimée par l'épithélium sécrétoire de la trompe de Fallope (Lagow *et al.* 1999). Le gène *MUC13* code pour une O-glycoprotéine transmembranaire dont la région C-Terminale (C-Ter) présente des similitudes avec celle de *MUC3*. *MUC15* code pour une N- et une O-glycoprotéine dont la forme longue est transmembranaire et la forme courte, sécrétée. *MUC16* code pour une volumineuse O-glycoprotéine exprimée par les cellules tumorales ovariennes (Antigène CA125). Enfin, entrent dans ce groupe deux gènes *MUC19* dont l'un coderait pour une protéine sécrétée et l'autre pour une protéine membranaire (Porchet and Aubert 2004).

II. La mucine membranaire MUC1

1. Structure du gène *MUC1*

Le gène humain codant pour la protéine *MUC1*, dont la taille varie de 4 à 7 kb, est localisé sur le chromosome 1 en q21-24. Il est organisé en domaines et se compose de 7 exons. L'exon 1 permet un adressage de *MUC1* à la membrane plasmique tandis que l'exon 2 code le domaine central de la protéine, caractérisé par 20 à 100 répétitions en tandem d'une séquence de 60 pb. Le nombre de VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) est allèle dépendant ce qui explique les différences

interindividuelles. Les exons 5, 6 et 7 codent pour les domaines transmembranaire et cytoplasmique de MUC1 (Gendler *et al.* 1990).

2. Régulation transcriptionnelle de *MUC1*

La régulation transcriptionnelle du gène codant pour MUC1 a été très largement étudiée dans des modèles mammaires (Abe and Kufe 1993). Le promoteur de *MUC1* se compose de nombreuses GC « boxes » ainsi que d'une TATA box, située 25 nucléotides en amont du site d'initiation de transcription (Abe *et al.* 1989). 2,9 kb de la région 5' de *MUC1* ont été caractérisés (Genbank : L06162 et X69118) et comportent de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription tels que Sp1, les protéines activatrices (*Activating Protein*) AP-1, AP-2 et AP-3, le facteur nucléaire NF-1 (*Nuclear Factor 1*), le récepteur aux oestrogènes, le « milk binding protein factor » ou encore le facteur de transcription STAT (*Signal Transduction and Activator of Transcription*) (Abe *et al.* 1989, Abe and Kufe 1993, Gaemers *et al.* 2001). L'équipe de Kovarik a déterminé que la région (-743/-1) du promoteur du gène *MUC1* est la séquence la plus courte permettant d'induire l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur dans les lignées cellulaires épithéliales exprimant MUC1. De plus, la région (-150/-60) du promoteur contient un élément *cis* pour le facteur Sp1 (-99/-90) ainsi qu'une E-box appelée E-MUC1 (-86/-64) indispensable à l'expression tissu-spécifique de MUC1 (Kovarik *et al.* 1993). Dans la lignée mammaire T47D, quatre sites de fixation pour les facteurs de transcription STAT ont été observés au niveau du promoteur de *MUC1* (-90, -75, -55, -35), près de la TATA box et des GC boxes (Zaretsky *et al.* 1999). Dans les cellules cancéreuses, les facteurs pro-inflammatoires IFN- γ (*Interféron- γ*) et l'interleukine 6 (IL-6) stimulent la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle de la région (-722/-1) du

promoteur de *MUC1*. Un élément *cis* STAT en -500 favorise cette activation. L'IFN- γ et l'IL-6 activent respectivement STAT1 et STAT3 qui ensuite interagissent avec un élément *cis* en (-503/-485). La fixation de STAT sur le promoteur de *MUC1* apparaît donc comme un événement important dans la surexpression de *MUC1* par les cellules tumorales (Gaemers *et al.* 2001). Dans cette même lignée mammaire, deux sites d'initiation de la transcription supplémentaires sont observés (-520 et -130) après stimulation par le TGF- β 1 (*Tumor Growth Factor- β 1*).

Dans les cellules adénocarcinomeuses humaines A549, la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) stimule l'expression de *MUC1* en augmentant *de novo* la transcription de MAP-kinases (*Mitogen Activated Protein kinase*). Un élément Sp1 (-99/-90) est nécessaire pour l'activation de *MUC1* par le TNF- α (Koga *et al.* 2007).

Enfin, dans les carcinomes rénaux à cellules claires, *MUC1* est directement régulée par HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor-1 α*) via des éléments HRE (*HIF Responsible Elements*) localisés en (-1488/-1485) et en (-1510/-1507), affectant les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses (Aubert *et al.* 2009).

3. Epissage alternatif de *MUC1*

Plusieurs isoformes issues de l'épissage alternatif de *MUC1* ont été décrites (Figure 3). L'isoforme *MUC1/SEC* est une forme sécrétée composée uniquement des répétitions en tandem du domaine extracellulaire. La forme *MUC1/Y* contient en revanche, le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique de *MUC1* (*MUC1 CT*) mais est dépourvue de répétitions en tandem (Baruch *et al.* 1999).

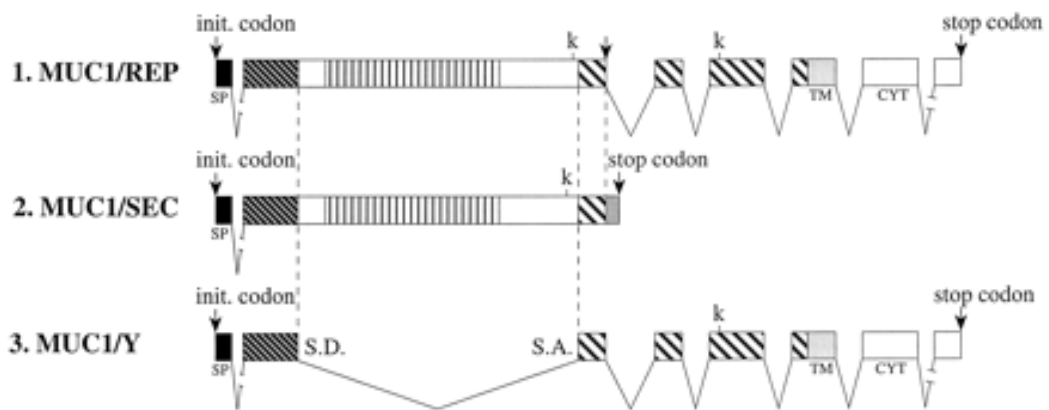


Figure 3 : Représentation schématique de 3 isoformes de MUC1 : MUC1, MUC1/SEC et MUC1/Y d'après Baruch et Al, 1999

SP : séquence codant le peptide signal de MUC1

TR : séquence codant les répétitions en tandem de MUC1

TM : séquence codant le domaine transmembrabaire de MUC1

CYT : séquence codant la queue cytoplasmique de MUC1

Les travaux récents de Zhang et collaborateurs ont montré l'existence de 78 isoformes de MUC1 grâce à une nouvelle méthode de RT-PCR leur permettant d'évaluer l'épissage alternatif de MUC1 dans différentes lignées tumorales humaines (HeLa, MCF7 et Jurkat). Ils ont ainsi montré que le polymorphisme nucléotidique observé en 3506 A/G pouvait réguler les sites d'épissage alternatif de l'extrémité 3' de l'intron 1 et aboutir à la production de courtes isoformes protéiques de MUC1. Ils ont, en outre, montré que cette mutation nucléotidique était retrouvée *in vivo* pendant la formation *de novo* de tumeurs chez les souris $Muc1^{+/-}Kras^{G12D/+}Pten^{LoxP/LoxP}$. Enfin, ces travaux ont permis d'identifier une nouvelle isoforme MUC1/Y-LSP (mutation nucléotidique A/G) capable d'inhiber la croissance tumorale chez des souris immunocompétentes atteintes de tumeur lymphoïde (Zhang *et al.* 2013).

4. Régulation épigénétique de MUC1

L'expression de *MUC1* est régulée par de petits ARN non codant, les microARN (miARN), tels que miR-145 et miR-1226 (Jin *et al.* 2010, Sachdeva and Mo 2010).

L'expression de *MUC1* est également régulée par son statut de méthylation. Le motif TR forme un îlot CPG (*Cytosine Preceeding Guanine*) méthylé dans les cellules circulantes lymphoïdes. Ce même motif est hypo-méthylé dans les cellules tumorales mammaires participant ainsi à la surexpression de *MUC1* (Zrihan-Licht *et al.* 1995).

5. Structure de la mucine membranaire MUC1

La mucine membranaire MUC1 est exprimée de manière relativement ubiquitaire au pôle apical des cellules épithéliales. Elle est issue d'un polypeptide précurseur codé par un gène unique qui, juste après sa traduction, est clivé en deux fragments

distincts par autoprotéolyse au niveau du motif GSVVV situé dans le domaine SEA (*Sperm protein Enterokinase and Agrin*) du segment *N*-ter de la protéine (Parry *et al.* 2001, Levitin *et al.* 2005, Macao *et al.* 2006). Il résulte de ce clivage deux sous-unités : les sous-unités *N*-ter et *C*-ter liées de manière non covalente (Ligtenberg *et al.* 1992).

La glycosylation débute lors de la traduction de MUC1 avec l'ajout de motifs *N*- et *O*-glycanniques dans le réticulum endoplasmique, la *O*-glycosylation étant la plus importante. Le domaine extracellulaire contient une séquence d'adressage qui exporte la protéine mûre à la membrane apicale des cellules épithéliales polarisées.

a) Domaine *N*-terminal de MUC1

Le domaine *N*-terminal de MUC1 est la plus grosse sous-unité. Il s'agit d'un peptide de 130 à 300 kDa, contenant la séquence d'adressage *N*-terminale exclusivement extracellulaire, composée de domaines VNTR comprenant 20 à 100 répétitions en tandem de la séquence GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP, support de la *O*-glycosylation (Figure 4A).

Le nombre de répétition est allèle dépendant, expliquant ainsi des variations interindividuelles importantes. La taille de la protéine mûre peut doubler après glycosylation. Une des caractéristiques de MUC1 est qu'elle ne possède pas,

contrairement aux autres mucines membranaires, de domaine EGF-like (*Epidermal Growth Factor*).

b) Domaine C-terminal de MUC1

Le domaine C-terminal de MUC1 est la plus petite sous-unité. Elle comprend une région extra-cellulaire de 58 acides aminés, richement *N*- et *O*-glycosylée, un court segment transmembranaire, permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique ainsi que la queue cytoplasmique (MUC1 CT) de 72 acides aminés (Figure 4B). Ces trois segments forment le domaine C-Ter de MUC1, d'une taille de 14 kDa et qui passe à 25 à 30 kDa après glycosylation et/ou phosphorylations.

La rétention de MUC1 CT au niveau de la membrane plasmique est due aux trois premiers résidus CQC (Cystéine-Glutamine-Cystéine) de sa séquence. La palmytoylation de ces résidus permet le recyclage de MUC1 à la surface apicale. MUC1 CT comporte également 7 résidus tyrosine potentiellement phosphorylables. Le sixième résidu est le siège de nombreuses phosphorylations notamment par les récepteurs de la famille ErbB (Schroeder *et al.* 2001), *c*-Src ou encore le PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) (Singh *et al.* 2007). Quand cette tyrosine est phosphorylée, elle devient un site d'ancrage pour des protéines disposant d'un domaine SH2 (Li *et al.* 2001). MUC1 CT peut également être phosphorylée par la Protéine Kinase C δ (PKC δ) et la GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*) sur les résidus sérine et thréonine du motif TDRSPYEKV, en amont du sixième résidu. Ainsi, la phosphorylation de MUC1 CT au niveau du sixième résidu tyrosine active la PKC δ et inhibe l'activité de la GSK-3 β . Elle permet, en outre, à MUC1 CT d'interagir avec la protéine de choc thermique Hsp 90 (*Heat-Shock Protein*).

MUC1 CT peut également interagir avec la β -caténine au niveau du motif SAGNGGSSLS.

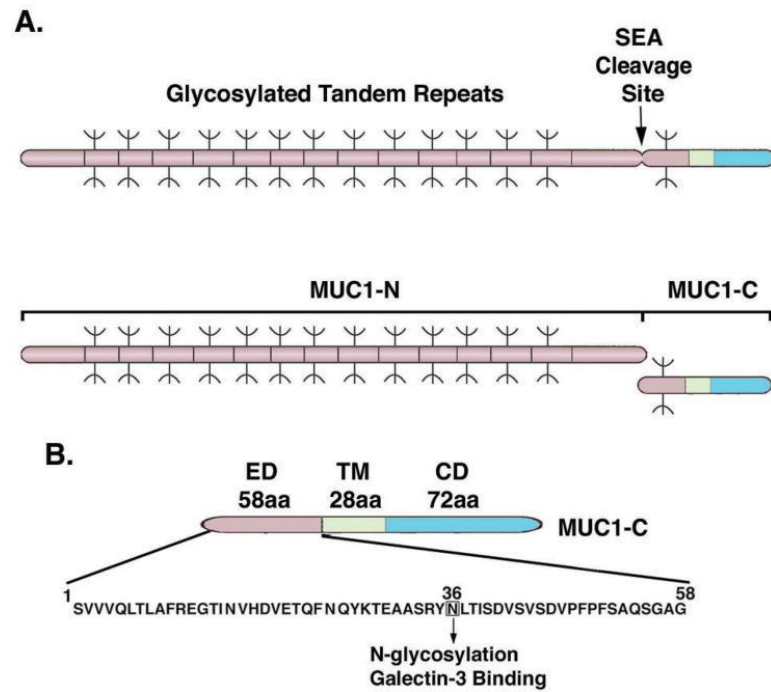


Figure 4 : Représentation schématique des différentes sous-unités de MUC1 (A) et de MUC1 CT (B) d'après Kufe et Al, 2009.

ED : séquence codant le domaine extracellulaire de MUC1 CT

TM : séquence codant le domaine transmembranaire de MUC1 CT

CD : séquence codant le domaine cytoplasmique de MUC1 CT

6. Clivage de MUC1 CT

Le clivage de MUC1 CT a été décrit dans la lignée épithéliale utérine normale HES comme étant effectué par la gamma secrétase (Julian *et al.* 2009). Cette protéolyse est précédée par un autre clivage juxta-membranaire réalisé par la sheddase ADAM 17 (*A Disintegrin And Metalloprotease-like 17*) (Thathiah *et al.* 2003). Le fragment cytoplasmique libéré est décrit comme étant acheminé vers la voie de dégradation endosomale. Dans cette même lignée cellulaire, une seconde sheddase avait été identifiée dans le clivage de MUC1, MT1-MMP (*Membrane Type Matrix Metalloproteases*) également appelée MMP14 (*Matrix Metalloprotease 14*) (Thathiah and Carson 2004).

7. Rôles de la mucine membranaire MUC1

La mucine membranaire MUC1, exprimée de manière relativement ubiquitaire au pôle apical des cellules épithéliales, est impliquée dans le maintien et l'homéostasie de nombreuses fonctions physiologiques.

Grâce à son importante glycosylation extracellulaire, elle assure l'hydratation et la lubrification des épithélia ; MUC1 constitue également une véritable barrière empêchant les agressions de pathogènes divers au niveau, par exemple, de l'épithélium pulmonaire où elle empêche leur infiltration dans l'espace interciliaire et intervillaire. Ainsi, grâce à l'encombrement stérique qu'elle induit, la glycosylation de MUC1 participe à la première ligne de défense.

Selon l'environnement, MUC1 possède des propriétés anti adhésives, notamment dûes à l'encombrement stérique lié à la glycosylation importante de l'axe extra cellulaire ou *a contrario* des propriétés adhésives, puisque la structure tridimensionnelle générée par les répétitions en tandem de sa partie *N-Ter* peut être reconnue par des molécules d'adhésion comme ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule*).

8. Territoires d'expression de MUC1

La mucine membranaire MUC1 recouvre les épithélia canaux et glandulaires de la sphère uro-génitale (reins, prostate et utérus), du tractus respiratoire, du pancréas, du sein, de l'estomac, de l'œsophage, du foie et des glandes salivaires. Elle est également exprimée par des cellules non épithéliales comme les lymphocytes B et T (Agrawal *et al.* 1998, Treon *et al.* 1999).

III. MUC1 et cancer

Environ 1,4 million de tumeurs sont diagnostiquées chaque année aux Etats-Unis, 900 000 d'entre elles surexpriment MUC1. MUC1 semble donc être une cible intéressante dans le développement de nouveaux agents anti-cancéreux tels que les vaccins, les anticorps ou encore les stratégies utilisant des peptides.

1. Modifications de l'expression de MUC1 observées dans les cellules tumorales

La mucine membranaire MUC1 apparait surexprimée dans de nombreux cancers comme ceux du pancréas ou encore du sein (Gendler 2001, Kim *et al.* 2002).

L'augmentation de son expression est corrélée à la progression tumorale et signe un mauvais pronostic (Baldus *et al.* 2005).

Cette surexpression de MUC1 est causée par une instabilité chromosomique au niveau de la région q21-24 du chromosome 1 (Merlo *et al.* 1989) mais également à l'existence d'une boucle d'autoinduction de la transcription de *MUC1* impliquant les facteurs de transcription STAT1 et STAT3, activés par les cytokines secrétées par les cellules effectrices lors de la réponse inflammatoire dans les cellules cancéreuses mammaires (Ahmad *et al.* 2011).

Depuis quelques années, de nombreuses études se focalisent sur le rôle des mi-ARN, petits ARN non codants pouvant jouer un rôle d'oncogène ou inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs.

Il a été observé que la surexpression de MUC1 semble étroitement liée à l'expression de mi-ARN. En effet, il a été montré que l'ARN messager de MUC1 était la cible de miR-145 (Sachdeva and Mo 2010) mais aussi de miR-125b (Rajabi *et al.* 2010). La diminution de leur expression survenant dans les cellules cancéreuses favoriserait la surexpression de MUC1. D'autre part, le miARN miR-1226, exprimé dans les cellules épithéliales mammaires normales, diminue les taux protéiques endogènes de MUC1. L'expression de ce suppresseur de tumeur est diminuée dans les lignées cellulaires carcinomateuses mammaires (Jin *et al.* 2010).

2. MUC1 et encombrement stérique

MUC1 est également décrit comme un oncogène capable de destabiliser les interactions cellule/cellule et cellule/matrice extra-cellulaire en conditions

pathologiques. Dans les cellules tumorales, MUC1 est surexprimée et délocalisée de manière circonférentielle empêchant ainsi les interactions cellule/cellule et cellule/matrice extra-cellulaire (Figure 5). Cet encombrement stérique crée par la présence de MUC1 sur tout le pourtour de la cellule ainsi que par une répulsion de charges est une des phases précoces du phénomène de diffusion métastatique (Taylor-Papadimitriou *et al.* 1999, Kohlgraf *et al.* 2003, Hollingsworth and Swanson 2004, Carraway *et al.* 2005).

