

**MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 16 Mai 2012
Par Melle Lucie COPPIN**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

***Rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression
des mucines membranaires MUC1 et MUC4 dans un
modèle d'adénocarcinome pancréatique canalaire humain***

Membres du jury :

Président	Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU Faculté de Pharmacie, Université de Lille II
Assesseurs	Madame le Docteur Malika BALDUYCK Faculté de Pharmacie, Université de Lille II Madame le Docteur Fabienne ESCANDE Centre de Biologie Pathologie, CHRU de Lille
Directeur de thèse	Monsieur le Professeur Pascal PIGNY Faculté de Médecine, Université de Lille II



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Christian SERGHERAERT
Vice- présidents :	Madame Stéphanie DAMAREY
	Professeur Marie-Hélène FOSSE-GOMEZ
	Professeur Régis MATRAN
	Professeur Salem KACET
	Professeur Paul FRIMAT
	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
	Professeur Patrick PELAYO
	Madame Claire DAVAL
	Madame Irène LAUTIER
	Monsieur Larbi AIT-HENNANI
	Monsieur Rémy PAMART
Secrétaire général :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER
	Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mlle	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie

Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Générale
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	VION	Daniel	Droit et déontologie pharmaceutique

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie et Virologie Cliniques
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GAMOT	André	Chimie Analytique
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LHERMITTE	Michel	Toxicologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)
M.	BONTE	Jean-Paul	Chimie Analytique et (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Générale
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BOUTILLON	Christophe	Chimie Organique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mlle	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie

Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLAMENT	Marie-Pierre	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Melle	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Virologie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Melle	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Pharmacie Galénique
Mme	POMMERY	Nicole	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Melle	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
Mme	VITSE	Annie	Parasitologie
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Clinique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	CREN	Yves	Information Médicale - Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques - Pharmacie virtuelle

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A mon président de thèse,

Monsieur le Professeur Thierry Brousseau,

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Chef de service de la Biochimie automatisée, des Protéines et de la Biologie
prédictive au Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHRU de Lille

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A mes juges,

Madame le Docteur Malika Balduyck,

Maître de Conférences,

Praticien Hospitalier,

Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire,
Service de Biochimie « Hormonologie, Métabolisme, Nutrition, Oncologie »
au Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHRU de Lille

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Veillez croire en l'expression de toute ma reconnaissance.

Madame le Docteur Fabienne Escande,

Praticien Hospitalier,

Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire,
Service de Biochimie « Hormonologie, Métabolisme, Nutrition, Oncologie »
au Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHRU de Lille

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères et respectueux remerciements.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Pascal Pigny,

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire,
Service de Biochimie « Hormonologie, Métabolisme, Nutrition, Oncologie »
au Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHRU de Lille

Je vous suis très reconnaissante pour votre aide, vos précieux conseils et pour votre implication dans ce travail.

Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A toutes les personnes qui ont collaboré à l'élaboration de ce travail,

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Pierre Formstecher de m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert et permis de réaliser ce stage.

Je remercie Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen pour son accueil au sein de l'équipe 5 de l'UMR 837 de l'Inserm et ses conseils scientifiques.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur Nicole Porchet pour ses précieux conseils et sa disponibilité.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'équipe 5 de l'UMR 837 de l'Inserm pour leurs remarques pertinentes, leur soutien et leur bonne humeur.

Je remercie Evelyne Crème pour sa disponibilité permanente, son aide précieuse et sa gentillesse.

Merci également à tous les membres du secteur d'oncogénétique et de génétique moléculaires du Centre de Biologie Pathologie de m'avoir accueillie pour la réalisation d'une partie de mon travail.

A ma famille, à mes amis,

Je vous remercie pour votre présence, votre confiance et votre soutien permanent.

Résumé

Les mucines MUC1 et MUC4 sont des O-glycoprotéines membranaires de masse moléculaire élevée, exprimées au pôle apical des cellules épithéliales saines où elles exercent un rôle de protection des épithéliums et interviennent dans la transduction de signaux. MUC1 et MUC4 sont respectivement sur- et néoexprimées au cours de l'adénocarcinome pancréatique canalaire, cancer de mauvais pronostic en raison de son caractère agressif et d'une détection tardive. La transformation maligne s'accompagne d'une délocalisation de ces mucines : leur distribution n'est plus restreinte au pôle apical de la cellule épithéliale mais devient circonférentielle et cytoplasmique. La galectine-3, lectine endogène interagissant avec les β -galactosides, est également surexprimée au cours de ce cancer. Des travaux préalables entrepris au sein de l'équipe 5 de l'UMR 837 de l'Inserm ont mis en évidence une diminution de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* dans des cellules cancéreuses pancréatiques humaines n'exprimant plus la galectine-3.

Notre objectif est de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu par la galectine-3 pour moduler l'expression de ces mucines dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Pour cela, nous disposons (i) de la lignée cellulaire cancéreuse pancréatique humaine CAPAN-1 invalidée spécifiquement pour le gène codant la galectine-3 par méthode de *sh*-RNA, (ii) d'un vecteur d'expression de cette protéine et (iii) de différentes constructions du promoteur de *MUC1* et du promoteur de *MUC4* clonées en amont du gène codant la luciférase.

Nos travaux permettent d'une part de montrer, par co-transfections cellulaires transitoires, que la galectine-3 n'exerce pas d'effet transactivateur sur les promoteurs de *MUC1* et de *MUC4*. D'autre part, l'étude de la demi-vie des transcrits de ces mucines en présence d'actinomycine D indique un raccourcissement de celle de *MUC4* en absence de galectine-3 alors que la demi-vie de *MUC1* reste inchangée. Ainsi, la galectine-3 pourrait être un facteur à l'origine de la surexpression de *MUC4* dans les cellules cancéreuses pancréatiques par le biais de la stabilisation de ses ARNm alors que le mécanisme intervenant dans la surexpression de *MUC1* reste à déterminer.

Mots clés : cancer, pancréas, galectine-3, MUC1, MUC4, promoteur, stabilité des ARNm

Table des matières

Table des matières	13
Index des figures.....	17
Index des tableaux	20
Liste des abréviations.....	21
Introduction	24
I. Pancréas et Adénocarcinome pancréatique canalaire	25
I.1. Pancréas sain	25
I.1.1. Anatomie	25
I.1.2. Physiologie	25
a. Le pancréas : une glande mixte	25
b. Pancréas exocrine	26
c. Pancréas endocrine.....	26
I.2. Types de cancers pancréatiques.....	27
I.3. Adénocarcinome pancréatique canalaire.....	28
I.3.1. Epidémiologie	28
I.3.2. Facteurs de risque	28
I.3.3. Symptômes	29
I.3.4. Diagnostic.....	29
a. Imagerie	29
b. Bilan biologique	30
c. Confirmation histologique	30
d. Bilan d'extension	31
I.3.5. Dépistage	31
I.3.6. Traitements	31
a. Chirurgie.....	31
b. Chimiothérapie	32
c. Radio-chimiothérapie.....	33
d. Nouveaux traitements.....	33
I.4. Carcinogénèse pancréatique.....	34
I.4.1. Lésions précurseurs de l'adénocarcinome pancréatique canalaire	34
I.4.2. Altérations génétiques	35
I.4.3. Modification de l'expression des mucines	36

II.	Mucines	37
II.1.	Structure	37
II.2.	Fonctions	38
II.3.	Mucines et cancérogénèse	40
III.	MUC4	41
III.1.	Structure	41
III.2.	Gène	42
III.3.	Caractérisation de la région 5'-flanquante de <i>MUC4</i> et régulation de son expression.....	44
III.4.	Distribution cellulaire de MUC4	45
III.5.	MUC4 et cancérisation	46
IV.	MUC1	47
IV.1.	Structure	47
IV.2.	Gène	48
IV.3.	Sites d'expression	49
IV.4.	MUC1 et cancérisation	49
V.	Galectines.....	51
V.1.	Généralités.....	51
V.2.	Galectine-3.....	53
V.2.1.	Gène	53
V.2.2.	La galectine-3.....	53
V.2.3.	Sites d'expression	54
V.2.4.	Ligands.....	54
V.2.5.	Fonctions.....	55
V.2.6.	Galectine-3 et cancer.....	56
Problématique et objectif du travail		58
Résultats		64
I.	Etude de l'expression des gènes et protéines d'intérêt dans les lignées cellulaires Sh1 et Sc	65
II.	Restauration de phénotype	67
III.	Etude du rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression des mucines membranaires MUC1 et MUC4.....	69
III.1.	Etude de l'activité du promoteur de <i>MUC1</i> et <i>MUC4</i> sous l'influence de la galectine-3	69
III.2.	Etude de l'influence de la galectine-3 sur la stabilité des transcrits de <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i>	74
III.3.	Etude de la liaison de la galectine-3 sur les transcrits de <i>MUC4</i>	75

Discussion	77
I. Etude de l'influence de la galectine-3 sur l'activité des promoteurs de <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i>	78
II. Etude du rôle de la galectine-3 sur la demi-vie des transcrits de <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i>	79
III. Liens entre <i>MUC1</i> ou <i>MUC4</i> et galectine-3 dans le cancer du pancréas.....	83
Conclusion	87
Appendice technique	89
I. Culture cellulaire	90
I.1. Lignée cellulaire cancéreuse humaine pancréatique CAPAN-1	90
I.2. Lignée cellulaire Sh1	90
I.3. Composition des milieux de culture	90
I.4. Conditions de culture.....	91
II. Restauration de phénotype	91
II.1. Traitement des cellules par la galectine-3 recombinante	91
II.2. Extraction des ARN et Reverse transcription spécifique	91
II.2.1. Récupération des cellules.....	92
II.2.2. Extraction des ARN	92
II.2.3. Synthèse de l'ADNc.....	92
III. Extraction des ARN totaux et <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> ...	93
III.1. Extraction des ARN totaux à partir de culture cellulaire	93
III.2. <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	94
III.2.1. <i>Reverse Transcription</i> : synthèse de l'ADNc	94
III.2.2. Amplification de l'ADNc par PCR	94
IV. Etude de la demi-vie des transcrits	95
V. Quantification de <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i> par PCR quantitative en temps réel (qPCR) ...	95
VI. Sous-clonage de produits PCR en vecteur plasmidique pCR® 2.1	97
VI.1. Ligation	97
VI.2. Transformation bactérienne par choc thermique	98
VI.3. Sélection des clones	98
VI.4. Extraction du plasmide	99
VI.5. Séquençage.....	99
VII. Préparations des constructions plasmidiques pour transfections cellulaires transitoires	99
VII.1. Transformation des bactéries E coli JM109.....	100
VII.2. Extraction plasmidique	100
VIII. Transfections transitoires	101
VIII.1. Préparation du vecteur dépourvu de l'insert codant la galectine-3.....	101
VIII.1.1. Digestion du vecteur par l'enzyme de restriction Not I.....	101

VIII.1.2.	Purification vecteur vide linéaire.....	102
VIII.1.3.	Ligation des extrémités du vecteur.....	102
VIII.2.	Transfections transitoires à l'Effectene®	102
VIII.3.	Préparation des extraits cellulaires totaux	103
VIII.4.	Dosage protéique.....	104
VIII.5.	Mesure de l'activité luciférase	104
IX.	Préparation d'extraits cellulaires totaux.....	105
X.	<i>Western-blot</i>	105
X.1.	Principe	105
X.2.	Réalisation du <i>Western Blot</i>	106
XI.	<i>Western Blot</i> MUC4	107
XII.	Immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines	108
XIII.	Statistiques	109
Références bibliographiques		110

Index des figures

Introduction	24
Figure 1 : Anatomie du pancréas.....	25
Figure 2 : Pancréas exocrine.....	26
Figure 3 : Représentation schématique d'un îlot de Langerhans.	27
Figure 4 : Courbe de survie globale chez les malades opérés d'un adénocarcinome pancréatique.....	28
Figure 5 : Coupes histologiques de tissu pancréatique sain et d'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC).	30
Figure 6 : Opération de Whipple.	32
Figure 7 : Mode d'action de la gemcitabine.....	33
Figure 8 : Lésions précurseurs de l'adénocarcinome pancréatique canalaire. ..	34
Figure 9 : Modèle de progression de l'adénocarcinome pancréatique.	34
Figure 10 : Coupes histologiques de tissu pancréatique sain, de PanIN et d'adénocarcinome pancréatique canalaire.....	35
Figure 11 : Modèle de progression des anomalies génétiques observées au cours de la carcinogenèse pancréatique.	36
Figure 12 : Profil d'expression des mucines MUC1, MUC2, MUC4 et MUC5AC au cours des différentes étapes de la cancérogenèse pancréatique.....	38
Figure 13 : Structure générale d'une mucine.	39
Figure 14 : Représentation schématique des mucines membranaires.	40
Figure 15 : Rôle des mucines sécrétées dans la protection des épithéliums.....	41
Figure 16 : Rôle des mucines membranaires dans la transduction de signaux.	41
Figure 17 : Sites d'expression des mucines chez le sujet sain.....	42
Figure 18 : Mucines et cancérogenèse.	43
Figure 19 : Représentation schématique de la mucine MUC4.	44
Figure 20 : Différents variants d'épissage de <i>MUC4</i>	45
Figure 21 : Représentation des éléments <i>cis</i> présents sur le promoteur de <i>MUC4</i>	46
Figure 22 : Eléments régulateurs de l'expression de <i>MUC4</i> et voies de signalisation associées.	47
Figure 23 : Rôles de MUC4 dans la cancérogenèse.....	48
Figure 24 : Représentation de la structure de MUC1 sous forme linéaire.	49
Figure 25 : Promoteur de <i>MUC1</i> et éléments intervenant dans sa régulation.	50
Figure 26 : Structure de MUC1 à l'état normal et dans les cellules cancéreuses.	51

Figure 27 :	Partenaires protéiques de MUC1 impliqués dans la signalisation cellulaire.	52
Figure 28 :	La galectine-3 : correspondance entre les exons et les domaines protéiques.....	55
Figure 29 :	Représentation schématique de la galectine-3 dans ses différents états (monomère, dimère et polymère).	56
Figure 30 :	Exemples du rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression de gènes.....	58
Figure 31 :	Rôle de la galectine-3 dans les différentes étapes de la cancérogenèse.	59
Problématique et objectif du travail		60
Figure 32 :	Stades de régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes.....	61
Figure 33 :	Représentation schématique de la machinerie transcriptionnelle et des facteurs qui lui sont associés.	62
Figure 34 :	Eléments de régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel.	63
Résultats		64
Figure 35 :	Etude de l'expression de la galectine-3 dans les cellules Sh1 et Sc.	65
Figure 36 :	Etude de l'expression de MUC4 dans les cellules Sh1 et Sc.	66
Figure 37 :	Expression relative de <i>MUC4</i> dans les cellules Sc et Sh1 évaluée par qPCR.....	66
Figure 38 :	Etude de l'expression de MUC1 dans les cellules Sh1 et Sc par <i>Western Blot</i>	67
Figure 39 :	Etude de l'expression <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i> dans les cellules Sc, Sh1 et Sh1 traitées par 4 µM de galectine-3 recombinante par RT-PCR semi-quantitative.	68
Figure 40 :	Etude de l'expression au niveau protéique de MUC1 et MUC4 dans les cellules Sc, Sh1 et Sh1 traitées par 4 µM de galectine-3 recombinante.....	68
Figure 41 :	Etude de l'expression de la galectine-3 dans les cellules Sh1 transfectées par le vecteur d'expression de la galectine-3.....	70
Figure 42 :	Positionnement des éléments <i>cis</i> -régulateurs pour les facteurs de transcription Sp1 et AP-1 au sein des promoteurs de <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i>	71

Figure 43 :	Effets de la galectine-3 sur l'activité des différentes régions des promoteurs de <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i>	72
Figure 44 :	Effets de la galectine-3 en présence de c-Jun ou Sp1 sur l'activité des différentes régions du promoteur de <i>MUC4</i>	73
Figure 45 :	Etude de la demi-vie des transcrits de <i>MUC1</i> et de <i>MUC4</i>	74
Figure 46 :	Représentation de la position des amorces utilisées pour la PCR réalisée dans l'expérience d'immuno-précipitation des complexes ARNm-protéines et des différentes formes d'épissage pouvant être détectées.....	75
Figure 47 :	Immunoprécipitation des ARNm de <i>MUC4</i> à l'aide des anticorps anti-galectine-3 et anti-U1 dans les cellules Sc.....	76
Discussion et perspectives de recherche		77
Figure 48 :	Rôle de la galectine-3 dans l'épissage des pré-ARNm par le biais de son interaction avec la ribonucléoprotéine U1.....	81
Figure 49 :	Représentation schématique de l'interaction entre <i>MUC4</i> et la galectine-3 intervenant dans le processus métastatique.	83
Appendice technique		89
Figure 50 :	Aspect microscopique des cellules CAPAN-1.	90
Figure 51 :	Différentes étapes de la synthèse de l'ADNc suite au traitement par la galectine-3 recombinante.....	93
Figure 52 :	Principe de la technique Taqman.....	96
Figure 53 :	Principe du <i>TA cloning kit</i>	97
Figure 54 :	Principe de l'utilisation du X-Gal lors du sous-clonage en vecteur pCR®2.1.....	98
Figure 55 :	Carte du vecteur pGL3-basique.	100
Figure 56 :	Principe des transfections cellulaires transitoires à l'Effectene.....	103
Figure 57 :	Principe de la réaction du dosage BCA.....	104
Figure 58 :	Principe de la réaction mise en jeu pour la mesure de l'activité luciférase.	105
Figure 59 :	Schéma représentant les différentes étapes d'un <i>Western Blot</i>	106
Figure 60 :	Principe de l'immunoprécipitation des <i>complexes</i> ARNm-protéines.	108

Index des tableaux

Introduction	24
Tableau I : Symptômes associés au cancer pancréatique et fréquences de leurs observations.....	29
Tableau II : Classification OMS des adénocarcinomes pancréatiques en fonction du degré de différenciation tumorale	31
Tableau III : Classification des galectines.....	54
Appendice technique	89
Tableau IV : Compositions des différents milieux de culture.....	90
Tableau V : Séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR.	94
Tableau VI : Sondes et amorces utilisées en qPCR.	96
Tableau VII : Composition du mélange réactionnel par puits lors d'une qPCR Taqman.	96
Tableau VIII : Conditions expérimentales utilisées pour les <i>Western Blot</i>	107
Tableau IX : Anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation des complexes ARNm- <i>protéines</i>	108

Liste des abréviations

aa	acide aminé
ACE	Antigène Carcino-Embryonnaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Alix/AIP-1	<i>ALG-2 interacting protein X</i>
AMOP	<i>Adhesion associated domain in MUC4 or other protein</i>
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ARE	<i>AU Rich Element</i>
ARE-BP	<i>ARE Binding Protein</i>
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASGP	<i>Ascites SialoGlycoProtein</i>
AUF1	<i>Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D</i>
BCA	Acide BiCinchoninique
Bcl-2	<i>B-Cell lymphoma 2</i>
Bcl-X _L	<i>Bcl-2-like protein 1</i>
BET	Bromure d'éthidium
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BRCA2	<i>BReast Cancer 2</i>
CA 19-9	<i>Carbohydrate Antigen 19-9</i>
Cdk	<i>Cyclin dependant kinase</i>
CDX	<i>Caudal-Related homeobox transcription factor</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CREB	<i>cAMP-Response Element Binding protein</i>
Ct	carboxy-terminal
DNase	DésoxyriboNucléase
dNTP	désoxyNucléotide TriPhosphate
DO	Densité Optique
DPC4	<i>Deleted in pancreatic cancer locus 4</i>
DUPAN-2	<i>Duke pancreatic monoclonal antigen type 2</i>
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	<i>Oestrogen Receptor</i>
ErbB2	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
FOX	<i>Forkhead box</i>
5-FU	5 Fluoro-Uracile

GDP	Guanosine diphosphate
GSK3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 β</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HNF	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
HuR	<i>Human antigen R</i>
ICAM1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
INK4	<i>Inhibitors of CDK4</i>
IPMN	<i>Intraductal papillary mucinous neoplasm</i>
IRP	<i>Iron Regulatory Protein</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
K-Ras	<i>Kirsten rat 2 viral oncogene</i>
LAMP	<i>Lysosome Associated Membrane Protein</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPH	<i>Lactase Phlorizin Hydrolase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MCN	<i>Mucinous cystic neoplasm</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
m/v	masse/volume
<i>MUC</i>	gène de mucine humain
Myc	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
NIDO	<i>Nidogen</i>
NFKB	<i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NP-40	Nonidet P40
Nt	amino-terminal
PABP	<i>PolyA Binding Protein</i>
PanIN	<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>
pb	paire de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDAC	<i>Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma</i>
PEA3	<i>Polyomavirus Enhancer Activator 3</i>
PI3K	<i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
PK-A/-C	<i>Protein Kinase A/C</i>
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

qPCR	PCR quantitative
RAR- α	<i>Retinoic acid receptor α</i>
RLB	<i>Reporter Lysis Buffer</i>
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RNase	RiboNucléase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SEA	<i>Sea-urchin sperm protein, Enterokinase, Agrin</i>
Ser	sérine
SH2	<i>Src homology 2</i>
sh-RNA	<i>short hairpain RNA</i>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
SMC	<i>Sialomucin Complex</i>
Sp1	<i>Specific protein 1</i>
SR	<i>serine/arginine-rich</i>
SRSF1	<i>serine/arginine-rich splicing factor 1</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SVF	Sérum de veau foetal
T°	Température
T°amb.	Température ambiante
TBS	Tampon Tris-HCl Salin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIA-1	<i>T-cell intracytoplasmic antigen 1</i>
Tm	<i>Melting Temperature</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP53	<i>Tumor Protein p53</i>
TR	<i>Tandem Repeat</i>
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)aminoéthane
TTF-1	<i>Thyroid Transcription Factor-1</i>
TTP	<i>Tristetrapolin</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>
v/v	volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Introduction

I. Pancréas et Adénocarcinome pancréatique canalaire

I.1. *Pancréas sain*

I.1.1. *Anatomie*

Le pancréas est un organe rétropéritonéal, situé derrière l'estomac, devant et au dessus des reins. Mesurant 15 à 20 cm de long, il pèse 80 g environ (figure 1A). Il est aplati d'avant en arrière et peut être divisé en quatre parties : la tête, l'isthme, le corps et la queue. La tête, située dans le cadre duodénal, représente la partie la plus volumineuse de cet organe et est reliée par un isthme au corps du pancréas. La queue est la portion terminale et la plus petite du pancréas (figure 1B) (Gilly, 2007).

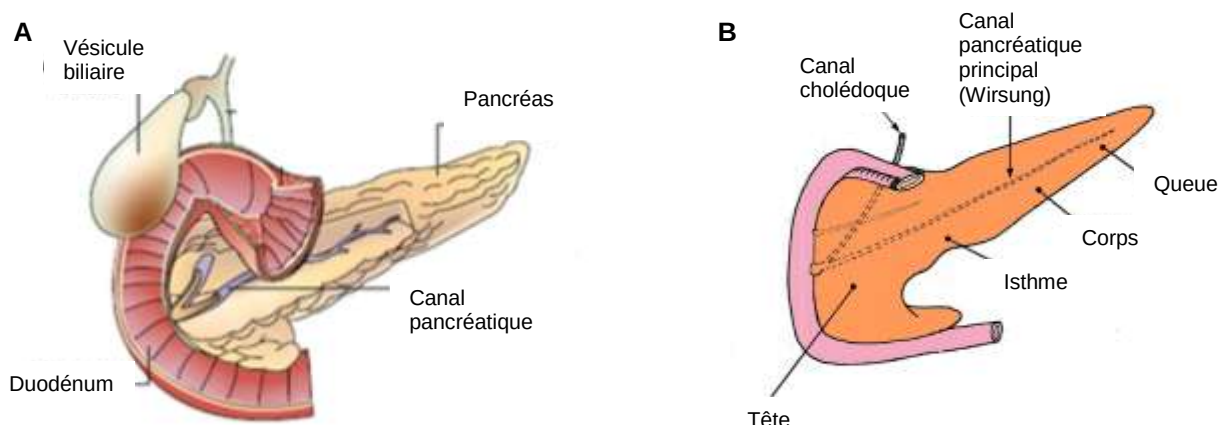


Figure 1 : Anatomie du pancréas.

(A) Localisation du pancréas à proximité du duodénum et de la vésicule biliaire (Bardeesy *et al.*, 2002).

(B) Différentes régions du pancréas : la tête, l'isthme, le corps et la queue (Fischer *et al.*, 2007).

I.1.2. *Physiologie*

a. *Le pancréas : une glande mixte*

Le pancréas est une volumineuse glande amphicrine, c'est-à-dire constituée de tissu exocrine et endocrine. Chez l'adulte, les cellules exocrines représentent environ 95 % du volume pancréatique (85 % de cellules acineuses et 10 % de cellules canalaire), alors que les cellules endocrines ne constituent qu'1 à 2 % du volume du pancréas (Pour *et al.*, 2003). Cette glande mixte exerce ainsi deux fonctions :

- elle participe à la digestion grâce à ses sécrétions exocrines qui forment le suc pancréatique,
- elle joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme glucidique *via* ses sécrétions endocrines.

b. Pancréas exocrine

Le pancréas exocrine est formé essentiellement de deux types cellulaires : les cellules acineuses d'une part et les cellules canalaire et centro-acineuses d'autre part.

Les cellules acineuses sont groupées en acini sécréteurs disposés en grappes (figure 2A et 2B). Elles sécrètent des enzymes participant à la digestion (protéases, amylase, nucléases, etc.) synthétisées sous formes inactives ; on parle alors de zymogènes. Ceci empêche la formation d'enzymes actives dans la glande pancréatique.

Les cellules canalaire et centro-acineuses forment les canaux excréteurs et élaborent une sécrétion aqueuse riche en bicarbonates qui forme, avec les enzymes sécrétées par les cellules acineuses, le suc pancréatique. Ces canaux constituent d'abord un système de conduits ramifiés faisant suite aux acini et sont appelés canaux intercanalaires. Ils deviennent ensuite des canaux intralobulaires puis interlobulaires qui se réunissent enfin en canaux collecteurs (canal de Wirsung et canal de Santorini) (Catala, 2007).

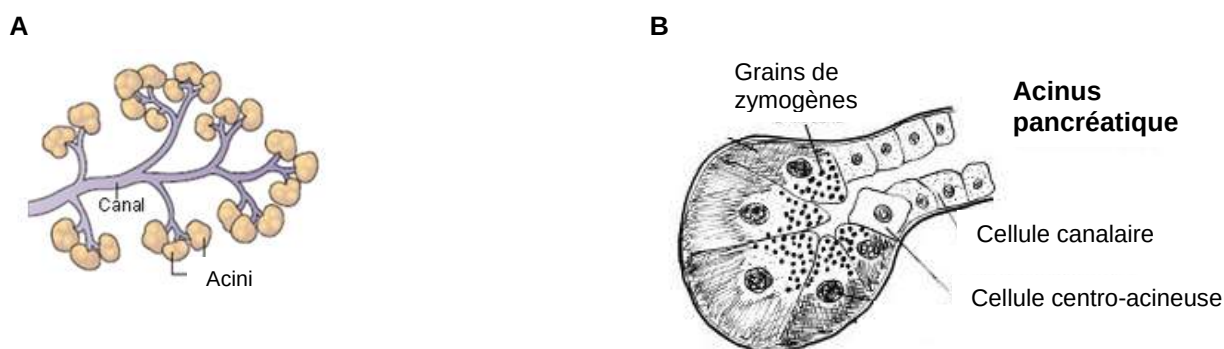


Figure 2 : Pancréas exocrine.

(A) Acini regroupés en grappes (Bardeesy *et al.*, 2002).

(B) Représentation schématisée d'un acinus pancréatique (Balas, 2010).

c. Pancréas endocrine

Le pancréas endocrine est constitué de petits îlots disséminés dans le parenchyme exocrine, les îlots de Langerhans. Leur diamètre est compris entre 100 et 300 μm et ils ne représentent qu'environ 1 à 2 % du volume de la glande. Les îlots de Langerhans synthétisent principalement quatre hormones, chacune étant produite par un type cellulaire différent (figure 3) :

- L'insuline est synthétisée par les cellules β des îlots. C'est la seule hormone hypoglycémisante ;
- Le glucagon, produite par les cellules α , est une hormone hyperglycémisante ;
- La somatostatine est synthétisée par les cellules δ . Elle exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline et de glucagon. Elle inhibe également la contraction de la vésicule biliaire et la motilité intestinale ;

- Le polypeptide pancréatique est produit par les cellules PP. Son rôle physiologique exact n'est pas entièrement déterminé.

Les îlots de Langerhans sont constitués respectivement de 20 %, 70 %, 5 % et 5 % de cellules α , β , δ et PP. L'organisation de ces types cellulaires est particulière : les îlots de Langerhans sont constitués d'une masse centrale de cellules productrices d'insuline (cellules β) alors que les autres types cellulaires se retrouvent à la périphérie des îlots. De plus, la proportion de chacune de ces cellules varie selon la localisation des îlots au sein du pancréas (Saumet, 2010).

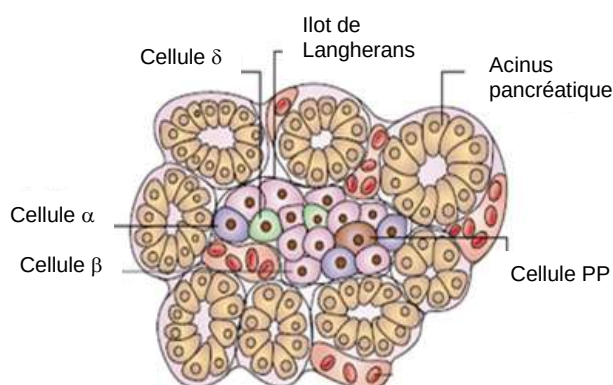


Figure 3 : Représentation schématique d'un îlot de Langerhans.

Il est constitué de cellules α , β , δ et PP, et est entouré de tissu pancréatique exocrine (Bardeesy *et al.*, 2002).

1.2. Types de cancers pancréatiques

Les tumeurs du pancréas peuvent être bénignes ou malignes, solides ou kystiques, développées à partir du tissu exocrine ou endocrine. Ces différents types tumoraux sont associés à des présentations cliniques et à des pronostics très différents (Lévy, 2009).

Le cancer du pancréas exocrine ou adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC) représente 90 % des tumeurs pancréatiques (dans 70 % des cas, ces tumeurs sont situées au niveau de la tête du pancréas, 20 % siègent dans le corps et 10 % dans la queue). Les 10 % restants des cancers pancréatiques sont constitués par de nombreux types histologiques beaucoup plus rares nécessitant des prises en charge spécifiques. On peut citer par exemple les cystadénomes séreux, les tumeurs endocrines, les carcinomes à cellules acineuses, les pancréatoblastomes et les néoplasies pseudopapillaires (Hezel *et al.*, 2006). Notre étude ne portera que sur l'adénocarcinome pancréatique canalaire.

I.3. Adénocarcinome pancréatique canalaire

I.3.1. Epidémiologie

L'adénocarcinome pancréatique canalaire représente la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux (Kohler *et al.*, 2011). Diagnostiqué le plus souvent entre 60 et 70 ans, sa découverte est le plus souvent réalisée à un stade avancé du fait de l'expression clinique tardive de la maladie, expliquant ainsi que seuls 20 % des patients sont diagnostiqués à un stade où la tumeur est encore résécable chirurgicalement. Tous stades confondus, la survie à 5 ans est inférieure à 5 %. En cas de chirurgie suivie de chimiothérapie, elle se situe entre 10 et 30 % à 5 ans (figure 4) (Bardeesy *et al.*, 2002).

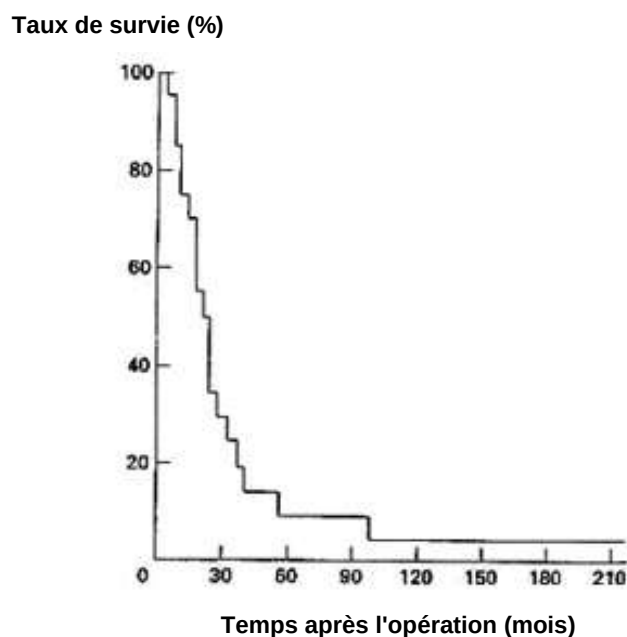


Figure 4 : Courbe de survie globale chez les malades opérés d'un adénocarcinome pancréatique (Société Nationale Française de Gastroentérologie : www.snfge.org).

I.3.2. Facteurs de risque

Les facteurs de risque reconnus pour favoriser le développement de ce cancer incluent le tabagisme, les affections pancréatiques (diabète, pancréatite alcoolique et pancréatite chronique héréditaire). Certaines associations syndromiques sont associées à un risque accru de développer cette pathologie, notamment le syndrome de Peutz-Jeghers (polypose hamartomatose du tube digestif), le cancer du colon non polyposique héréditaire (syndrome HNPCC), le syndrome FAMMM (*Familial atypical multiple mole-melanoma*) et les formes familiales du cancer du sein avec mutation du gène *BRCA2* (*BReast Cancer 2*) (Buscail and Bournet, 2006).

1.3.3. Symptômes

Le diagnostic est le plus souvent tardif du fait d'une expression clinique à un stade avancé de ce cancer. De plus, la symptomatologie diffère selon la localisation tumorale. Lorsqu'il est situé au niveau de la tête du pancréas, l'adénocarcinome pancréatique canalaire est révélé par un ictère cholestatique sans fièvre pouvant être accompagné d'un prurit, d'une vésicule biliaire dilatée, d'une altération de l'état général avec amaigrissement et parfois de douleurs abdominales. En cas de tumeur située au niveau du corps ou de la queue du pancréas, le diagnostic peut être posé face à une douleur de l'hypochondre gauche isolée mais cette localisation est souvent asymptomatique, l'altération de l'état général étant dans ce cas révélatrice. Plus rarement, ce cancer peut être mis en évidence suite à la survenue d'un diabète de type 2 chez un homme de plus de 40 ans sans antécédents familiaux de diabète et sans obésité ou suite à l'aggravation d'un diabète préexistant. Une pancréatite aiguë peut également être révélatrice (Tableau I) (Fischer *et al.*, 2007 ; Vincent *et al.*, 2011 ; www.has-sante.fr).

Tableau I : Symptômes associés au cancer pancréatique et fréquences de leurs observations (www.snfge.org).

Signes cliniques	Fréquences (%)
Douleurs abdominales	60-80
Amaigrissement (souvent massif et rapide)	50-80
Ictère	40-80
Prurit	25
Thrombophlébite	<15
Vomissements	<15
Pancréatite aiguë	<15

1.3.4. Diagnostic

Le diagnostic du cancer pancréatique est habituellement posé lorsqu'apparaissent les signes cliniques d'appel et repose sur différents éléments présentés ci-dessous.

a. Imagerie

En présence de symptômes peu spécifiques, le bilan débute généralement par une échographie. Celle-ci est parfois suffisante pour poser le diagnostic. En situations douteuses, le scanner avec injection de produit de contraste est l'examen de référence pour le diagnostic positif et le bilan d'extension. L'écho-endoscopie est utile en cas de doute au

scanner ou de petite tumeur pancréatique (inférieure à 2 cm) (Fischer *et al.*, 2007 ; Massard, 2005).

b. Bilan biologique

Le bilan biologique cherchera à objectiver une cholestase (dosage de la bilirubine et des phosphatases alcalines) et un diabète. Le dosage du CA 19-9 (*Carbohydrate Antigen 19-9*) n'a pas d'intérêt car ce marqueur n'est ni sensible (en particulier pour les petites tumeurs) ni spécifique. En effet, il peut s'élever en cas de cancer ovarien ou d'un autre organe digestif et même dans certaines affections bénignes telles que les cholestases ou le diabète. Il est surtout utile pour la surveillance évolutive du cancer pancréatique (Lévy, 2009).

D'autres marqueurs peuvent être recherchés tels que :

- l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) ; il présente un intérêt dans la surveillance de ce cancer (Yzet, 2005) ;
- le marqueur sérique DU-PAN-2 (*Duke pancreatic monoclonal antigen type 2*), motif glycanique de la mucine MUC1 ; (Yzet, 2005) ;
- la mutation de l'oncogène K-Ras (*Kirsten rat 2 viral oncogene*) ; cette mutation peut être recherchée dans le suc pancréatique ou dans le produit de brossage pancréatique obtenus par écho-endoscopie (Goggins *et al.*, 2005).

c. Confirmation histologique

La confirmation histologique sur biopsie est indispensable avant tout traitement par radiothérapie ou chimiothérapie (figure 5). Les critères de Kloppel permettent de classer la tumeur en grade I, II ou III selon son degré de différenciation. Pour cela, le pathologiste prend en compte l'architecture, les atypies nucléaires, le niveau de mucosécrétion et le nombre de mitoses observées (Chatelain and Flejou, 2004) (Tableau II).

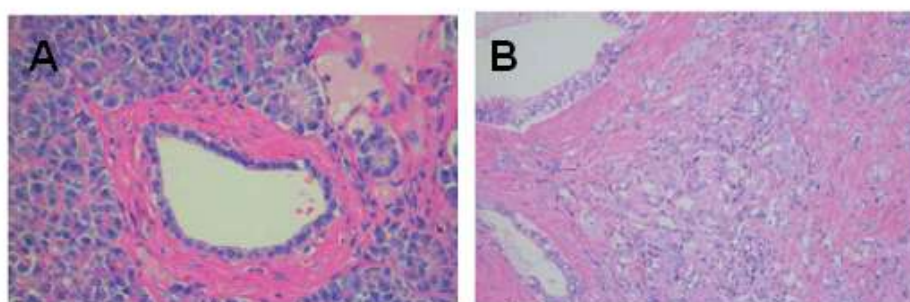


Figure 5 : Coupes histologiques de tissu pancréatique sain et d'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC) (A : canal pancréatique sain, B : PDAC.) (Nagata *et al.*, 2007).

Tableau II : Classification OMS des adénocarcinomes pancréatiques en fonction du degré de différenciation tumorale (d'après Chatelain and Flejou, 2004).

Grade tumoral	Différenciation glandulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique (10 champs, x40)	Mucosécrétion
1	Bien différenciée	Minimes, noyaux polarisés	< 5 mitoses	Abondante
2	Moyennement différenciée	anisonucléose, nucléole proéminent	5 à 10 mitoses	Peu marquée
3	Peu différenciée	Noyaux élargis, irréguliers, hyperchromatiques	> 10 mitoses	Minime

d. Bilan d'extension

La recherche de métastases viscérales et ganglionnaires repose en première intention sur le scanner thoraco-abdomino-pelvien en coupes fines. L'écho-endoscopie peut apporter des éléments complémentaires pour évaluer l'extension tumorale. (Thésaurus de cancérologie ; Lévy, 2009).

1.3.5. Dépistage

Un des enjeux importants pour diminuer la mortalité de ce cancer est d'en faire le diagnostic à un stade précoce. Toutefois, à l'inverse du cancer du côlon, il n'existe pas de dépistage du cancer du pancréas organisé dans la population générale. Ceci est lié à l'absence de définition de groupes à risque en dehors des cas particuliers cités ci-dessus et au manque d'examens facilement réalisables et peu coûteux ayant une spécificité et une sensibilité suffisantes (Lévy, 2009).

Actuellement, parmi les marqueurs biologiques, le dosage de l'antigène CA19-9 est peu contributif à cause de ses inconvénients cités précédemment. Parmi les techniques d'imagerie, l'écho-endoscopie est la méthode de choix car elle permet de détecter des lésions pancréatiques de petites tailles (Rosty, 2004 ; Hammel, 2006). Il apparaît donc nécessaire de découvrir de nouveaux biomarqueurs pour diagnostiquer précocement ce cancer.

1.3.6. Traitements

a. Chirurgie

La chirurgie d'exérèse tumorale avec curage ganglionnaire est le seul traitement curatif des cancers pancréatiques (figure 6). Elle doit être systématiquement envisagée, en

l'absence de métastases, après évaluation de la résécabilité tumorale et prise en compte des comorbidités du patient. Le type d'opération chirurgicale est adapté à la situation clinique et notamment à la localisation de la tumeur (opération de Whipple, spléno pancréatectomie gauche ou caudale) (figure 6) (Freelove and Walling, 2006).

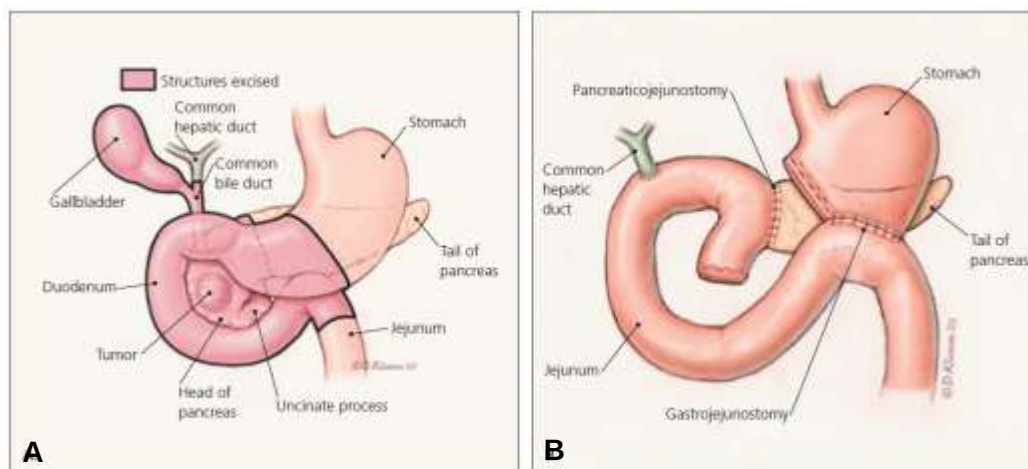


Figure 6 : Opération de Whipple (duodéno-pancréatectomie céphalique) : (A) avant intervention ; (B) après chirurgie (Freelove and Walling, 2006).

Cette intervention est pratiquée lorsque la tumeur se trouve au niveau de la tête du pancréas. Elle consiste à retirer la tête du pancréas, une partie de l'estomac et de l'intestin grêle, le canal cholédoque, la vésicule biliaire et les ganglions lymphatiques voisins. Les sécrétions hépatiques et pancréatiques sont ensuite mises en continuité avec le tube digestif grâce à une chirurgie reconstructrice.

En complément de la chirurgie, des cures de chimiothérapie adjuvante par gemcitabine sont recommandées. L'association d'une radio-chimiothérapie à base de 5 fluoro-uracile (5-FU) peut être discutée dans certains cas (Yzet, 2005).

b. Chimiothérapie

Si la tumeur n'est pas opérable (c'est-à-dire pour les tumeurs localement avancées non métastatiques et dans les situations métastatiques), le patient bénéficie d'une chimiothérapie en complément des traitements symptomatiques (chirurgie de dérivation, support nutritionnel, traitement antalgique, soutien psychologique) (Fischer *et al.*, 2007).

Le traitement de référence repose sur l'utilisation de la gemcitabine en monothérapie (Saif, 2011). Il s'agit d'un analogue synthétique fluoré de la désoxycytidine exerçant son action par le biais de deux mécanismes (figure 7). D'une part, cet agent anticancéreux empêche la synthèse d'ADN en s'incorporant dans les brins d'ADN en élongation. D'autre part, il inhibe la ribonucléotide réductase, enzyme nécessaire à la synthèse des nucléotides. Cette dernière action entraîne un déficit de désoxycytidine triphosphate dans la cellule, favorisant l'incorporation de la gemcitabine triphosphate dans l'ADN (Mini *et al.*, 2006).

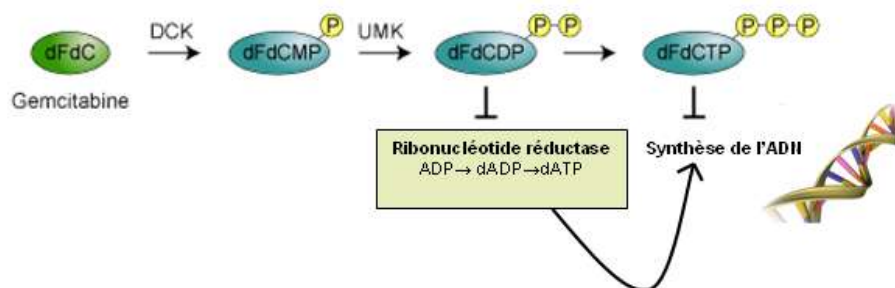


Figure 7 : Mode d'action de la gemcitabine (adapté de www.invivogen-therapeutics.com).
Son principe d'action est basé sur l'inhibition de la ribonucléotide réductase et l'incorporation des dérivés fluorés dans l'ADN.

Récemment, un essai clinique de phase III a mis en évidence que l'utilisation du protocole FOLFIRINOX (association d'oxaliplatine, d'irinotécan, de leucovorine et de 5-FU) permet d'augmenter la survie des patients par rapport au traitement basé sur la gemcitabine seule (survie de 11,1 mois avec FOLFIRINOX *versus* 6,8 mois avec la gemcitabine) (Saif *et al.*, 2011).

c. Radio-chimiothérapie

La radio-chimiothérapie (radiothérapie associée au 5 FU) peut être utilisée après la chirurgie dans l'objectif de diminuer les rechutes locales. Elle est également envisageable en complément de traitement pour les patients ne présentant pas de métastases et ne progressant pas sous chimiothérapie seule (Fischer *et al.*, 2007).

d. Nouveaux traitements

D'autres procédés thérapeutiques sont en cours d'étude comme l'immunothérapie passive à l'aide d'anticorps ciblant des protéines anormales (K-Ras, MUC1) exprimées par les cellules cancéreuses (Jonckheere *et al.*, 2010). Des protocoles d'immunothérapie active stimulant la production d'anticorps par le patient sont également testés ; c'est le cas par exemple du vaccin peptidique basé sur l'utilisation du peptide K-Ras muté (Koido *et al.*, 2011). Enfin, de nouveaux traitements sont en cours d'évaluation tels que les inhibiteurs d'angiogenèse, la thérapie ciblée utilisant des molécules dirigées contre les tyrosines kinases, etc. (Hingorani and Izeradjene, 2007).

I.4. Carcinogénèse pancréatique

I.4.1. Lésions précurseurs de l'adénocarcinome pancréatique canalaire

Des études cliniques ont permis d'identifier trois types de lésions précurseurs de l'adénocarcinome pancréatique (figure 8) : les PanIN (*pancreatic intraepithelial neoplasia* ou néoplasie intraépithéliale pancréatique), les MCN (*mucinous cystic neoplasm* ou néoplasie mucineuse kystique) et les IPMN (*intraductal papillary mucinous neoplasm* ou néoplasie mucineuse papillaire intracanaulaire) (Hezel *et al.*, 2006).

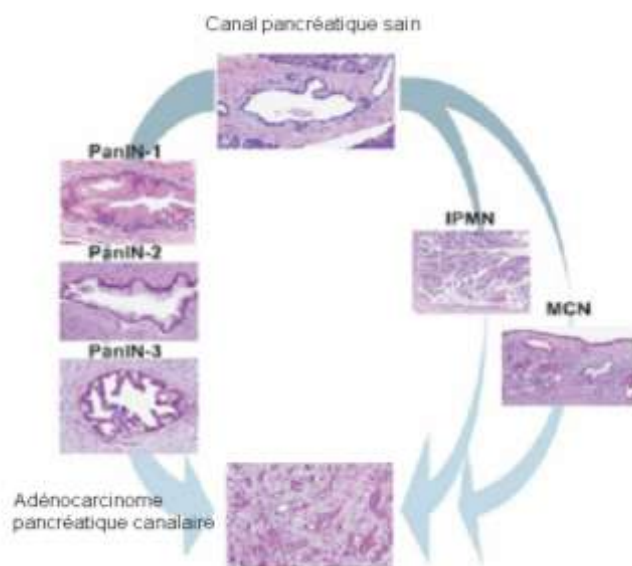


Figure 8 : Lésions précurseurs de l'adénocarcinome pancréatique canalaire (d'après Hezel *et al.*, 2006).

Parmi les lésions précurseurs de ce cancer, les plus étudiées sont les PanIN. Celles-ci sont divisées en stades progressifs (figure 9) : PanIN-1A, -1B, -2 et -3 et représentent l'évolution d'une prolifération intracanaulaire vers un carcinome invasif. Les stades PanIN-1A et -1B correspondent à des lésions de type hyperplasie sans dysplasie, PanIN-2 est associé à une dysplasie variable et PanIN-3 correspond à un carcinome *in situ* (Bardeesy *et al.*, 2002) (figure 10).

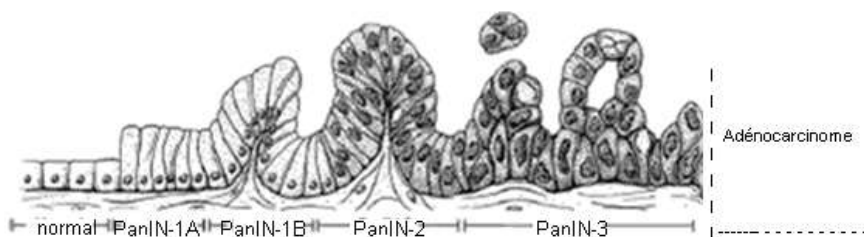


Figure 9 : Modèle de progression de l'adénocarcinome pancréatique (d'après Hruban *et al.*, 2000).

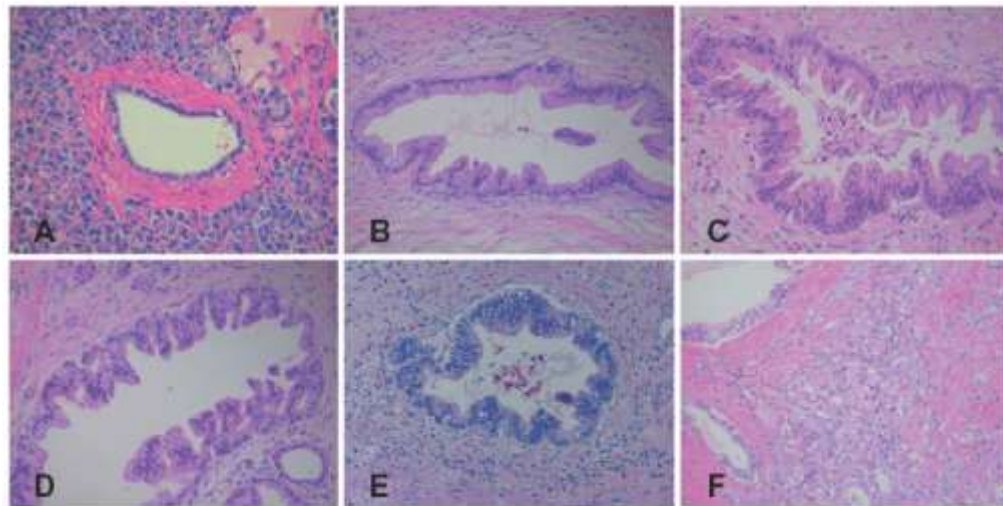


Figure 10 : Coupes histologiques de tissu pancréatique sain (A), de PanIN (B : PanIN-1A, C : PanIN-1B, D : PanIN-2, E : PanIN-3) et d'adénocarcinome pancréatique canalaire (F) (Nagata *et al.*, 2007).

1.4.2. Altérations génétiques

De façon générale, l'activation d'oncogènes et la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs conduisent à la croissance non contrôlée et autonome des cellules cancéreuses et contribuent à la tumorigenèse.

La progression tumorale pancréatique est associée à des modifications cytologiques et à l'accumulation d'altérations génétiques (figure 11). Dans le modèle de progression moléculaire décrit par Hruban *et al.* (2000), des anomalies génétiques variées s'accumulent dès les stades PanIN-1 (activation de *KRAS*, surexpression d'*ERBB2*) et PanIN-2 (inactivation de *INK4*) jusqu'au stade PanIN-3 (inactivation de *TP53*, *BRCA2*, *DPC4*).