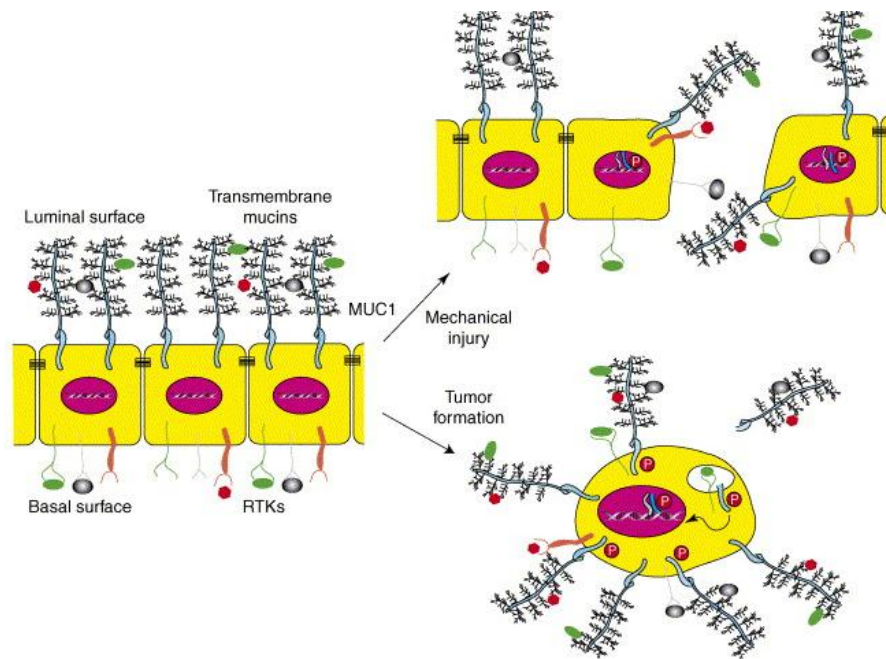


Figure 5 : Rôle anti-adhérent de MUC1 dans le cancer d'après Singh et Al, 2006.

MUC1 est exprimée au pôle apical des cellules épithéliales polarisées, permettant les interactions cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire (à gauche). Les cellules tumorales surexpriment MUC1 qui se trouve également délocalisé de manière circumférentielle, empêchant les interactions cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire par un phénomène d'encombrement stérique.

3. MUC1 et polarité cellulaire

Différentes jonctions cellulaires assurent la polarité et le maintien de la cohésion du tapis de cellules épithéliales. Les jonctions serrées, appelées zonula occludens, forment un anneau entourant la cellule et permettent une occlusion complète de l'espace intercellulaire et délimitent le pôle apical et baso-latéral de la cellule. Elles sont composées d'un complexe protéique regroupant les protéines PAR3, PAR6 (*Partitioning Defective proteins*) et l'aPKC (*Atypical Protein Kinase C*). La surexpression et surtout la délocalisation circonférentielle de MUC1 dans les cellules tumorales conduit à rendre possible son interaction avec un récepteur baso-latéral, ErbB2. MUC1, en liant ErbB2, l'active et permet ainsi son interaction avec PAR6 et l'aPKC qui empêche ainsi toute interaction possible avec leur partenaire PAR3, aboutissant à une déstabilisation des jonctions serrées (Aranda *et al.* 2006).

Les jonctions adhérentes forment une véritable ceinture d'adhérence (zonula adhaerens). L'E-cadhérine joue un rôle essentiel dans le maintien de la morphologie et de la structure des tissus épithéliaux. Les plaques intracytoplasmiques sont formées de molécules de caténine (α , β et γ) (Pokutta and Weis 2007). L'E-cadhérine se lie à la β -caténine, et permet son interaction avec l' α -caténine elle-même liée au cytosquelette d'actine. L'importance des forces de liaison associant l'E-cadhérine à la caténine est fonction du degré de phosphorylation des caténines. La γ -caténine ou plakoglobine lie les cadhérines et favorise la liaison de leur queue cytoplasmique au cytosquelette d'actine *via* l' α -caténine. La γ -caténine est aussi trouvée dans les desmosomes où elle permet la jonction entre les cadhérines desmosomiques et la desmoplakine.

MUC1 peut interagir avec la β -caténine au niveau de son motif SAGNGGSSLS (Yamamoto *et al.* 1997). Ainsi, la surexpression de MUC1 associée aux carcinomes induit la séquestration de la β -caténine et empêche la formation des complexes cadhérine/ β -caténine à l'origine des jonctions adhérentes.

Par ailleurs, une glycosylation aberrante de MUC1 est observée dans les cellules tumorales (Limacher and Acres 2007) (Figure 6). Les chaînes glycaniques sont raccourcies, dues à une modification du profil d'expression des glycosyltransférases permettant l'expression de nouveaux motifs glycaniques. L'expression et la reconnaissance de ces nouveaux motifs peut ainsi moduler les propriétés d'adhésion et d'invasion des cellules tumorales (Lloyd *et al.* 1996). Il a été montré que l'hypoglycosylation du domaine extracellulaire de MUC1 induisait l'interaction de MUC1 avec CIN85 (*Cbl Interacting protein*) et augmentait ainsi les propriétés invasives des cellules tumorales mammaires et des cellules de choriocarcinome (Cascio *et al.* 2013).

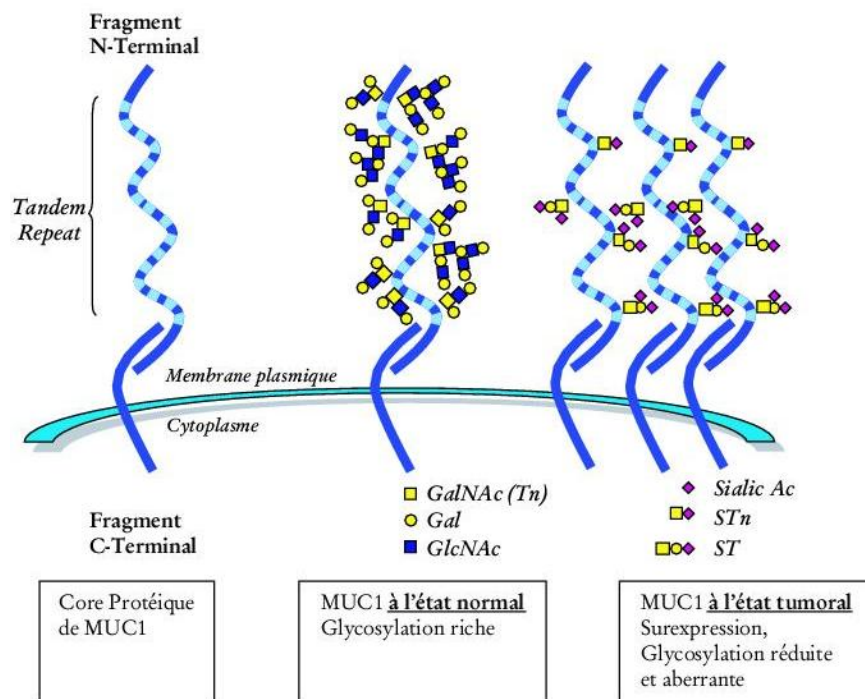


Figure 6 : La glycosylation de MUC1 est aberrante en conditions tumorales d'après Limacher et Al, 2007

L'extrémité N-Ter de MUC1 est richement O-glycosylée. Les cellules tumorales présentent une glycosylation aberrante avec des chaînes glycaniques raccourcies laissant apparaître de nouveaux motifs glycaniques

4. Rôle des VNTR dans la signalisation intracellulaire

Cascio et collaborateurs ont montré que le domaine extra-cellulaire de MUC1 était retrouvé au niveau du noyau des cellules tumorales. Associé à la sous-unité p65 de NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*), il induit la production de cytokines pro-inflammatoires induisant, d'une part, une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B, impliquée dans la survie cellulaire, et favorisant, d'autre part, l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires dans le microenvironnement tumoral et l'induction d'une inflammation chronique permettant la progression tumorale (Cascio *et al.* 2011).

Des travaux récents ont également montré une localisation nucléaire du domaine extracellulaire de MUC1 associée aux spliceosomes. Cependant, son rôle dans ce compartiment n'a toujours pas été établi (Kumar *et al.* 2012).

5. Clivage de MUC1 CT en conditions tumorales

MUC1 CT est retrouvé en grande quantité dans le noyau des cellules tumorales mammaires, pancréatiques et rénales. Il a été montré que MUC1 CT interagissait avec le promoteur de nombreux gènes, comme celui de la *cycline D1*, induisant alors une augmentation des propriétés de prolifération des cellules surexprimant MUC1 (Merlin *et al.* 2011). Néanmoins, aucune étude n'a jusqu'ici été réalisée afin d'identifier les mécanismes moléculaires responsables du clivage de MUC1 en condition pathologique.

6. MUC1 CT et voies de signalisation

a) MUC1 CT active la voie Wnt/ β -caténine/TCF/LEF

La voie Wnt régule de développement normal et le devenir des cellules de l'axe crypto-villositaire sain. Dans les cellules tumorales, elle est impliquée dans les phénomènes de prolifération, d'adhésion, de différenciation et de motilité cellulaire. Wnt est une glycoprotéine sécrétée qui dissocie le complexe GSK-3 β /APC (*Adenomatous Polyposis Coli*)/Axine et empêche la dégradation de la β -caténine par le protéasome. La β -caténine, en interagissant avec les facteurs de transcription LEF1 (*Lymphoid Enhancer Factor 1*) et TCF (*T-cell Factor*) (Figure 7), active la transcription des gènes cibles de la voie Wnt comme c-Myc ou encore la cycline D1. MUC1 CT possède un domaine de liaison à la β -caténine au niveau du motif SXXXXXSSL (Yamamoto *et al.* 1997). L'association de MUC1 CT avec des éléments de la voie Wnt est d'ailleurs associée au potentiel carcinogénétique et métastatique de nombreux cancers (Li *et al.* 1998, Hattrup *et al.* 2004). Dans un modèle mammaire, il a été montré que MUC1 interagissait avec la protéine APC et que cette liaison se trouvait renforcée par la stimulation des cellules avec de l'EGF. De même, les cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 transfectées avec l'ADNc codant pour une forme de MUC1 CT n'ayant pas de motif de liaison à la β -caténine ou à la GSK-3 β ne modifient pas sur leur phénotype invasif suggérant ainsi que cette association augmenterait les propriétés d'invasion des cellules tumorales. Dans ce même modèle, il a également été montré que l'expression de MUC1 était associée à une augmentation de l'expression de la β -caténine à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Schroeder *et al.* 2003, Hattrup *et al.* 2004). MUC1 CT peut entrer en compétition avec l'E-cadhérine en liant

la β -caténine avec laquelle elle s'associe normalement au niveau des jonctions adhérentes. Une équipe a mis au point un peptide pénétrant la membrane plasmique des cellules, le MIP (*MUC1 Inhibitory Protein*), capable d'empêcher à la fois l'interaction de MUC1 avec la β -caténine et l'EGFR et induisant ainsi une diminution de la croissance tumorale (Bitler *et al.* 2009).

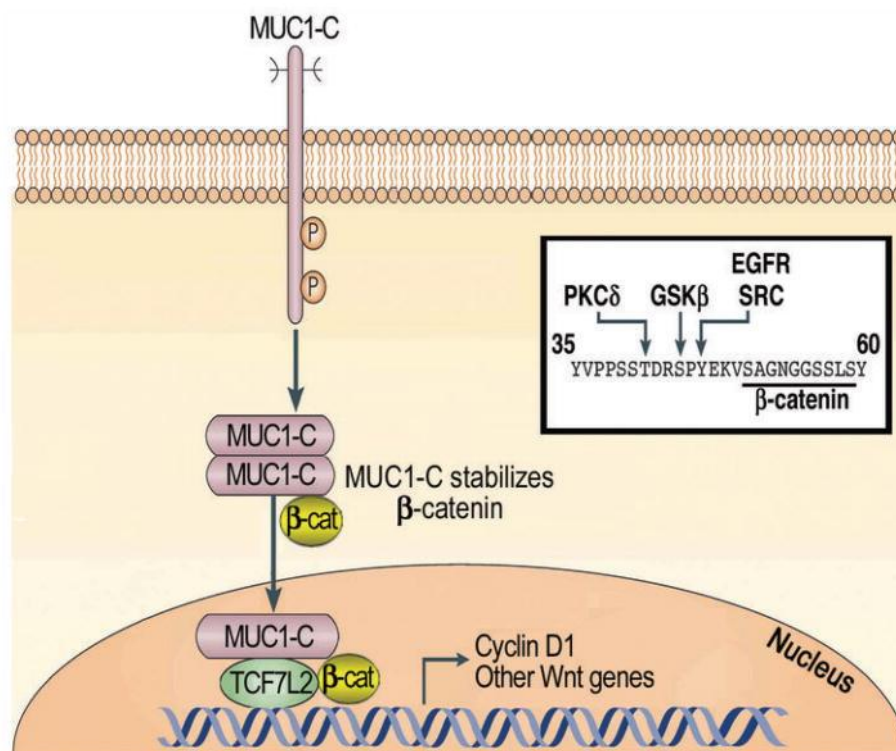


Figure 7 : MUC1 CT active la voie Wnt/ β -caténine/TCF/LEF d'après Kufe et Al, 2009.

La forme phosphorylée de MUC1 CT peut interagir avec la β -caténine. Le complexe ainsi formé est transloqué au noyau où, en interagissant avec les facteurs de transcription TCF ou LEF, il active la transcription de gènes cibles tel que la *cycline D1*.

b) MUC1 CT régule la voie NF- κ B

Il a été montré que MUC1 CT favorise la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B et la transcription de ses gènes cibles. Dans les cellules tumorales, MUC1 CT interagit constitutivement avec les kinases à l'origine de la dégradation des inhibiteurs de NF- κ B (Thompson *et al.* 2006).

c) MUC1 CT régule la voie p53

Le suppresseur de tumeur p53 présente des mutations dans de nombreux cancers. Il régule les fonctions apoptotiques, la réparation et les recombinaisons de l'ADN. MUC1 CT interagit avec p53 et contribue à la régulation de l'activation transcriptionnelle de p21 en réponse aux dommages à l'ADN. En effet, p21 est un acteur clé dans la progression du cycle cellulaire et l'inhibition de l'apoptose qui inhibe également la transcription du gène proapoptotique *Bax*. Associé à p53, MUC1 CT occupe les promoteurs de *p21* et de *Bax*. Ainsi, MUC1 CT servirait de co-régulateur transcriptionnel en modulant l'affinité de différents régulateurs transcriptionnels pour leurs éléments de réponse au niveau du promoteur (Wei *et al.* 2005).

d) MUC1 CT active la voie des MAP Kinases

C'est *via* les récepteurs de la famille ErbB que MUC1 CT est impliqué dans la voie de signalisation des MAP Kinases. En effet, elle potentialise leur effet en augmentant l'activation d'Erk1 et Erk2 (*Extracellular signal-related kinase*) dans les glandes mammaires murines (Schroeder *et al.* 2001). MUC1 CT interagit également avec le

complexe Grb2-Sos et servirait de protéine adaptatrice permettant le recrutement de Grb2 au niveau des sites proches d'ErbB1 par la phosphorylation de MUC1 CT. Des expériences de délétion de la queue cytoplasmique de MUC1 ou l'utilisation de clones cellulaires mutés au niveau de ses tyrosines, empêchant ainsi la phosphorylation de MUC1, ont montré que l'activation des voies Erk1/2 était abolie, mettant en évidence le rôle clé joué par MUC1 dans la voie des MAPK, notamment dans les modèles tumoraux mammaire et pancréatique. De plus, Bitler et collaborateurs ont montré que l'expression de MUC1 dans les cellules tumorales mammaires était nécessaire pour observer l'accumulation nucléaire de l'EGFR et ainsi promouvoir l'expression de la cycline D1 (Merlin *et al.* 2011). Des travaux complémentaires, réalisés au sein de notre équipe, ont montré que la galectine-3, une lectine endogène, favorise la formation d'un complexe entre MUC1 et l'EGFR et permet son internalisation et sa translocation nucléaire (Bitler *et al.* 2009).

e) MUC1 CT stabilise le récepteur aux oestrogènes ER- α

Il existe deux isoformes du récepteur nucléaire aux oestrogènes : ER- α et ER- β (*Estrogen Receptor*). Tous deux permettent une régulation de la transcription de gènes cibles en se fixant, liés à leur ligand, au niveau des éléments de réponse aux oestrogènes ERE de l'ADN. Le 17 β estradiol (E2) est le ligand le plus connu du récepteur aux oestrogènes. Il augmente la croissance, le développement de différents tissus et organes. Il favorise également l'interaction d'ER- α avec la queue cytoplasmique de MUC1 (Wei *et al.* 2006). Le complexe formé par MUC1 CT et ER- α a été mis en évidence sur le promoteur des gènes cibles du récepteur aux œstrogènes, participant ainsi à la prolifération et à la survie des cellules tumorales

mammaires (Zaretsky *et al.* 1999). Il a par ailleurs été montré qu'une inhibition de MUC1 C dans les cellules ER⁺ résistantes au Tamoxifène restaurait la sensibilité au traitement et inhibait la croissance des cellules tumorales mammaires BT-474 (Wei *et al.* 2006).

f) MUC1 CT régule l'endocytose

La translocation de MUC1 à la membrane plasmique est liée à l'état de glycosylation de son domaine extracellulaire (Kinlough *et al.* 2004). En revanche, l'internalisation de MUC1 est indépendante de la glycosylation puisqu'elle est régulée par des motifs présents au niveau de sa queue cytoplasmique. Ainsi, la tyrosine du motif YHPM permet l'interaction de MUC1 avec la protéine AP-2 (Clathrin Adaptator Protein) (Figure 8) tandis que la tyrosine du motif YTNP régule l'interaction de MUC1 CT avec le domaine SH2 de Grb2 (Figure 8), qui est impliquée dans les étapes précoces de son internalisation. La palmytoylation de deux cystéines du motif CQCRRK retrouvé au niveau du domaine cytoplasmique de MUC1 régule quant à elle le taux de MUC1 recyclé à la membrane plasmique mais n'influe pas sur le taux d'endocytose de la mucine (Kinlough *et al.* 2004, Kinlough *et al.* 2006).

g) MUC1 CT est impliquée dans la réponse immunitaire

MUC1 est exprimée par certaines cellules T activées en réponse à la stimulation des récepteurs T. Sa queue cytoplasmique est liée et phosphorylée par les tyrosines kinases Lck et ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) respectivement au niveau de la tyrosine des motifs YEKV et YHPM (Figure 8) (Li *et al.* 2004). Ces phosphorylations augmentent l'affinité de MUC1 CT pour la β -caténine (Figure 8),

connectant ainsi l'activation des cellules T avec la voie Wnt/ β -caténine. En phosphorylant MUC1 CT au niveau de la tyrosine du motif YEKV, la kinase Lyn renforce également l'affinité de MUC1 CT pour la β -caténine (Figure 8). L'association de la queue cytoplasmique de MUC1 avec Lyn est augmentée par l'IL-7, activatrice physiologique des lymphocytes. Il a été montré, dans les cellules de myélome RPMI8826, que la stimulation par l'IL-7 augmentait la translocation nucléaire du complexe formé par MUC1 CT et la β -caténine (Li *et al.* 2003). MUC1 jouerait ainsi un rôle dans l'activation des cellules immunes en augmentant leur motilité cellulaire et en leur permettant de migrer jusqu'aux zones appropriées telles que les ganglions lymphatiques pour faciliter leur activation, leur maturation et ainsi permettre l'expansion de la réponse immune. De même, il a été montré que l'expression aberrante de MUC1 dans les lymphocytes malins de myélome ou de lymphome pourrait contribuer à l'expression altérée de gènes induisant un potentiel métastatique accru (Singh and Hollingsworth 2006).