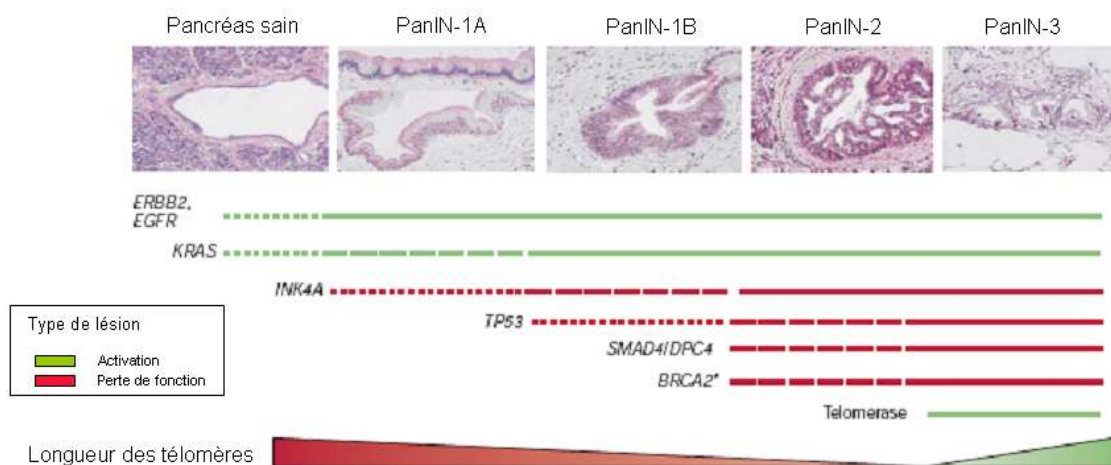


Figure 11 : Modèle de progression des anomalies génétiques observées au cours de la carcinogenèse pancréatique (Bardeesy *et al.*, 2002).

En plus des mutations ou des pertes alléliques, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par un mécanisme épigénétique est fréquente. Celui-ci est médié par hyperméthylation des îlots CpG situés dans les régions promotrices de ces gènes. L'hyperméthylation se produit lors des stades PanIN-2 et -3 et par conséquent, l'exploitation diagnostique de ce phénomène, c'est-à-dire la détection de la méthylation aberrante de l'ADN dans les échantillons, constituerait une stratégie pour la détection précoce de l'adénocarcinome pancréatique canalaire (Feldmann and Maitra, 2008).

I.4.3. Modification de l'expression des mucines

Le profil d'expression des mucines est modifié au cours des différentes étapes de la cancérogénèse pancréatique. L'étude simultanée du niveau d'expression de MUC1, MUC2, MUC4 et MUC5AC constituerait une stratégie efficace pour la détection précoce des lésions pancréatiques ainsi que pour l'évaluation de leur degré de malignité et leur classification (Yonezawa *et al.*, 2010). Ainsi, MUC1 est surexprimée dès les premiers stades de la cancérogénèse, MUC4 et MUC5AC sont néoexprimées alors que MUC2 reste absente du tissu tumoral (figure 12).

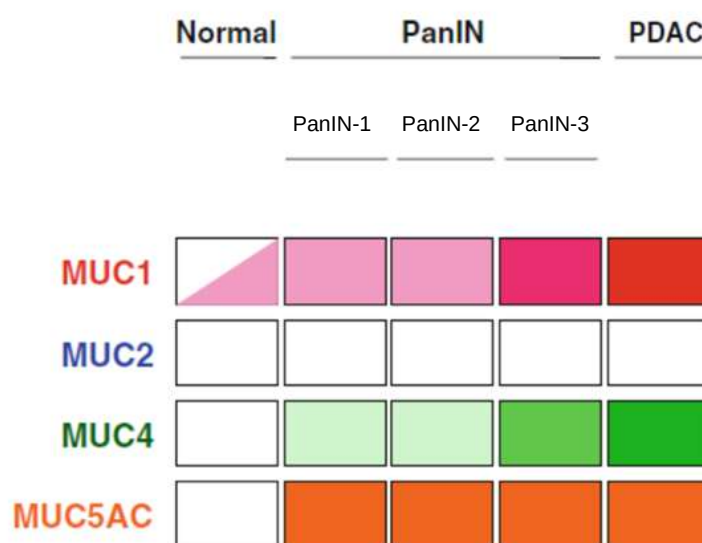


Figure 12 : Profil d'expression des mucines MUC1, MUC2, MUC4 et MUC5AC au cours des différentes étapes de la cancérogénèse pancréatique (d'après Yonezawa *et al.*, 2010).
L'intensité de la couleur correspond à la fréquence d'expression de la mucine associée.

II. Mucines

II.1. *Structure*

Les mucines sont des protéines O-glycosylées de masse moléculaire élevée. Leur squelette protéique, appelé apomucine (figure 13), comporte des séquences d'acides aminés (aa) répétées en tandem riches en résidus sérines, thréonines et prolines (20 à 55 % de la composition en aa). Sur les résidus sérines et thréonines viennent se greffer des chaînes O-glycanniques (60 à 80 % du poids sec). Les résidus prolines assurent à la protéine une conformation nécessaire à sa glycosylation et au maintien de l'apomucine sous forme étirée. Les chaînes O-glycanniques sont formées de galactose, fucose, N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine et d'acide neuraminique. L'assemblage des chaînes O-glycosidiques conduit à une grande diversité de structures glycanniques différant par leur composition, leur longueur (2 à 20 résidus de sucres) et leur acidité. La présence de résidus sulfates et d'acides neuraminiques confère aux mucines des propriétés polyanioniques. Ainsi, elles sont classées en trois catégories selon leur charge : les mucines neutres pauvres en résidus acides (fucomucines), les mucines acides riches en résidus d'acides N-acétylneuraminiques (sialomucines) et les mucines très acides riches en résidus sulfates (sulfomucines). Les extrémités carboxy- et amino-terminales sont caractérisées par leur richesse en résidus cystéines et/ou par la présence de sites de N-glycosylation (Porchet and Aubert, 2004 ; Groux-Degroote *et al.*, 2008).

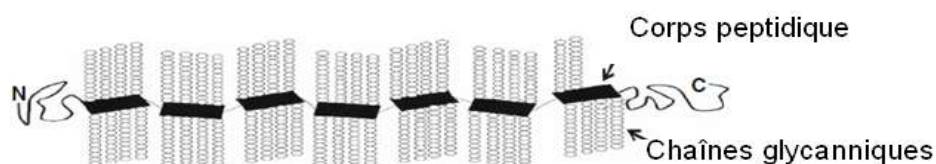


Figure 13 : Structure générale d'une mucine (d'après Yonezawa *et al.*, 2010).

Une mucine est constituée d'un squelette protéique (apomucine) sur lequel viennent se greffer des chaînes glycanniques.

Selon leurs propriétés structurales, les mucines sont classées en deux catégories principales : les mucines sécrétées et les mucines membranaires (Porchet and Aubert, 2004 ; Jonckheere and Van Seuning, 2008b) :

- Les mucines sécrétées comprennent deux sous-types : les mucines solubles et celles participant à la formation du gel de mucus. Ces dernières (MUC2, -5AC, -5B, -6 et -19), exprimées par des cellules épithéliales spécialisées dans le stockage et la sécrétion apicale des mucines, forment des oligomères et des multimères responsables de la formation du réseau tridimensionnel du gel de mucus grâce à leurs domaines N- et C-terminaux riches en

résidus cystéines. Les mucines solubles (MUC7 et MUC9) sont plus petites, ne forment pas de gel, et sont surtout exprimées dans les sécrétions moins visqueuses telles que les sécrétions salivaires et lacrymales.

- Les mucines membranaires (MUC1, -3A, -3B, -4, -12, -13, -15, -16, -17, -20 et -21), sont définies par la présence d'un domaine hydrophobe transmembranaire unique suivi d'un court domaine cytoplasmique associé à des éléments du cytosquelette ou à des protéines adaptatrices (figure 14). Elles sont exprimées par de nombreux types de cellules épithéliales non spécialisées dans la mucosécrétion. Parmi les mucines de cette catégorie, MUC1 et MUC4 sont les mieux caractérisées.

- A ces deux catégories s'ajoutent les mucines MUC8 et MUC18 appartenant au groupe des mucines non classées.

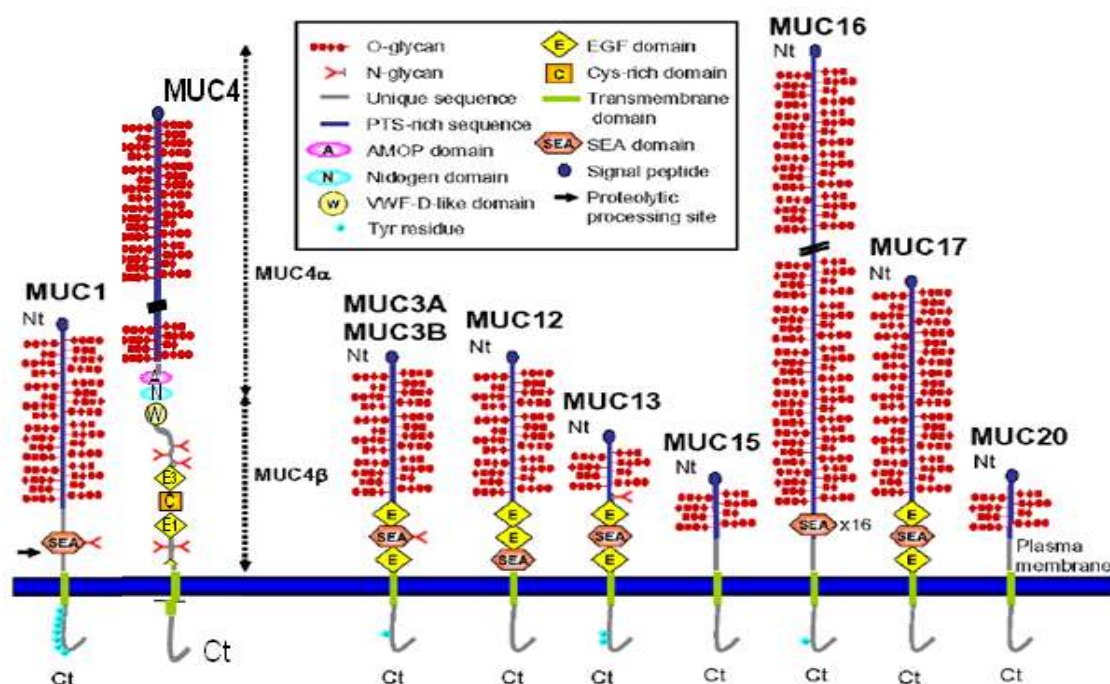


Figure 14 : Représentation schématique des mucines membranaires (Jonckheere and Van Seuning, 2008b).

II.2. Fonctions

Les mucines sécrétées entrent dans la composition du mucus, gel hydraté recouvrant les épithéliums bordant la lumière des tracts digestif, respiratoire et génital. Il est constitué de 95 % d'eau et les 5 % restants sont formés d'électrolytes, de constituants lipidiques, de mucines ainsi que de différentes protéines exerçant un rôle de protection (le lysosyme, les défensines, les inhibiteurs de protéases, etc.) Les mucines sécrétées contribuent aux propriétés rhéologiques et biologiques du mucus (figure 15). Elles jouent un rôle important de protection des épithéliums (hydratation, lubrification, protection contre les pathogènes),

leur glycosylation créant un environnement hydrophile idéal pour ces fonctions (Porchet and Aubert, 2004).

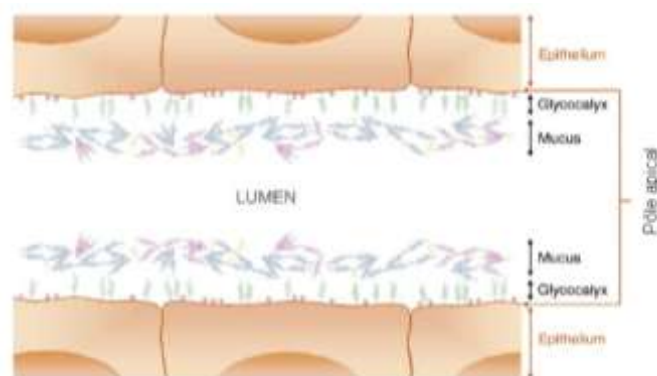


Figure 15 : Rôle des mucines sécrétées dans la protection des épithélium (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

Les mucines membranaires, exprimées à la surface cellulaire, participent à la formation du gel de mucus, aux interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire et interviennent dans la signalisation cellulaire (figure 16). Ainsi, MUC1 est impliquée dans la transduction de signaux *via* sa queue cytoplasmique qui possède des sites de phosphorylation (Carraway *et al.*, 2003). La mucine MUC4 exerce, quant à elle, la fonction de co-récepteur par le biais de ses domaines de type *Epidermal Growth Factor (EGF) like* localisés au niveau extracellulaire à proximité de son domaine transmembranaire (Jonckheere and Van Seuning, 2008a).

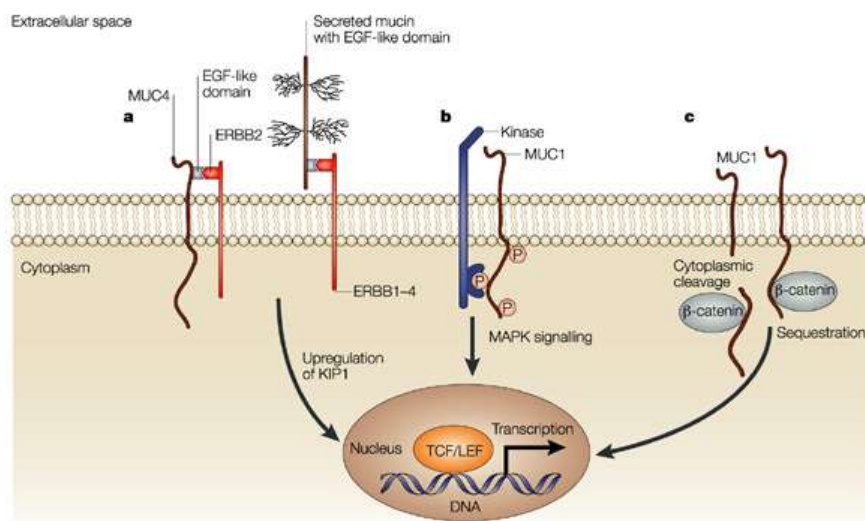


Figure 16 : Rôle des mucines membranaires dans la transduction de signaux (Hollingsworth and Swanson, 2004).

L'expression des mucines est régulée de façon spatiotemporelle. Elle dépend également de l'état du tissu (sain, inflammatoire ou cancéreux) et de son stade de développement (Audié *et al.*, 1993). Les mucines sont retrouvées au niveau des épithéliums digestif, respiratoire et uro-génital (figure 17) (Andrianifahanana *et al.*, 2006).

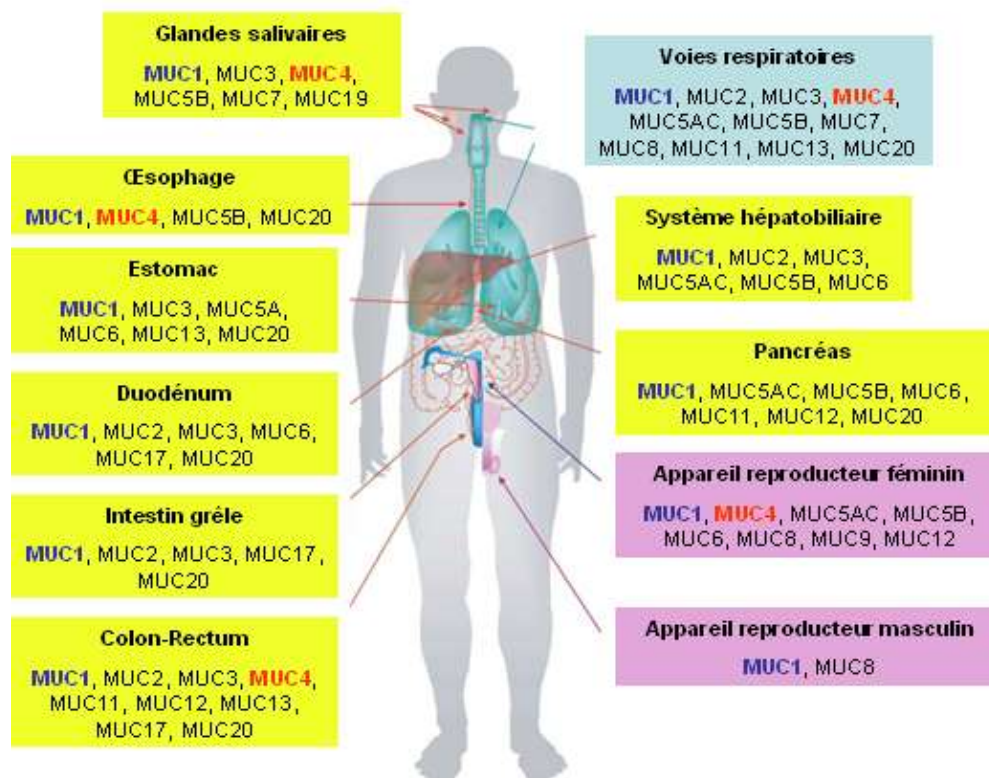


Figure 17 : Sites d'expression des mucines chez le sujet sain (adapté de Andrianifahanana *et al.*, 2006) : épithéliums digestif (jaune), respiratoire (bleu) et urogénital (rose).

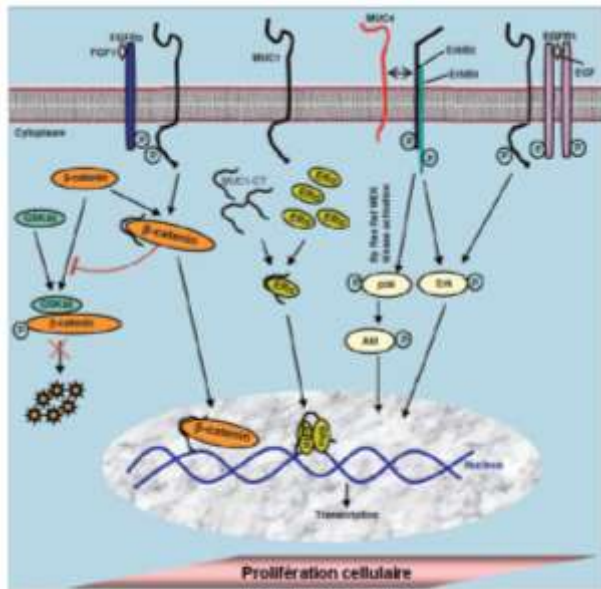
II.3. Mucines et cancérogénèse

Les mucines sont impliquées dans la pathogenèse des cancers. En effet, des modifications de leur expression et de leur glycosylation y sont fréquemment observées. Ces changements influencent la croissance cellulaire, l'adhésion et l'invasion cellulaire ainsi que la surveillance immunitaire (Hollingsworth and Swanson, 2004).

Ainsi, la surexpression des mucines membranaires participe à l'oncogenèse par l'activation de voies de signalisation favorisant la croissance et la survie cellulaire et affectant le processus apoptotique (figure 18A). Ces phénomènes se produisent le plus souvent après la perte de la polarité cellulaire qui conduit à une distribution circonférentielle des mucines, celles-ci étant normalement localisées au pôle apical des cellules épithéliales saines (figure

18B). Cette modification de localisation permet leur interaction avec des molécules normalement exprimées au pôle basolatéral, comme les récepteurs à activité tyrosine kinase, favorisant ainsi la prolifération et la survie cellulaire (figure 18A) (Singh and Hollingsworth, 2006).

A



B

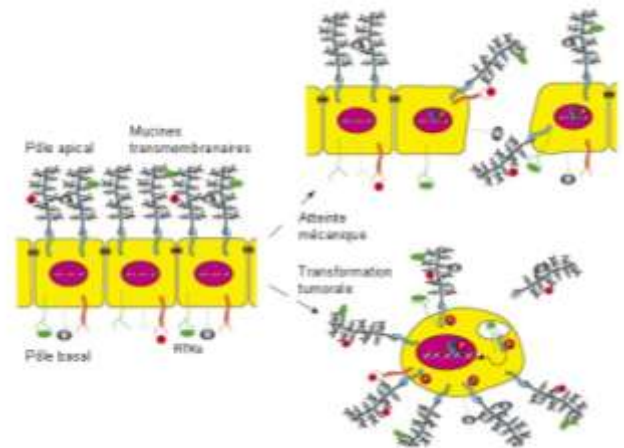


Figure 18 : Mucines et cancérogénèse.

(A) Activation des voies de signalisation par les mucines membranaires conduisant à la prolifération cellulaire (Bafna et al., 2010).

(B) Délocalisation des mucines après perte de la polarité cellulaire (Singh and Hollingsworth, 2006). Il en résulte une interaction avec certains récepteurs à activité tyrosine kinase normalement localisés au pôle basolatéral de la cellule épithéliale.

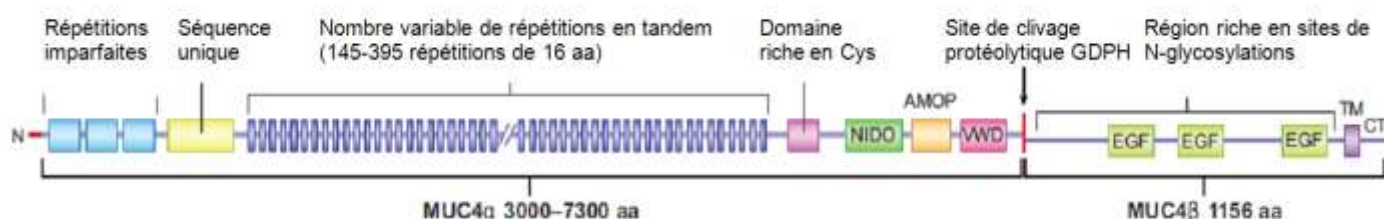
III. MUC4

III.1. *Structure*

La mucine membranaire MUC4 est synthétisée sous forme d'un précurseur unique de 550 à 930 kDa selon la taille du domaine central répété en tandem. La partie N-terminale de la protéine comprend un peptide signal de 27 aa suivi de trois motifs de répétitions imparfaites variant de 126 à 130 aa et d'une séquence unique de 554 aa. Le domaine central est constitué d'un nombre variable de répétitions parfaites en tandem d'un motif de 16 aa (145 à 395 répétitions) générant un polymorphisme inter-individuel de longueur de type VNTR (nombre variable de répétitions en tandem). La partie C-terminale est constituée de 12 domaines distincts (CT1 à CT12) comprenant un domaine NIDO homologue du domaine

angiogène de la protéine nidogène, un domaine AMOP (*Adhesion associated domain in MUC4 or other protein*), deux domaines riches en résidus cystéines, trois domaines *Epidermal Growth Factor* (EGF) *like*, un domaine transmembranaire et enfin un domaine cytoplasmique. Entre les domaines CT4 et -5 se trouve un site de clivage protéolytique « GDPH » situé au sein de la séquence glycine-acide aspartique-proline-histidine (figure 19A) (Chaturvedi *et al.*, 2008). En effet, après sa sortie du réticulum endoplasmique, le précurseur de MUC4 est clivé en deux sous-unités associées de façon non covalente : MUC4 α est la sous-unité *mucin like* extra-cellulaire ; MUC4 β est la sous-unité transmembraire *growth factor like* (Moniaux *et al.*, 1999) (figure 19B).

A



B

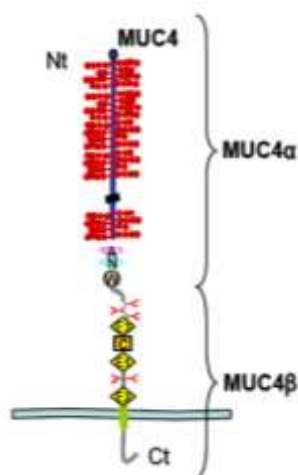


Figure 19 : Représentation schématique de la mucine MUC4.

(A) sous forme linéaire: représentation de ses différents domaines (Hatstrup and Gendler, 2008).

(B) sous forme ancrée à la membrane (Jonckheere and Van Seuning, 2008b).

MUC4 est l'homologue du complexe sialomucine membranaire du rat appelé Sialomucin Complex (SMC). Ce dernier est également un complexe protéique hétérodimérique composé d'une sous-unité ASGP1 (Ascites Sialoglycoprotein) et d'une sous-unité membranaire growth factor like ASGP2. Carraway *et al.*, (1999) ont mis en évidence que le domaine EGF1 de la sous-unité membranaire ASGP2 interagit avec le récepteur ErbB2.

III.2. Gène

Le gène *MUC4*, cloné à partir d'une banque d'ADNc de muqueuse trachéobronchique humaine (Porchet *et al.*, 1991), est situé sur le chromosome 3, dans la région q29, et

contient 26 exons. Le premier exon code la région 5'UTR (*Untranslated Region*) et le peptide signal. Le deuxième exon est en position centrale et contient une séquence unique de 2,8 kilobases (kb) suivi de la répétition d'un motif de 48 paires de bases (pb). Les 24 autres exons codent le reste de la protéine (domaine extracellulaire, parties transmembranaire et cytoplasmique) (Moniaux *et al.*, 1999).

L'épissage alternatif des transcrits de *MUC4* génère une série de variants (figure 20) dont les plus longs ont une taille comprise entre 14 et 26 kb. Jusqu'à présent, 24 isoformes ont été rapportées, dénommées sv0 à sv21-*MUC4*, *MUC4/X* et *MUC4/Y*. Les épissages se produisent en majorité en aval de la région *tandem repeat* générant trois types de variants :

- les formes sécrétées (sv1 à-7, sv9, sv11 à -20) ;
- les variants membranaires (sv0, sv8, sv10 et sv21) ;
- les formes dépourvues du domaine central de type mucine (*MUC4/X* et *MUC4/Y*).

Le profil d'expression de ces différentes formes moléculaires varie selon les types cellulaires, les organes et l'état physiopathologique (Escande *et al.*, 2002). En particulier, certains variants ont été mis en évidence dans des cellules cancéreuses pancréatiques (Choudhury *et al.*, 2000).

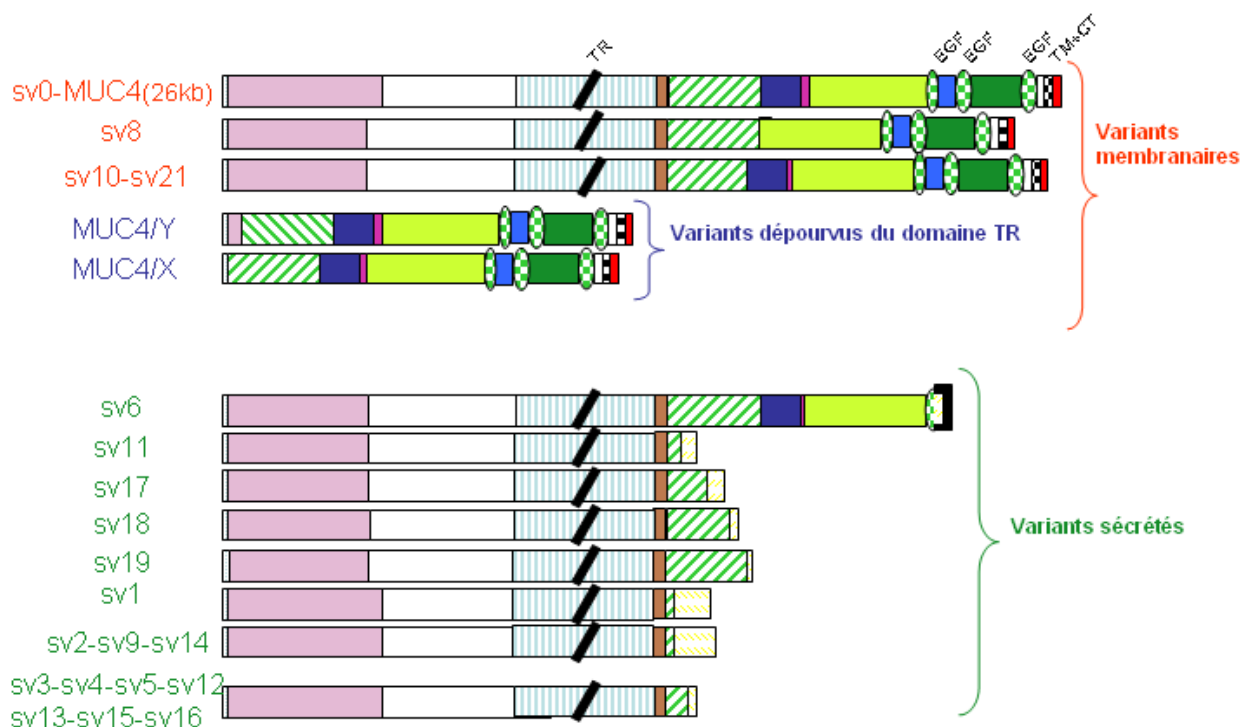


Figure 20 : Différents variants d'épissage de *MUC4* (adapté de Escande *et al.*, 2002).

III.3. Caractérisation de la région 5'-flanquante de MUC4 et régulation de son expression

La région 5' flanquante de *MUC4* s'étend sur 4 kb en amont du premier codon ATG. Différentes études ont permis d'identifier deux régions actives appelées promoteurs proximal et distal (figure 21) (Perrais *et al.*, 2001).

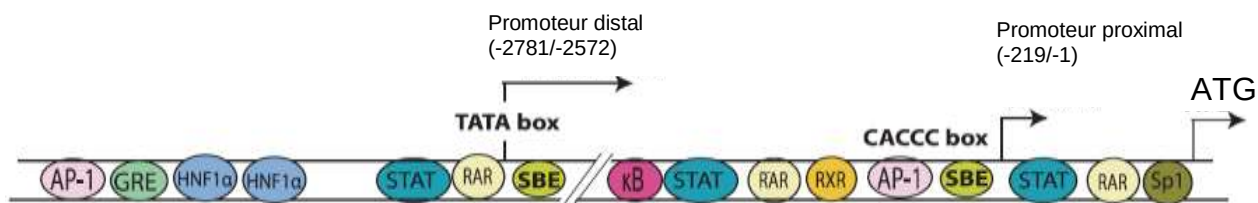


Figure 21 : Représentation des éléments *cis* présents sur le promoteur de *MUC4* (Chaturvedi *et al.*, 2008).

La région 5' flanquante de *MUC4* comporte quatre sites d'initiation de la transcription : un dans le promoteur proximal et trois dans le promoteur distal. Le promoteur proximal de 2,7 kb environ ne contient pas de boîte TATA et se situe en aval de la première boîte TATA active (-2672/-2668). Ces deux régions promotrices sont riches en résidus GC et contiennent des sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription tels que AP-1 (*Activator Protein-1*, facteur constitué de l'association des protéines Jun/Fos ou Jun/Jun), Sp1 (*Specific Protein 1*) ... (Perrais *et al.*, 2001).

L'expression de *MUC4* est finement régulée et implique de nombreuses voies de signalisation. En effet, elle peut être modulée au niveau transcriptionnel par différents facteurs (figure 22) dont une partie est présentée ci-dessous (Carraway *et al.*, 2009 ; Andrianifahanana *et al.*, 2006) :

- Les facteurs de croissance tels que l'EGF, le TGF α (*Transforming Growth Factor α*) exercent un effet inducteur sur l'expression de *MUC4* par le biais de l'activation de tyrosines kinases. Le facteur de croissance TGF β exerce quant à lui son effet *via* l'activation des facteurs Smad2 et Smad4 ;
- L'interféron γ (IFN γ), cytokine pro-inflammatoire, régule l'expression de *MUC4* par le biais de STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) ;
- Les acides biliaires activent également *MUC4* *via* la voie de la Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) ou par la fixation du facteur de transcription HNF-1 (*Hepatocyte Nuclear Factor 1*) sur le promoteur de *MUC4* ;
- Les interleukines (IL) sont capables de moduler l'expression de *MUC4*, l'IL-9 agissant *via* JAK3 (*Janus Kinase 3*) et l'IL-4 par le biais de l'activation du facteur de transcription STAT6 ;

- Le canal chlore CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) est un régulateur négatif de l'expression de *MUC4* ;
- La régulation épigénétique de *MUC4* est un élément important. Ainsi, la déméthylation des îlots CpG et l'acétylation des histones participent à sa surexpression. Le microARN-150 inhibe quant à lui l'expression de *MUC4* (Srivastava *et al.*, 2011).

Une régulation post-transcriptionnelle a également été mise en évidence. Elle s'exerce via la stabilisation des transcrits de *MUC4*, par exemple, par l'élastase produite par les polynucléaires neutrophiles lors du processus inflammatoire (Fischer *et al.*, 2003).

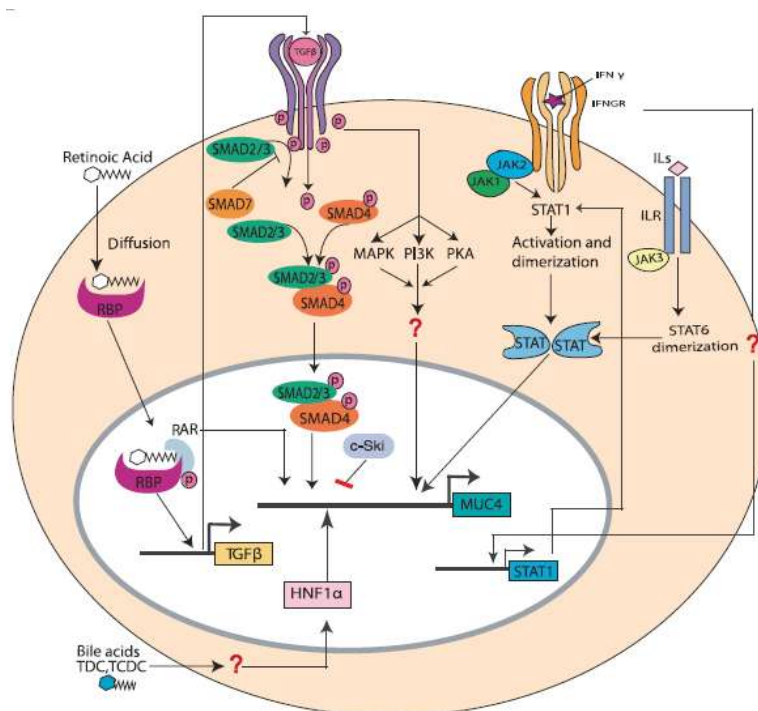


Figure 22 : Eléments régulateurs de l'expression de *MUC4* et voies de signalisation associées (Chaturvedi *et al.*, 2008).

III.4. Distribution cellulaire de *MUC4*

L'expression tissulaire de *MUC4* est très large. Celle-ci n'est pas restreinte aux cellules mucipares et s'observe aussi au niveau des cellules épithéliales non spécialisées dans la mucosécrétion, comme par exemple au niveau des cellules ciliées bronchiques ou des entérocytes. Ainsi, *MUC4* est présente dans les épithéliums respiratoire, digestif et urogénital alors qu'elle n'est pas détectée dans le pancréas sain, la vésicule biliaire et le foie (Porchet and Aubert, 2004). Cette mucine est localisée uniquement au pôle apical des cellules épithéliales saines (Fauquette *et al.*, 2007). Elle est également retrouvée sous forme sécrétée dans certaines sécrétions biologiques comme le lait, les larmes et la salive (Chaturvedi *et al.*, 2008).

III.5. MUC4 et cancérisation

De nombreuses études ont mis en évidence des modifications du profil d'expression et de glycosylation des mucines lors des maladies inflammatoires et du processus tumoral. MUC4, absente du tissu pancréatique sain ou lors de la pancréatite chronique (Andrianifahanana *et al.*, 2001), est fortement exprimée dans les canaux pancréatiques métaplasiques et la fréquence de son expression augmente avec le stade de la néoplasie pancréatique intraépithéliale (Swartz *et al.*, 2002). Il s'agit d'un marqueur de mauvais pronostic et son expression est corrélée au degré de malignité de ce cancer. De plus, la mucine MUC4 présente des anomalies de distribution cellulaire au cours de l'adénocarcinome pancréatique. En effet, son expression n'est plus restreinte au pôle apical des cellules mais concerne le pourtour membranaire et le cytoplasme des cellules tumorales (Fauquette *et al.*, 2007).

Cette mucine participe au processus cancéreux par la modification de l'adhérence cellulaire, par suppression de l'apoptose des cellules tumorales (Hollingsworth and Swanson, 2004) et par la modulation des voies de signalisation, *via* sa capacité à interagir avec le récepteur ErbB2, favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Albrecht and Carraway, 2011). L'encombrement stérique créé par cette mucine peut aussi être à l'origine de la résistance des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques tels que les anticorps, ces derniers n'ayant plus accès à leurs molécules cibles (figure 23) (Price-Schiavi *et al.*, 2002).

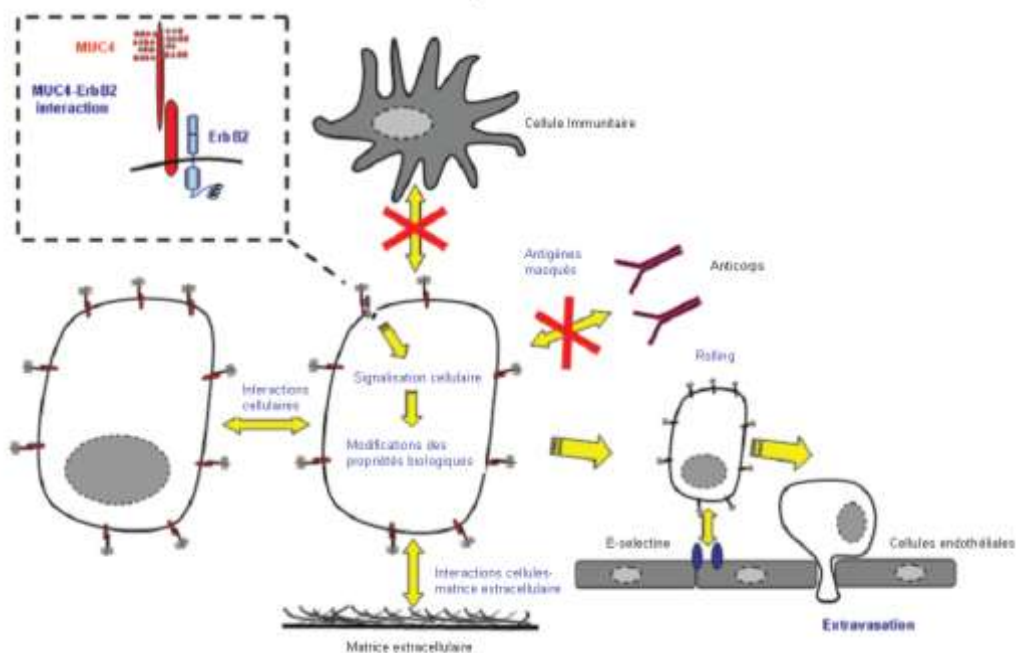


Figure 23 : Rôles de MUC4 dans la cancérogenèse (Jonckheere and Van Seuning, 2008a).

Elle entraîne des modifications des interactions cellulaires, de la transduction de signaux, de la réponse immunitaire, et est impliquée dans le processus métastatique.

En dehors de l'adénocarcinome pancréatique, MUC4 est également surexprimée ou néoexprimée dans d'autres cancers tels que l'adénocarcinome pulmonaire, la dysplasie de haut grade de l'œsophage et l'adénocarcinome œsophagien développé sur métaplasie de Barrett, les carcinomes ovariens, les cholangiocarcinomes intrahépatiques et les carcinomes développés à partir de canaux biliaires extrahépatiques. Dans toutes ces situations, l'expression de MUC4 est associée à un mauvais pronostic (Jonckheere and Van Seuningen, 2010). Cependant, dans les carcinomes épidermoïdes des glandes salivaires, la surexpression de cette protéine est de bon pronostic (Weed *et al.*, 2004).

IV. MUC1

IV.1. *Structure*

La mucine MUC1 est une volumineuse O-glycoprotéine (250 à 500 kDa), également connue sous le nom de *Polymorphic Epithelial Mucin* (PEM), épisialine, Dupan-2, *Human Milk Fat Globule* (HMFG), *Epithelial Membran Antigen* (EMA), DF3 et CD227 (Jonckheere and Van Seuningen, 2008b).

L'apomucine MUC1 est dépourvue de domaines de polymérisation et ne possède pas de domaines de type EGF. Cette protéine est synthétisée sous forme d'un précurseur unique qui est ensuite clivé dans le réticulum endoplasmique au niveau du motif glycine-sérine-valine-valine-valine (GSVVV) situé entre ses domaines SEA (*Sea-urchin sperm protein, Enterokinase, Agrin*) et transmembranaire. Les deux sous-unités résultantes restent associées de façon non covalente. La sous-unité extracellulaire de type mucine est formée de la répétition en tandem d'un motif de 20 aa où viennent se greffer des résidus glycaniques. La sous-unité transmembranaire est quant à elle composée d'un petit domaine extracellulaire de 58 aa suivi d'une région transmembranaire de 28 aa et d'une queue cytoplasmique de 72 aa. Cette mucine peut être N-glycosylée notamment au niveau du domaine SEA qui fait suite au domaine répété en tandem (figure 24) (Jonckheere and Van Seuningen, 2008b).

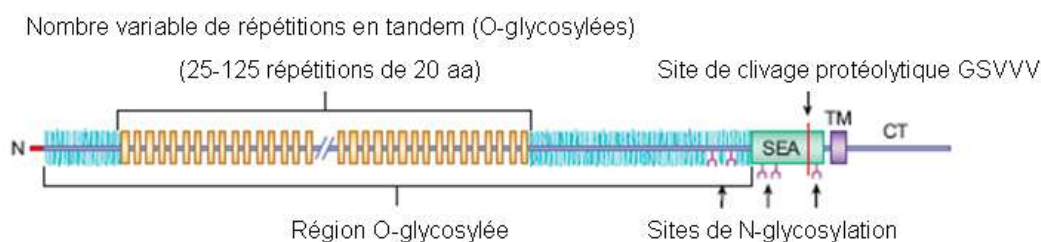


Figure 24 : Représentation de la structure de MUC1 sous forme linéaire (Hattrup and Gendler, 2008).

IV.2. Gène

Le gène codant la mucine MUC1 est situé sur le chromosome 1 en position q21-q24. Il est formé de sept exons et sa taille varie de 4 à 7 kb selon le nombre de répétitions en tandem. L'exon 1 code le peptide signal, l'exon 2 le domaine central répété en tandem et les exons 6 et 7 codent respectivement le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique (Jonckheere and Van Seuningen, 2008a).

La régulation transcriptionnelle de *MUC1* a surtout été étudiée dans cadre du cancer du sein. Malgré la surexpression de cette mucine dans l'adénocarcinome pancréatique canalaire, aucun mécanisme de régulation transcriptionnelle spécifique du pancréas n'a été rapporté jusqu'à ce jour.

Le promoteur de *MUC1* est riche en résidus GC et contient une boîte TATA située 25 nucléotides en amont du premier codon ATG. La région 5' flanquante, de 2,9 kb environ, est caractérisée par la présence de sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription tels que Sp1, AP-1, AP-2, AP-3, ER (*Estrogen Receptor*), STAT3, GATA3... L'expression de *MUC1* peut être induite, par exemple, par l'IFN γ et l'IL-6 (via les facteurs de transcription STAT1 et -3) ainsi que par le TNF α par le biais du facteur de transcription *Nuclear Factor Kappa B* (NF κ B) (figure 25) (Jonckheere and Van Seuningen, 2008b).

Une régulation de *MUC1* au niveau épigénétique intervient également via la méthylation ou l'acétylation des histones, la méthylation de l'ADN et par le biais de certains microARN tels que le miR145 (Sachdeva and Mo, 2010), le miR125b (Rajabi et al., 2010) et le miR1226 (Jin et al., 2010).

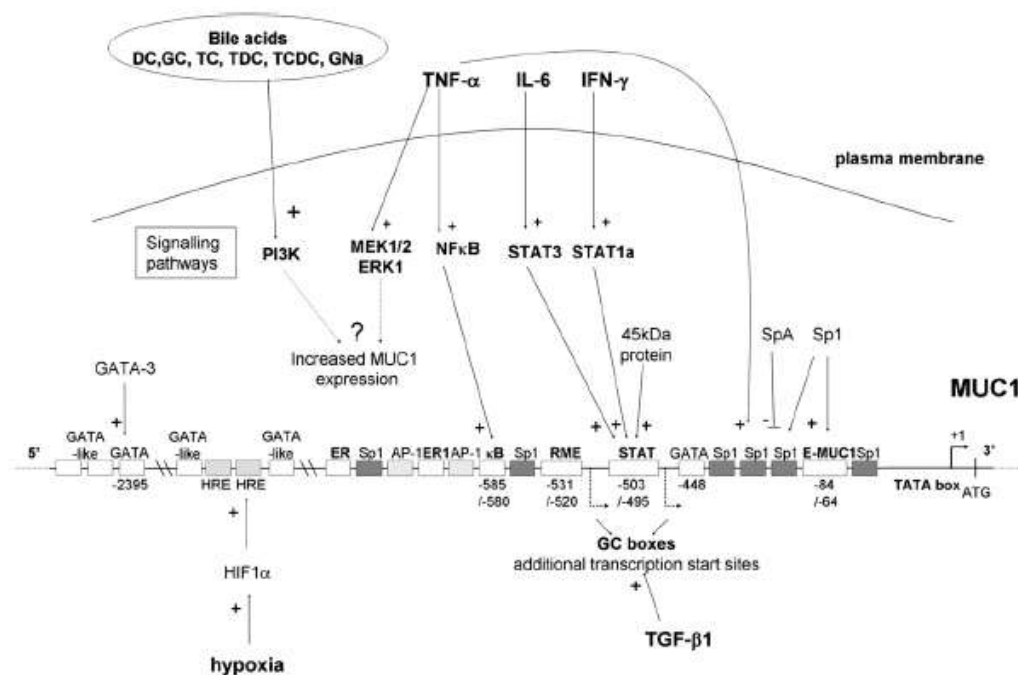


Figure 25 : Promoteur de *MUC1* et éléments intervenant dans sa régulation (Jonckheere and Van Seuningen, 2010).

Plusieurs transcrits de *MUC1* issus d'un épissage alternatif ont été décrits dans la littérature tels que MUC1/X, MUC1/Y, MUC1/SEC, etc. Ainsi, la forme MUC1/Y résulte de la délétion du domaine central de type mucine et semble agir comme un récepteur membranaire. Le variant MUC1/SEC est sécrété dans le milieu extracellulaire suite à un épissage alternatif conduisant à la perte du domaine transmembranaire. Cependant, les fonctions de ces différentes formes de MUC1 ne sont pas déterminées (Hanisch and Müller, 2000).

IV.3. Sites d'expression

La mucine MUC1 est présente à la surface apicale des cellules des épithéliums bronchique, mammaire, salivaire, pancréatique, prostatique et utérin. Elle est exprimée plus faiblement dans les cellules épithéliales du colon, de l'intestin grêle, de l'estomac et de la vésicule biliaire. Une forme soluble est retrouvée dans le lait maternel (Hatstrup and Gendler, 2008).

IV.4. MUC1 et cancérisation

La mucine MUC1 est impliquée dans la cancérogénèse. Schroeder *et al.* (2004) ont mis en évidence que des souris surexprimant cette mucine développent spontanément une tumeur mammaire, lui attribuant ainsi un rôle d'oncogène.

Cette mucine est fréquemment surexprimée dans les tissus cancéreux, phénomène associé à une perte de la polarité apicale avec une expression membranaire circonférentielle et/ou cytoplasmique. Des modifications de la glycosylation de MUC1 sont également observées telles que la présence de chaînes glycaniques plus courtes et de motifs saccharidiques différents (figure 26) (Hatstrup and Gendler, 2008).

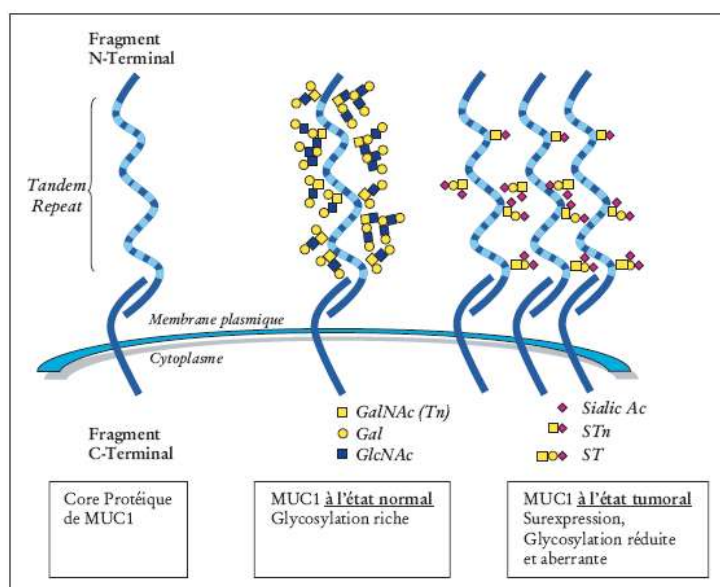


Figure 26 : Structure de MUC1 à l'état normal et dans les cellules cancéreuses (Limacher and Acres, 2007).

La surexpression de MUC1, souvent associée à un comportement tumoral agressif et à un mauvais pronostic, est retrouvée dans plus de 90 % des cas de cancer du sein. Elle est également fréquente dans d'autres cancers comme ceux des ovaires, du colon, du poumon, etc. (Hattrup and Gendler, 2008). Dans le pancréas, l'expression de MUC1 augmente tout au long de la transformation néoplasique (Yonezawa *et al.*, 2010).

MUC1 intervient dans la signalisation cellulaire, la différenciation et la prolifération cellulaire. Elle agit comme un oncogène par l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'initiation et la progression tumorale.

La queue cytoplasmique de MUC1 contient sept résidus tyrosines phosphorylables par des protéines kinases ainsi que des sites d'interaction pour des protéines à domaine de type SH2 (*Src Homology 2*). Ainsi, elle interagit avec les protéines *cellular-Src protein kinase* (c-Src), *Tyrosine-protein kinase Lyn*, *Glycogen Synthetase Kinase 3 β* (GSK3 β), *Protein Kinase C δ* (PKC δ), la β -caténine et les membres des récepteurs de la famille ErbB (figure 27). Ces interactions activent différentes voies de signalisation comme les voies MAPkinase et PI3K (Singh and Hollingsworth, 2006) expliquant le rôle de MUC1 dans la tumorigenèse.

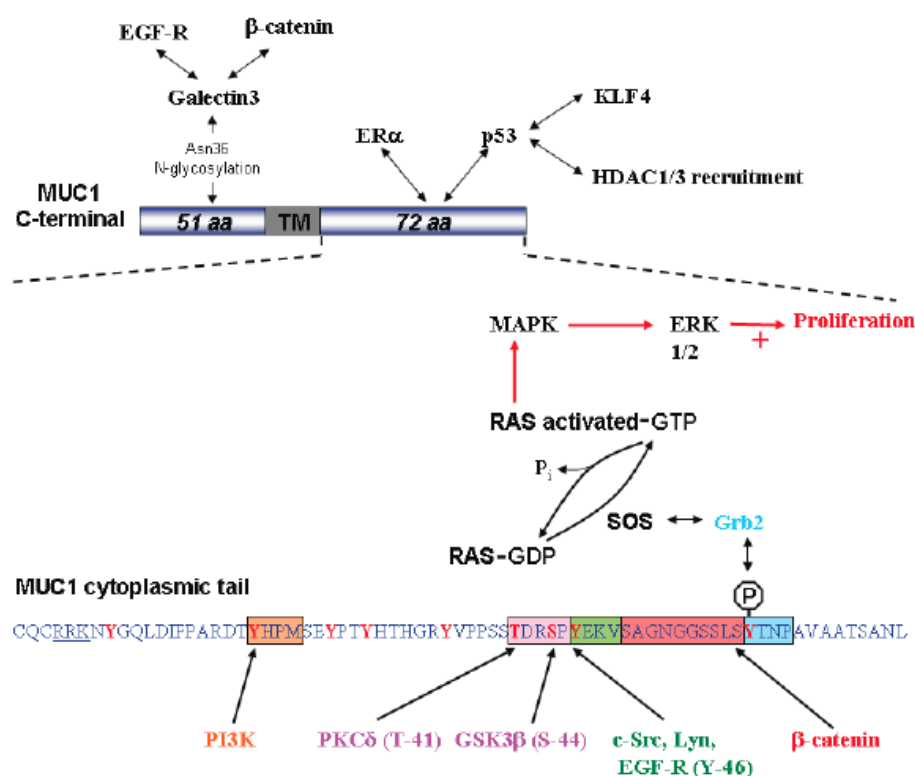


Figure 27 : Partenaires protéiques de MUC1 impliqués dans la signalisation cellulaire. (Jonckheere and Van Seuning, 2008a).

Par ailleurs, la queue cytoplasmique de MUC1 est capable de former des complexes avec certains facteurs de transcription ($ER\alpha$, β -caténine...), d'être clivée puis transloquée dans le noyau avec ces facteurs afin d'influencer la transcription de leurs gènes cibles comme celui codant la cycline D1. Ce mécanisme modifie par exemple la prolifération cellulaire (Albrecht and Carraway, 2011).