Les cellules suppressives myéloïdes participent à la suppression caractéristique de la réponse immune en conditions tumorales en inhibant l'action des cellules T. Il a été montré que la différenciation aberrante de cette population dans les cellules progénitrices myéloïdes de souris KO *MUC1* était liée à une diminution de l'expression de la β -caténine directement liée à la perte d'expression de MUC1 (Poh *et al.* 2009).

N-Ter

C-Ter



Figure 8 : Séquence peptidique de MUC1 CT.

En violet : protéines sans activité kinase interagissant avec MUC1 CT

En orange : protéines présentant une activité tyrosine kinase pouvant phosphoryler MUC1 CT

h) MUC1 CT régule l'apoptose induite par le stress oxydatif

Il a été montré que MUC1 régulait l'apoptose *in vivo* et *in vitro*. MUC1 CT active la voie PI3K-Akt (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) augmentant ainsi l'expression protéique du facteur antiapoptotique Bcl_{XL} *in vitro* (Raina *et al.* 2004). La transcription de MUC1 est activée par le stress oxydatif et associée à la diminution des taux d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) et d'H₂O₂ intracellulaires. MUC1 favorise également par déphosphorylation, l'activation de FOXO3a, un facteur de transcription régulant la réponse au stress oxydatif par la voie PI3K-Akt. Il a d'ailleurs été montré que l'expression de la queue cytoplasmique de MUC1 est suffisante pour activer FOXO3a, impliquant une diminution des taux de ROS intracellulaires et donc une diminution de la réponse apoptotique qu'ils induisent (Yin *et al.* 2004). De plus, la stimulation du récepteur ErbB par l'héréguline potentialise l'adressage mitochondrial de la queue cytoplasmique de MUC1 et serait responsable de la diminution de la réponse apoptotique liée aux ROS. La surexpression de MUC1, caractéristique des cellules tumorales, diminue le relargage du cytochrome c par la mitochondrie en réponse aux traitements par des agents chimiothérapeutiques tels que le cisplatine et serait responsable de l'acquisition d'un phénotype chimiorésistant. Il a, par ailleurs, été montré que MUC1 CT, en s'associant avec la caspase-8, pouvait bloquer son activation et, par conséquent, l'apoptose en réponse à la stimulation des récepteurs de mort par le TNF- α ou par le Fas-ligand dans les cellules tumorales coliques HCT116 (Agata *et al.* 2008).

7. MUC1 et chimiorésistance

MUC1 est impliquée *in vitro* dans le phénomène de chimiorésistance. En effet, il a été montré que l'action des agents chimiothérapeutiques était diminuée en présence de MUC1 et qu'à l'inverse, leur effet était potentialisé en l'absence d'expression de MUC1. Ainsi, la surexpression de MUC1 apparaît dans les signatures moléculaires de chimiorésistance des tumeurs ovariennes, prostatiques et mammaires (Takano *et al.* 2004, Li *et al.* 2010). Il a récemment été montré que MUC1 induisait une résistance des cellules tumorales pancréatiques des lignées BxPC3 et Capan-1 à la Gemcitabine et à l'Etoposide *via* la surexpression de gènes de la famille des MDR (*MultiDrug Resistance*) *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCC5* et *ABCB1* (Nath *et al.* 2013).

8. MUC1, une cible thérapeutique prometteuse

a) Vaccins anti-MUC1

L'action principale des vaccins anti-MUC1 est d'induire une réponse immunitaire des cellules T dirigée contre le peptide MUC1 présenté à la surface des cellules tumorales mammaires par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I/II. Quelques vaccins anti-MUC1 sont actuellement en phase avancée d'essais cliniques comme le L-BLP25 (Stivumax de chez EMD Serono) et testé avec succès chez des patientes ayant un cancer du sein ainsi que chez des patients atteints d'un carcinome pulmonaire à non petites cellules de grade 3 non résécables lors d'essais cliniques de phase III (Degregorio *et al.* 2012).

Le PANVAC-V, un autre type de vaccin recombiné avec un virus, contient des transgènes pour MUC1, CEA et trois molécules co-stimulant les cellules T (B7.1,

LFA-3 et ICAM-1). Un vaccin similaire, le PANVAC-F, est construit avec ces mêmes transgènes dans le virus de la variole aviaire rendu déficient pour la réplication. Douze patientes ayant un cancer du sein ont été vaccinées avec le PANVAC-V puis avec des doses dites « boostantes » de PANVAC-F. Pour quatre d'entre elles, la maladie s'est rapidement stabilisée tandis qu'une autre patiente a développé une réponse immunitaire complète selon les critères RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*), qui a duré 37 mois (Gulley et al. 2008).

b) Mise au point d'anticorps monoclonaux

Chez la souris, les répétitions en tandem du domaine extracellulaire sont très immunogènes. De nombreux anticorps monoclonaux ciblant cette sous-unité ont été développés, certains étant même en essais cliniques (Figure 9).

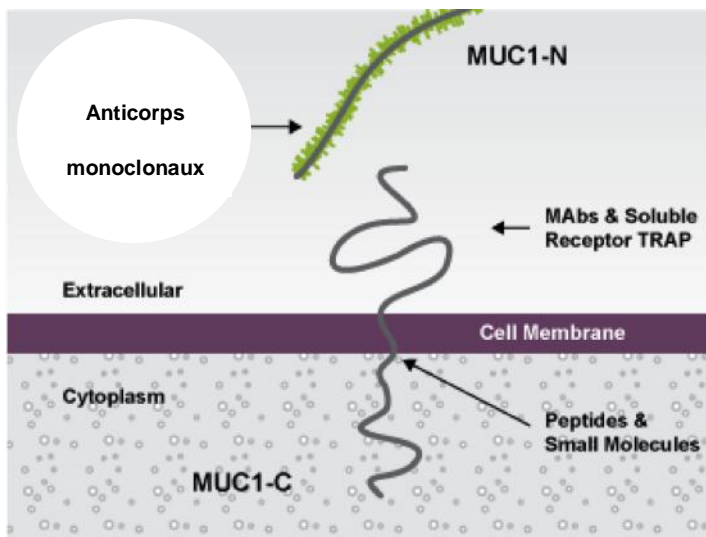


Figure 9 : Stratégies thérapeutiques ciblant MUC1 d'après *Genus Oncology*

Les anticorps monoclonaux ciblent des épitopes particuliers du domaine extracellulaire de MUC1. Une autre stratégie consiste à cibler MUC1 CT avec des petits peptides traversant la membrane plasmique.

Pour exemple, l'AS1402 est une immunoglobuline G1 humaine liant les répétitions en tandem de MUC1 et capable d'induire une cytotoxicité des cellules tumorales mammaires exprimant MUC1. En phase I d'essais cliniques, une étude a été menée afin de déterminer les doses d'AS1402 à injecter afin d'atteindre une cytotoxicité maximale des cellules tumorales exprimant MUC1 (Pegram *et al.* 2009). En phase II d'essais cliniques, l'AS1402 a été combiné au LETROZOLE chez des patientes ayant développé un cancer du sein métastatique ER⁺ mais cette étude n'a donné aucun résultat probant, cette association n'ayant aucun effet synergique (Ibrahim *et al.* 2011).

Dans les cellules tumorales mammaires, le domaine extracellulaire de MUC1 (CA 15.3) est clivé et retrouvé en quantités importantes dans le plasma des patientes ayant développé un cancer du sein métastatique. De ce fait, le pool de MUC1 extracellulaire forme une barrière physique rendant impossible l'action des anticorps monoclonaux.

Contrairement à son domaine extracellulaire, la queue cytoplasmique de MUC1 n'est pas détectable dans le plasma des patients et représente donc une cible idéale pour des anticorps monoclonaux qui pourraient ainsi atteindre MUC1 CT au niveau des cellules tumorales mammaires.

c) Agents ciblant MUC1 CT

La queue cytoplasmique de MUC1 contient un motif CQC nécessaire à sa dimérisation et à ses fonctions oncogéniques. De petits peptides capables de traverser la membrane plasmique des cellules, comme le GO-201, ont été mis au point afin de cibler directement ce motif CQC et de bloquer la dimérisation de la

queue cytoplasmique de MUC1 dans les cellules tumorales mammaires, atténuant ainsi sa délocalisation nucléaire. Il a été montré que le traitement des cellules tumorales avec du GO-201 était associé à un arrêt de la prolifération et à la survenue tardive d'une mort cellulaire par apoptose/nécrose (Raina *et al.* 2009). L'inhibition de la dimérisation de MUC1 CT empêche l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en abolissant l'interaction entre TCF7L2 et MUC1 CT. De plus, séquestrée à la membrane plasmique, MUC1 CT ne peut plus interagir avec STAT3, ce qui empêche donc l'activation de la voie de signalisation STAT3 (Ahmad *et al.* 2011). Il a également été montré dans des cellules tumorales mammaires, que le traitement au GO-201 empêche la formation d'un complexe entre MUC1 CT et NF- κ B RelA, diminuant significativement l'expression des gènes cibles de la voie NF- κ B. Dans un modèle murin, l'administration de GO-201 a entraîné la régression des xénogreffes de tumeurs mammaires. Malgré tout, les acides aminés composant ce peptide sont en conformation L- (situés à gauche dans la projection de Fischer) et donc susceptibles d'être dégradés par les protéases du plasma et du microenvironnement tumoral.

Actuellement en phase I d'essais cliniques, un deuxième peptide ciblant MUC1CT, le GO-203 est testé dans le cadre du traitement de divers carcinomes, notamment celui de la prostate ou encore le carcinome pulmonaires à non petites cellules (Raina *et al.* 2011, Rajabi *et al.* 2012). Il se présente sous une forme plus courte et essentiellement composée d'acides aminés en conformation D- (situés à droite dans la conformation de Fischer), empêchant sa dégradation par les protéases et augmentant donc sa stabilité.

La queue cytoplasmique de MUC1, surexprimée dans de nombreux cancers, représente donc une cible thérapeutique idéale.

IV. Les reins

Les reins sont situés immédiatement sous le diaphragme, plaqués contre la paroi postérieure de la cavité abdominale, de part et d'autre du rachis. D'une longueur moyenne de 12 cm chez l'adulte, ces organes suspendus sont protégés par trois couches tissulaires :

- La capsule protectrice ou capsule rénale
- La graisse péri-rénale
- Le fascia de Gérota qui les maintient dans leur position et les protège des traumatismes externes.

Chaque rein est surmonté d'une glande surrénale et se compose de deux parties :

- Le parenchyme rénal qui comprend le cortex et la médullaire, il s'agit de la partie fonctionnelle du rein qui renferme les unités fonctionnelles appelées néphrons.
- La voie excrétrice : à ce niveau, l'urine formée dans les néphrons est déversée dans les calices avant d'arriver dans le bassinet puis progresse dans la vessie *via* l'uretère.

L'urine est ensuite acheminée hors de l'organisme par l'uretère (Figure 10)

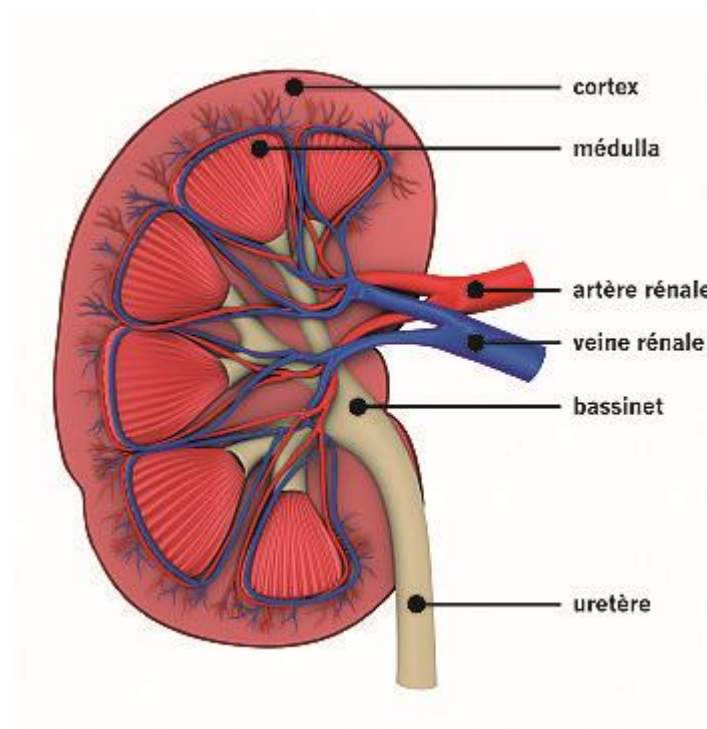


Figure 10 : Anatomie du rein *d'après Novartis.ch*

1. Fonction rénale

Le principal rôle des reins consiste en l'élimination des sels et de l'eau en excès et des dérivés azotés. Ils ont aussi un rôle de détoxification.

La fonction rénale joue également un rôle central dans certaines grandes fonctions physiologiques. En effet, elle permet la maturation des hématies dans la moelle osseuse en sécrétant l'érythropoïétine (EPO). Elle régule également les taux de calcium grâce à la Vitamine D qui est activée en calcitriol au niveau du rein. Enfin, elle intervient dans la régulation de la pression artérielle grâce à la sécrétion de rénine.

2. Les cancers du rein

Environ 10% des tumeurs rénales sont bénignes comme les oncocytomes, les adénomes papillaires et les angiomyolipomes qui sont des tumeurs adipeuses mésoenchymateuses.

Les carcinomes rénaux malins représentent donc 90% des cancers du rein avec une part mineure occupée par les carcinomes tubulopapillaires de types 1 et 2 (10 à 15%), les carcinomes à cellules chromophobes (3 à 5%), les carcinomes des tubes collecteurs de Bellini et des formes plus exceptionnelles dans 15% des cas. Le sous-type histologique majeur est le carcinome rénal à cellules claires (cRCC) qui représente à lui seul 70% à 80% des carcinomes malins du rein (Patard *et al.* 2010).

a) Circonstances de découverte

La découverte du cancer du rein est fortuite, dans 40% des cas, lors d'un scanner abdominal ou d'une échographie réalisée pour une symptomatologie sans lien réel avec la tumeur. Il existe toutefois, dans 42% des cas, des symptômes urologiques comme une hématurie macroscopique totale ou récidivante (20%), des douleurs lombaires (10%) ou plus rarement, une masse lombaire palpable (2%).

b) Facteurs pronostiques classiques

A l'issue du diagnostic, il est possible de donner un stade d'extension du cancer. La classification la plus utilisée est la **classification TNM (Sobin LH 2009)**, T pour tumeur, N pour ganglion (node en anglais), et M pour métastases. Dans le cas du cancer du rein, la classification TNM est la suivante :

T – TUMEUR PRIMITIVE

TX – Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive

T0 – Pas de signe de tumeur primitive

T1 – Tumeur intrarénale ≤ 7 cm dans son plus grand diamètre

T1a – tumeur ≤ 4 cm

T1b – tumeur > 4 cm et ≤ 7 cm

T2 – Tumeur intrarénale > 7 cm dans son plus grand diamètre, limitée au rein

T2a – tumeur > 7 cm et < 10 cm

T2b – tumeur > 10 cm, limitée au rein

T3 – Tumeur étendue aux veines majeures ou aux tissus périrénaux mais sans envahissement de la glande surrénale ipsilatérale ni dépassement du fascia de Gérota

T3a – Tumeur macroscopiquement étendue à la veine rénale ou à ses branches segmentaires (contenant des muscles) ou tumeur envahissant la graisse péri rénale et/ou le tissu adipeux du sinus rénal (hile rénal) mais sans dépassement du fascia de Gérota

T3b – Tumeur macroscopiquement étendue à la veine cave au-dessous du diaphragme

T3c – Tumeur macroscopiquement étendue à la veine cave au-dessus du diaphragme ou envahissant la paroi de la veine cave

T4 – Tumeur étendue au-delà du fascia de Gérota (y compris l'extension par contiguïté à la glande surrénale ipsilatérale)

N – ADÉNOPATHIES RÉGIONALES

NX – Renseignements insuffisants pour classer l'atteinte des ganglions lymphatiques

N0 – Pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux

N1 – Atteinte d'un seul ganglion lymphatique régional

N2 – Atteinte de plus d'un ganglion lymphatique régional

M – MÉTASTASES À DISTANCE

M0 – Pas de métastases à distance

M1 – Métastases à distance

Ceci permet de différencier les formes localisées, sans métastase, et les formes disséminées. Parmi les formes localisées, l'extension locale augmente le risque

de rechute. C'est dans ces situations que l'on discute actuellement l'intérêt d'un traitement adjuvant.

c) Le grade de Führman

Le **Grade de Führman** est également utilisé (Fuhrman *et al.* 1982). Il s'agit d'un « grading » nucléaire simple et reproductible basé sur l'aspect du noyau au moyen grossissement (X20). Il s'applique quel que soit le sous-type histologique. Quatre grades sont ainsi définis, correspondant à des pronostics de plus en plus défavorables. Le grade I évoque des noyaux ronds d'environ 10µm, avec un nucléole peu visible voire absent, le grade II correspond à des noyaux ronds et irréguliers d'environ 15µm, avec un nucléole visible mais petit, le grade III évoque une grande irrégularité nucléaire avec un nucléole large et proéminent tandis que le grade IV correspond à des noyaux multilobés de plus de 20µm avec un gros nucléole et une chromatine irrégulière.

Le grade de Führman possède une forte valeur pronostique. Bien que certains auteurs lui reprochent un manque de reproductibilité interindividuelle, il reste reconnu comme la méthode la plus fiable de « grading » histologique.

3. Causes

Le premier facteur de risque du carcinome rénal établi est le tabagisme, responsable de la survenue de la maladie dans 25 à 30% des cas (Hunt *et al.* 2005). Cependant, les mécanismes d'action du tabac sur la carcinogenèse rénale restent encore inconnus. La deuxième cause est l'obésité. En effet, les individus ayant un indice de

masse corporelle élevée présentent un risque accru de développer un cancer du rein. Les perturbations hormonales liées au surpoids et une exposition accrue aux stéroïdes sexuels seraient à l'origine de 25% des cas de cancer (Ljungberg *et al.* 2011). Enfin, l'hypertension artérielle est également décrite comme étant à l'origine de la survenue de la maladie. Il existerait une relation de type dose/effet entre la pression artérielle élevée et le cancer du rein (Ljungberg *et al.* 2011).

4. Voies moléculaires impliquées

Deux voies moléculaires majeures sont impliquées dans la genèse du carcinome rénal (Edeline J) .

- **La voie VHL/HIF/VEGF** : elle se trouve activée par inactivation du gène suppresseur de tumeur *VHL* (*Von Hippel-Lindau*). Cette mutation génique est retrouvée dans 100% des maladies de Von Hippel-Lindau et dans 70% des carcinomes rénaux à cellules claires de cause non héréditaire.

En conditions physiologiques, la protéine VHL cible la sous-unité α du facteur HIF-1 α et induit sa dégradation par ubiquitinylation. Dans les cellules tumorales exposées à l'hypoxie, le complexe VHL ne peut plus cibler et dégrader HIF-1 α , induisant une accumulation nucléaire de HIF-1 α et l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles comme *VEGF* et *PDGF* (Linehan et Srinivasan. 2013) (Figure 11). Par ailleurs, Il a été montré au sein de l'équipe que HIF-1 α régulait directement MUC1 et induisait une augmentation des propriétés invasives et migratoires des cellules de carcinome rénal à cellules claires (Aubert *et al.*2009).

- La voie PI3K/Akt/mTOR : l'implication de la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) a été décrite au niveau de la cellule tumorale.

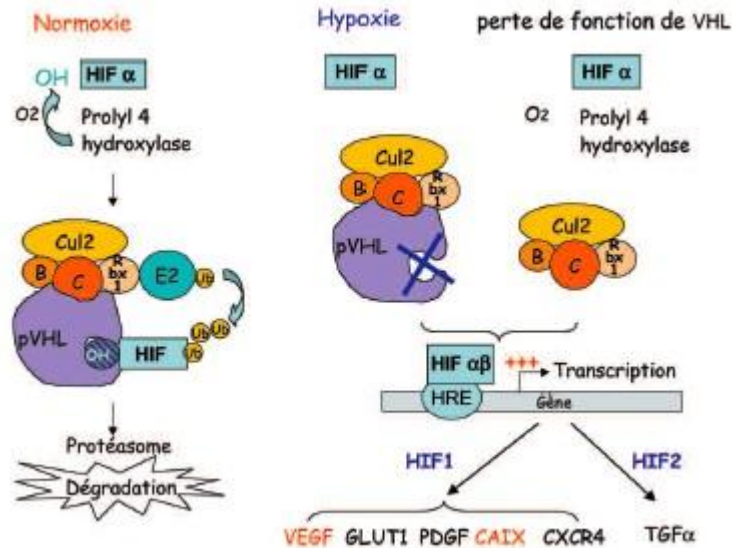


Figure 11 : La voie VHL/HIF et les gènes cibles d'après Urofrance.org.

En condition normoxique, la dégradation de la sous unité HIF-1 α dépend de son ubiquitinylation par VHL. HIF-1 α est constitutionnellement exprimé soit en situation hypoxique soit en cas d'inactivation de VHL. La stabilisation de HIF-1 α entraîne une activation des gènes cibles tels que VEGF et PDGF.

5. Données épidémiologiques

En 2011, il apparaissait **11 090 nouveaux cas** de cancer du rein en France (Données de l'Institut National de Veille Sanitaire, INVS), représentant ainsi 3% de l'ensemble des cancers. L'âge moyen de survenue du carcinome rénal est 65 ans (Hayat *et al.* 2007) et touche deux fois plus les individus de sexe masculin (Lipworth *et al.* 2006).

6. Les traitements du cancer du rein

La néphrectomie totale ou partielle est réalisée dans le cas de carcinomes rénaux non métastatiques. Bien souvent découverts tardivement, les carcinomes rénaux à cellules claires sont bien souvent métastatiques d'emblée. La résection chirurgicale demeure le traitement de référence chez les patients en bon état général avec un site pulmonaire unique et chez qui la tumeur du rein représente la majeure partie du volume tumoral dans le cadre d'une maladie qui n'évolue pas rapidement. Son indication a d'ailleurs été montrée comme bénéfique en association avec les immunothérapies (IFN- α ou IL-2).

Le développement des thérapies ciblées, utilisées seules ou associées à la chirurgie, a profondément modifié la prise en charge du cRCC au cours de ces cinq dernières années (Figure 11). Parmi les plus utilisées en première ou deuxième intention, le Sunitinib et le Sorafenib, deux grands représentants du groupe des inhibiteurs de tyrosine kinase et enfin, le Temsirolimus et l'Everolimus, deux inhibiteurs de la voie mTOR (Mejean *et al.* 2007).

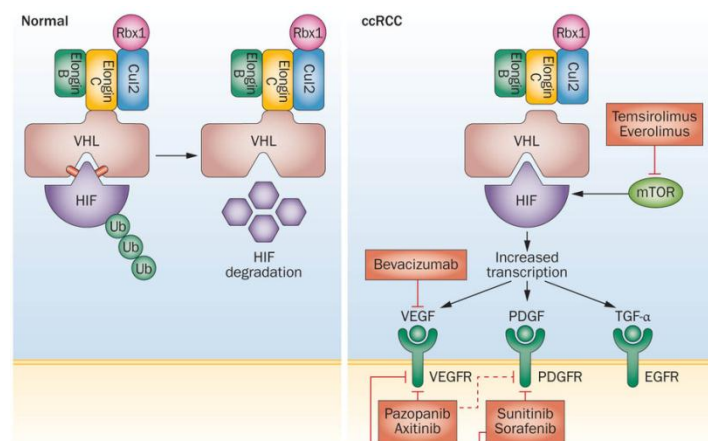


Figure 12 : Thérapies ciblées utilisées dans le traitement du carcinome rénal à cellules claires d'après Linehan et Srinivasan. 2013.

Situation clinique	Patient	Traitement
1ère ligne thérapeutique	Risques bas et intermédiaire	Sunitinib ou Bevacizumab+IFN α
	Haut risque	Temsirolimus
2ème ligne thérapeutique	Traitement antérieur par cytokines	Sorafenib
	Traitement par anti-VEGFR Traitement par mTOR(-)	Everolimus Essais cliniques

Figure 13 : Prise en charge thérapeutique des cRCC métastatiques d'après Audenet et Al. 2009.

Selon le stade TNM établi par les anatomopathologistes après biopsie, il convient de traiter les patients avec des inhibiteurs de la voie mTOR (Everolimus et Temsirolimus) ou avec des inhibiteurs de tyrosine kinases (Sorafenib et Sunitinib).

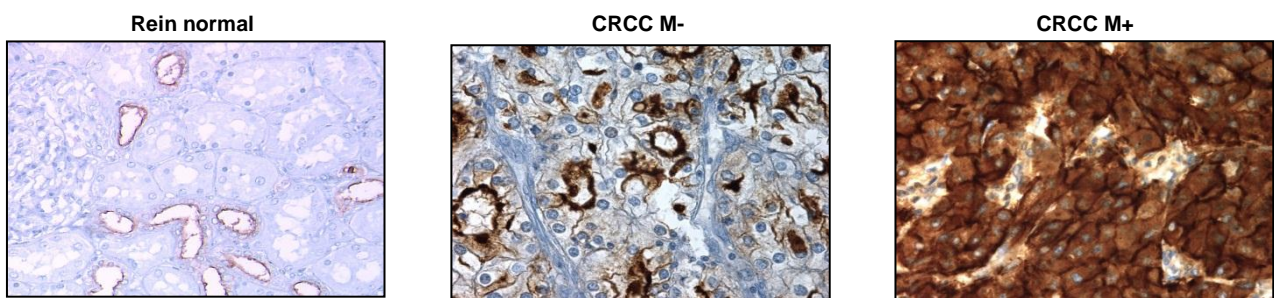
Cependant, bien que permettant une stabilisation de la maladie avec une survie sans progression variant de 5 à 15 mois, ces traitements n'améliorent que très peu la durée de vie des patients atteints d'un cRCC. En effet, si les antiangiogéniques ont permis des progrès indéniables dans la prise en charge du cancer du rein métastatique, le traitement n'est pas curatif et le taux de survie à cinq ans reste faible (10 à 20 %). Or 35 à 45 % des cancers du rein sont ou deviendront métastatiques (Zisman *et al.* 2002).

De plus, leur action semble limitée dans le temps, après une efficacité initiale, les traitements deviennent souvent moins efficaces avec le temps, la tumeur semblant trouver le moyen d'échapper à la thérapie choisie. Il existe un certain nombre de patients qui ne répondent pas à ces traitements (Buti *et al.* 2013).

Les enjeux actuels majeurs sont donc d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles qui pourraient permettre une meilleure prise en charge des patients mais également d'élucider les mécanismes à l'origine de la chimiorésistance caractéristique du carcinome rénal à cellules claires

Contexte et objectifs de l'étude

Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que la mucine membranaire MUC1 était exprimée au pôle apical des cellules épithéliales du parenchyme rénal sain. Le Professeur Xavier Leroy a montré que MUC1 était surexprimée dans les carcinomes rénaux à cellules claires et que la délocalisation cytoplasmique de MUC1 associée au cancer se trouvait corrélée au statut métastatique des patients (Leroy *et al.*2002).



En montrant que MUC1 était une cible de la voie de l'hypoxie/HIF, le Dr Sébastien Aubert a montré que MUC1 était un acteur majeur de la carcinogénèse rénale (Aubert *et al.*2009).

Les objectifs de notre étude étaient :

- Déterminer le rôle joué par MUC1 dans la progression tumorale rénale
- Identifier le rôle joué par chaque domaine de MUC1
- Identifier la part d'implication de MUC1 dans le phénomène de chimiorésistance caractérisant les cRCC
- Identifier les mécanismes moléculaires à l'origine du clivage de la queue cytoplasmique de MUC1.

RESULTATS

PARTIE 1

La localisation nucléaire de MUC1-C induit l'invasion des cellules de cRCC *via* un mécanisme sheddase/gamma secrétase dépendant.

PARTIE 2

MUC1 induit la chimiorésistance des cellules de cRCC

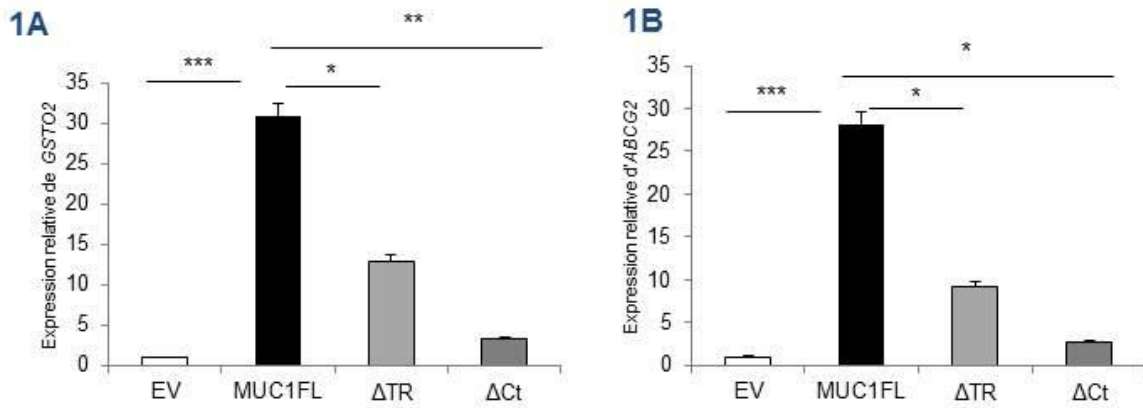


Figure 1 : MUC1 augmente l'expression de gènes de chimiorésistance. Analyse transcriptomique réalisée sur une puce 44K sur les clones ACHN (EV et MUC1FL). En utilisant la technologie TaqMan, des qPCR ont été réalisées à partir d'ADNc de cellules surexprimant MUC1FL. L'expression de GSTO2 (A) et d'ABCG2 (B) ont été évaluées.

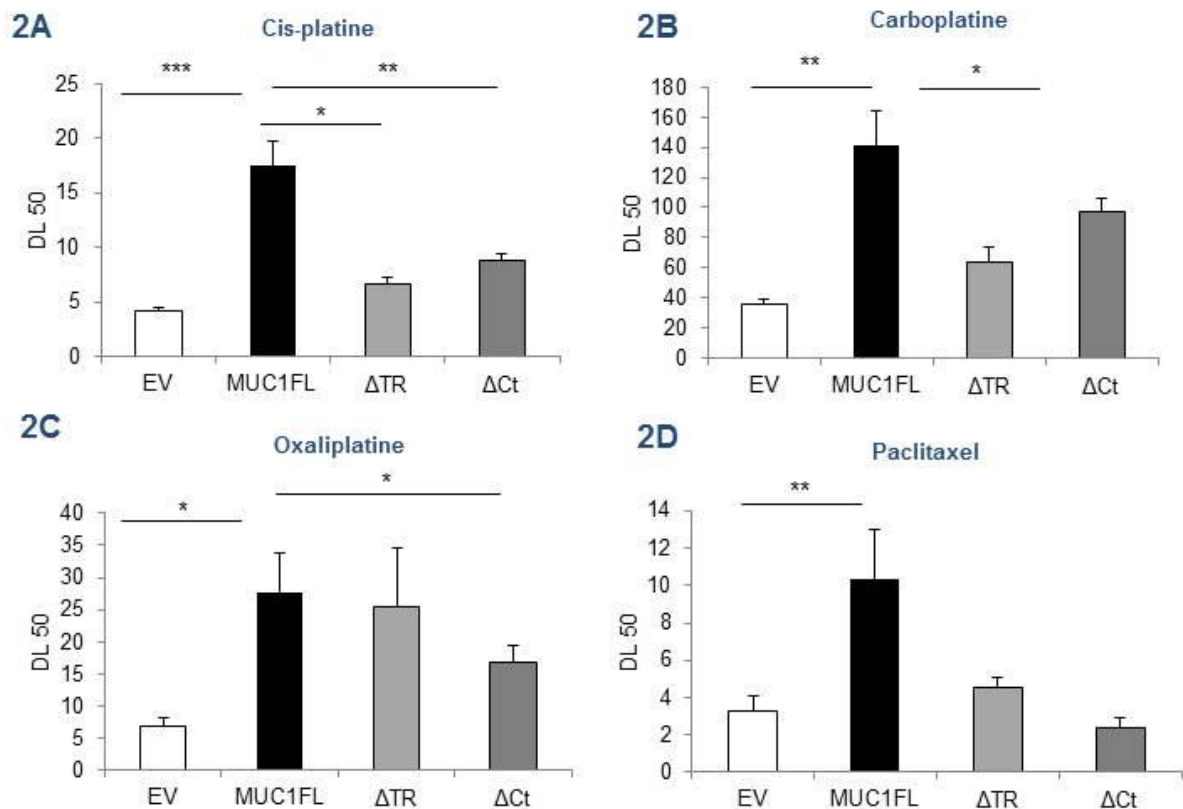


Figure 2 : MUC1 augmente les propriétés de chimiorésistance. Un test de cytotoxicité a été réalisé sur les clones ACHN stablement transfectés avec un vecteur vide (EV), le vecteur d'expression de MUC1 (MUC1FL) ou avec l'ADNc de MUC1 déletée de ses répétitions en tandem ou de sa queue cytoplasmique après un traitement au cis-platine (A), au carboplatine (B), à l'oxaliplatine (C) ou au paclitaxel (D). Les valeurs sont des écarts standards à la moyenne et représentent 5 expériences séparées (* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001).

Le carcinome renal à cellules claires est une des tumeurs les plus chimio et radio résistantes. Il a été montré que la surexpression de MUC1 sortait dans les signatures de chimiorésistance des carcinomes ovariens, mammaires et thyroïdiens (L'Esperance *et al.* 2006, Luistro *et al.* 2012, Pitroda *et al.* 2009, Siragusa *et al.* 2007). L'analyse transcriptomique menée sur nos clones cellulaires ACHN a révélé que la surexpression de MUC1 induisait la surexpression de *GSTO2* (fc = 2,27, $p < 0,01$) et d'*ABCG2* (fc = 1,85, $p < 0,01$), tous deux connus comme appartenant à la famille des MDR. Ces résultats ont été confirmés par qPCR comparant les clones contrôle MUC1 EV aux clones surexprimant MUC1FL et montraient ainsi une surexpression de *GSTO2* et d'*ABCG2* (respectivement 30,9 et 28,19 fois, $p < 0,001$, Figures 1A-B).

MUC1 CT est impliquée dans l'expression de ces deux gènes puisqu'il n'existe pas de différence significative avec les clones contrôle MUC1 EV tandis que la déplétion des répétitions en tandem ne semble avoir qu'un léger effet sur leur expression.

Afin d'évaluer l'effet de la surexpression de MUC1 sur la chimiorésistance des cellules de cRCC, les clones ACHN ont été traités avec diverses drogues de chimiothérapie, utilisées dans le traitement de nombreux cancers : les thérapies à base de platinium (agents alkylants) et le Paclitaxel, un inhibiteur du fuseau mitotique. Après 72h de traitement, une mesure de la dose létale 50 (DL50) montrait que les clones MUC1FL étaient plus résistantes que les clones EV au cisplatine (MUC1FL=17,46 $\mu\text{M} \pm 2,25$ vs EV=4,11 $\mu\text{M} \pm 0,37$, $p < 0,001$; Figure. 1C), au carboplatine (MUC1FL=141,6 $\mu\text{M} \pm 22,1$ vs EV=35,6 $\mu\text{M} \pm 2,8$, $p < 0,001$; Figure. 1D), à l'oxaliplatine (MUC1FL=27,68 $\mu\text{M} \pm 6,25$ vs EV=6,7 $\mu\text{M} \pm 1,54$, $p < 0,001$; Figure. 1E) et au paclitaxel (MUC1FL=10,31 $\mu\text{M} \pm 2,7$ vs EV=3,25 $\mu\text{M} \pm 0,86$, $p < 0,01$; Figure. 1F). Les

différentes constructions MUC1FL ($p < 0,001$), MUC1 Δ TR ($p < 0,01$ or $p < 0,05$) or MUC1 Δ CT ($p < 0,001$, $p < 0,01$ or $p < 0,05$) étaient suffisantes pour induire une résistance au platinium tandis que la résistance au paclitaxel induite par MUC1 nécessitait la protéine entière puisqu'aucune différence significative de dose létale 50 observée entre les clones MUC1 EV ($3,25 \mu\text{M} \pm 0,86$), MUC1 Δ TR ($4,5 \mu\text{M} \pm 0,61$) et MUC1 Δ CT ($2,31 \mu\text{M} \pm 0,62$) (Figure. 1F).

En conclusion, nos travaux montrent que dans les cellules de carcinome rénal, la surexpression de MUC1 induit (i) l'expression de deux gènes appartenant à la famille des MDR, *GSTO2* et *ABCG2* et (ii) une chimiorésistance au platinium et aux agents anti-mitotiques.

DISCUSSION

Dans les carcinomes rénaux à cellules claires, la mucine membranaire MUC1 est surexprimée et présente une délocalisation membranaire circonférentielle et cytoplasmique associée à un mauvais pronostic (Leroy *et al.* 2002).

L'objectif de notre étude était de mettre en évidence les rôles de MUC1 dans la progression tumorale rénale et d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques permettant une meilleure prise en charge du carcinome rénal à cellules claires.