La mucine MUC1 possède des propriétés antiadhésives. L'encombrement stérique créé par cette mucine perturbe les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Ce mécanisme favorise la libération des cellules cancéreuses dans la circulation. De plus, MUC1 peut interagir directement avec la β -caténine *via* un motif présent dans sa queue cytoplasmique. Dans la cellule, la β -caténine interagit avec la E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes qui maintiennent les interactions cellulaires. La surexpression de MUC1 conduit donc à une augmentation de sa liaison à la β -caténine, inhibant ainsi les interactions β -caténine/E-cadhérine au niveau de ces jonctions. Ce phénomène interrompt par conséquent les contacts entre cellules facilitant ainsi la dissémination des cellules tumorales. Cependant, MUC1 possède également des propriétés adhésives associées à la structure modifiée de ses oligosaccharides qui peuvent se lier à des molécules d'adhérence telles qu'ICAM1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) et la E-sélectine. Ce mécanisme facilite l'attachement des cellules à un site métastatique distant du site tumoral primitif (Kufe, 2009).

La surexpression de MUC1 perturbe également les interactions entre les cellules cancéreuses et les lymphocytes cytotoxiques affectant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale (Hollingsworth and Swanson, 2004).

Enfin, MUC1 peut être à l'origine d'une résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies par le biais de son action anti-apoptotique *via* les voies PI3K/Akt, Bcl-xl (*Bcl-2-like protein 1*) et par le transfert de sa queue cytoplasmique au niveau de la membrane mitochondriale externe afin d'atténuer la libération de facteurs pro-apoptotiques (Albrecht and Carraway, 2011).

V. Galectines

V.1. Généralités

Les galectines sont une famille de protéines caractérisées par leur capacité à se lier aux β -galactosides et par la présence dans leur structure d'un « domaine de reconnaissance des carbohydrates » (CRD). Jusqu'à présent, 15 galectines ont été identifiées chez les mammifères ; toutes contiennent au moins un domaine CRD conservé de 130 aa environ (Dumic *et al.*, 2006).

En fonction de l'organisation et du nombre de domaines CRD, les galectines sont classées en trois sous-types (tableau III) (Fukumori *et al.*, 2007) :

- Le groupe « prototype » comprend celles qui n'ont qu'un seul domaine CRD, soit les galectines-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15.
- La galectine-3 (gal-3), seul membre du groupe « chimère », est constituée d'un court domaine N-terminal suivi d'une séquence consensus répétée riche en résidus tyrosines, glycines et prolines rattachée au domaine CRD.
- Le type double, ou en tandem, comprend les galectines-4, -6, -8, -9, -12 constituées d'une seule chaîne polypeptidique comportant deux domaines CRD distincts mais homologues et séparés par une séquence non conservée de 70 aa. Ces deux domaines CRD permettent la liaison à deux épitopes glycaniques.

Tableau III : Classification des galectines (adapté de Liu *et al.*, 2005).

Type	Structure	Galectine
1 domaine CRD, groupe « prototype »		1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15
1 domaine CRD, groupe « chimère »		3
2 domaines CRD, type « double »		4, 6, 8, 9, 12
 : domaine CRD  : chaîne peptidique		

Les galectines sont retrouvées dans le cytoplasme, le noyau, la surface cellulaire et le milieu extra-cellulaire avec une distribution variant selon le type cellulaire (Dumic *et al.*, 2006). En effet, certaines galectines sont présentes dans une grande variété de tissus tandis que d'autres ont une expression tissulaire spécifique. Par exemple, la galectine-1 est surtout exprimée dans les tissus d'origine mésodermique, la galectine-7 dans les épithéliums stratifiés, la galectine-5 dans les cellules sanguines et la galectine-4 est spécifique des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (Liu *et al.*, 2002).

Leur présence en dehors de la cellule est la conséquence d'une sécrétion par un mécanisme non conventionnel puisqu'elles sont dépourvues de la séquence signal permettant l'insertion dans le réticulum endoplasmique (Hughes, 1999).

V.2. Galectine-3

V.2.1. Gène

La galectine-3 est codée par le gène *LGALS3* de 17 kb environ, localisé sur le chromosome 14 en position q21-22 et composé de 6 exons et 5 introns (figure 28) (Dumic *et al.*, 2006).

L'exon 1 code une partie de la séquence 5' UTR de l'ARNm et l'exon 2 le reste de cette région ainsi que le site d'initiation de la traduction et les six premiers aa. L'exon 3 contient la séquence du domaine N-terminal de la protéine. Les trois derniers exons codent le domaine CRD (Krzeslak and Lipinska, 2004).

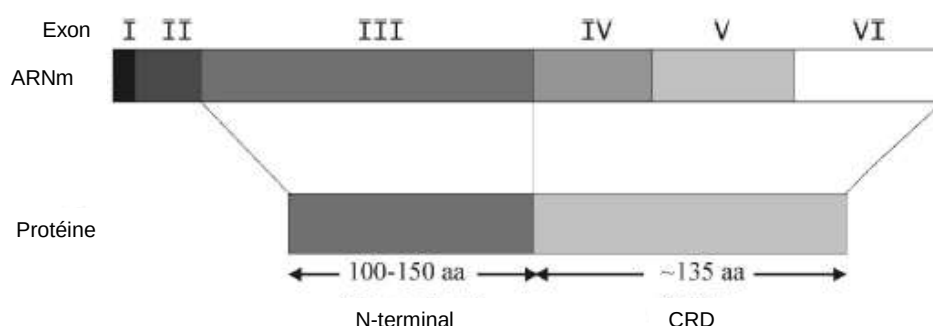


Figure 28 : La galectine-3 : correspondance entre les exons et les domaines protéiques (Krzeslak and Lipinska, 2004).

L'expression de cette protéine est régulée au niveau transcriptionnel par différents facteurs. Ainsi, la région promotrice du gène codant la galectine-3 comporte divers éléments régulateurs tels que cinq sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1, deux sites pour le facteur NFκB, une séquence consensus hélice-boucle-hélice, etc. (Dumic *et al.*, 2006).

V.2.2. La galectine-3

La galectine-3 est une protéine de 30 kDa environ. Elle possède deux domaines fonctionnels (Figure 29) (Dumic *et al.*, 2006 ; Newlaczyl and Yu, 2011) :

- un domaine N-terminal, flexible, formé de 7 à 14 répétitions d'une séquence de 9 aa riche en résidus prolines, glycines et tyrosines (PGAYPGXXX) (Wang *et al.*, 2004), ne possédant pas d'activité de liaison aux glycanes mais essentiel à l'activité biologique de la galectine-3. Il comporte également des sites de phosphorylation (Ser 6 et Ser 12), il est impliqué dans la

sécrétion de cette lectine par un mécanisme non conventionnel et intervient dans la polymérisation de cette galectine (formation de pentamères) en présence de ligands.

- un domaine C-terminal de structure globulaire, le CRD, de 130 aa environ. On y retrouve un motif asparagine-tryptophane-glycine-arginine (NWGR) responsable de l'activité anti-apoptotique de la galectine-3 et conservé au sein des protéines de la famille Bcl-2 (*B-Cell lymphoma 2*). Le CRD permet également l'association de deux molécules de galectine-3 en l'absence de ligands.

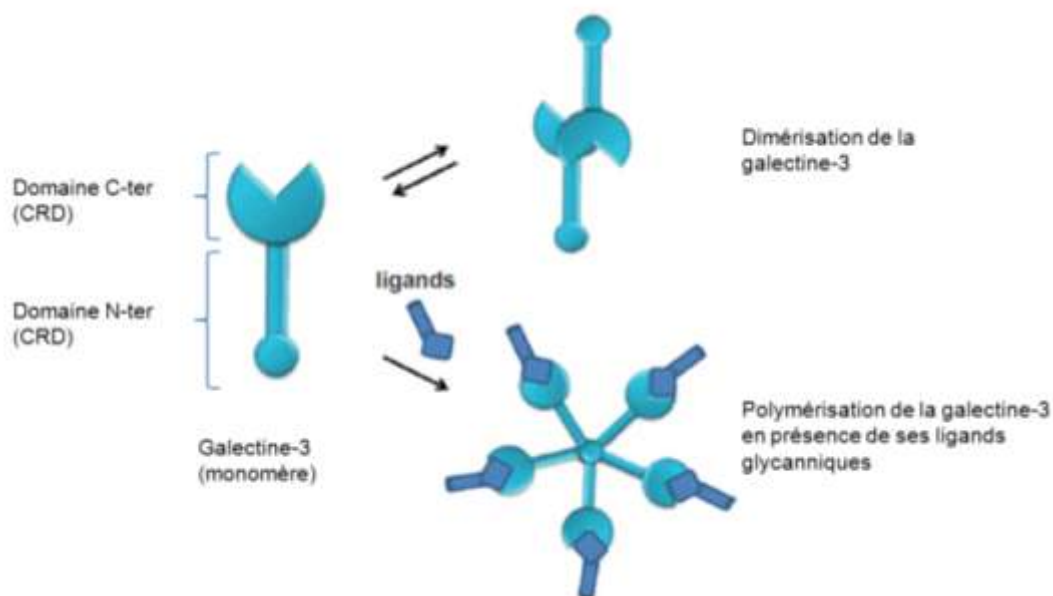


Figure 29 : Représentation schématique de la galectine-3 dans ses différents états (monomère, dimère et polymère) (d'après Newlaczyl and Yu, 2011).

V.2.3. Sites d'expression

Cette protéine est retrouvée de façon ubiquitaire dans les tissus adultes humains mais à des niveaux différents selon le type tissulaire. Fortement exprimée par les cellules immunitaires et épithéliales, la galectine-3 est présente dans la muqueuse gastrique, les épithéliums mammaire et prostatique ainsi que dans les monocytes et les macrophages (Fukumori *et al.*, 2007).

V.2.4. Ligands

Les galectines sont des lectines se liant de façon spécifique aux β -galactosides par l'intermédiaire de leur CRD. La présence de galactose est indispensable pour leur liaison à leurs ligands. L'affinité de liaison augmente s'il est associé à d'autres saccharides, par exemple à la *N*-acétylglucosamine (Dumic *et al.*, 2006). Certaines galectines ne possédant

qu'un seul domaine CRD sont capables de former des dimères ou des oligomères permettant ainsi leur liaison à plusieurs ligands.

Il existe de nombreux partenaires de la galectine-3 qui sont structurellement et fonctionnellement très divers, localisés aussi bien dans le milieu extracellulaire qu'intracellulaire. Ainsi, la galectine-3 se lie à la laminine, protéine de la matrice extracellulaire, à des protéines membranaires comme LAMP1 et 2 (*Lysosome Associated Membrane Protein*), ou à des protéines intracellulaires telles qu'Alix/AIP-1 (*ALG-2 interacting protein X*) ou Bcl-2 (Wang *et al.*, 2004).

V.2.5. Fonctions

La galectine-3 exerce de nombreuses fonctions biologiques dépendantes de sa localisation intra- ou extracellulaire.

La galectine-3 est présente dans le milieu extracellulaire où elle intervient dans la migration et l'adhérence cellulaire, les interactions cellule-cellule *via* ses propriétés de liaison aux glycanes (Dumic *et al.*, 2006).

Dans la cellule, elle est retrouvée au niveau nucléaire et cytoplasmique. Cependant sa localisation varie selon le type cellulaire, le statut de prolifération des cellules, les conditions de culture et la transformation cellulaire (Wang *et al.*, 2004).

Au niveau nucléaire, elle intervient dans la régulation de certaines voies de signalisation comme la voie Wnt (Liu *et al.*, 2002) et dans l'épissage des pré-ARNm (Dagher *et al.*, 1995) par le biais de son interaction avec la ribonucléoprotéine U1 (Haudek *et al.*, 2010). Cette dernière fait partie du spliceosome, complexe dynamique de particules ribonucléoprotéiques. De plus, Lin *et al.* (2002) ont mis en évidence l'implication de la galectine-3 nucléaire dans la régulation de la transcription de gènes (figure 30). En effet, elle favorise le pouvoir transactivateur des facteurs de transcription CREB (*cAMP-Response Element Binding protein*) et Sp1 induisant ainsi l'activité du promoteur de la cycline D1. Song *et al.* (2005) ont montré que la galectine-3 module l'expression de *MUC2* dans les cellules cancéreuses coliques au niveau transcriptionnel par la stabilisation de la liaison de protéines nucléaires au niveau du site AP-1 du promoteur de *MUC2*. Elle interagit également avec le facteur de transcription TTF-1 (*Thyroid Transcription Factor-1*) stimulant ainsi l'activité transcriptionnelle de ce facteur (Paron *et al.*, 2003).

La galectine-3 cytoplasmique exerce une action anti-apoptotique par l'inhibition de la libération du cytochrome c (Dumic *et al.*, 2006) et module différentes voies de transduction de signaux comme celle faisant intervenir K-Ras (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Elle intervient aussi dans le trafic intracellulaire des glycoprotéines. Ainsi, l'adressage apical de la *lactase phlorizin hydrolase* (LPH) est dépendant d'une interaction directe avec la galectine-3

(Delacour *et al.*, 2006). Par ailleurs, Merlin *et al.* (2011) ont montré que cette lectine régule l'endocytose et la localisation subcellulaire de MUC1 et de l'EGFR (*EGF receptor*) dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

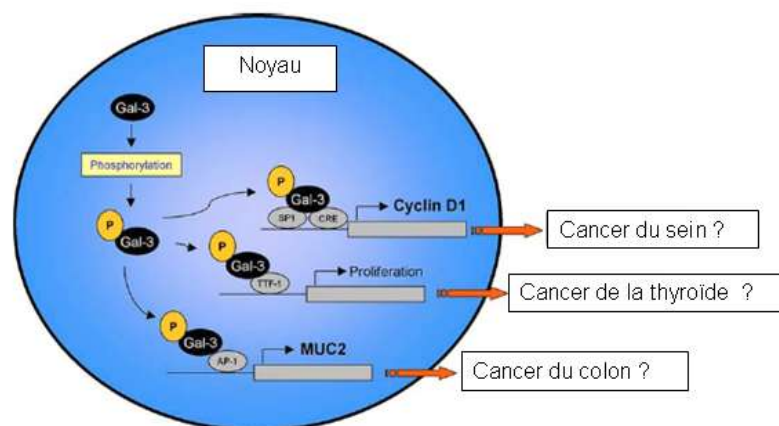


Figure 30 : Exemple du rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression de gènes (d'après Nakahara *et al.*, 2007).

V.2.6. Galectine-3 et cancer

La galectine-3 est exprimée dans une grande variété de tumeurs avec une intensité dépendante de la progression tumorale, du pouvoir invasif et métastatique (Danguy *et al.*, 2002). Sa distribution intracellulaire est également modifiée dans certains cancers, ce qui en fait un marqueur potentiel pour le diagnostic et le pronostic (Liu *et al.*, 2005). Berberat *et al.* (2001) ont montré par *Western blot* et immunohistochimie que la galectine-3 est surexprimée au cours de l'adénocarcinome pancréatique.

Cette lectine participe au processus tumoral en intervenant dans (figure 31 A et B) :

- 1) la transformation cellulaire par son interaction avec l'oncogène Ras et par ce biais elle favorise la transformation cellulaire induite par cet oncogène. En effet, la galectine-3 stabilise la protéine K-Ras au niveau de la membrane plasmique, ce qui favorise l'activation des voies de signalisation impliquant Raf-1 et la PI3K ;
- 2) le cycle cellulaire par la régulation du taux des protéines p21 et p27 ;
- 3) l'apoptose par son interaction avec Bcl-2, favorisant ainsi la localisation mitochondriale de cette protéine ;
- 4) le processus métastatique par la modification de l'adhésion cellulaire, de la migration et de l'invasion des cellules tumorales en recrutant notamment les intégrines et d'autres protéines de surface ;
- 5) l'angiogenèse en favorisant la migration des cellules endothéliales ;

- 6) l'échappement de la tumeur face à la surveillance du système immunitaire par la modulation de l'activité de ses cellules effectrices et les taux de cytokines (Liu and Rabinovich, 2005).

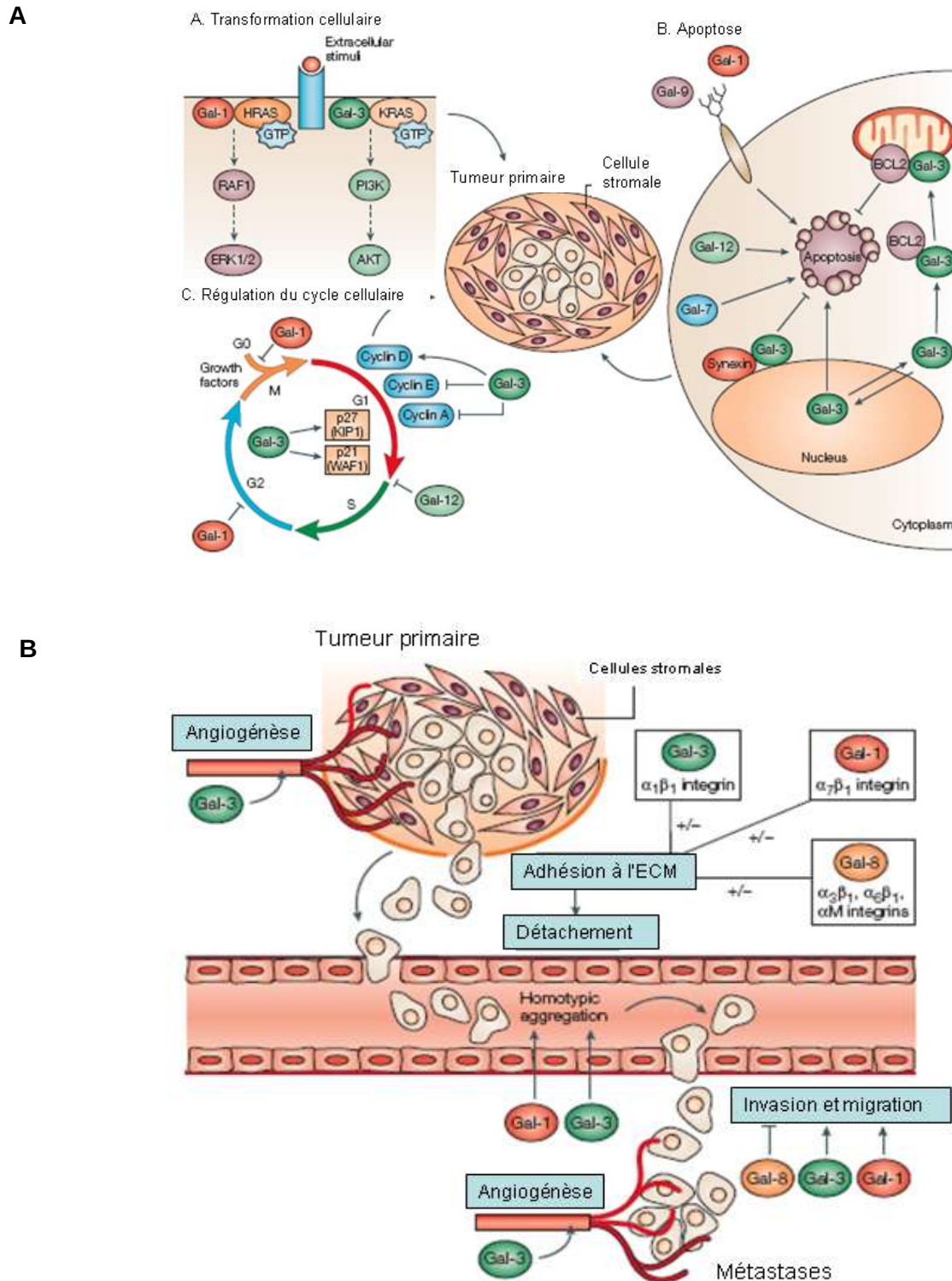


Figure 31 : Rôle de la galectine-3 dans les différentes étapes de la cancérogenèse (Liu and Rabinovich, 2005).

(A) Dans l'initiation du processus tumoral : la galectine-3 affecte la transformation cellulaire, l'apoptose et modifie le cycle cellulaire.

(B) Dans le processus métastatique : par le biais de la modulation de l'angiogenèse, de la migration et de l'invasion cellulaire.

Problématique et objectif du travail

Les mucines MUC1 et MUC4 sont respectivement sur- et néoexprimées au cours de l'adénocarcinome pancréatique canalaire et présentent des anomalies de distribution cellulaire lors de cette néoplasie (Fauquette *et al.*, 2007 ; Hattrup and Gendler, 2008). La galectine-3 étant connue pour son rôle dans le trafic intracellulaire des glycoprotéines, la lignée cancéreuse pancréatique humaine CAPAN-1 invalidée spécifiquement pour le gène codant la galectine-3, a été mise en place au laboratoire dans le but d'étudier le rôle de cette protéine dans le trafic intracellulaire des mucines membranaires (Merlin *et al.*, 2011).

Des travaux préalables obtenus au sein de l'UMR 837 ont mis en évidence une diminution de l'expression des gènes codant les mucines MUC1 (Merlin *et al.*, 2011) et MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines CAPAN-1 n'exprimant plus la galectine-3. L'objectif de ce travail est donc de déterminer le rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* dans ces cellules.

Notre démarche d'étude est basée sur les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes, ainsi que sur les données de la littérature concernant MUC1, MUC4 et la galectine-3.

L'expression des gènes eucaryotes est un mécanisme finement régulé pouvant s'exercer à différentes étapes, depuis la séquence d'ADN jusqu'aux produits finaux des gènes. Ainsi sont concernés la structure de la chromatine, la transcription, la maturation des ARN pré-messagers, la traduction et la stabilité des ARNm ainsi que celle des protéines (figure 32).

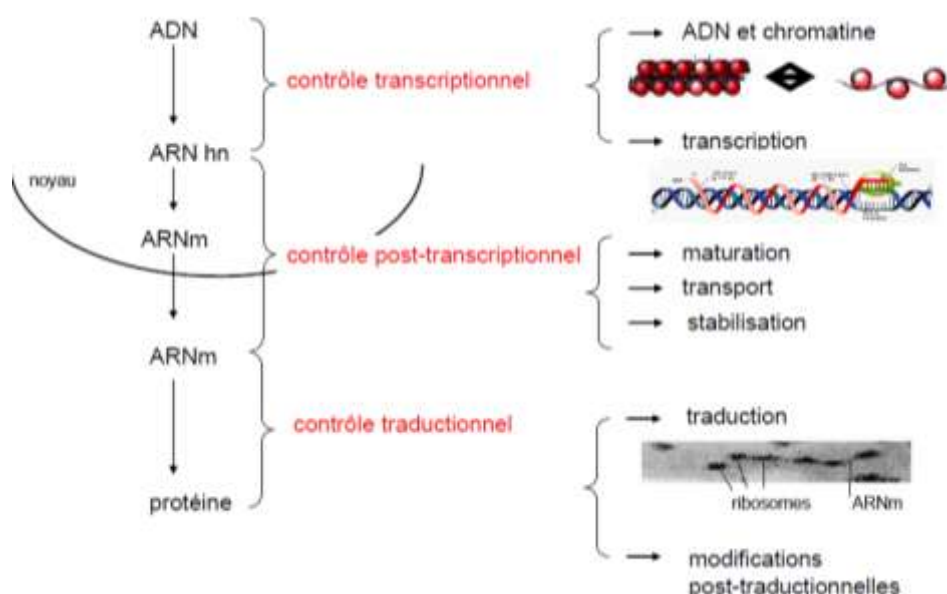


Figure 32 : Stades de régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes (Lunardi, 2010).

1. Régulation transcriptionnelle

Dans un premier temps, la régulation de l'expression des gènes peut s'effectuer au niveau transcriptionnel par l'intermédiaire de la structure de l'ADN. En effet, cette double hélice peut exister sous une forme lâche, l'euchromatine, ou sous une forme compactée, l'hétérochromatine. Sous cette dernière forme, les gènes ne sont pas accessibles aux polymérases. L'ADN est enroulé autour d'un cœur protéique constitué d'histones pour former un nucléosome. Les histones peuvent être méthylées, acétylées et/ou phosphorylées. Ces modifications entraînent un changement dans la structure de la chromatine qui devient plus lâche, l'ADN étant ainsi plus accessible aux facteurs de transcription (Pollard *et al.*, 2004). L'ADN peut également être méthylé au niveau des répétitions de cytosines et de guanines (îlots CpG). Cette méthylation provoque la condensation de l'ADN et conduit à l'inactivation des gènes (Kaplan and Delpech, 1989).

La régulation transcriptionnelle passe aussi par le recrutement et l'activation de facteurs de transcription (figure 33). Ces protéines, capables d'interagir avec l'ADN, exercent leur action par le contrôle de l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle. Cette dernière est un complexe comprenant l'ARN polymérase, enzyme synthétisant l'ARN pré-messager, et des facteurs de transcription dit généraux, car nécessaires à la transcription de tous les gènes. Afin de moduler de façon précise le niveau de transcription de certains gènes, des facteurs de transcription appelés « spécifiques » (activateurs ou répresseurs) entrent en jeu. En effet, les gènes eucaryotes possèdent des séquences régulatrices, présentes au niveau des régions promotrices, et reconnues par les facteurs spécifiques qui augmentent ou diminuent le taux de transcription de ces gènes (Watson *et al.*, 2009).

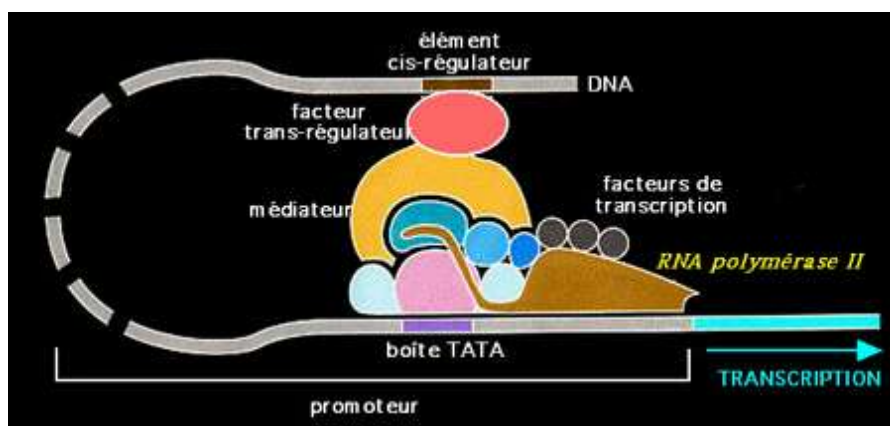


Figure 33 : Représentation schématique de la machinerie transcriptionnelle et des facteurs qui lui sont associés (<http://www.chups.jussieu.fr>).

2. Régulation post-transcriptionnelle

Des processus de régulation post-transcriptionnelle interviennent dans la maturation des ARNm, dans leur transport intracellulaire et leur stabilité (figure 34).