L'étude de la surexpression de MUC1 sur la viabilité cellulaire en utilisant un test MTS/PMS, nous a permis d'apprécier de manière générale les capacités de prolifération, de survie cellulaire ainsi que le métabolisme mitochondrial. Nous montrons ainsi une augmentation de la viabilité cellulaire conférée par la surexpression de MUC1 dans les ACHN. Dans nos modèles cellulaires rénaux, nous montrons, à l'aide de plusieurs approches, que la surexpression de MUC1 modifiait les capacités prolifératives des différents clones cellulaires. Nous avons étudié le profil d'expression de la Cycline D1 dans la lignée cellulaire ACHN et observons une variation en comparant les clones surexprimant MUC1 aux clones contrôle transfectés avec un vecteur vide tout comme le décrivait Bitler (Bitler *et al.* 2009). En effet, dans un modèle mammaire, il montrait qu'une perte d'expression de MUC1 induisait celle de la cycline D1 suggérant donc l'implication de MUC1 dans la prolifération. Des études de la prolifération par numération cellulaire confirment nos résultats, montrant que la surexpression de MUC1 influe sur la prolifération ainsi que sur le cycle cellulaire des clones cellulaires ACHN comparable aux modèles mammaires et pancréatiques publiés (Yuan *et al.* 2007, Bitler *et al.* 2009, Raina *et al.*

2009) . Nous montrons également une augmentation de l'expression des formes phosphorylées de p38, Akt et Erk p42/44 concomitantes à la surexpression de MUC1 et expliquant l'augmentation de la survie et de la prolifération cellulaires.

La surexpression de MUC1 augmente d'une manière significative le pouvoir invasif et de migration des clones MUC1 FL de la lignée cellulaire ACHN. Nous montrons par ailleurs un rôle prédominant de MUC1 CT dans ce processus invasif. Ce résultat corrobore les précédents travaux menés au laboratoire où l'inactivation de MUC1 par la stratégie de shRNA dans la lignée carcinomateuse rénale Caki-2 diminuait significativement les propriétés d'invasion et de migration (Aubert *et al.* 2009). Par ailleurs, le domaine extracellulaire de MUC1 ne semble pas impliqué dans l'invasion cellulaire contrairement à ce que montraient les travaux de Satoh (Satoh *et al.* 2000) à savoir qu'en altérant la O-glycosylation avec un inhibiteur de cette modification post-transcriptionnelle, le Benzyl- α -GalNAc, l'invasion était abolie. Une voie impliquant la β -caténine serait responsable de l'augmentation de l'invasion et de la migration en réponse à la surexpression de MUC1. La diminution de l'expression de MUC1 dans la lignée pancréatique PANC1 diminue les capacités migratoires des cellules et induit une relocalisation de la β -caténine du noyau au cytoplasme. En parallèle, la formation de complexes β -caténine/E-cadhérine ainsi qu'une relocalisation membranaire de la E-cadhérine (marqueur épithélial) étaient observés (Yuan *et al.* 2007) dans les cellules PANC1. Ces mêmes cellules présentaient un pouvoir invasif moindre suggérant que la surexpression de MUC1 pourrait affecter la migration et l'invasion des cellules cancéreuses en diminuant la formation de complexes β -caténine/E-cadhérine. Tout comme dans ce modèle pancréatique, nous observons dans la lignée cellulaire ACHN une surexpression de la β -caténine ainsi

qu'une expression délocalisée au noyau cellulaire. Comme il a été décrit dans un modèle tumoral mammaire, MUC1 CT induit une localisation nucléaire de la β -caténine associée à une augmentation de son activité et une augmentation de l'expression de la cycline D1 et de c-Myc (Li *et al.* 2011). Plus récemment, les travaux de Gnemmi et collaborateurs ont montré que la surexpression de MUC1 était associée à la surexpression et à la délocalisation nucléaire de la β -caténine, à l'origine du phénotype mésenchymateux des cellules tumorales rénales (Gnemmi *et al.* 2014). Par ailleurs, nous montrons que le domaine extracellulaire et la queue cytoplasmique de MUC1 sont impliqués dans l'augmentation des capacités migratoires des clones ACHN. Les répétitions en tandem du domaine extracellulaire de MUC1 ont déjà été décrites comme participant à la migration des cellules tumorales mammaires et de choriocarcinome en interagissant avec CIN85 (Cascio *et al.* 2013).

La délocalisation membranaire circonférentielle de MUC1, fréquemment retrouvée dans les tumeurs, est à l'origine d'une modification des interactions cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire.

Dans notre étude, nous montrons par des tests d'agrégation que la surexpression de MUC1 est à l'origine d'une diminution significative des propriétés d'adhérence de la cellule. Ces résultats corroborent de précédents travaux qui montrent que MUC1 joue, par encombrement stérique, un rôle dans les propriétés anti-adhésives des cellules et se trouve associé au phénotype métastatique (Kondo *et al.* 1998, Li *et al.* 2005). Nous montrons également une implication synergique des domaines extra et intracellulaire de MUC1. La délocalisation circonférentielle de MUC1 pourrait

empêcher les interactions cellule-cellule par un phénomène d'encombrement stérique. Par ailleurs, il a été observé que même les clones cellulaires n'exprimant pas MUC1 présentaient des capacités d'adhérence très faibles sur les différentes matrices testées.

Nous avons ensuite cherché à savoir si la surexpression de MUC1 conférait aux clones de la lignée ACHN une résistance à l'anoïkis, programme de mort cellulaire déclenchée quand la cellule perd ses interactions avec les cellules voisines ou avec la matrice extracellulaire. Les clones cellulaires MUC1 FL acquéraient la capacité de croître sur une matrice de PolyHema les empêchant d'adhérer au plastique de culture alors que les clones n'exprimant pas MUC1 mourraient par apoptose. Nos travaux corroborent une autre étude, dans laquelle il est montré que les cellules KB humaines carcinomateuses, présentaient une croissance indépendante de l'ancrage quand MUC1 était surexprimée (Li *et al.* 2005). Il avait déjà été montré que dans un modèle de tumeur de la prostate, la surexpression de MUC1 contribuait à une activation constitutive de la voie NF-KB, favorisant ainsi la survie cellulaire (Sweeney *et al.* 2004). Nos travaux font écho à ces résultats puisque nous montrons également une activation de la voie NF-KB en particulier une augmentation de l'expression des sous-unités p50 et p65 ainsi qu'une délocalisation nucléaire de celles-ci associée à la surexpression de MUC1, suggérant l'implication de MUC1 dans la survie cellulaire. En outre, la surexpression de MUC1 dans le cancer du côlon a été associée à l'atténuation de l'activation de la caspase 8 en réponse à l'activation du récepteur de mort TRAIL et favorisait de cette façon la survie des cellules tumorales. Par ailleurs, MUC1 CT peut s'associer avec p53 et favoriser l'arrêt de la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose en présence de lésions de l'ADN (Wei *et al.* 2005). Dans notre modèle, nous soulignons une diminution de l'expression de la caspase 9 ainsi

que de la molécule pro-apoptotique Bax, et une augmentation de l'expression de l'oncogène c-myc associées à la surexpression de MUC1. De plus, nous montrons l'implication à la fois de la queue cytoplasmique de MUC1 ainsi que des répétitions en tandem du domaine extra-cellulaire dans cette résistance à l'apoptose. L'importance de la queue cytoplasmique de MUC1 dans la résistance à la mort cellulaire a déjà été décrite par Hollingsworth dans un modèle pancréatique (Kohlgraf *et al.* 2003). En effet, il montre que MUC1 CT active, comme dans notre modèle rénal, la voie PI3K-Akt et augmente l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-x_L. Il montre en outre que la surexpression de MUC1 diminue le relargage de cytochrome c par la mitochondrie en réponse au cisplatine, phénomène qui se reproduit en délétant la queue cytoplasmique de MUC1, mettant en exergue son rôle dans la réponse anti-apoptotique.

L'analyse transcriptomique réalisée dans la lignée ACHN montrent que 150 gènes sont sur ou sous-exprimés dans les clones surexprimant MUC1 comparativement aux clones contrôle. Parmi eux, les gènes *GSTO2* et *ABCG2* sont surexprimés et connus pour être impliqués dans la chimiorésistance. L'implication d'ABCG2 ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) dans la chimiorésistance a déjà été décrite dans le modèle tumoral mammaire où elle participe à l'efflux des drogues de chimiothérapie telles que la doxorubicine et le SN-38 (métabolite actif de l'Irinotécan) (Doyle *et al.* 1998). De manière intéressante, il a été décrit à la fois dans les cellules cancéreuses prostatiques (Lee *et al.* 2004) et dans les cellules leucémiques (Huang *et al.* 2013), que l'expression respective des gènes *ABCC1* et *ABCG2* était régulée par la voie PI3K/Akt, qui se trouve surexprimée également dans notre modèle rénal. ABCG2 est aussi impliquée dans la résistance des cellules tumorales ovariennes en réponse au traitement par le cisplatine et le paclitaxel (Chau *et al.* 2013). Aucune

donnée n'est cependant disponible concernant le rôle potentiel de GSTO2 dans les cellules tumorales. MUC1 est déjà connu comme marqueur de chimiorésistance dans les tumeurs ovariennes (L'Esperance *et al.* 2006). Il a également été décrit comme marqueur de chimiorésistance à la gemcitabine et à l'ectoposide dans les cellules tumorales pancréatiques BxPC3 et Capan-1 (Nath *et al.* 2013). Le cancer du rein étant une des tumeurs les plus chimiorésistantes, notre hypothèse était que MUC1 pourrait être une candidate dans le phénomène de chimiorésistance. Nous avons validé par qPCR les résultats obtenus sur puce Agilent® et confirmons la surexpression de *GSTO2* et d'*ABCG2* dans les clones surexprimant MUC1, faisant d'elle un marqueur possible de chimiorésistance dans le modèle rénal. Nous avons cherché à préciser le rôle joué par MUC1 dans ce phénomène de chimiorésistance en traitant les cellules ACHN avec des agents chimiothérapeutiques de différentes classes et montrons que la surexpression de MUC1 diminue significativement la sensibilité des clones ACHN au cisplatine, à l'oxaliplatine, au carboplatine et au paclitaxel. De plus, nous montrons l'implication à la fois du domaine extra-cellulaire et de la queue cytoplasmique de MUC1 dans cette résistance aux drogues. L'implication de la queue cytoplasmique de MUC1 dans ce phénomène a déjà été décrite par Hollingsworth qui montrait que l'adressage mitochondrial de MUC1 CT atténuait le processus apoptotique en réponse aux agents génotoxiques (Singh and Hollingsworth 2006). Dans un modèle mammaire, il a également été montré que l'inhibition de MUC1 CT induisait une augmentation de l'apoptose en réponse au taxol et à la doxorubicine (Kufe 2013). En effet, dans les cellules cancéreuses mammaires, MUC1 CT se trouve localisée d'une part au noyau où elle interagit avec des facteurs de transcriptions comme TCF7L2, impliqué dans la croissance et la survie cellulaires, et d'autre part à la membrane mitochondriale externe où elle

bloque l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. En se liant au domaine BH3 de la molécule pro-apoptotique Bax, MUC1 CT bloque sa dimérisation et le relargage de cytochrome c médié par Bax (Ahmad *et al.* 2012). Le domaine extracellulaire de MUC1 semble également impliqué dans la résistance à l'apoptose développée par les cellules tumorales. Notre hypothèse est que la surexpression et la délocalisation circonférentielle de MUC1 forment une barrière protectrice empêchant l'action des agents chimio thérapeutiques. De plus, Cascio *et al.* ont montré que le domaine extracellulaire de MUC1 était retrouvé localisé au noyau des cellules tumorales, induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires *via* un complexe formé par MUC1 et la sous-unité p65 de NF- κ B, induisant d'une part une augmentation de l'activation de cette voie de survie cellulaire et favorisant d'autre part l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires dans le micro-environnement tumoral et l'induction d'une inflammation chronique permettant la progression tumorale (Cascio *et al.* 2011).

Kufe a déjà montré, dans un modèle d'étude de cancer mammaire, que la queue cytoplasmique de MUC1 comportait une séquence CQC lui permettant de s'homodimériser et ainsi d'exercer sa fonction oncogénique (Kufe 2013). En traitant nos clones ACHN MUC1FL avec du GO-203, un peptide pénétrant la membrane cellulaire, nous montrons que le simple fait d'inhiber la translocation au noyau de MUC1-C induisait une diminution significative des propriétés invasives des clones cellulaires, suggérant que MUC1 C est nécessaire et suffisante pour induire cette propriété biologique en conditions pathologiques. La surexpression de MUC1 pourrait donc à elle seule expliquer la chimiorésistance importante du carcinome rénal à cellules claires, faisant d'elle une cible thérapeutique potentielle.

Grâce à une séparation protéique nucléaire et cytoplasmique, nous montrons dans notre modèle rénal un pool d'expression important de MUC1 dans le noyau des ACHN. Il a précédemment été décrit dans un modèle murin de cellules épithéliales utérines normales, que MUC1 CT était clivé par l'action combinée d'une sheddase et de la gamma secrétase, libérée dans le cytoplasme puis dégradée (Julian *et al.* 2009). Notre hypothèse était donc qu'en condition pathologique, le fragment libéré après clivage protéolytique n'était cette fois pas voué à la dégradation mais délocalisé au noyau où il jouerait le rôle de co-activateur transcriptionnel de gènes tels que la *cycline D1* ou encore *NFκB*, impliqués dans la prolifération et la survie cellulaires des clones ACHN. De nombreuses sheddases sont surexprimées dans les cancers de l'ovaire, de la prostate, du côlon ou encore dans le mélanome (McCulloch *et al.* 2000, Lee *et al.* 2010). Dans le carcinome rénal à cellules claires, ADAM17 et MT1-MMP (ou MMP14) se trouvent particulièrement surexprimées (Petrella and Brinckerhoff 2006, Guo *et al.* 2013). Nous avons dans un premier temps focalisé notre attention sur l'expression de ces trois sheddases dans notre modèle rénal de cellules ACHN. Grâce à des siARN ciblant ADAM10, MMP14 et ADAM17, nous avons montré que l'inhibition de l'expression d'ADAM10 et d'ADAM17 et, dans une moindre mesure celle de MMP14 diminuait sensiblement le pool d'expression nucléaire de MUC1 CT, suggérant une implication de ces trois sheddases dans le clivage protéolytique de MUC1 au niveau de la membrane extracellulaire. De manière intéressante, nous montrons que l'inhibition de l'expression d'ADAM10 diminue significativement les propriétés invasives des clones MUC1 FL. Nous savions par ailleurs que MUC1 possède une séquence potentiellement reconnue par la gamma secrétase. En traitant nos clones ACHN MUC1 FL avec du L685,458, inhibiteur spécifique de l'activité catalytique de la

gamma secrétase, nous montrons une diminution significative du pouvoir invasif des clones MUC1 FL. L'utilisation de siARN ciblant spécifiquement PSEN1, la sous-unité catalytique de la gamma secrétase, nous montrons à la fois une diminution significative du pool d'expression protéique nucléaire de MUC1 CT et une diminution du pouvoir invasif des clones MUC1FL, suggérant une action combinée d'ADAM10 et dans une moindre mesure, celle d'ADAM17 et de la gamma secrétase dans le clivage protéolytique à l'origine du relargage de MUC1 CT dans le cytoplasme des cellules cancéreuses.

Nous montrons en outre, qu'ADAM 10 et ADAM17 sont très faiblement exprimées dans les cellules rénales saines et que leur expression, concomitante à celle de MUC1, est augmentée dans les cellules tumorales (ACHN, 786-O parentales et RCC4-), suggérant une potentielle boucle de régulation positive de leur expression par MUC1.

En conclusion, nous montrons que MUC1 est impliquée dans progression tumorale rénale et que les sheddases ADAM10 et ADAM17 ainsi que la γ -secrétase sont nécessaires à la translocation nucléaire de MUC1-C et à l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules tumorales. De plus, notre hypothèse est que les expressions de MUC1, ADAM10 et d'ADAM17 sont co-régulées *via* une boucle de régulation positive. MUC1 apparaît donc comme étant une cible thérapeutique intéressante par le blocage de son clivage ou de sa translocation nucléaire grâce à des inhibiteurs pharmacologiques ou une stratégie utilisant des peptides.

PERSPECTIVES

Notre étude a montré que les cellules tumorales rénales ACHN surexprimant MUC1 surexprimaient également ADAM10, ADAM17 et dans une moindre mesure MMP14. Nous avons également montré que le clivage de MUC1 CT par ADAM10 était responsable de sa translocation nucléaire. Il conviendra alors de doser l'activité enzymatique de ces différentes protéases afin de valider l'augmentation de leur activité en condition tumorale. Par ailleurs, il sera intéressant de vérifier qu'ADAM 10, ADAM 17 et MMP14 sont bien à l'origine du clivage de MUC1 par un test de clivage *in vitro*. De plus, il nous faudra déterminer, pour chaque sheddase, le site spécifique de clivage. Pour cela, nous procéderons à une expérience de dégradation d'Edman suivie d'une analyse par spectrométrie de masse des produits de dégradation. Par ailleurs, nous avons montré qu'ADAM10 et ADAM17 étaient exprimées dans le noyau cellulaire des ACHN surexprimant MUC1. Nous déterminerons une potentielle fixation de ces deux enzymes sur le promoteur de MUC1 grâce à une immunoprécipitation de la chromatine des différentes zones du promoteur de MUC1 afin de déterminer s'il existe une boucle de régulation entre MUC1 et ADAM10/17 en condition pathologique. Par ailleurs, il a été montré que PAX2 (Paired-Box Gene 2), largement exprimée durant la néphrogenèse et ré-exprimée en condition tumorale, était capable de lier le promoteur d'ADAM 10 dans les cellules tumorales rénales et de moduler son expression, constituant ainsi une des étapes précoces de la carcinogenèse rénale (Doberstein *et al.* 2011). Nous tenterons de déterminer une éventuelle fixation de MUC1 CT sur les promoteurs d'ADAM10/17 et de MMP14 afin d'évaluer son influence sur les différentes sheddases.

Par ailleurs, une étude a montré qu'ADAM 10, surexprimée en condition pathologique grâce à HIF-1 α , était responsable du clivage du CMH de classe I à la surface des cellules tumorales, permettant leur échappement aux effecteurs de

l'immunité innée (Barsoum *et al.* 2011). Les travaux de Sébastien Aubert ont montré que MUC1 était une cible de la voie de l'hypoxie, la voie majeure de la carcinogenèse rénale (Aubert *et al.* 2009). Il serait alors intéressant de déterminer si dans notre modèle de carcinome rénal, HIF-1 α est également à l'origine de la surexpression d'ADAM 10, elle-même responsable du clivage de MUC1 impliqué dans l'augmentation des propriétés invasives des clones ACHN.

Nos travaux ont montré que MUC1 induisait la chimiorésistance des cellules tumorales rénales ACHN. La limite principale de notre étude réside dans le fait que n'ont pu être testés que des agents chimiothérapeutiques de certaines classes en excluant les antiangiogéniques, pourtant les plus utilisés à l'heure actuelle en traitement de première intention. Nous pourrions développer nos recherches en utilisant le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet. Cette méthode, facile à mettre en place et peu coûteuse, nous permettrait d'implanter nos différents clones cellulaires (MUC1EV, MUC1FL, MUC1 Δ CT) et d'observer directement la néoangiogenèse. Nous pourrions dans un second temps tester différentes molécules (Sunitinib, sorafenib, everolimus et temsirolimus) associées ou pas au GO-203 ou à un inhibiteur d'ADAM 10 (GI254023X) et observer leur effet sur les vaisseaux sanguins tumoraux et ainsi valider potentiellement certaines des cibles thérapeutiques proposées par notre étude.

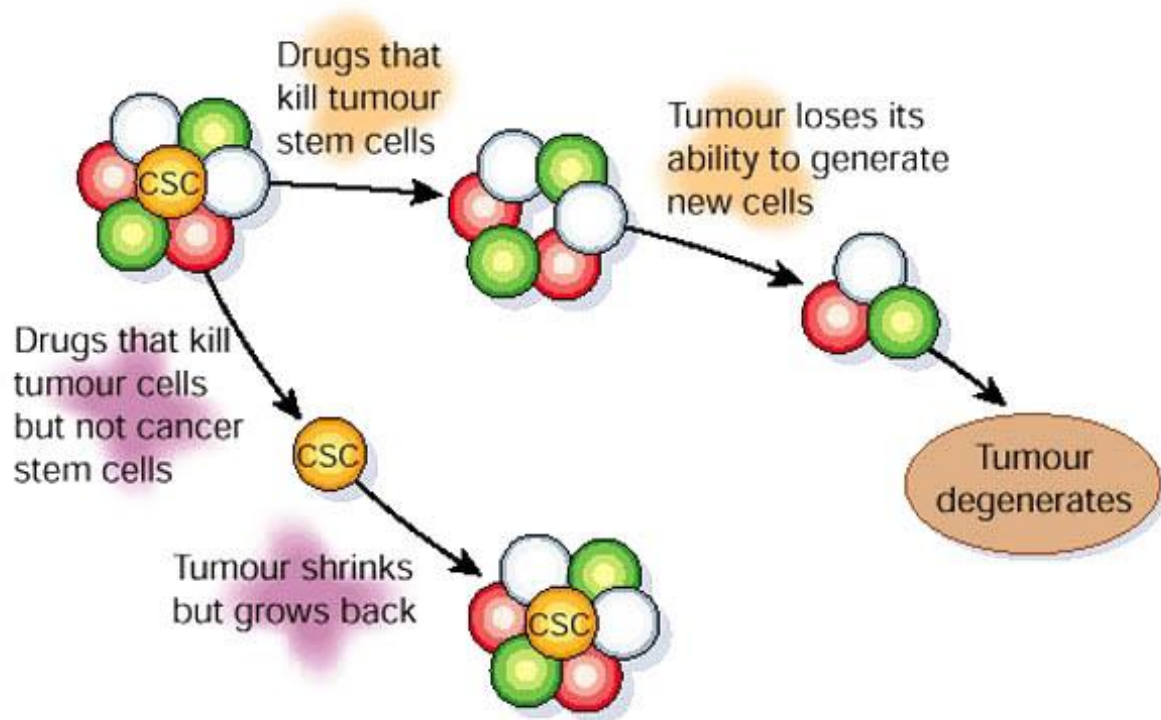


Figure 12 : Régénération de la tumeur par les cellules souches cancéreuses après traitement chimio thérapeutique non ciblé d'après *Reya et Al, 2001*

Un nouvel axe de travail consistera à étudier MUC1 en tant que marqueur de cellule souche cancéreuse (CSC). En effet, La théorie des CSC s'oriente vers un modèle plus hiérarchisé où seule une fraction de la population cellulaire est capable d'initier une tumeur mais à une fréquence très élevée (Reya *et al.* 2001). Les CSC, grâce à leur capacité de quiescence, seraient capables d'échapper à l'action des chimiothérapies ciblant les cellules ayant des capacités prolifératives accrues et, en provoquant la formation d'une nouvelle tumeur, provoqueraient à elles seules une récurrence de la pathologie (Figure 12) (Wicha *et al.* 2006). Il apparaît donc intéressant de pouvoir déterminer des marqueurs spécifiques de cette sous population afin de les cibler directement.

Une des particularités des CSC est qu'elles sont particulièrement résistantes aux chimiothérapies grâce à la surexpression à leur surface de transporteurs de la famille des ATP Binding Cassette comme ABCG2, ABCB1 et ABCC1, souvent associés aux CSC (Caldera *et al.* 2012, Alisi *et al.* 2013, Liu *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2013). Nous avons montré que les clones ACHN surexprimant MUC1 surexprimaient également ABCG2. Il conviendra alors de vérifier sa fonctionnalité en cytométrie en flux puis de déterminer quel pourcentage de la population cellulaire exprime ABCG2.

MUC1*, forme clivée de MUC1FL agissant comme un véritable récepteur aux facteurs de croissance, a récemment été décrit comme exprimé par les cellules souches indifférenciées avec d'autres marqueurs de cellules souches naïves comme Oct4 ou encore Nanog (Hikita *et al.* 2008, Mahanta *et al.* 2008, Smagghe *et al.* 2013). Nous vérifierons l'expression de MUC1* par nos différents clones cellulaires ACHN ainsi que l'expression des marqueurs de cellules souches associés.

De plus, il a été montré dans un modèle de cancer colique que HIF-1 α activait le

promoteur de CD133, un autre marqueur de CSC (Ohnishi *et al.* 2013). Les conditions hypoxiques étant corrélées avec la génération de CSC exprimant CD133 (Canis *et al.* 2013), il serait intéressant de vérifier la présence de ce marqueur à la surface de nos cellules tumorales rénales et d'identifier de nouveaux marqueurs de surface afin de pouvoir trier les cellules et isoler efficacement la sous-population de CSC.

Nous avons en outre montré que la surexpression de MUC1 était associée à la surexpression de MMP14. Or, l'action de cette métalloprotéase ne semble pas directement liée au clivage de la queue cytoplasmique de MUC1. Nous n'avons pour le moment pas élucidé son rôle. Il a été montré que MMP14 clivait CD133 dans un modèle de tumeur cérébrale (Annabi *et al.* 2008). Si nous validons l'expression de CD133 dans nos cellules tumorales rénales, il conviendra de vérifier les cibles potentielles de MMP14, comme CD133 ainsi que d'autres cibles importantes dans l'organisation du microenvironnement tumoral. Nous pourrions ainsi préciser le rôle joué par MMP14 dans la progression tumorale rénale.

Enfin, quand nous aurons déterminé les marqueurs de CSC les plus importants dans notre modèle rénal, nous trierons nos populations cellulaires en cytométrie en flux afin d'isoler cette sous population. Nous vérifierons que ces cellules expriment bien les gènes de cellules souches comme Oct-4 et Nanog qui permettent leur auto-renouvellement. Nous pourrions ensuite analyser le profil transcriptomique de ces clones cellulaires afin d'identifier des gènes potentiellement responsables de la flambée oncogénique.

Nous les cultiveront en agar mou, afin de vérifier que ces cellules possèdent bien la caractéristique de former des sphéroïdes.

Enfin, nous les injecterons en très faible quantité (1000 cellules) chez des souris

immunodéficientes. Si notre sous population cellulaire est bien constituée de CSC, cette infime quantité devrait suffire au développement d'une tumeur (Jordan *et al.* 2006).

Nous réaliserons des cultures primaires de cellules issues de biopsies tumorales de patients atteints d'un cRCC de grades III ou IV. Après une sélection des cellules capables de s'auto-renouveler et une caractérisation des sous-populations pour leur clonogénicité, leur capacité de différenciation ainsi que cité plus haut, leur capacité à générer des tumeurs *in vivo*, il conviendra de réaliser un protéome membranaires des CSC de cRCC destiné à identifier des biomarqueurs potentiels qui pourraient, en pratique, faciliter la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cRCC.

En 2000, Weinberg définissait les 6 principales caractéristiques de la cellule tumorale, la décrivant comme :

- indépendante vis-à-vis des signaux de prolifération**
- insensible aux signaux anti-prolifératifs**
- Résistante à l'apoptose**
- Proliférant à l'infini**
- Capable d'angiogenèse**
- Capable d'invasion et de diffusion métastatique**

Les cellules de cRCC présentent l'ensemble de ces caractéristiques et nous montrons que MUC1 est impliquée dans chacune de ces propriétés, faisant d'elle un élément clé à la fois dans les phases précoces de la carcinogenèse et dans la progression tumorale et le phénomène de diffusion métastatique

associé. Notre étude nous a donc permis d'identifier une cible thérapeutique potentielle dans la prise en charge des cRCC, pouvant être directement modulée par l'action de peptides tel que le GO-203.

MATERIEL ET METHODES

I. Culture cellulaire

1. Modèles cellulaires

ACHN : Lignée cellulaire carcinomateuse rénale issue d'une métastase pleurale d'un cRCC de l'adulte.

786-O : Lignée cellulaire carcinomateuse rénale exprimant constitutivement MUC1

Tableau 1 : Lignées cellulaires employées et leur milieu de culture

Lignées cellulaires	Composition des milieux
ACHN	Milieu MEM + 10% de SVF + solution d'acides aminés non essentiels (100X) 0,1% + Pyruvate de Sodium 100mM 1% + L-glutamine 200mM 1% + 1X Pénicilline/Streptomycine
786-O	Milieu DMEM glucose 4,5g/l + 10% SVF + 1% L-Glutamine 200mM + 1X Pénicilline/Streptomycine

2. Conditions de culture

Toutes les manipulations des flacons de culture s'effectuaient sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. Toutes les lignées étaient cultivées sur support plastique et incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ et 95% d'air. Le milieu de culture de chaque lignée cellulaire était changé 2 à 3 fois

Tous les 7 jours, une division des cellules était effectuée. Le tapis cellulaire était lavé au PBS (tampon phosphate salin) 1X puis détaché avec une solution de trypsine-EDTA 1X à 37°C pendant 5 min. 5 ml de milieu de culture étaient ajoutés. L'ensemble était transféré dans un tube puis centrifugé pendant 5 min à 1 200 t/min

à température ambiante (TA). Après aspiration du surnageant, le culot était homogénéisé avec du milieu de culture et 10 µl de la suspension obtenue était prélevée afin de réaliser en présence de bleu trypan un comptage cellulaire à l'aide du compteur Cellcounter® (Invitrogen). Les cellules étaientensemencées à raison de $0,5 \times 10^6$ cellules pour une T25 et de 1×10^6 cellules pour une T75. L'appréciation de la confluence était réalisée par contrôle visuel au microscope inversé.

II. Expériences de transfections

1. Transfections stables

Différents vecteurs d'expression de MUC1 (codant pour l'ARNm de MUC1 délétée de ses répétitions en tandem ou délétée de sa queue cytoplasmique) et un vecteur rétroviral pRetroSuper.Neo.GFP codant un *shARN* ciblant MUC1 ont été transfectés respectivement dans les ACHN et les 786-O avec de l'Effectene™ (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les clones obtenus ont ensuite été isolés par une répétition de dilutions limites.

2. Invalidation d'expression par technique de *siARN*

$1,5 \times 10^6$ cellules étaientensemencées en flasque de 75 cm³ dans du milieu dépourvu d'antibiotiques. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules étaient transfectées avec 100nM de *siARN* ciblant PSEN1, ADAM10, MMP14, ADAM17 ou de *siARN* control Non-Targeting SMARTpool® dans 60µl de tampon de transfection selon les recommandations du fournisseur (Dharmacon, Perbio, France).

Les protéines étaient récupérées 48h après la transfection puis dosées par un dosage BCA.

3. Détermination de la concentration de la pression de sélection à la Généticine (G418)

Les cellules étaient ensemencées en plaques à 6 puits à raison de 10^5 cellules par puits et cultivées pendant 7 jours. L'ajout de G418 à des concentrations allant de 1 μ g/ml à 10 μ g/ml était effectué dès le lendemain de l'ensemencement des cellules. Le milieu contenant le G418 était changé quotidiennement. La concentration de G418 correspondant à la pression de sélection suffisante était celle pour laquelle il ne restait aucune cellule vivante au bout de 10 à 14 jours. Ainsi, la concentration de G418 choisie pour les ACHN et les 786-O correspondait à 6 μ g/ml.

III. Traitement des cellules

1. Traitement au L685,458

Les cellules ACHN et 786-O étaient traitées à un pourcentage de confluence estimé à 70% avec 10ng/ml de L685,458 (Calbiochem) pendant 24h dans leur milieu de culture habituel.

2. Traitements au CP-2 et au GO-203

Les tapis cellulaires d'ACHN et 786-O étaient traités à 70% de confluence avec 5 μ M de CP-2 et de GO-203 (GenScript) pendant 48h.

IV. Dosages biochimiques

1. Dosage des protéines

Le dosage de protéines était réalisé par la méthode au BCA (acide bicinchoninique) avec utilisation du kit commercialisé par Pierce, selon les recommandations du fournisseur. La densité optique était lue à 570 nm sur un lecteur de type Microplate Reader Model 3550 (Bio-Rad).

2. Dosage de l'activité luciférase

L'activité luciférase était dosée par une réaction bioluminescente entre la luciférase et son substrat, la luciférine. La transfection transitoire du vecteur rapporteur de κ B-LUC, contenant 3 sites de fixation pour κ B a été réalisée avec le Kit Effectène™ (Qiagen, Courtaboeuf, France) sur des tapis cellulaires ayant atteint une confluence estimée à 70% en plaques à 6 puits. Les protéines étaient ensuite extraites avec l'ajout de 100 μ l de tampon de lyse (Report Lysis Buffer 1X) par puits et les plaques étaient ensuite placées 15 min sous agitation avant la récupération des protéines par grattage des tapis cellulaires. Transférés dans des microtubes de 1,5 ml, les lysats étaient centrifugés à 14 000g pendant 3 min. Les surnageants étaient alors récupérés. Une plaque à 96 puits à fond opaque (Cellstar®, Sigma-Aldrich®), où avaient été déposés préalablement 20 μ l de chaque échantillon, était placée dans un

luminomètre : le Mithras LB 904 (Berthold Technologies) qui ajoutait automatiquement la luciférine (Luciferase Assay Reagent, Promega). Les variations d'activité luciférase entre les différentes conditions étaient appréciées après normalisation des valeurs obtenues rapportées à la quantité de protéines des échantillons obtenue par un dosage BCA.

V. Western-Blot

1. Préparation des extraits cellulaires totaux

Les tapis cellulaires étaient rincés avec 5 ml de PBS 1X stérile après aspiration du milieu. Puis, le tapis cellulaire de chaque T75 était recouvert avec 5 ml de PBS 1X et les cellules étaient récupérées à l'aide d'un grattoir. L'ensemble était récupéré et centrifugé pendant 5 min à 1 500 t/min. Le surnageant était aspiré et le culot était repris avec 100 µl de tampon de lyse RIPA (25 mM Tris-HCL pH 7,6 ; 150 mM NaCl ; 1% NP40 ; 1% Sodium deoxycholate ; 0,1% SDS). Les cellules faisaient ensuite l'objet d'une sonication puis d'une agitation par rotation pendant 30 min à +4°C. Les tubes Eppendorf® étaient centrifugés pendant 30 min à 14 000 t/min à +4°C. Les surnageants (extraits cellulaires totaux) étaient alors transférés dans des tubes Eppendorf® et conservés à -80°C.

2. Réalisation de fractions protéiques nucléaires et cytoplasmiques

Les cellules étaient cultivées en flasque de 75 cm³ permettant ainsi d'obtenir une quantité importante de matériel pour chaque fraction protéique. Les tapis cellulaires étaient grattés sur glace, sans élimination du milieu de culture puis transférés dans

un tube à centrifuger de 50 ml. La flasque était ensuite rincée avec 15 ml de PBS 1X glacé. Le volume total récupéré (approximativement 30 ml) était centrifugé pendant 5 minutes à 1600 tr/min à 4 °C. Le culot était ensuite repris par 0,5 ml de PBS 1X, transféré dans un tube 1,5 ml puis centrifugé 1 minute à 9000 tr/min à 4 °C.

Le culot était repris dans 1 ml de solution de lyse A, préalablement refroidi à 4°C en deux fois (2 x 0,5 ml) puis centrifugé à 9000 tr/min à 4° C.

Solution de lyse A

- 1 ml de tampon A (HEPES/KOH 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM) - DTT 0,5 mM - PMSF 0,5 mM - Leupeptine 10 µg/mL

- Aprotinine 10 µg/ml

Le culot, repris dans 150 µL de solution A' de lyse, était bien homogénéisé puis laissé sur glace durant 10 min. Au bout de 5 min, le tube était « gratté » sur un portoir métallique afin de lyser les cellules par choc mécanique. Le lysat cellulaire était ensuite centrifugé à 14000 tr/min durant 10 min à 4° C.

Solution de lyse A'

- 1 ml de tampon A (HEPES/KOH 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM) - DTT 0,5 mM - PMSF 0,5 mM - Leupeptine 10µg/ml

- Aprotinine 10 µg/ml- Molybdate de sodium 0,1 mM - Beta-glycérophosphate disodique 10 mM - Fluorure de sodium 10 mM - Orthovanadate de sodium 0,1 mM - p-nitro-phénylphosphate 30 mM - NP-40 0,1% v/v

Le surnageant qui correspond à la fraction cytosolique (150 µL) était transféré dans un tube 1,5mL puis est clarifié par centrifugation à 16000 x g durant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant obtenu était de nouveau transféré dans un tube 1,5 mL propre auquel était ajouté 225 µL de solution D, avant d'être conservé à -80 °C.

Solution de lyse D

- 1 mL de tampon D (HEPES/KOH 20 mM, pH 7,9, KCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, glycérol 20% v/v))

- DTT 0,5 mM - PMSF 0,5 mM

Le culot qui correspond à la fraction nucléaire était repris dans 125 µL de solution C et incubé sur glace durant 10 minutes. Toutes les 5 minutes, le tube était « gratté » sur un portoir métallique afin de lyser par choc mécanique les cellules. Le lysat cellulaire était ensuite centrifugé à 16000 x g durant 10 minutes à 4 °C.

Solution de lyse C

- 1 mL de tampon A (HEPES/KOH 20 mM, pH 7,9, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glycérol 25% v/v)

- DTT 0,5 mM - PMSF 0,5 mM - Leupeptine 10 µg/mL - Aprotinine 10 µg/mL - Molybdate de sodium 0,1 mM - Beta-glycérophosphate disodique 10 mM - Fluorure de sodium 10 mM - Orthovanadate de sodium 0,1 mM - p-nitro-phénylphosphate 30 mM

Le surnageant qui correspond à la fraction nucléaire (125 µL environ), était transféré dans un tube 1,5 mL puis clarifié par centrifugation à 16000 x g durant 10 min à 4 °C. Le surnageant obtenu était de nouveau transféré dans un tube 1,5 mL propre auquel était ajouté 187,5 µL de solution D, avant d'être conservé à -80 °C.