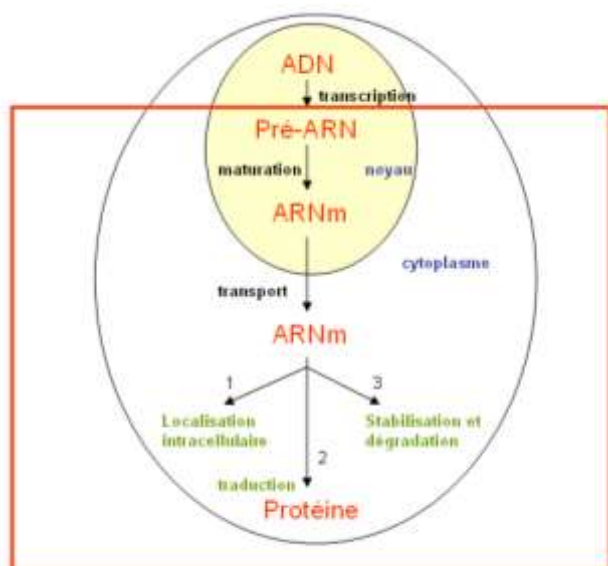


Figure 34 : Eléments de régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (encadré rouge) (<http://www.e-campus.uvsq.fr/>).

2.1. Maturation

Les ARNm sont d'abord synthétisés sous une forme immature. Ces pré-ARNm vont subir une maturation comportant l'ajout d'une coiffe en 5', d'une queue polyA en 3', un épissage et parfois un processus d'*editing* (modification de certains nucléotides). Chacune de ces étapes est sujette à régulation (Parent and Bisailon, 2006).

2.2. Transport

Avant d'être traduit, les ARNm matures vont se complexer avec des facteurs de liaison de façon à être exportés vers le cytoplasme *via* les pores nucléaires. Ce transport est également régulé (Pollard *et al.*, 2004).

2.3. Stabilité

Une fois dans le cytoplasme, les ARNm peuvent être dégradés après une période plus ou moins longue définie par leur demi-vie et donc par leur stabilité. La modulation de la demi-vie des ARNm est un processus finement régulé faisant intervenir des séquences du transcrit, cibles de facteurs de stabilisation ou déstabilisation des ARNm.

Les extrémités 5' et 3' des transcrits constituent des régions protectrices contre leur dégradation. En effet, la liaison de protéines au niveau de la coiffe en 5' et des protéines PABP (*PolyA binding protein*) au niveau de la queue polyA crée un encombrement stérique constituant un obstacle aux 5'→3' et 3'→5' exonucléases (Ross, 1996).

De plus, au niveau de la région 3'UTR, des séquences riches en adénines et uraciles (*AU rich element*, ARE) constituent le site de liaison de facteurs appelés *ARE Binding Proteins* (ARE-BP) qui régulent la stabilité des ARNm. Ils sont regroupés en trois catégories : les protéines de la famille Hu stabilisatrices, la TTP (*Tristetrapolin*) déstabilisatrice et la protéine AUF1 (*Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D*) exerçant soit un rôle stabilisateur ou déstabilisateur selon l'isoforme mise en jeu et le type cellulaire (Meyer et al., 2004).

Par ailleurs, la demi-vie de certains ARNm est modulée en fonction de la variabilité des besoins cellulaires. Par exemple, la demi-vie de l'ARNm qui code le récepteur de la transferrine chez les mammifères est régulée par le taux de Fer dans la cellule. Les concentrations élevées de Fer dans le cytoplasme entraînent le détachement d'une protéine de protection de l'ARNm du récepteur de la transferrine, l'*Iron Regulatory Protein* (IRP), le transcrit devenant alors vulnérable au clivage donc à la dégradation (Staton et al., 2000).

Enfin, les ARNm peuvent être également la cible de microARN, ARN simple brin non codant possédant une séquence complémentaire des ARNm endogènes. Ils contrôlent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel par clivage de leurs ARNm cibles lorsque leur appariement est total avec ceux-ci (Hartmann et al., 2004).

Ainsi, le niveau de synthèse d'une protéine est essentiellement conditionné par la concentration de son ARNm dans le cytoplasme, qui est elle-même le résultat de l'équilibre entre les taux de synthèse et de dégradation de cet ARNm. La régulation de la demi-vie des transcrits joue donc de ce fait un rôle tout aussi important que la régulation transcriptionnelle (Cheadle et al., 2005).

3. Régulation traductionnelle

Quand l'ARNm atteint le cytoplasme, sa traduction en protéine est aussi régulée. L'initiation de la traduction peut être suspendue par des protéines régulatrices se liant au niveau de la région 5'UTR de l'ARNm empêchant par conséquent la liaison des ribosomes. Par exemple, en cas de déficit en Fer, l'IRP se lie à l'ARNm de la ferritine et prévient sa traduction en bloquant la progression des ribosomes le long de l'ARNm (Staton et al., 2000). Les ARNm peuvent également être séquestrés dans des compartiments inactifs sur le plan traductionnel, les « P-Bodies » (Kishore et al., 2010). Enfin, les microARN peuvent également réprimer la traduction de leurs ARNm cibles en cas d'appariement partiel avec ceux-ci (Hartmann et al., 2004).

4. Régulation post-traductionnelle

Lorsque la protéine est produite, sa structure peut être modifiée et par conséquent son activité affectée. De plus, les protéines sont dégradées par le protéasome après avoir été associées à plusieurs unités d'ubiquitine. Ce processus modifie ainsi l'expression d'un gène par action sur son produit final (Pollard *et al.*, 2004).

Nous nous proposons donc de déterminer le(s) niveau(x) où la galectine-3 intervient dans la régulation de l'expression de *MUC1* et *MUC4* et les mécanismes mis en jeu.

Résultats

I. Etude de l'expression des gènes et protéines d'intérêt dans les lignées cellulaires Sh1 et Sc

Nous avons réalisé notre étude sur les cellules Sh1 dérivant de la lignée cancéreuse pancréatique humaine CAPAN-1 invalidée spécifiquement pour le gène codant la galectine-3 par méthode de *sh*-RNA et sur la lignée cellulaire contrôle correspondante (Sc) (Merlin *et al.*, 2011).

Nous nous sommes assurés de la persistance de la diminution de l'expression de ce gène par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules Sh1. Les résultats obtenus (figure 35A) confirment la diminution des transcrits de la galectine-3 dans cette lignée en comparaison aux cellules contrôles (Sc).

Le *Western blot* (figure 35B) réalisé à partir d'extraits cellulaires totaux met en évidence une répression totale de l'expression au niveau protéique de la galectine-3 dans les cellules Sh1 par rapport aux cellules contrôles (Sc).

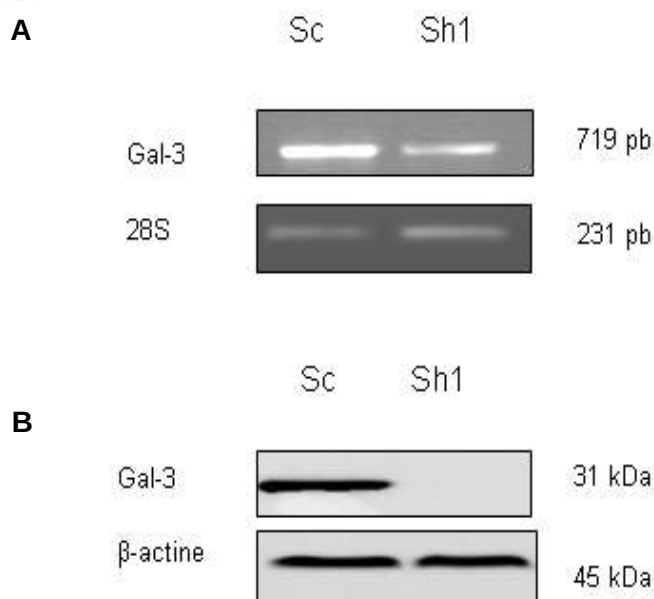


Figure 35 : Etude de l'expression de la galectine-3 dans les cellules Sh1 et Sc.

(A) par RT-PCR semi-quantitative sur des ARN préparés à partir de cellules post-confluentes. L'ARN 28S est utilisé comme contrôle interne. L'image est représentative de trois manipulations indépendantes.

(B) par *Western Blot* sur des lysats cellulaires totaux préparés à partir de cellules à confluence + 2 jours et séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide (12,5 %) en présence de SDS. La β -actine sert de contrôle de charge. Ce blot est représentatif de trois expériences indépendantes.

Des résultats antérieurs à cette étude, obtenus au sein de l'équipe 5 de l'UMR 837 de l'Inserm ont montré une diminution de l'expression du gène codant la mucine MUC4 dans les cellules Sh1 par rapport aux cellules Sc. Nous avons vérifié ces données par RT-PCR semi-quantitative (figure 36A) et *Western Blot* (figure 36B). Les résultats obtenus montrent une diminution de l'expression de MUC4 dans les cellules Sh1.

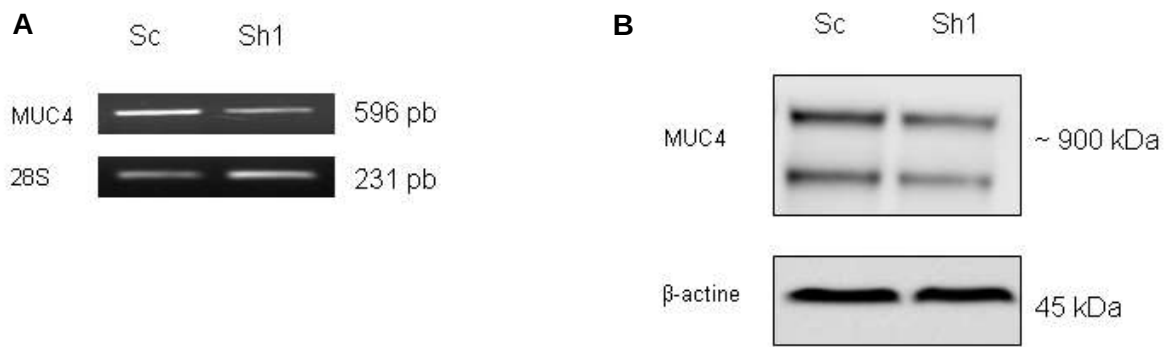


Figure 36 : Etude de l'expression de MUC4 dans les cellules Sh1 et Sc.

(A) par RT-PCR semi-quantitative, sur des ARN préparés à partir de cellules post-confluentes. L'ARN 28S est utilisé comme contrôle interne. L'image est représentative de trois manipulations indépendantes.

(B) par *Western Blot*, sur des lysats cellulaires totaux préparés à partir de cellules à confluence + 2 jours et séparés par électrophorèse en gel d'agarose (2 %) en présence de SDS. La β -actine sert de contrôle de charge. Ce blot est représentatif de trois expériences indépendantes.

Nous avons par la suite quantifié les transcrits de ce gène par PCR quantitative en temps réel (qPCR) à l'aide de la méthode TaqMan. Celle-ci indique une expression relative de *MUC4* de 16,7% dans les cellules Sh1 par rapport aux cellules Sc (100 %). Cette diminution est statistiquement significative au seuil de 1% ($p < 0,01$) (figure 37).

Ces résultats sont concordants et confirment une diminution de l'expression de la mucine MUC4 en absence de galectine-3, à la fois au niveau des ARNm et au niveau protéique.

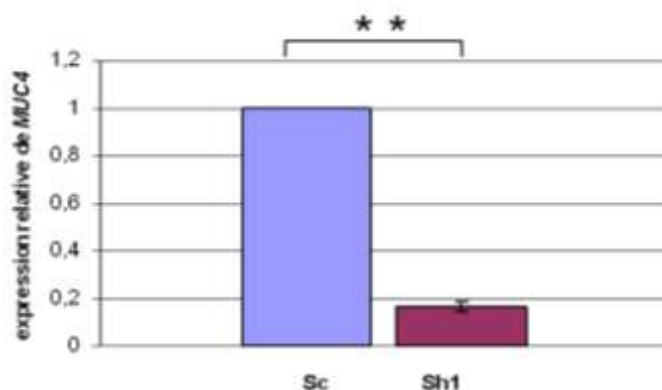


Figure 37 : Expression relative de *MUC4* dans les cellules Sc et Sh1 évaluée par qPCR.

Le graphique représente la moyenne $\pm$ l'écart-type de trois expériences indépendantes où les échantillons ont été analysés en triple (** $p < 0,01$).

Merlin *et al.* (2011) ont mis en évidence une diminution de l'expression de *MUC1* d'environ deux tiers dans les cellules Sh1 par rapport aux cellules Sc par qPCR. Nous avons réalisé un *Western Blot* afin de confirmer cette différence au niveau protéique. Les résultats obtenus mettent en évidence cette différence (figure 38).

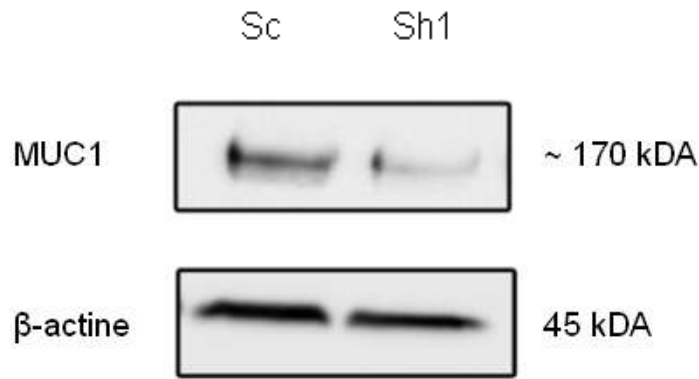


Figure 38 : Etude de l'expression de MUC1 dans les cellules Sh1 et Sc par *Western Blot*.

Les analyses ont été réalisées sur des lysats cellulaires totaux préparés à partir de cellules à confluence + 2 jours et séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide (4-10 %) en présence de SDS. La β -actine sert de contrôle de charge. Ce blot est représentatif du taux de MUC1 dans les deux lignées cellulaires et a été réalisé lors de trois expériences indépendantes.

En conclusion, nous avons confirmé une diminution de l'expression des mucines membranaires MUC1 et de MUC4 dans les cellules Sh1 par rapport aux cellules Sc au niveau transcriptionnel et au niveau protéique.

II. Restauration de phénotype

L'objectif de l'expérience de restauration de phénotype est de déterminer si l'ajout de galectine-3 recombinante permet aux cellules Sh1 de retrouver des niveaux d'expression des mucines MUC1 et MUC4 similaires à ceux observés dans les cellules Sc. Pour cela, les cellules Sh1 ont été traitées, après déplétion en sérum pendant 3 h, par 4 μ M de galectine-3 durant 40 h puis les ARN totaux ont été extraits et soumis à une reverse transcription. Les résultats de la RT-PCR sont présentés sur la figure 39.

L'intégration par densitométrie des bandes visualisées indique que les cellules Sh1 traitées par la galectine-3 retrouvent respectivement un niveau d'expression de MUC1 et de MUC4 d'environ 100 % et 70 % par rapport aux cellules Sc. Les cellules Sh1 seules ont un niveau d'expression des transcrits de MUC1 et de MUC4 inférieur à 5 %. L'expression de ces mucines augmente donc suite au traitement par la galectine-3.

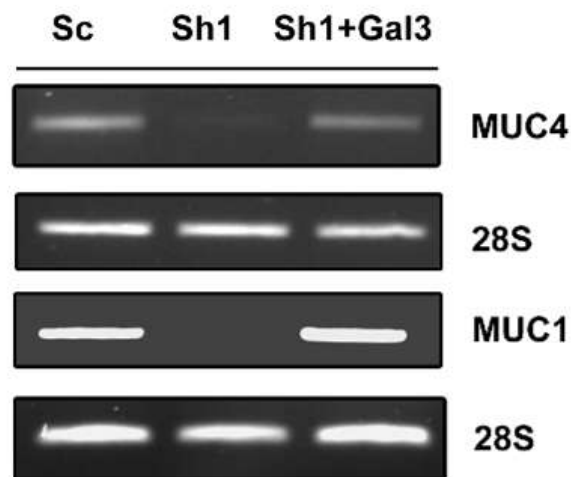


Figure 39 : Etude de l'expression *MUC1* et de *MUC4* dans les cellules Sc, Sh1 et Sh1 traitées par 4 μ M de galectine-3 recombinante par RT-PCR semi-quantitative. Celle-ci a été réalisée sur des ARN préparés à partir de cellules cultivées en plaques 24 puits à l'aide du kit « SuperScript III CellsDirect Synthesis system » (Invitrogen). L'ARN 28S est utilisé comme contrôle interne. L'image est représentative de trois manipulations indépendantes.

De plus, la réalisation d'extraits cellulaires totaux à partir de cellules Sc, Sh1 et Sh1 traitées par de la galectine-3 recombinante nous a permis d'évaluer la modification de l'expression de MUC1 et MUC4 au niveau protéique suite à l'addition de galectine-3 dans le milieu de culture. Comme attendu, les *Western Blot* indiquent une augmentation de l'expression des deux mucines suite à ce traitement (figure 40).

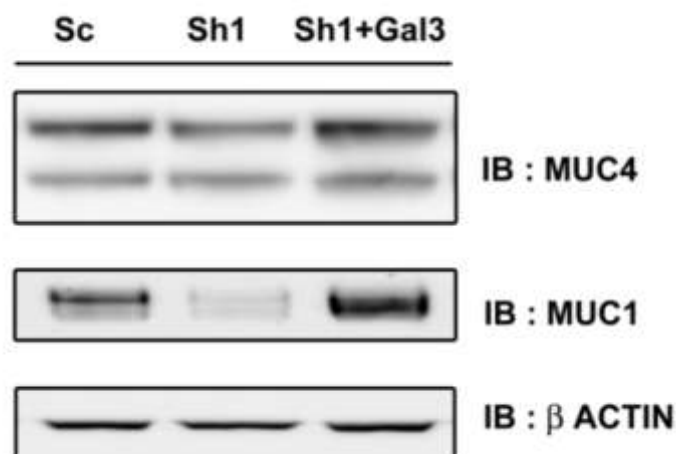


Figure 40 : Etude de l'expression au niveau protéique de MUC1 et MUC4 dans les cellules Sc, Sh1 et Sh1 traitées par 4 μ M de galectine-3 recombinante. Les *Western Blot* ont été réalisés sur des lysats cellulaires totaux séparés par électrophorèse. La β -actine sert de contrôle de charge. L'image est représentative de trois expériences indépendantes.

Ces résultats nous ont donc amenés à nous interroger sur les mécanismes par lesquels la galectine-3 régule positivement l'expression de *MUC1* et de *MUC4*.

Afin d'expliquer les diminutions d'expression de ces mucines observées dès le stade des transcrits dans les cellules Sh1, nous avons exploré deux hypothèses. Celles-ci ont été déterminées en se référant aux mécanismes généraux de la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes et aux rôles connus de la galectine-3 dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant la Cycline D1 (Lin *et al.*, 2002) et *MUC2* (Song *et al.*, 2005) et de son intervention dans l'épissage des ARNm (Dagher *et al.*, 1995).

Nous avons donc envisagé une régulation au niveau :

- transcriptionnel : la galectine-3 modifierait l'activité du promoteur de *MUC1* et de *MUC4*,
- au niveau post-transcriptionnel : la galectine-3 modifierait la stabilité des transcrits de *MUC1* et de *MUC4*.

III. Etude du rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression des mucines membranaires MUC1 et MUC4

III.1. Etude de l'activité du promoteur de MUC1 et MUC4 sous l'influence de la galectine-3

Dans un premier temps, nous avons étudié l'hypothèse d'une régulation de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* par la galectine-3 au niveau transcriptionnel. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'influence de la galectine-3 sur l'activité du promoteur de ces mucines. Pour cela, nous disposons d'un vecteur d'expression codant la galectine-3 (pCMV6-XL4, Origene). Une digestion réalisée par l'enzyme de restriction *Not I* suivie d'une purification du vecteur linéaire sans insert sur gel d'agarose puis d'une ligation nous ont permis d'obtenir le vecteur pCMV6-XL4 vide. Cette construction a servi de référence lors des différentes expériences de transfections transitoires.

Tout d'abord, nous nous sommes assurés que les cellules Sh1 transfectées par le vecteur d'expression de la galectine-3 expriment bien cette protéine. Le *Western blot* (figure 41) indique une augmentation de l'expression de la galectine-3 après transfections transitoires des cellules Sh1 par des quantités croissantes de ce vecteur.

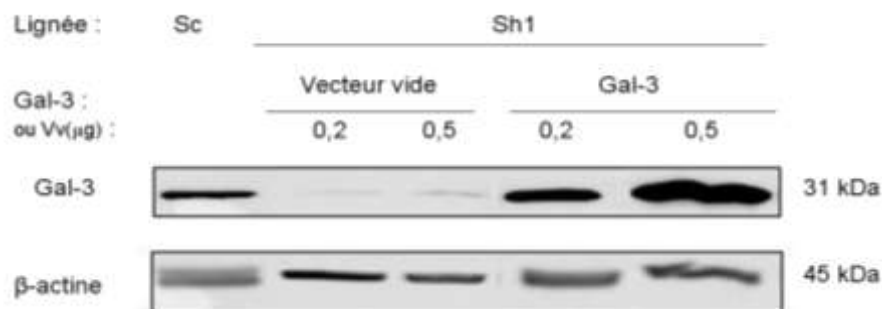


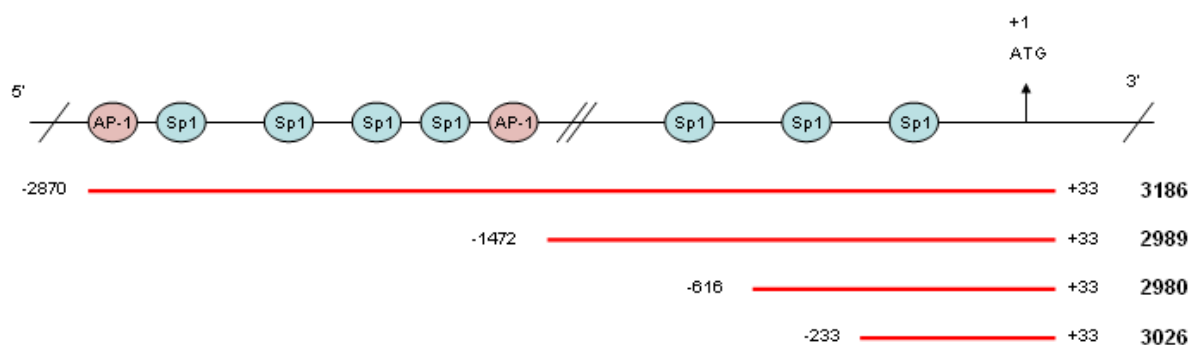
Figure 41 : Etude de l'expression de la galectine-3 dans les cellules Sh1 transfectées transitoirement par le vecteur d'expression de la galectine-3. Celle-ci a été réalisée par *Western Blot*, à partir d'extraits cellulaires totaux de cellules Sc et Sh1 transfectées par le vecteur d'expression de la galectine-3 ou le vecteur vide (Vv). La révélation est réalisée avec un anticorps anti-galectine-3 et anti- β -actine. La β -actine sert de contrôle de charge.

La quantité de 0,2 μ g de vecteur d'expression a été retenue car elle permet de ré-induire l'expression de la galectine-3 à un niveau similaire à celui présent dans les cellules Sc.

Ensuite, nous avons co-transfecté transitoirement différentes constructions du promoteur de *MUC1* ou de *MUC4* clonées en amont du gène codant la luciférase disponibles à l'UMR 837 (Perrais *et al.*, 2001) et 0,2 μ g du vecteur d'expression de la galectine-3 dans les cellules Sh1. Les données de la littérature indiquent que la galectine-3 régule l'expression de certains gènes par le biais de la stabilisation des facteurs de transcription AP-1 et Sp1 sur le promoteur de gènes cibles (Lin *et al.*, 2002 ; Song *et al.*, 2005). Puisque des éléments *cis* pour ces facteurs sont présents dans les promoteurs de *MUC1* et de *MUC4*, il est possible que la galectine-3 régule l'expression de *MUC4* de cette manière. Nous avons donc sélectionné, parmi les fragments des promoteurs de *MUC1* et de *MUC4*, ceux contenant des éléments *cis*-régulateurs pour ces facteurs.

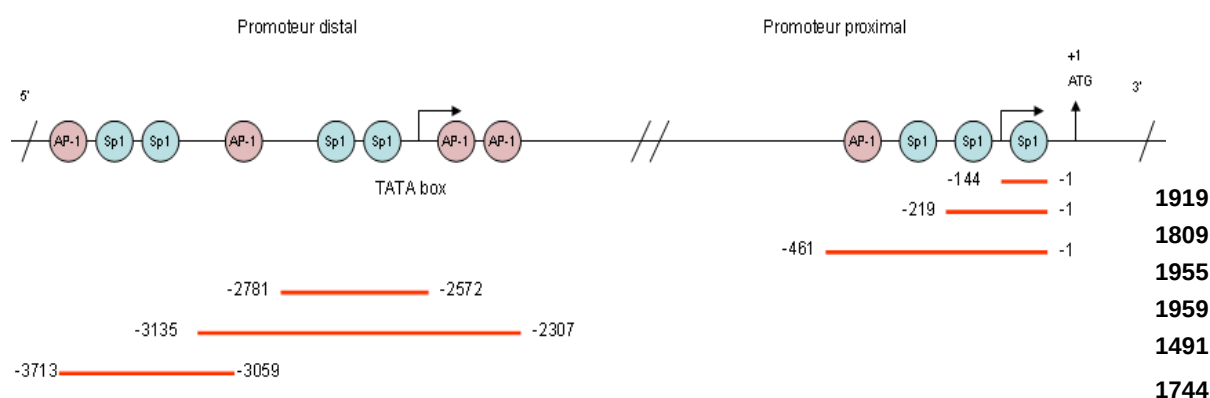
Pour *MUC1*, nous avons testé les quatre constructions du promoteur clonées en vecteur pGL3 contenant les sites de liaison pour les facteurs de transcription AP-1 et Sp1 (figure 42A). En ce qui concerne *MUC4*, six fragments ont été retenus. La figure 42B schématise ses deux promoteurs (proximal et distal), les éléments *cis* régulateurs pour ces deux facteurs de transcription et la position des constructions sélectionnées.