3. Western-Blot

20 µg de protéines totales étaient mélangés à un volume de solution de dénaturation (Agent réducteur NuPAGE 10X d'Invitrogen contenant 500 mM de dithiothreitol (DTT) ; Lithium Dodécyl Sulfate (LDS) 4X contenant du bleu de Coomassie G250 et du rouge de phénol). Le mélange était dénaturé pendant 5 min à 100°C puis déposé sur le gel. La séparation électrophorétique s'effectuait dans les cuves d'électrophorèse Xcell Surelock™ Mini-Cell en tampon NuPAGE® MOPS SDS à 200 V pendant 60 min. Après migration, les protéines étaient transférées grâce au système Xcell Surelock™ Mini-Cell sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm dans un tampon de transfert NuPAGE® à 30 V. Le transfert s'effectuait en 70 min. Suite au transfert, les sites de la membrane libres étaient saturés par une solution de lait : 10 ml de lait écrémé 20% /TBST 1X (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; Tween-20 0,05%) toute une nuit à 4°C sous agitation. La membrane était lavée 3 x 10 min avec 10 ml de TBST avant d'être incubée avec l'anticorps primaire dilué dans 10 ml de TBST sous agitation à TA pendant 1 h au minimum (Tableau 2).

La membrane était lavée 3 x 5 min avec 10 ml de TBST puis l'anticorps secondaire spécifique couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) était appliqué pendant 45 min. La membrane était rincée 2 x 5 min avec 10 ml de TBST. Les

bandes immunoréactives étaient visualisées par chimioluminescence à l'aide du kit Super Signal System (Pierce) au LAS4000 (Fujifilm).

Tableau 2: Anticorps utilisés pour le Western Blot

Antigène	Masse moléculaire (kDa)	Clone ou référence	Dilution
MUC1	250/500	M8 (Dr D. Swallow)	1/500
MUC1	25/30	Ab-5 (MH1) (Neomarkers)	1/3000
Bax	23	N-20 (Santa Cruz)	1/500
Bcl_{XL}	30	H-5 (Santa Cruz)	1/500
C myc	70	N-262 (Santa Cruz)	1/500
Caspase 9	47	L1407 (Cell Signaling Technology)	1/500
Akt	60	C67E7 (Santa Cruz)	1/500
Phospho-Akt (Ser473)	60	D9E (Cell Signaling technology)	1/500
p38	38	Ref #9212 (Cell Signaling Technology)	1/500
Phospho-p38	38	D3F9 (Cell Signaling technology)	1/500
Erk1/2	42/44	I37F5 (Cell Signaling Technology)	1/500
Phospho-Erk1/2	42/44	20G11 (Cell Signaling Technology)	1/500
JNK	46/54	56G8 (Cell Signaling technology)	1/500
Phospho-JNK	46/54	Ref #9251 (Cell Signaling Technology)	1/500
Cycline D1	36	Ref #2926 (Cell Signaling Technology)	1/500
Beta-catenine	88	Ref #8480 (Cell Signaling Technology)	1/500

NF-KB p50	50	H-119 (Cell Signaling Technology)	1/500
NF-KB p65	65	E498 (Cell Signaling Technology)	1/500
ADAM 10	50	Ab1997 (Abcam)	1/1000 (WB)
ADAM 17	68	Ab57484 (Abcam)	1/1000 (WB)
Sp1	105	Ref sc-59 (Santa Cruz)	1/1000
Tubuline	50	Clone DM1A (Sigma Aldrich)	1/1000
β actine	42	Ref A5441 (Sigma Aldrich)	1/5000

VI. Etude de la viabilité et de la prolifération cellulaires

1. Test MTS/PMS: *(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium/ phenazine methosulfate)*

Cette expérience était réalisée grâce au kit Promega «Celltiter96[®] Aqueous Non Radioactive Cell Proliferation Assay » en plaques à 96 puits. 100 μ l de milieu contenant 2500 cellules étaient déposés dans chaque puits puis nous y ajoutions 24h plus tard 20 μ l de solution MTS/PMS dans l'obscurité. La plaque était ensuite placée 3h en étuve à 37°C, 5% en CO₂ puis l'absorbance reflétant la formation de Formazan, métabolite du MTS, était déterminée en spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 490 nm.

2. Numération cellulaire

Les cellules étaient ensemencées en plaques à 6 puits à raison de 50 000 cellules par puits. Les cellules étaient comptées chaque jour à l'aide du compteur Cellcounter[®] d'Invitrogen en présence de bleu Trypan.

VII. Expériences d'invasion en chambre de Boyden

Les capacités invasives des cellules étaient évaluées par la réalisation de tests *in vitro* au moyen de chambres d'invasion BD Biocoat[™] Matrigel[™]. Les clones cellulaires étaient ensemencés dans des chambres de Boyden comportant une membrane munie de pores de 8 μm et recouverte de Matrigel[™] à raison de 50 000 cellules par insert et cultivées dans un milieu dépourvu de SVF. La chambre inférieure contient du milieu de culture avec un chimioattractant (10% SVF). Après 24h de culture, la face supérieure des inserts recouverte de Matrigel[™] était grattée. Ensuite, les cellules présentes sur la face inférieure des inserts étaient fixées par une solution de méthanol. La membrane était récupérée puis placée sur une lame de verre et colorée avec du DAPI (présent dans le milieu de montage (Vectashield[®] Mounting Medium with DAPI)). Le comptage des noyaux était effectué au microscope à fluorescence.

VIII. Expériences de migration cellulaire

1. Wound-healing assay

Les cellules de la lignée ACHN étaientensemencées dans des boîtes de Pétri à raison de 1×10^6 cellules. Vingt-quatre heures après confluence, à l'aide de la pointe d'un cône de 1000 μ l, nous réalisons deux blessures rectilignes parallèles du tapis cellulaire. Le tapis cellulaire était ensuite rincé à l'aide d'une solution de PBS 1X. Puis, 2 ml de milieu de culture étaient ajoutés. Les blessures étaient numérotées et un quadrillage repère était réalisé au feutre noir sur la face inférieure des boîtes de Pétri. Puis, les blessures étaient mesurées en deux points à l'aide du logiciel NIS-Element (Nikon Corporation) aux temps T0 et T6 h, et un pourcentage de fermeture des blessures était déterminé.

2. Migration en chambre de Boyden

Les capacités migratoires des cellules 786-O étaient également évaluées par la réalisation de tests *in vitro* sur chambre de Boyden sans Matrigel™ selon le même protocole que les expériences d'invasion.

IX. Etude de la croissance indépendante de l'ancrage

Une solution mère de PolyHEMA à 120 mg/ml était reprise dans de l'éthanol absolu pour obtenir une solution à 12 mg/ml. La dissolution de la poudre se faisait à 50°C et sous agitation pendant une nuit. Le test était réalisé en plaque à 96 puits où 50 μ l étaient déposés dans chaque puits. Après une nuit de séchage, sous agitation en

étuve sèche et un rinçage préalable au PBS, 2500 cellules étaient déposées dans chaque puits. Tous les jours, pendant 5 à 7 jours, 20µl de solution MTS/PMS étaient déposés dans chaque puits dans l'obscurité. La plaque était ensuite placée 3h en étuve à 37°C, 5% en CO₂ puis l'absorbance était déterminée en spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 490 nm.

X. Etude des propriétés d'adhérence

Nous avons étudié l'effet de la surexpression de MUC1 sur l'adhérence des clones ACHN sur différentes matrices : collagène de types I et IV, fibronectine, laminine et vitronectine (kit Millipore « Milliccoat™ screening Kit »). Ce protocole était réalisé sur des tapis cellulaires dont la confluence était estimée à 50%. Un million de cellules étaientensemencées dans du milieu de culture puis placé en étuve pendant 1h. Les puits étaient ensuite rincés 3 fois avec 200µl de PBS contenant du calcium et du magnésium. Une coloration au Crystal violet à 0,2% était réalisée (100µl de colorant par puits) pendant 6 min à TA. Les puits étaient rincés 5 fois avec 300 µl de PBS 1X afin d'éliminer l'excès de marquage puis 100 µl d'un tampon de solubilisation (50% de NaH₂PO₄ 0,1M pH 4,5 ; 50% d'éthanol) étaient ajoutés dans chaque puits. La plaque était mise sous agitation lente à TA pendant 10 min. L'absorbance était déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 570 nm.

XI. Etude des propriétés d'agrégation cellulaire

Les cellules étaientensemencées à raison de 50 000 cellules par puits dans des plaques à 6 puits préalablement recouverts avec 2 ml d'agarose 0,8 % puis placées sous agitation à l'étuve pendant 1 h. Les cellules isolées et agrégées étaient comptées au microscope inversé. Le pourcentage de cellules agrégées était déterminé par le calcul suivant :

Pourcentage de cellules agrégées = (Nombre de cellules agrégées / (Nombre de cellules isolées + nombre de cellules agrégées)) x100

XII. Tests de cytotoxicité

Notre but était de déterminer les IC₅₀ de différentes drogues pour les clones MUC1FL, ΔTR et ΔCT *versus* les clones EV afin d'établir un rôle potentiel de MUC1 dans la chimiorésistance. L'IC₅₀ est la concentration inhibitrice à 50%, cette mesure quantitative indique quelle quantité un médicament est nécessaire pour inhiber à 50% un processus biologique.

A J0, un ensemencement de 5000 cellules dans 100μl de milieu était réalisé dans les puits centraux de la plaque à 96 puits, les puits périphériques contenant 200μl de PBS afin d'éviter l'évaporation du milieu dans les puits contenant les cellules. Les cellules étaient mises en culture pendant 24 heures.

A J1, le milieu était aspiré et remplacé par du milieu de culture contenant des concentrations appropriées et croissantes des différentes drogues anticancéreuses étudiées. Les dilutions étaient effectuées extemporanément.

Après une exposition de 72 heures à la drogue, le test MTS de viabilité était réalisé : 20µl de MTS étaient ajoutés dans tous les puits. La lecture de l'absorbance, à 492nm, était effectuée 1 heure plus tard sur un spectromètre C1000™ Cycler de BioRad.

XIII. Analyses moléculaires

1. Extractions d'ARN

Les ARN totaux étaient extraits selon le protocole du fournisseur du kit *Total RNA Purification*, Nucleospin®RNA II (MACHERY-NAGEL). La qualité et la quantité des ARN étaient estimées (Plateforme de génomique de l'IFR 114) en vue de la réalisation d'une puce Agilent® 44K DualColor. Celle-ci nous a permis de constater la bonne qualité de nos ARN avec un RIN compris entre 9,5 et 10. Ces ARN étaient conservés à -80°C.

2. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

a) Synthèse de l'ADNc

L'ADNc était synthétisé à partir de 0,5 µg d'ARN totaux grâce au kit « High Capacity cDNA Reverse Transcriptase » (Applied Biosystems).

b) Amplification de l'ADNc par PCR quantitative

L'amplification de l'ADNc était réalisée avec les primers spécifiques pour *MUC1*, *ABCG2* et *GSTO2* en ayant recours à la technologie TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'amplification par PCR était réalisée sur le C1000 Biorad™ PCR System (Bio-Rad, CA). Le *PPIA* (Cyclophiline A) était utilisé comme contrôle interne. L'expression relative des taux d'ARNm était calculée par la méthode $\Delta\Delta Ct$.

3. Analyse transcriptomique

Une analyse transcriptomique sur puce Agilent® 44K DualColor a été réalisée (Dr Martin Figeac, Plateforme de génomique fonctionnelle et structurale, IFR 114, IMPRT). La stratégie « Flip/Flop » a été utilisée et consistait à confronter un clone MUC1+ à un clone contrôle MUC1⁻ puis à un second contrôle était utilisée.

Tableau 3 : Sondes TaqMan® utilisées

Nom du gène	Sonde TaqMan®
Peptidylprolyl isomerase A (Cyclophiline A)	Hs99999904_m1
ATP-binding cassette, sous-famille G (WHITE), membre 2	Hs01053790_m1
Glutathione S-transferase omega 2	Hs00826661
Mucine 1 membranaire	Hs00159357

XIV. Expériences *in vivo*

Des injections sous-cutanées de $2 \cdot 10^6$ cellules étaient réalisées chez des souris SCID Beige mâles de 6 semaines (Charles River, France) élevées en conditions stériles. La croissance tumorale était évaluée périodiquement. Le volume tumoral (mm^3) était déterminé par la formule $V = I^2 \times L/2$ où I correspondait à la largeur (en mm) et L à la longueur de la tumeur (en mm). Les souris étaient sacrifiées 55 jours après inoculation. Toutes les procédures étaient en accord avec la charte éthique et approuvées par le comité éthique (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, Numéro d'accord: CEEA 172011).

XV. Analyses statistiques

L'analyse statistique était effectuée à l'aide du logiciel GraphPad InStat[®] software (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA). Les variations par rapport à la moyenne arithmétique étaient exprimées en s.e.m (standart error mean). Les moyennes étaient comparées par le test t de Student.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe, M. and D. Kufe (1993). "Characterization of cis-acting elements regulating transcription of the human DF3 breast carcinoma-associated antigen (MUC1) gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(1): 282-286.

Abe, M., J. Siddiqui and D. Kufe (1989). "Sequence analysis of the 5' region of the human DF3 breast carcinoma-associated antigen gene." Biochem Biophys Res Commun **165**(2): 644-649.

Agata, N., R. Ahmad, T. Kawano, D. Raina, S. Kharbanda and D. Kufe (2008). "MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8." Cancer Res **68**(15): 6136-6144.

Agrawal, B., M. J. Krantz, J. Parker and B. M. Longenecker (1998). "Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation." Cancer Res **58**(18): 4079-4081.

Ahmad, R., M. Alam, H. Rajabi and D. Kufe (2012). "The MUC1-C oncoprotein binds to the BH3 domain of the pro-apoptotic BAX protein and blocks BAX function." J Biol Chem **287**(25): 20866-20875.

Ahmad, R., H. Rajabi, M. Kosugi, M. D. Joshi, M. Alam, B. Vasir, T. Kawano, S. Kharbanda and D. Kufe (2011). "MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop." Sci Signal **4**(160): ra9.

Alisi, A., W. C. Cho, F. Locatelli and D. Fruci (2013). "Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma." Int J Mol Sci **14**(12): 24706-24725.

Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, C. Laflamme, M. P. Lachambre, Y. Rolland, H. Sartelet and R. Beliveau (2008). "Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype." Mol Cancer Res **6**(6): 907-916.

Aranda, V., T. Haire, M. E. Nolan, J. P. Calarco, A. Z. Rosenberg, J. P. Fawcett, T. Pawson and S. K. Muthuswamy (2006). "Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control." Nat Cell Biol **8**(11): 1235-1245.

Aubert, S., V. Fauquette, B. Hemon, R. Lepoivre, N. Briez, D. Bernard, I. Van Seuningem, X. Leroy and M. Perrais (2009). "MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression." Cancer Res **69**(14): 5707-5715.

Baldus, S. E., J. R. Wienand, J. P. Werner, S. Landsberg, U. Drebber, F. G. Hanisch and H. P. Dienes (2005). "Expression of MUC1, MUC2 and oligosaccharide epitopes

in breast cancer: prognostic significance of a sialylated MUC1 epitope." Int J Oncol **27**(5): 1289-1297.

Barsoum, I. B., T. K. Hamilton, X. Li, T. Cotechini, E. A. Miles, D. R. Siemens and C. H. Graham (2011). "Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide." Cancer Res **71**(24): 7433-7441.

Baruch, A., M. Hartmann, M. Yoeli, Y. Adereth, S. Greenstein, Y. Stadler, Y. Skornik, J. Zaretsky, N. I. Smorodinsky, I. Keydar and D. H. Wreschner (1999). "The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein." Cancer Res **59**(7): 1552-1561.

Bitler, B. G., I. Menzl, C. L. Huerta, B. Sands, W. Knowlton, A. Chang and J. A. Schroeder (2009). "Intracellular MUC1 peptides inhibit cancer progression." Clin Cancer Res **15**(1): 100-109.

Caldera, V., M. Mellai, L. Annovazzi, O. Monzeglio, A. Piazzini and D. Schiffer (2012). "MGMT hypermethylation and MDR system in glioblastoma cancer stem cells." Cancer Genomics Proteomics **9**(4): 171-178.

Canis, M., A. Lechner, B. Mack, P. Zengel, R. P. Laubender, U. Koehler, V. Heissmeyer and O. Gires (2013). "CD133 induces tumour-initiating properties in HEK293 cells." Tumour Biol **34**(1): 437-443.

Carraway, K. L., V. P. Ramsauer and C. A. Carraway (2005). "Glycoprotein contributions to mammary gland and mammary tumor structure and function: roles of adherens junctions, ErbBs and membrane MUCs." J Cell Biochem **96**(5): 914-926.

Cascio, S., A. M. Farkas, R. P. Hughey and O. J. Finn (2013). "Altered glycosylation of MUC1 influences its association with CIN85: the role of this novel complex in cancer cell invasion and migration." Oncotarget **4**(10): 1686-1697.

Cascio, S., L. Zhang and O. J. Finn (2011). "MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor-kappaB p65 and binding to cytokine promoters: importance of extracellular domain." J Biol Chem **286**(49): 42248-42256.

Chau, W. K., C. K. Ip, A. S. Mak, H. C. Lai and A. S. Wong (2013). "c-Kit mediates chemoresistance and tumor-initiating capacity of ovarian cancer cells through activation of Wnt/beta-catenin-ATP-binding cassette G2 signaling." Oncogene **32**(22): 2767-2781.

Degregorio, M., M. Degregorio, G. T. Wurz, G. T. Wurz, A. Gutierrez, A. Gutierrez and M. Wolf (2012). "L-BLP25 vaccine plus letrozole for breast cancer: Is translation possible?" Oncoimmunology **1**(8): 1422-1424.

Desseyn, J. L., M. P. Buisine, N. Porchet, J. P. Aubert, P. Degand and A. Laine (1998). "Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family." J Mol Evol **46**(1): 102-106.

Devine, P. L. and I. F. McKenzie (1992). "Mucins: structure, function, and associations with malignancy." Bioessays **14**(9): 619-625.

Doberstein, K., J. Pfeilschifter and P. Gutwein (2011). "The transcription factor PAX2 regulates ADAM10 expression in renal cell carcinoma." Carcinogenesis **32**(11): 1713-1723.

Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi and D. D. Ross (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-15670.

Edeline J, V. C., Patard JJ, Rioux-Leclerc N "Voies moléculaires dans le cancer du rein : de la biologie aux traitements de demain." Bulletin du cancer. **Volume 97, 5-15, Cancers du rein, Synthèse.**

Fuhrman, S. A., L. C. Lasky and C. Limas (1982). "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma." Am J Surg Pathol **6**(7): 655-663.

Gaemers, I. C., H. L. Vos, H. H. Volders, S. W. van der Valk and J. Hilkens (2001). "A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells." J Biol Chem **276**(9): 6191-6199.

Gendler, S. J. (2001). "MUC1, the renaissance molecule." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(3): 339-353.

Gendler, S. J., E. P. Cohen, A. Craston, T. Duhig, G. Johnstone and D. Barnes (1990). "The locus of the polymorphic epithelial mucin (PEM) tumour antigen on chromosome 1q21 shows a high frequency of alteration in primary human breast tumours." Int J Cancer **45**(3): 431-435.

Gulley, J. L., P. M. Arlen, K. Y. Tsang, J. Yokokawa, C. Palena, D. J. Poole, C. Remondo, V. Cereda, J. L. Jones, M. P. Pazdur, J. P. Higgins, J. W. Hodge, S. M. Steinberg, H. Kotz, W. L. Dahut and J. Schlom (2008). "Pilot study of vaccination with recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma." Clin Cancer Res **14**(10): 3060-3069.

Guo, Z., X. Jin and H. Jia (2013). "Inhibition of ADAM-17 more effectively down-regulates the Notch pathway than that of gamma-secretase in renal carcinoma." J Exp Clin Cancer Res **32**: 26.

Hattrup, C. L., J. Fernandez-Rodriguez, J. A. Schroeder, G. C. Hansson and S. J. Gendler (2004). "MUC1 can interact with adenomatous polyposis coli in breast cancer." Biochem Biophys Res Commun **316**(2): 364-369.

Hattrup, C. L. and S. J. Gendler (2008). "Structure and function of the cell surface (tethered) mucins." Annu Rev Physiol **70**: 431-457.

Hayat, M. J., N. Howlader, M. E. Reichman and B. K. Edwards (2007). "Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program." Oncologist **12**(1): 20-37.

Hikita, S. T., K. S. Kosik, D. O. Clegg and C. Bamdad (2008). "MUC1* mediates the growth of human pluripotent stem cells." PLoS One **3**(10): e3312.

Hollingsworth, M. A. and B. J. Swanson (2004). "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface." Nat Rev Cancer **4**(1): 45-60.

Huang, F. F., D. S. Wu, L. Zhang, Y. H. Yu, X. Y. Yuan, W. J. Li, X. P. Chen, X. L. Zhao, F. P. Chen and H. Zeng (2013). "Inactivation of PTEN increases ABCG2 expression and the side population through the PI3K/Akt pathway in adult acute leukemia." Cancer Lett **336**(1): 96-105.

Hunt, J. D., O. L. van der Hel, G. P. McMillan, P. Boffetta and P. Brennan (2005). "Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies." Int J Cancer **114**(1): 101-108.

Ibrahim, N. K., K. O. Yariz, I. Bondarenko, A. Manikhas, V. Semiglazov, A. Alyasova, V. Komisarenko, Y. Shparyk, J. L. Murray, D. Jones, S. Senderovich, A. Chau, F. Erlandsson, G. Acton and M. Pegram (2011). "Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer." Clin Cancer Res **17**(21): 6822-6830.

Jin, C., H. Rajabi and D. Kufe (2010). "miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death." Int J Oncol **37**(1): 61-69.

Jordan, C. T., M. L. Guzman and M. Noble (2006). "Cancer stem cells." N Engl J Med **355**(12): 1253-1261.

Julian, J., N. Dharmaraj and D. D. Carson (2009). "MUC1 is a substrate for gamma-secretase." J Cell Biochem **108**(4): 802-815.

Kim, G. E., H. I. Bae, H. U. Park, S. F. Kuan, S. C. Crawley, J. J. Ho and Y. S. Kim (2002). "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas." Gastroenterology **123**(4): 1052-1060.

Kinlough, C. L., R. J. McMahan, P. A. Poland, J. B. Bruns, K. L. Harkleroad, R. J. Stremple, O. B. Kashlan, K. M. Weixel, O. A. Weisz and R. P. Hughey (2006). "Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation." J Biol Chem **281**(17): 12112-12122.

Kinlough, C. L., P. A. Poland, J. B. Bruns, K. L. Harkleroad and R. P. Hughey (2004). "MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions." J Biol Chem **279**(51): 53071-53077.

Koga, T., I. Kuwahara, E. P. Lillehoj, W. Lu, T. Miyata, Y. Isohama and K. C. Kim (2007). "TNF-alpha induces MUC1 gene transcription in lung epithelial cells: its signaling pathway and biological implication." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(3): L693-701.

Kohlgraf, K. G., A. J. Gawron, M. Higashi, J. L. Meza, M. D. Burdick, S. Kitajima, D. L. Kelly, T. C. Caffrey and M. A. Hollingsworth (2003). "Contribution of the MUC1 tandem repeat and cytoplasmic tail to invasive and metastatic properties of a pancreatic cancer cell line." Cancer Res **63**(16): 5011-5020.

Kondo, K., N. Kohno, A. Yokoyama and K. Hiwada (1998). "Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines." Cancer Res **58**(9): 2014-2019.

Kovarik, A., N. Peat, D. Wilson, S. J. Gendler and J. Taylor-Papadimitriou (1993). "Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC1 gene." J Biol Chem **268**(13): 9917-9926.

Kufe, D. W. (2013). "MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches." Oncogene **32**(9): 1073-1081.

Kumar, P., L. Lindberg, T. L. Thirkill, J. W. Ji, L. Martsching and G. C. Douglas (2012). "The MUC1 extracellular domain subunit is found in nuclear speckles and associates with spliceosomes." PLoS One **7**(8): e42712.

L'Esperance, S., I. Popa, M. Bachvarova, M. Plante, N. Patten, L. Wu, B. Tetu and D. Bachvarov (2006). "Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors." Int J Oncol **29**(1): 5-24.

Lagow, E., M. M. DeSouza and D. D. Carson (1999). "Mammalian reproductive tract mucins." Hum Reprod Update **5**(4): 280-292.

Lee, J. T., Jr., L. S. Steelman and J. A. McCubrey (2004). "Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells." Cancer Res **64**(22): 8397-8404.

Lee, S. B., A. Schramme, K. Doberstein, R. Dummer, M. S. Abdel-Bakky, S. Keller, P. Altevogt, S. T. Oh, J. Reichrath, D. Oxmann, J. Pfeilschifter, D. Mihic-Probst and P. Gutwein (2010). "ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma." J Invest Dermatol **130**(3): 763-773.

Leroy, X., F. Zerimech, L. Zini, M. C. Copin, M. P. Buisine, B. Gosselin, J. P. Aubert and N. Porchet (2002). "MUC1 expression is correlated with nuclear grade and tumor progression in pT1 renal clear cell carcinoma." Am J Clin Pathol **118**(1): 47-51.

Levitin, F., O. Stern, M. Weiss, C. Gil-Henn, R. Ziv, Z. Prokocimer, N. I. Smorodinsky, D. B. Rubinstein and D. H. Wreschner (2005). "The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain." J Biol Chem **280**(39): 33374-33386.

Li, Q., J. Ren and D. Kufe (2004). "Interaction of human MUC1 and beta-catenin is regulated by Lck and ZAP-70 in activated Jurkat T cells." Biochem Biophys Res Commun **315**(2): 471-476.

Li, X., L. Wang, D. P. Nunes, R. F. Troxler and G. D. Offner (2005). "Suppression of MUC1 synthesis downregulates expression of the epidermal growth factor receptor." Cancer Biol Ther **4**(9): 968-973.

Li, Y., A. Bharti, D. Chen, J. Gong and D. Kufe (1998). "Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin." Mol Cell Biol **18**(12): 7216-7224.

Li, Y., W. Chen, J. Ren, W. H. Yu, Q. Li, K. Yoshida and D. Kufe (2003). "DF3/MUC1 signaling in multiple myeloma cells is regulated by interleukin-7." Cancer Biol Ther **2**(2): 187-193.

Li, Y., P. J. Cozzi and P. J. Russell (2010). "Promising tumor-associated antigens for future prostate cancer therapy." Med Res Rev **30**(1): 67-101.

Li, Y., H. Kuwahara, J. Ren, G. Wen and D. Kufe (2001). "The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin." J Biol Chem **276**(9): 6061-6064.

Li, Y., H. Yi, Y. Yao, X. Liao, Y. Xie, J. Yang, Z. Yan, L. Wang, S. Lu, Y. Kuang, M. Gu, J. Fei, Z. Wang and L. Huang (2011). "The cytoplasmic domain of MUC1 induces hyperplasia in the mammary gland and correlates with nuclear accumulation of beta-catenin." PLoS One **6**(4): e19102.

Ligtenberg, M. J., L. Kruijshaar, F. Buijs, M. van Meijer, S. V. Litvinov and J. Hilkens (1992). "Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor." J Biol Chem **267**(9): 6171-6177.

Limacher, J. M. and B. Acres (2007). "[MUC1, a therapeutic target in oncology]." Bull Cancer **94**(3): 253-257.

Lipworth, L., R. E. Tarone and J. K. McLaughlin (2006). "The epidemiology of renal cell carcinoma." J Urol **176**(6 Pt 1): 2353-2358.

Liu, Y. S., H. C. Hsu, K. C. Tseng, H. C. Chen and S. J. Chen (2013). "Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer." Biomed Pharmacother **67**(8): 791-799.

Ljungberg, B., S. C. Campbell, H. Y. Choi, D. Jacqmin, J. E. Lee, S. Weikert and L. A. Kiemeny (2011). "The epidemiology of renal cell carcinoma." Eur Urol **60**(4): 615-621.

Lloyd, K. O., J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. Yin and J. Taylor-Papadimitriou (1996). "Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells." J Biol Chem **271**(52): 33325-33334.

Macao, B., D. G. Johansson, G. C. Hansson and T. Hard (2006). "Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 71-76.

Mahanta, S., S. P. Fessler, J. Park and C. Bamdad (2008). "A minimal fragment of MUC1 mediates growth of cancer cells." PLoS One **3**(4): e2054.

McCulloch, D. R., M. Harvey and A. C. Herington (2000). "The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone." Mol Cell Endocrinol **167**(1-2): 11-21.

Mejean, A., J. M. Correas, B. Escudier, M. de Fromont, H. Lang, J. A. Long, Y. Neuzillet, J. J. Patard and T. Piechaud (2007). "[Kidney tumors]." Prog Urol **17**(6): 1101-1144.

Merlin, J., L. Stechly, S. de Beauce, D. Monte, E. Leteurtre, I. van Seuningen, G. Huet and P. Pigny (2011). "Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells." Oncogene **30**(22): 2514-2525.

Merlo, G. R., J. Siddiqui, C. S. Cropp, D. S. Liscia, R. Lidereau, R. Callahan and D. W. Kufe (1989). "Frequent alteration of the DF3 tumor-associated antigen gene in primary human breast carcinomas." Cancer Res **49**(24 Pt 1): 6966-6971.

Nath, S., K. Daneshvar, L. D. Roy, P. Grover, A. Kidiyoor, L. Mosley, M. Sahraei and P. Mukherjee (2013). "MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes." Oncogenesis **2**: e51.

Ohnishi, S., O. Maehara, K. Nakagawa, A. Kameya, K. Otaki, H. Fujita, R. Higashi, K. Takagi, M. Asaka, N. Sakamoto, M. Kobayashi and H. Takeda (2013). "hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors." PLoS One **8**(6): e66255.

Parry, S., H. S. Silverman, K. McDermott, A. Willis, M. A. Hollingsworth and A. Harris (2001). "Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites in vivo." Biochem Biophys Res Commun **283**(3): 715-720.

Patard, J. J., H. Baumert, J. M. Correas, B. Escudier, H. Lang, J. A. Long, Y. Neuzillet, P. Paparel, L. Poissonnier, N. Rioux-Leclercq, M. Soulie and U. Oncology Committee of the French Association of (2010). "[Recommendations Onco-Urology 2010: Kidney cancer]." Prog Urol **20 Suppl 4**: S319-339.

Patton, S., S. J. Gendler and A. P. Spicer (1995). "The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues." Biochim Biophys Acta **1241**(3): 407-423.

Pegram, M. D., V. F. Borges, N. Ibrahim, J. Fuloria, C. Shapiro, S. Perez, K. Wang, F. Schaedli Stark and N. Courtenay Luck (2009). "Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer." Breast Cancer Res **11**(5): R73.

Petrella, B. L. and C. E. Brinckerhoff (2006). "Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase." Mol Cancer **5**: 66.

Pigny, P., V. Guyonnet-Duperat, A. S. Hill, W. S. Pratt, S. Galiegue-Zouitina, M. C. d'Hooge, A. Laine, I. Van-Seuningen, P. Degand, J. R. Gum, Y. S. Kim, D. M. Swallow, J. P. Aubert and N. Porchet (1996). "Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes." Genomics **38**(3): 340-352.

- Poh, T. W., J. M. Bradley, P. Mukherjee and S. J. Gendler (2009). "Lack of Muc1-regulated beta-catenin stability results in aberrant expansion of CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells from the bone marrow." Cancer Res **69**(8): 3554-3562.
- Pokutta, S. and W. I. Weis (2007). "Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 237-261.
- Porchet, N. and J. P. Aubert (2004). "[MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]." Med Sci (Paris) **20**(5): 569-574.
- Raina, D., R. Ahmad, M. D. Joshi, L. Yin, Z. Wu, T. Kawano, B. Vasir, D. Avigan, S. Kharbanda and D. Kufe (2009). "Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells." Cancer Res **69**(12): 5133-5141.
- Raina, D., S. Kharbanda and D. Kufe (2004). "The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts." J Biol Chem **279**(20): 20607-20612.
- Raina, D., M. Kosugi, R. Ahmad, G. Panchamoorthy, H. Rajabi, M. Alam, T. Shimamura, G. I. Shapiro, J. Supko, S. Kharbanda and D. Kufe (2011). "Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells." Mol Cancer Ther **10**(5): 806-816.
- Rajabi, H., R. Ahmad, C. Jin, M. D. Joshi, M. Guha, M. Alam, S. Kharbanda and D. Kufe (2012). "MUC1-C oncoprotein confers androgen-independent growth of human prostate cancer cells." Prostate **72**(15): 1659-1668.
- Rajabi, H., C. Jin, R. Ahmad, C. McClary, M. D. Joshi and D. Kufe (2010). "MUCIN 1 ONCOPROTEIN EXPRESSION IS SUPPRESSED BY THE miR-125b ONCOMIR." Genes Cancer **1**(1): 62-68.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Sachdeva, M. and Y. Y. Mo (2010). "MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1." Cancer Res **70**(1): 378-387.
- Satoh, S., Y. Hinoda, T. Hayashi, M. D. Burdick, K. Imai and M. A. Hollingsworth (2000). "Enhancement of metastatic properties of pancreatic cancer cells by MUC1 gene encoding an anti-adhesion molecule." Int J Cancer **88**(4): 507-518.

Schroeder, J. A., M. C. Adriance, M. C. Thompson, T. D. Camenisch and S. J. Gendler (2003). "MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion." Oncogene **22**(9): 1324-1332.

Schroeder, J. A., M. C. Thompson, M. M. Gardner and S. J. Gendler (2001). "Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland." J Biol Chem **276**(16): 13057-13064.

Singh, P. K. and M. A. Hollingsworth (2006). "Cell surface-associated mucins in signal transduction." Trends Cell Biol **16**(9): 467-476.

Singh, P. K., Y. Wen, B. J. Swanson, K. Shanmugam, A. Kazlauskas, R. L. Cerny, S. J. Gendler and M. A. Hollingsworth (2007). "Platelet-derived growth factor receptor beta-mediated phosphorylation of MUC1 enhances invasiveness in pancreatic adenocarcinoma cells." Cancer Res **67**(11): 5201-5210.

Smaghe, B. J., A. K. Stewart, M. G. Carter, L. M. Shelton, K. J. Bernier, E. J. Hartman, A. K. Calhoun, V. M. Hatzioannou, G. Lillacci, B. A. Kirk, B. A. DiNardo, K. S. Kosik and C. Bamdad (2013). "MUC1* ligand, NM23-H1, is a novel growth factor that maintains human stem cells in a more naive state." PLoS One **8**(3): e58601.

Sobin LH, G. M., Wittekind C (2009). "TNM Classification of malignant tumors." UICC International Union Against Cancer 7th edn: 255-257.

Sweeney, C., L. Li, R. Shanmugam, P. Bhat-Nakshatri, V. Jayaprakasan, L. A. Baldrige, T. Gardner, M. Smith, H. Nakshatri and L. Cheng (2004). "Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate." Clin Cancer Res **10**(16): 5501-5507.

Takano, M., K. Fujii, T. Kita, Y. Kikuchi and K. Uchida (2004). "Amplicon profiling reveals cytoplasmic overexpression of MUC1 protein as an indicator of resistance to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer." Oncol Rep **12**(6): 1177-1182.

Taylor-Papadimitriou, J., J. Burchell, D. W. Miles and M. Dalziel (1999). "MUC1 and cancer." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 301-313.

Thathiah, A., C. P. Blobel and D. D. Carson (2003). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding." J Biol Chem **278**(5): 3386-3394.

Thathiah, A. and D. D. Carson (2004). "MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17." Biochem J **382**(Pt 1): 363-373.

Thompson, E. J., K. Shanmugam, C. L. Hattrup, K. L. Kotlarczyk, A. Gutierrez, J. M. Bradley, P. Mukherjee and S. J. Gendler (2006). "Tyrosines in the MUC1 cytoplasmic tail modulate transcription via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor-kappaB pathways." Mol Cancer Res **4**(7): 489-497.

Treon, S. P., J. A. Mollick, M. Urashima, G. Teoh, D. Chauhan, A. Ogata, N. Raje, J. H. Hilgers, L. Nadler, A. R. Belch, L. M. Pilarski and K. C. Anderson (1999). "Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone." Blood **93**(4): 1287-1298.

Wei, X., H. Xu and D. Kufe (2005). "Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response." Cancer Cell **7**(2): 167-178.

Wei, X., H. Xu and D. Kufe (2006). "MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha." Mol Cell **21**(2): 295-305.

Wicha, M. S., S. Liu and G. Dontu (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." Cancer Res **66**(4): 1883-1890; discussion 1895-1886.

Yamamoto, M., A. Bharti, Y. Li and D. Kufe (1997). "Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion." J Biol Chem **272**(19): 12492-12494.

Yin, L., L. Huang and D. Kufe (2004). "MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress." J Biol Chem **279**(44): 45721-45727.

Yuan, Z., S. Wong, A. Borrelli and M. A. Chung (2007). "Down-regulation of MUC1 in cancer cells inhibits cell migration by promoting E-cadherin/catenin complex formation." Biochem Biophys Res Commun **362**(3): 740-746.

Zaretsky, J. Z., R. Sarid, Y. Aylon, L. A. Mittelman, D. H. Wreschner and I. Keydar (1999). "Analysis of the promoter of the MUC1 gene overexpressed in breast cancer." FEBS Lett **461**(3): 189-195.

Zhang, G., Z. Wang, W. Luo, H. Jiao, J. Wu and C. Jiang (2013). "Expression of Potential Cancer Stem Cell Marker ABCG2 is Associated with Malignant Behaviors of Hepatocellular Carcinoma." Gastroenterol Res Pract **2013**: 782581.

Zhang, L., A. Vlad, C. Milcarek and O. J. Finn (2013). "Human mucin MUC1 RNA undergoes different types of alternative splicing resulting in multiple isoforms." Cancer Immunol Immunother **62**(3): 423-435.

Zisman, A., A. J. Pantuck, J. Wieder, D. H. Chao, F. Dorey, J. W. Said, J. B. deKernion, R. A. Figlin and A. S. Belldegrun (2002). "Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma." J Clin Oncol **20**(23): 4559-4566.

Zrihan-Licht, S., M. Weiss, I. Keydar and D. H. Wreschner (1995). "DNA methylation status of the MUC1 gene coding for a breast-cancer-associated protein." Int J Cancer **62**(3): 245-251.