A MUC1



N° des constructions du promoteur de MUC1

B MUC4



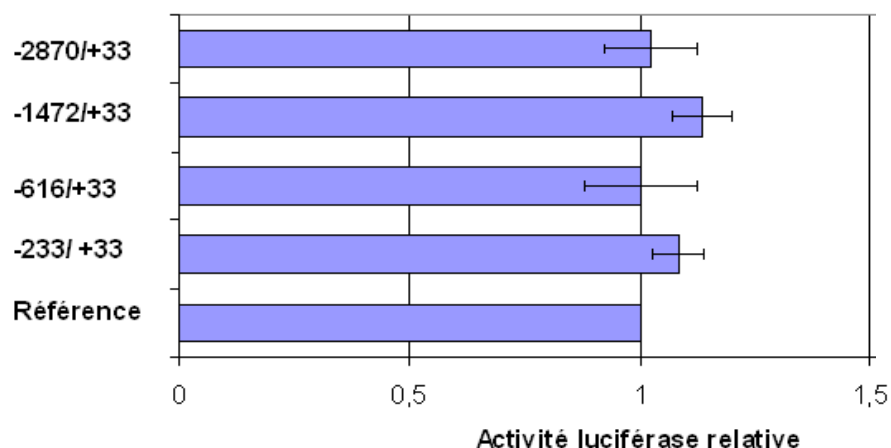
AP-1 Sp1 : Sites de liaison des facteurs de transcription

N° des constructions du promoteur de MUC4

Figure 42 : Positionnement des éléments *cis*-régulateurs pour les facteurs de transcription Sp1 et AP-1 au sein des promoteurs de MUC1 (A) et de MUC4 (B). Les constructions utilisées dans la suite des expériences sont représentées par un trait rouge. La numérotation se réfère au A du premier ATG (Perrais *et al.*, 2001).

Après la sélection des constructions, nous avons réalisé les expériences de co-transfections cellulaires transitoires des cellules Sh1. Les résultats obtenus révèlent que les activités luciférase relatives résultantes des co-transfections des constructions du promoteur de MUC1 (figure 43A) ou de MUC4 (figure 43B) et du vecteur d'expression de la galectine-3 ne sont pas significativement différentes de celles obtenues lors des co-transfections de ces mêmes constructions avec le vecteur vide.

A MUC1



B MUC4

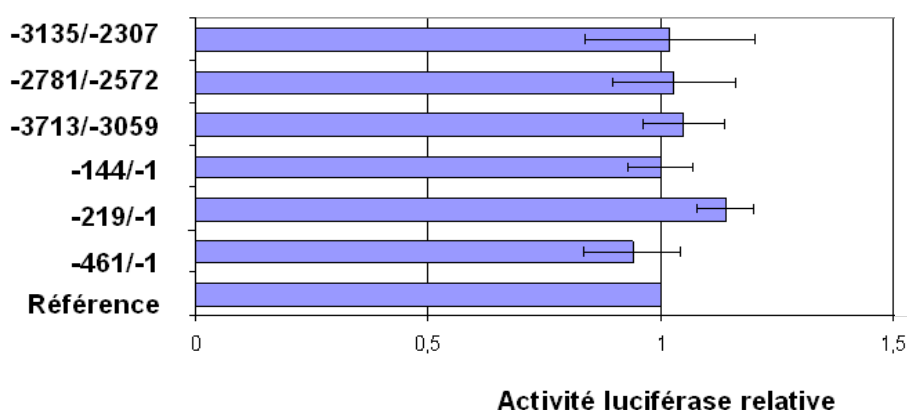


Figure 43 : Effets de la galectine-3 sur l'activité des différentes régions des promoteurs de *MUC1* et de *MUC4*.

Les activités luciférase relatives ont été obtenues lors des co-transfections transitoires des cellules Sh1 par le vecteur d'expression de la galectine-3 (0,2 µg) et les constructions du promoteur de *MUC1* (A) ou de *MUC4* (B) (1 µg). Ces résultats sont exprimés en niveau d'induction d'activité luciférase relative par rapport au vecteur d'expression vide (dont la valeur est posée à 1). Les résultats représentent la moyenne $\pm$ l'écart-type de deux expériences indépendantes où chaque co-transfection a été réalisée en triple.

Par conséquent, ces données indiquent que la galectine-3 seule ne semble pas moduler l'activité des promoteurs de *MUC1* et de *MUC4*.

Ensuite, nous avons testé l'influence de l'ajout des vecteurs d'expression des facteurs de transcription AP-1 et Sp1, lors des co-transfections, en présence de galectine-3, sur l'activité du promoteur de *MUC4*. Pour cela, nous avons sélectionné les constructions pour lesquelles ces facteurs de transcription sont connus pour avoir un effet positif sur l'activité du

promoteur de *MUC4* (Fauquette *et al.*, 2005). Trois d'entre elles ont été retenues (régions -461/-1, 219/-1 et -3135/-2307).

Les expériences de co-transfections indiquent que l'ajout des facteurs de transcription AP-1 et Sp1 ne modifie pas l'effet de la galectine-3 sur l'activité du promoteur de *MUC4* (figure 44). Par contre, lors des co-transfections, la galectine-3 semble réduire l'activité du promoteur de *MUC4* induite par AP-1 (c-Jun). Ces résultats nous permettent de conclure à l'absence d'effet transactivateur de la galectine-3 sur le promoteur de *MUC4*. N'ayant pas observé d'effet synergique en présence de ces facteurs sur l'activité du promoteur de *MUC4*, nous n'avons pas encore testé ces co-transfections en présence du promoteur de *MUC1*.

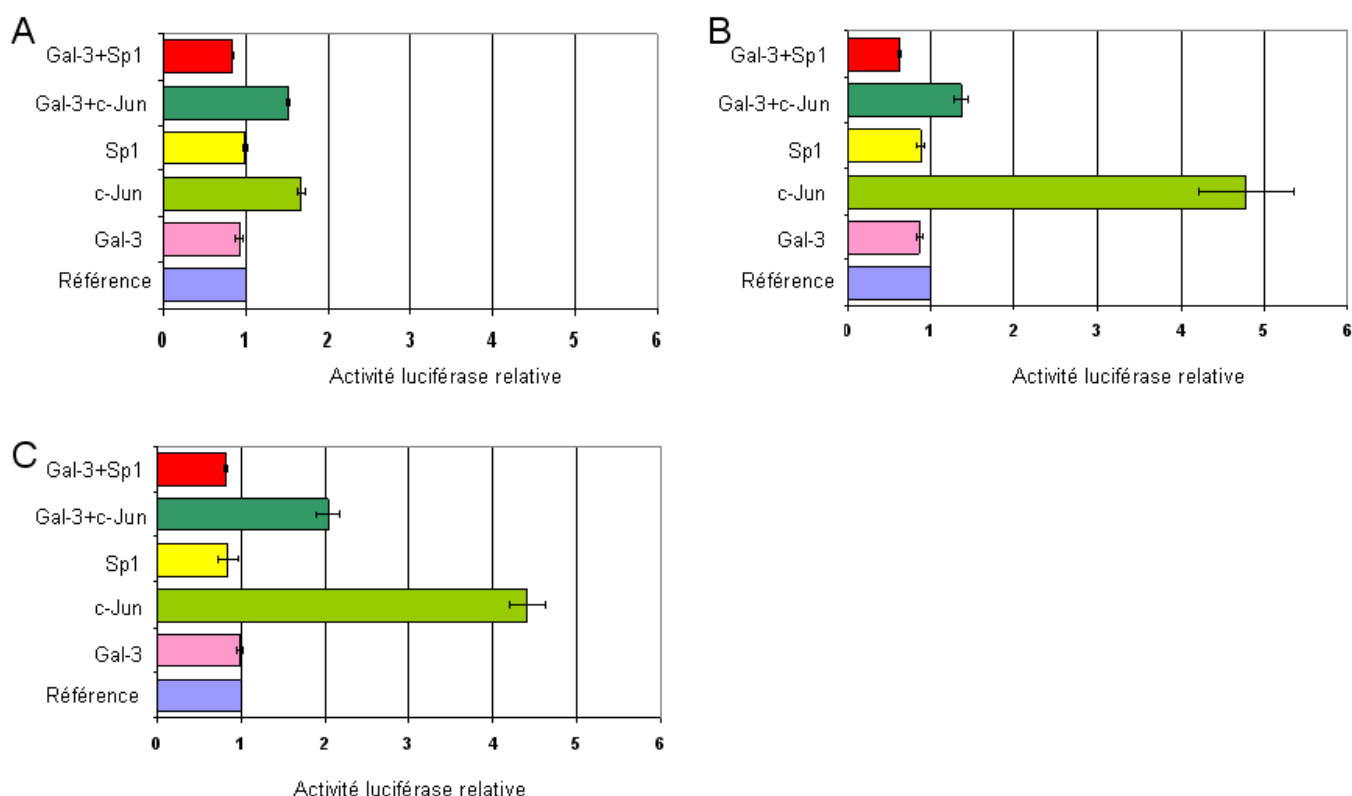


Figure 44 : Effets de la galectine-3 en présence de c-Jun ou Sp1 sur l'activité des différentes régions du promoteur de *MUC4*.

Les vecteurs d'expression codant gal-3, Sp1 et c-Jun (0,2 µg) ont été co-transfectés de façon transitoire seul ou en combinaison dans les cellules Sh1 avec les fragments codant les régions -461/-1 (A), -219/-1 (B) et -3135/-2307 (C) du promoteur de *MUC4*. Les résultats sont exprimés en niveau d'induction d'activité luciférase relative par rapport au vecteur d'expression vide (référence) et représentent la moyenne de deux expériences indépendantes où les co-transfections ont été réalisées en triple.

III.2. Etude de l'influence de la galectine-3 sur la stabilité des transcrits de *MUC1* et de *MUC4*

Cette absence de régulation à l'étape transcriptionnelle nous a conduits à rechercher une régulation par un mécanisme post-transcriptionnel. Par conséquent, nous nous sommes demandés si la galectine-3 pouvait influencer la stabilité des transcrits de *MUC1* et de *MUC4*. Pour cela, nous avons mesuré la demi-vie de ces ARNm en présence d'actinomycine D (inhibiteur de la transcription). Cette expérience a été réalisée à deux reprises sur des cellules post-confluentes. Les ARN totaux ont été récupérés, soumis à une RT-PCR puis les niveaux des transcrits de *MUC1* et de *MUC4* ont été évalués par qPCR TaqMan. Les résultats nous ont permis de tracer les courbes (figure 45A et B) représentant l'évolution de la quantité des transcrits de *MUC1* et de *MUC4* sur 30 h. La quantité d'ARNm de ces mucines pour chaque temps (0, 3, 6, 9, 12, 24 et 30 h) est normalisée grâce à la quantité d'ARN 18S de l'échantillon correspondant et est exprimée par rapport au temps zéro (100 %).

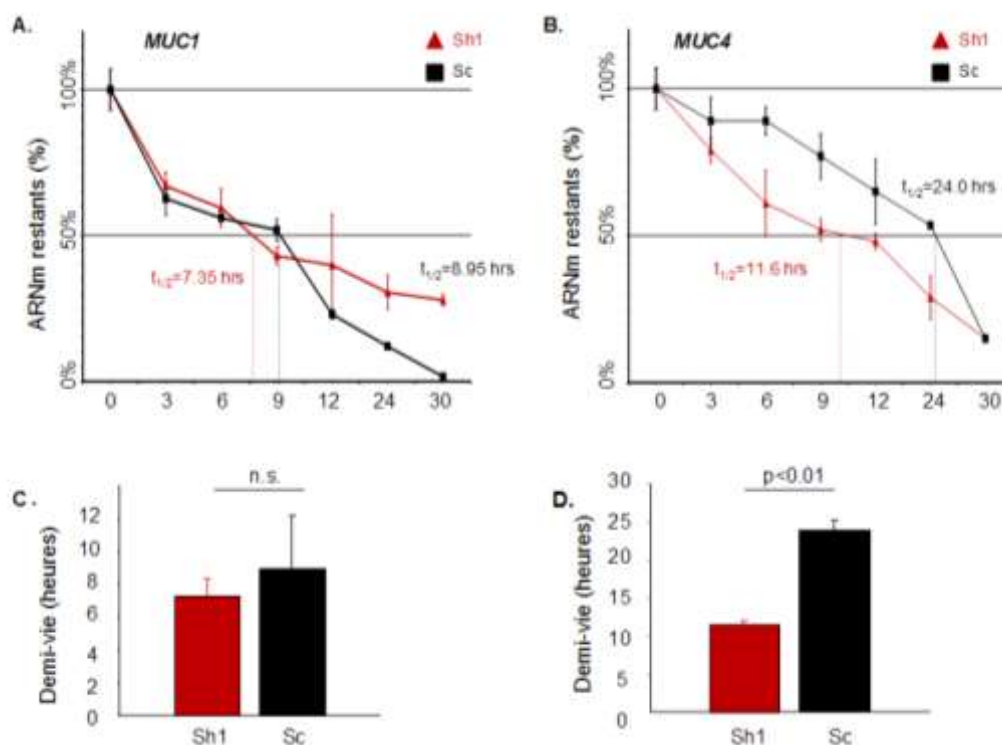


Figure 45 : Etude de la demi-vie des transcrits de *MUC1* et de *MUC4*.

(A et B) Courbes traduisant la diminution des ARNm de *MUC1* (A) et de *MUC4* (B), déterminées par qPCR dans les cellules Sc et Sh1 (quantité normalisée grâce à la quantité d'ARN 18S de chaque échantillon). Chaque point des graphiques représente la moyenne $\pm$ l'écart-type de deux expériences indépendantes où les échantillons ont été analysés en triple.

(C et D) Demi-vie des transcrits de *MUC1* (C) et de *MUC4* (D) dans les cellules Sc et Sh1. Les graphiques représentent la moyenne $\pm$ l'écart-type de la demi-vie des ARNm de *MUC1* et de *MUC4* dans les cellules Sc et Sh1. Celle-ci a été déduite des courbes construites à partir des données de qPCR (temps nécessaire pour que la quantité d'ARNm à temps zéro soit divisée par deux) lors de deux manipulations indépendantes (n.s. : non significatif).

La demi-vie des transcrits, représentant le temps nécessaire pour que la quantité de l'ARNm étudié présente au temps zéro soit divisée par deux, a été déduite des courbes de décroissance des transcrits. Celle de *MUC4* est de $24 \text{ h} \pm 1,2 \text{ h}$ dans les cellules Sc alors que celle observée dans les cellules Sh1 est de $11,6 \text{ h} \pm 0,4 \text{ h}$ (figure 45D). La différence de demi-vie entre les deux types cellulaires est statistiquement significative ($p < 0,01$) indiquant donc que la galectine-3 stabiliserait les transcrits de *MUC4*.

La demi-vie des transcrits de *MUC1* est de $8,9 \text{ h} \pm 3,3 \text{ h}$ dans les cellules Sc et de $7,3 \text{ h} \pm 1,1 \text{ h}$ dans les cellules Sh1. Cette différence est statistiquement non significative (figure 45C). Contrairement à ce qui est observé pour *MUC4*, l'effet de la galectine-3 sur l'expression de *MUC1* ne passerait pas par la stabilisation des ARNm de cette mucine.

III.3. Etude de la liaison de la galectine-3 sur les transcrits de *MUC4*

La stabilisation des transcrits de *MUC4* par la galectine-3 pourrait s'expliquer par sa liaison sur les ARNm de *MUC4*. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons réalisé une immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines à l'aide d'un anticorps anti-galectine-3 et d'un anticorps anti-U1 (constituant du spliceosome) dans les cellules Sc. Ce dernier sert de contrôle positif puisque la ribonucléoprotéine U1 est présente sur les pré-ARNm lors du processus d'épissage. Une immunoprécipitation réalisée en absence d'anticorps et une autre effectuée grâce à une immunoglobuline irrelevante de type IgG servent de témoins négatifs. Afin de réaliser la PCR après la synthèse de l'ADNc, nous avons choisi des amorces situées dans les exons 23 et 25, permettant d'évaluer l'épissage des ARNm de *MUC4*. En effet, la forme épissée entre ces exons est mise en évidence par une bande située à 596 pb alors que le transcrit immature est détecté à une taille supérieure à 2 kb selon la présence d'un ou de deux introns (figure 46).

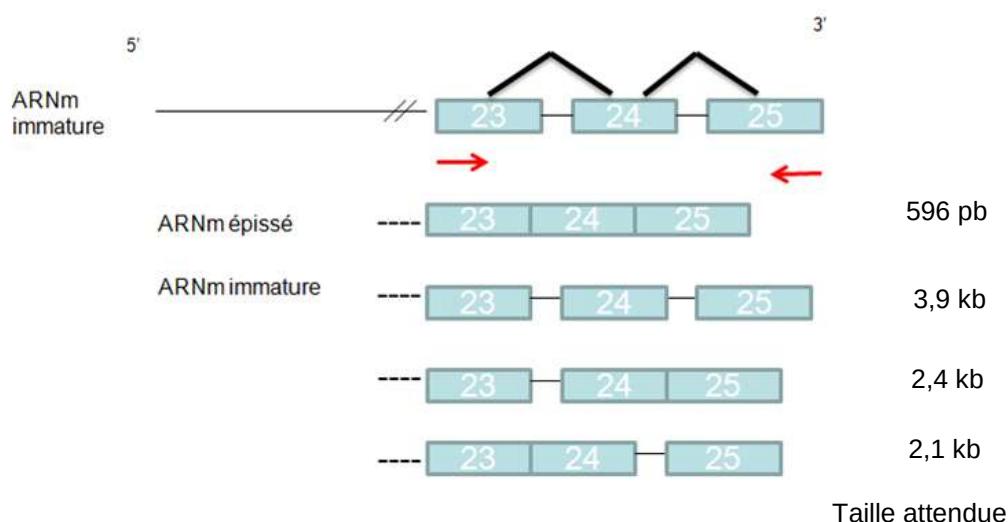


Figure 46 : Représentation de la position des amorces utilisées pour la PCR réalisée dans l'expérience d'immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines et des différentes formes d'épissage pouvant être détectées.

Les résultats obtenus après RT-PCR (figure 47) indiquent que l'anticorps anti-galectine-3 permet d'immunoprécipiter les ARNm de *MUC4*, ce qui confirme l'hypothèse d'une liaison de la galectine-3 sur les transcrits de cette mucine. La présence d'une bande à 596 pb (figure 47) indique que l'ARNm immunoprécipité est épissé entre les deux exons, suggérant ainsi que la galectine-3 se lierait à des transcrits épissés entre les exons 23 et 25.

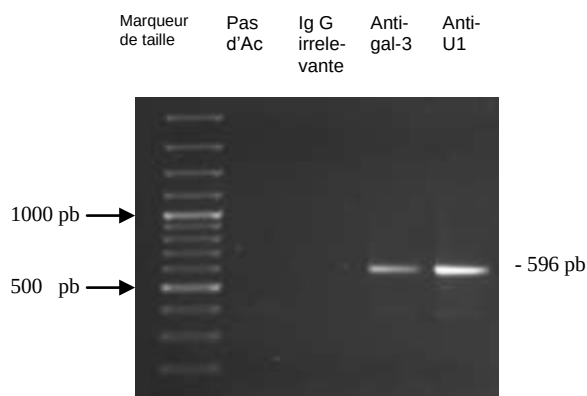


Figure 47 : Immunoprécipitation des ARNm de *MUC4* à l'aide des anticorps anti-galectine-3 et anti-U1 dans les cellules Sc.

La figure représente les résultats obtenus après transcription inverse des ARNm immunoprécipités suivi d'une amplification par PCR utilisant des amorces ciblant l'ADNc de *MUC4* (amorce sens dans l'exon 23 et antisens dans l'exon 25).

Cette interaction entrainerait la stabilisation des ARNm de *MUC4* expliquant ainsi leur quantité plus importante dans les cellules Sc (exprimant la galectine-3) par rapport aux cellules Sh1.

Discussion

Les mucines membranaires MUC1 et MUC4 sont respectivement sur- et néoexprimées au cours de l'adénocarcinome pancréatique canalaire et présentent des anomalies de localisation cellulaire. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces modifications d'expression ne sont pas complètement élucidés. L'étude des régions 5' flanquantes des gènes des mucines humaines MUC1 et MUC4 a montré l'existence au sein de ces promoteurs de nombreux sites potentiels de liaison pour des facteurs de transcription tels que Sp1, AP-1, etc. (Perrais *et al.*, 2001).

La caractérisation de la lignée cancéreuse pancréatique humaine CAPAN-1, invalidée spécifiquement pour le gène *LGALS3* (cellules Sh1) dans le but d'étudier le rôle de la galectine-3 dans le trafic intracellulaire des mucines (Merlin *et al.*, 2011), a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* dans ces cellules par rapport aux cellules contrôles (Sc) exprimant la galectine-3.

Les différentes expériences réalisées durant notre étude ont permis d'apporter des éléments dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* par cette lectine endogène.

I. Etude de l'influence de la galectine-3 sur l'activité des promoteurs de MUC1 et de MUC4

Les résultats concernant le niveau d'expression de ces mucines dans les cellules Sh1 et Sc ainsi que l'expérience de restauration de phénotype démontrent une régulation positive par la galectine-3 dès le stade des transcrits de *MUC1* et de *MUC4*, puisque leurs quantités augmentent en présence de galectine-3. Nous avons alors supposé l'existence soit d'une régulation transcriptionnelle, soit d'une modification de la stabilité des transcrits de *MUC1* et de *MUC4* sous l'influence de la galectine-3.

Actuellement, aucune donnée de la littérature n'évoque de lien entre la galectine-3 et la régulation de l'expression de *MUC1* et de *MUC4*, ces protéines étant néanmoins surexprimées au cours de l'adénocarcinome pancréatique. Cependant, des études ont déjà décrit la modulation de l'expression de certains gènes par la galectine-3, en particulier ceux codant certaines mucines. En effet, Song *et al.* (2005) ont montré que la galectine-3 intervient dans la régulation de l'expression de *MUC2* dans les cellules cancéreuses coliques humaines au niveau transcriptionnel par la stabilisation de la liaison de protéines nucléaires au niveau d'un des sites AP-1 (-1871) présents dans le promoteur de ce gène. Cette induction serait la conséquence d'une interaction directe entre la galectine-3 nucléaire et le complexe de transcription AP-1 (c'est-à-dire les facteurs c-Jun et Fra1). La régulation de l'expression de gènes par la galectine-3 fait appel également à d'autres facteurs de transcription tel que Sp1. Ainsi, Lin *et al.* (2002) ont mis en évidence que la galectine-3

module l'activité du promoteur de la cycline D1 par la stabilisation du facteur de transcription Sp1 sur ses éléments *cis* présents dans le promoteur de ce gène.

Du fait de la localisation nucléaire de la galectine-3 dans les cellules Sc (Merlin *et al.*, 2011) et de la présence de sites de fixation pour les facteurs AP-1 et Sp1 dans les promoteurs de *MUC1* et de *MUC4* (Perrais *et al.*, 2001), nous avons supposé dans un premier temps l'existence d'une régulation transcriptionnelle de *MUC1* et de *MUC4* par la galectine-3 et nous avons ainsi étudié l'influence de la galectine-3 sur l'activité des promoteurs de ces mucines.

Nous avons réalisé des co-transfections cellulaires transitoires, dans les cellules Sh1, du vecteur d'expression de la galectine-3 et des différentes constructions du promoteur de *MUC1* ou de *MUC4* clonées en amont du gène codant la luciférase. Les activités luciférase résultantes de ces co-transfections ne sont pas différentes de celles obtenues avec le vecteur d'expression dépourvu de l'insert codant la galectine-3. Les résultats obtenus indiquent donc que cette lectine ne module pas directement l'activité transcriptionnelle de *MUC1* et de *MUC4*.

II. Etude du rôle de la galectine-3 sur la demi-vie des transcrits de *MUC1* et de *MUC4*

Les résultats précédents nous ont amenés à explorer un autre processus pouvant expliquer la modulation de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* par la galectine-3.

Fischer *et al.* (2003) ont mis en évidence l'implication de l'élastase des polynucléaires neutrophiles, produite lors du processus inflammatoire, dans la modification de la stabilité des transcrits de *MUC4*, leur demi-vie passant de 5 h à 21 h en présence de l'enzyme. De la même façon, nous avons étudié si la galectine-3 pouvait exercer une régulation de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* au niveau post-transcriptionnel, notamment en modulant la stabilité de leurs transcrits.

Afin de déterminer si la galectine-3 agit sur les demi-vies des ARNm de *MUC1* et de *MUC4*, nous avons déterminé celles-ci dans les cellules Sh1 et Sc en présence d'actinomycine D.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative de la demi-vie des transcrits de *MUC4* en absence de cette protéine. En effet, la demi-vie des transcrits de *MUC4* est de 24 h dans les cellules Sc et de 11 h dans les cellules Sh1, différence statistiquement significative. Cela indique donc que la galectine-3 pourrait être impliquée dans la stabilisation des transcrits de *MUC4* et ces données expliqueraient la diminution quantitative des ARNm de *MUC4* observée en absence de galectine-3. Ces résultats mettent donc en évidence une régulation de l'expression de *MUC4* par la galectine-3 au niveau post-transcriptionnel.

Afin d'expliquer les mécanismes mis en jeu dans la stabilisation des transcrits de *MUC4* par la galectine-3, différentes hypothèses peuvent être posées :

1) Tout d'abord, les séquences de type ARE (séquences riches en adénines et uraciles contenues dans la région 3' non codante de l'ARNm) présentes dans la région 3'UTR des transcrits de *MUC4* pourraient être impliquées dans ce phénomène. En effet, ces séquences peuvent être la cible de la protéine stabilisatrice appelée *Human antigen R* (HuR). Ce mécanisme est démontré pour les gènes codant le $TNF\alpha$, c-myc, etc. (Nguyen-Chi and Morello, 2008).

Nous pouvons donc supposer que la galectine-3 agirait par le biais de ces séquences de type ARE soit :

- en modulant le « turn over » de la protéine HuR,
- en modifiant la distribution cellulaire de HuR, entraînant ainsi une répartition de cette protéine favorable pour la stabilisation des ARNm de *MUC4*,
- en facilitant l'interaction de HuR avec les séquences de type ARE présentes dans les transcrits de *MUC4*. En effet, la galectine-3 possède des caractéristiques communes avec les protéines de la famille SR (protéines riches en résidus sérines et arginines). Ces deux groupes de protéines présentent une distribution nucléaire et cytoplasmique, interviennent dans l'épissage des pré-ARNm, se lient aux motifs glycaniques et peuvent être retrouvées à la surface de certains types cellulaires (Haudek *et al.*, 2010). Delestienne *et al.* (2011) ont mis en évidence qu'un membre de la famille des protéines SR, appelé SRSF1 (*serine/arginine-rich splicing factor 1*), interagit avec TIA1 (*T-cell intracytoplasmic antigen 1*), protéine se liant aux séquences de type ARE des transcrits. Un parallèle pourrait être établi dans notre modèle : la galectine-3, analogue des protéines SR, serait capable d'interagir avec HuR, analogue de TIA1. Ainsi, la galectine-3, tout comme les protéines SR, participerait à la régulation post-transcriptionnelle des ARNm possédant des séquences de type ARE par le biais d'interactions protéine-protéine avec les *ARE-binding proteins*.

2) Nous pouvons également envisager que la galectine-3 exercerait son action stabilisatrice par l'intermédiaire des *PolyA Binding Proteins* (PABP). Ces dernières sont capables de se lier au niveau de la queue polyA des ARNm, protégeant le transcrit de l'attaque des exonucléases et assurant ainsi le maintien de l'intégrité de l'ARNm. En effet, si la queue polyA n'est pas protégée, elle est soumise au processus de deadénylation par ces

enzymes, favorisant la perte de la coiffe de l'ARNm en 5' (*decapping*) et la dégradation de l'ARNm par différentes exonucléases.

3) Enfin, la galectine-3 pourrait moduler l'expression d'une protéine stabilisatrice spécifique des ARNm de *MUC4*. Ce processus a déjà été décrit pour l'ARNm du récepteur de la transferrine stabilisé par l'IRP en absence de Fer, le protégeant ainsi de la dégradation. Cependant, aucune protéine ciblant spécifiquement les ARNm de *MUC4* n'a encore été décrite.

On peut également supposer que la galectine-3 interagirait directement avec les transcrits de *MUC4* pour exercer cette action, sans passer par une protéine stabilisatrice. Néanmoins, la plupart des actions médiées par la galectine-3 sur un ARNm s'exerce de façon indirecte, que ce soit pour la régulation transcriptionnelle où elle agit par la stabilisation de facteur de transcription ou pour son rôle dans l'épissage où elle intervient par l'intermédiaire de la ribonucléoprotéine U1 (figure 48).

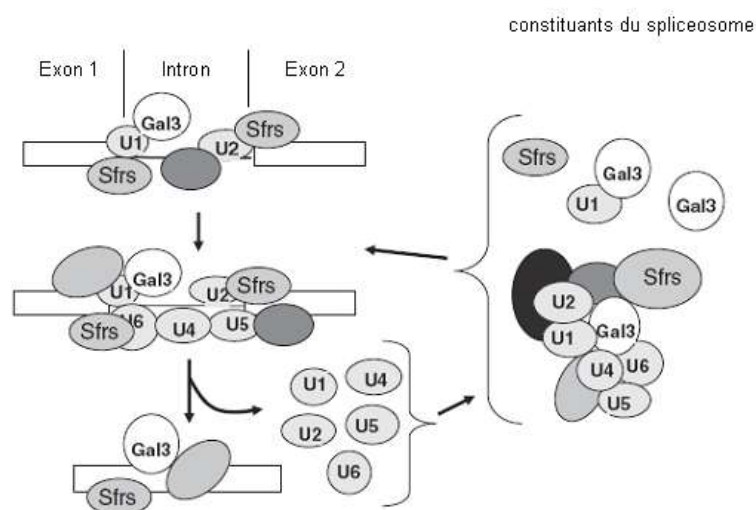


Figure 48 : Rôle de la galectine-3 dans l'épissage des pré-ARNm par le biais de son interaction avec la ribonucléoprotéine U1 (Haudek *et al.*, 2010).

Nous avons exploré l'hypothèse de la stabilisation des ARNm de *MUC4* en recherchant une interaction entre la galectine-3 et les transcrits de *MUC4* par immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines. Cette expérience nous a permis d'immunoprécipiter les ARNm de *MUC4* avec un anticorps anti-galectine-3, validant ainsi cette hypothèse. Il semble donc que cette protéine soit capable d'interagir avec les transcrits de *MUC4*. Ce processus pourrait expliquer leur stabilisation et donc l'allongement de leur demi-vie en présence de galectine-3. Cependant, le site de liaison potentiel (queue polyA ou région 3'UTR des transcrits) et le type d'interaction (directe ou faisant intervenir une

protéine) restent à déterminer. L'implication d'une protéine intermédiaire est envisageable car il est maintenant démontré que la galectine-3 et la galectine-1 interviennent dans l'épissage des pré-ARNm (Patterson *et al.*, 2004) en se liant de façon indirecte à ceux-ci. En effet, ces protéines s'associent à la ribonucléoprotéine U1 du spliceosome pour exercer cette fonction.

En conclusion, la galectine-3, connue pour son rôle dans l'épissage des pré-ARNm par une liaison indirecte à ceux-ci, semble interagir avec les transcrits de *MUC4* entraînant ainsi leur stabilisation.

La demi-vie des transcrits de *MUC1*, déterminée en présence d'actinomycine D est de 8,9 h dans les cellules Sc et de 7,3 h dans les cellules Sh1. Cette différence est non statistiquement significative, ce qui indique donc que la galectine-3 ne semble pas modifier la stabilité des ARNm de *MUC1*.

Comment expliquer alors leur diminution en absence de cette lectine ? Nos résultats suggèrent que la galectine-3 ne modifie ni l'activité du promoteur de *MUC1* ni la stabilité de ses transcrits. Nous pouvons alors supposer l'existence d'une régulation épigénétique de l'expression de *MUC1* sous l'influence de la galectine-3.

Ramasamy *et al.* (2007) ont mis en évidence un lien entre la galectine-3 et cette mucine par le biais d'un microARN. Ces deux acteurs agissent dans une boucle de régulation positive. La surexpression de *MUC1*, phénomène observé dans certains cancers, supprime l'expression de miR322 qui déstabilise normalement le transcrit de la galectine-3. Ce mécanisme régule donc positivement l'expression du gène codant la galectine-3 par le biais de *MUC1*.

Des modifications de l'expression des microARN sont observées au cours du processus tumoral. Leur profil d'expression dans l'adénocarcinome pancréatique canalaire indique une surexpression des microARN oncogéniques, appelés oncomir, et une sous-expression de ceux exerçant un rôle suppresseur de tumeurs (Rachagani *et al.*, 2010). Levy *et al.* (2011) ont montré dans un modèle murin que la perte de la galectine-3 est associée à l'augmentation de l'expression du microARN let-7c, régulateur négatif de l'expression de *KRAS*. Ce mécanisme explique la diminution de l'expression de cet oncogène en l'absence de cette lectine. De la même façon, dans notre modèle, la galectine-3 pourrait réprimer l'expression d'un microARN déstabilisateur des ARNm de *MUC1*, phénomène expliquant la présence de cette mucine dans les cellules Sc puisque ses transcrits ne sont plus dégradés. Dans les cellules Sh1, l'absence de cette lectine serait dans ce cas associée à la présence du microARN et donc à la dégradation des transcrits de *MUC1*.

La galectine-3 ne semble donc pas faire intervenir le même mécanisme pour réguler l'expression de *MUC1* et de *MUC4* dont les transcrits ont une taille de 4 à 6,5 kb pour *MUC1*

et 14 à 26 kb pour *MUC4*. Une question demeure alors en suspend : la modification de la stabilité des ARNm par la galectine-3 concernerait-elle les transcrits de grande taille ?

III. Liens entre MUC1 ou MUC4 et galectine-3 dans le cancer du pancréas

La mucine MUC4 et la galectine-3 sont toutes deux surexprimées au cours de l'adénocarcinome pancréatique. Nos travaux ont mis en évidence le rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression de *MUC4* par le biais de la stabilisation de ses transcrits. Cette modulation post-transcriptionnelle pourrait être liée aux rôles de la galectine-3 et de MUC4 dans la tumorigenèse. En effet, à l'implication propre de chacune de ces protéines dans la cancérogenèse s'ajoute leur interaction au cours du processus métastatique observé dans le cancer pancréatique (Senepati *et al.*, 2010). Celui-ci nécessite notamment l'adhérence des cellules cancéreuses, qui se sont détachées du site tumoral initial, aux cellules endothéliales pour envahir un site secondaire. Cette étude démontre que la mucine MUC4, riche en résidus O-glycosylés, est un partenaire de la galectine-3. Cette dernière, présente dans le milieu extracellulaire sur les cellules endothéliales, permet l'attachement, dans un premier temps réversible, des cellules cancéreuses exprimant MUC4 par le biais des motifs glycaniques présents sur cette mucine. Cette interaction entraîne par la suite une redistribution de MUC4 à la surface des cellules cancéreuses (phénomène de *capping*), permettant ainsi l'exposition de molécules d'adhérence telles que les intégrines, normalement masquées par la grande taille de MUC4. Ce processus entraîne un attachement cette fois-ci irréversible des cellules tumorales aux cellules endothéliales, favorisant de ce fait le phénomène métastatique (figure 49).

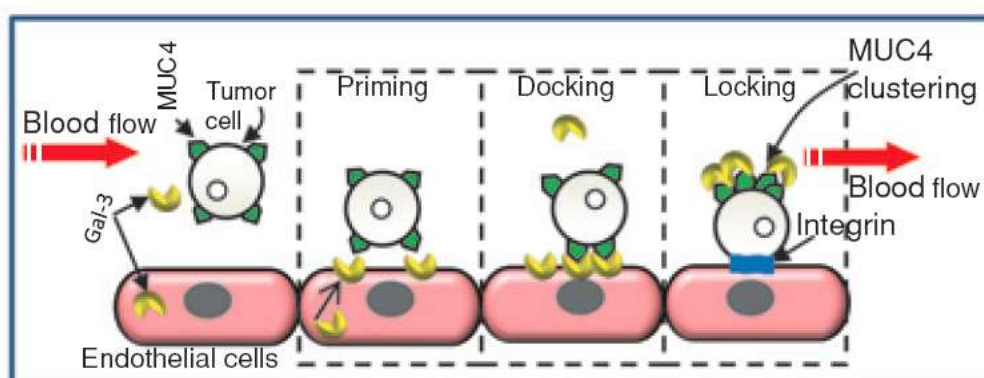


Figure 49 : Représentation schématique de l'interaction entre MUC4 et la galectine-3 intervenant dans le processus métastatique (Senepati *et al.* 2010).

Zhoa *et al.* (2009) ont décrit ce même processus d'interaction pour la mucine membranaire MUC1. En effet, cette dernière interagit par l'intermédiaire de son motif

antigénique « Thomsen Friedenreich » (galactose $\beta(1\rightarrow3)$ *N*-acetylgalactosamine α -) avec la galectine-3. Cela entraîne une redistribution de MUC1 à la surface cellulaire et permet l'exposition de molécules d'adhérence habituellement masquées par cette mucine, facilitant ainsi la dissémination métastatique de la même façon que celle décrite pour MUC4.

Nos travaux suggèrent donc l'existence d'un mécanisme de régulation de l'expression de MUC4, par le biais de la stabilisation de ses transcrits, qui impliquerait la galectine-3, attribuant ainsi un nouveau rôle à cette lectine. Cependant, nous n'avons pas retrouvé cette fonction envers les ARNm de *MUC1*, suggérant ainsi un rôle stabilisateur spécifique de la galectine-3 vis-à-vis des ARNm de grande taille.

Ce travail offre différentes perspectives de recherche :

Objectif 1 : Etude de la régulation de l'expression de MUC4 par la galectine-3 dans les cellules cancéreuses pancréatiques

Ce sujet nous a permis d'explorer différents mécanismes pouvant expliquer la régulation de l'expression de *MUC4* par la galectine-3. Les résultats obtenus par co-transfections cellulaires transitoires nous indiquent que la galectine-3 n'exerce pas d'effet transactivateur sur le promoteur de *MUC4*. La mesure de la demi-vie des transcrits de *MUC4* en présence d'actinomycine D montre une diminution de celle-ci dans les cellules Sh1 par rapport aux cellules Sc suggérant ainsi un effet positif de la galectine-3 sur la stabilisation des ARNm de *MUC4*.

La suite du projet consistera à confirmer une interaction entre la galectine-3 et les transcrits de *MUC4* par immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines puis à préciser le(s) site(s) de liaison de la galectine-3 sur le transcrit de *MUC4* et le mécanisme (direct ou indirect) en cause.

Dans un premier temps, afin d'étudier l'implication de la queue polyA, nous déterminerons la demi-vie des ARNm de *MUC4* en présence de cordycepine, un inhibiteur de la polyadénylation des ARNm. Si une diminution de la demi-vie des transcrits de *MUC4* est constatée dans les cellules Sc exprimant la galectine-3 en présence de la drogue, cela indiquera l'implication de la queue polyA dans la stabilisation des ARNm de *MUC4* par la galectine-3.

Dans un second temps, afin de déterminer la zone d'interaction de la galectine-3 sur les transcrits de *MUC4*, nous générerons différentes ribosondes radiomarquées par le [32 P]. Celles-ci seront obtenues en sous-clonant des fragments obtenus par PCR et correspondants aux zones d'intérêt de l'ARNm de *MUC4* en vecteur pGEM (Promega). Les

ribosondes seront utilisées afin d'évaluer la liaison de la galectine-3 par retard de migration sur gel en ARN (REMSA) et nous identifierons les complexes sondes-galectine-3 par « Supershift » à l'aide d'un anticorps anti-galectine-3. Ainsi, nous déterminerons le(s) site(s) de fixation de cette protéine sur les transcrits de *MUC4*, processus à l'origine de leur stabilisation.

Objectif 2 : Etude de la régulation de l'expression de MUC1 par la galectine-3 dans les cellules cancéreuses pancréatiques

Des travaux préalables ont montré une diminution de l'expression de *MUC1* de 66 % dans les cellules Sh1 par rapport aux cellules Sc par qPCR (Merlin *et al.*, 2011). Le mécanisme par lequel la galectine-3 interviendrait dans la régulation de l'expression de *MUC1* est méconnu. Cependant, nous avons montré qu'il ne fait pas intervenir de régulation de l'activité du promoteur de *MUC1* et que la galectine-3 ne module pas la stabilité des transcrits de cette mucine.

Nous rechercherons donc une régulation au niveau épigénétique en comparant le profil des microARN entre les cellules Sh1 et Sc par qPCR en ciblant dans un premier temps ceux qui sont connus pour être impliqués dans sa régulation (miR125-b, -145, -1226). Nous pouvons également envisager de comparer ces profils à l'aide de puces spécifiques de microARN.

En fonction des résultats obtenus, des expériences de transfections cellulaires transitoires des cellules Sh1 par des inhibiteurs de ce(s) microARN (antagomir) permettront de déterminer si l'expression de *MUC1* redevient comparable à celle observée dans les cellules Sc à la fois aux niveaux transcriptionnel et protéique. En effet, le microARN ne peut plus exercer son effet inhibiteur en présence de son antagoniste.

Objectif 3 : Etude de l'influence de la galectine-3 sur la production des variants d'épissage de MUC4

L'épissage alternatif des ARNm de *MUC4* génère 24 variants comprenant 18 formes sécrétées, 4 membranaires et 2 dépourvues du domaine central répété en tandem. L'étude menée par Choudhury *et al.* (2000) a mis en évidence une modification de l'expression de ces variants dans les cellules cancéreuses pancréatiques avec notamment la forme sv10-*MUC4* observée dans 37 % des cas d'adénocarcinome pancréatique canalaire alors qu'elle n'est pas présente dans le tissu pancréatique sain. Il s'agit d'un variant membranaire différent de la forme sv0-*MUC4* par la délétion de 156 nucléotides dans le domaine CT2 (extrémité C-terminale de la sous-unité *MUC4* α).

Nous souhaitons étudier l'influence de la galectine-3 sur ce processus, celle-ci étant un facteur d'épissage capable d'interagir avec la ribonucléoprotéine U1 (Haudek *et al.*, 2010), composant du spliceosome.

Tout d'abord, nous comparerons le profil des variants de *MUC4*, sur des ARN polyA purifiés à partir de cellules Sc et Sh1, par RT-PCR à l'aide de différentes amorces permettant de distinguer divers variants. Nous étudierons également ce phénomène par séquençage haut-débit sur les ARN polyA purifiés à partir de différentes lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques et sur des ARNm commerciaux issus de trachée et de colon.

Si des différences sont visibles, nous évaluerons la modification de l'efficacité d'épissage entre les cellules Sc et Sh1 en sous-clonant des fragments du gène *MUC4* constitués d'une séquence intron-exon-intron à étudier en vecteur pCAS (collaboration, Dr Buisine, Lille).

Ce travail devrait nous permettre de préciser les différents mécanismes d'action de la galectine-3 sur les ARNm des mucines membranaires MUC1 et MUC4.

Conclusion

Cette étude nous a permis de déterminer le rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression des mucines membranaires MUC1 et MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

En effet, la galectine-3 n'affecte pas l'activité des promoteurs de *MUC1* et de *MUC4* mais agit par le biais de la stabilisation des transcrits de *MUC4*, entraînant ainsi un allongement de leur demi-vie. Ceci expliquerait en partie la quantité plus importante de mucine MUC4 associée à la surexpression de la galectine-3, situation observée lors de l'adénocarcinome pancréatique canalaire. Le mécanisme intervenant dans la modification de l'expression de la mucine MUC1 reste à déterminer.

L'ensemble des travaux portant sur la régulation de l'expression de *MUC4* ont montré d'une part une régulation au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs tels que le TGF β , les facteurs de transcription PEA3, AP-2, les facteurs de transcription intervenant dans la différenciation cellulaire (HNF, GATA, CDX, FOXA), etc. D'autre part, il existe, au cours de l'adénocarcinome pancréatique, une régulation au niveau épigénétique de *MUC4* par le biais de la méthylation de l'ADN et de la modification des histones (Jonckheere and Van Seuning, 2008a). Notre travail a permis de mettre en évidence une régulation de l'expression de *MUC4* au niveau post-transcriptionnel par le biais de la stabilisation de ses transcrits par la galectine-3. L'ensemble de ces résultats montrent que l'expression de *MUC4* est finement régulée dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

Appendice technique

I. Culture cellulaire

I.1. *Lignée cellulaire cancéreuse humaine pancréatique CAPAN-1*

La lignée cellulaire CAPAN-1 (ATCC HTB-79) provient d'une métastase hépatique d'un adénocarcinome pancréatique canalaire d'un homme caucasien de 40 ans. Ces cellules poussent en monocouche et possèdent une morphologie de cellules épithéliales prismatiques (figure 50).

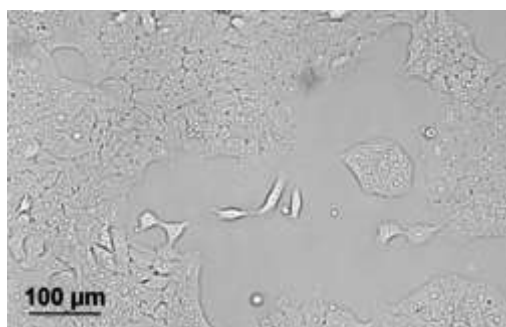


Figure 50 : Aspect microscopique des cellules CAPAN-1 (grossissement x 100).

I.2. *Lignée cellulaire Sh1*

Les cellules Sh1 dérivent de la lignée cellulaire CAPAN-1 invalidée spécifiquement pour le gène codant la galectine-3 humaine par *short hairpin RNA* (*sh*-RNA) médié par infection rétro-virale (Merlin *et al.*, 2011). La séquence utilisée cible la partie 3' de l'exon 5 (GAAGAAAGACAGTCGGTTT) du gène *LGALS3*. Comme témoin négatif, une construction *Scramble* (Sc) (AAGTCAATCAACACGGTAACA) spécifique d'aucun ARNm humain a été mise au point après criblage de banques d'ADN génomique et de transcrits humains.

I.3. *Composition des milieux de culture*

Les compositions des milieux de culture sont résumées dans le tableau IV.

Tableau IV : Compositions des différents milieux de culture.

Lignée cellulaire	Composition du milieu de culture
CAPAN-1	RPMI 1640 + 15 % (v/v) de sérum de veau fœtal + 100 U/ml pénicilline/streptomycine + 2 mM L-glutamine
Sh1 et Sc	RPMI 1640 + 15 % (v/v) de sérum de veau fœtal + 100 U/ml pénicilline/streptomycine + 2 mM L-glutamine + 200 ng/ml puromycine

I.4. Conditions de culture

Les milieux de culture et les différents réactifs sont de qualité culture cellulaire (Invitrogen) et sont maintenus stériles. Le changement de milieu est effectué tous les jours sous hotte à flux laminaire.

Les cellules sontensemencées une fois par semaine de la façon suivante : après élimination du milieu de culture, les cellules sont rincées une fois avec du tampon phosphate salin 1X selon Dubelcco (D-PBS 1X). Puis, 2 ml de trypsine-EDTA (trypsine 0,05 % (v/v), EDTA 0,5 mM) sont ajoutés et les flacons de culture de 25 cm² (Falcon®) sont placés à 37 °C pendant 10 min. Une fois les cellules dissociées, la trypsine est neutralisée par 8 ml de milieu et la suspension est transférée dans un tube à centrifuger de 50 ml. Celui-ci est centrifugé à 470 x *g* durant 4 min à température ambiante (T°amb.). Le surnageant est ensuite aspiré et 10 ml de milieu neuf sont ajoutés. Suite à un comptage cellulaire effectué en cellule de Malassez en présence de bleu de trypan à 0,05 % (m/v), les cellules sont réparties dans des flacons de culture à raison de 5.10⁵ cellules par flacon de 25 cm² ou de 1,5.10⁶ cellules par flacon de 75 cm². Ceux-ci sont ensuite placés à 37 °C en présence de 5 % de CO₂.

II. Restauration de phénotype

II.1. Traitement des cellules par la galectine-3 recombinante

Une semaine avant la récupération des ARNm, les cellules sontensemencées en plaque 24 puits à raison de 2,5.10⁴ cellules par puits dans un volume de 500 µl de milieu complet. Deux jours avant la récupération, les cellules sont privées de sérum de veau fœtal (SVF), c'est-à-dire qu'elles sont rincées deux fois avec du D-PBS 1X puis recouvertes de milieu contenant 0,01 % (m/v) de Sérumalbumine Bovine (BSA), 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine et 1 % (v/v) de L-Glutamine. Quatre heures plus tard, ce milieu est additionné de 4 µM de galectine-3 recombinante pour une durée de 40 h au cours desquelles le milieu contenant la lectine est renouvelé deux fois.

II.2. Extraction des ARN et Reverse transcription spécifique

La récupération des ARNm est réalisée en utilisant le kit « SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis System » (Invitrogen). Il présente l'avantage d'extraire les ARN à partir d'un nombre de cellules compris entre 1 et 1.10⁴, ce qui permet de réduire le volume du milieu de culture des cellules et donc la quantité de galectine-3 recombinante à utiliser.

II.2.1. Récupération des cellules

Après lavage du tapis cellulaire avec du D-PBS 1X, les cellules sont détachées du support par incubation dans 500 μ l de trypsine-EDTA pendant 10 min à 37 °C. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 9,5 ml de milieu neuf complet dans un tube à centrifuger de 15 ml. Celui-ci est centrifugé à 470 x g pendant 4 min à T°amb. Le culot cellulaire obtenu est remis en suspension dans 5 ml de D-PBS 1X froid. Les cellules sont de nouveau centrifugées dans les mêmes conditions et le culot cellulaire est repris par 200 μ l de D-PBS 1X froid. Les cellules sont comptées en lame de Malassez et le volume de D-PBS 1X est ajusté afin d'obtenir $7,5 \cdot 10^3$ cellules par microlitre.

II.2.2. Extraction des ARN

Les ARNm sont extraits à l'aide du kit « SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis System ». Pour cela, dans un microtube de 0,2 ml, 10 μ l de « tampon de resuspension » et 1 μ l de RNaseOUT® (40 U/ μ l, mélange de différents inhibiteurs de RNases) sont ajoutés à 1 μ l de cellules (soit $7,5 \cdot 10^3$ cellules) avant une incubation de 10 min à 75 °C. Afin d'éliminer toutes traces d'ADN, 5 μ l de DNase I® et 1,6 μ l de tampon 10X de la DNase I sont additionnés et le tout est laissé 5 min à T°amb (figure 51). Ensuite, l'ajout de 1,2 μ l d'EDTA (25 mM) est suivi d'une incubation à 70 °C pendant 5 min afin d'arrêter la réaction.

II.2.3. Synthèse de l'ADNc

La synthèse de l'ADNc (figure 51) est réalisée en ajoutant 1 μ l de dNTPs (10 mM) et 2 μ l d'oligo(dT)₂₀ (50 mM). Le mélange est incubé 5 min à 70 °C puis 2 min sur glace avant l'apport de 6 μ l de tampon RT 5X, 1 μ l de RNaseOUT®, 1 μ l d'enzyme SuperScript III RT® (200 U/ μ l) et 1 μ l de DTT 0,1 M. Le tout est incubé 50 min à 50 °C puis 5 min à 85 °C afin d'inactiver la réaction. Pour finir, l'ajout d'1 μ l de l'enzyme RNase H® (2 U/ μ l) est suivi d'une incubation de 20 min à 37 °C sur glace. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20 °C.

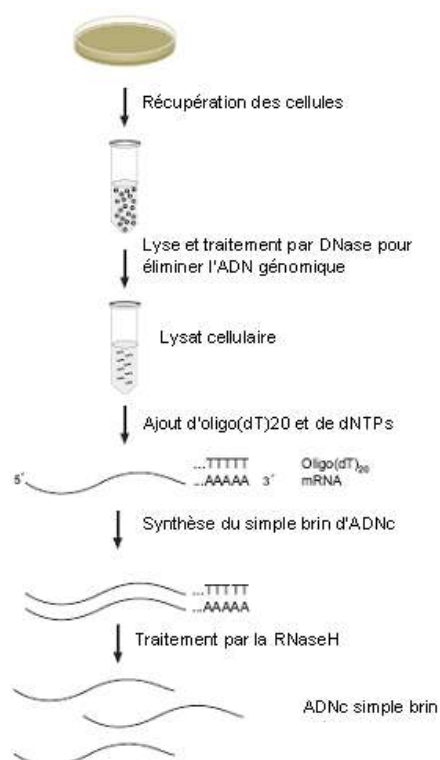


Figure 51 : Différentes étapes de la synthèse de l'ADNc suite au traitement par la galectine-3 recombinante (d'après Invitrogen).

Le lysat cellulaire est traité par de la DNase puis l'ajout d'oligo(dT)₂₀ et de dNTPs permet la synthèse de l'ADNc. Le traitement par la RNase H[®] élimine les traces d'ARN.

III. Extraction des ARN totaux et Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

III.1. Extraction des ARN totaux à partir de culture cellulaire

L'extraction est réalisée sur des cellules post-confluentes (confluence + 1 jour) cultivées en flacon de culture de 25 cm² en suivant le protocole du kit « NucleoSpin[®] RNA II » (Macherey Nagel). Le principe repose sur l'utilisation d'une colonne munie d'une membrane de silice sur laquelle s'adsorbent les acides nucléiques, un traitement à la DNase permettant d'éliminer les traces d'ADN.

Pour cela, les cellules sont préalablement lysées par 350 µl du tampon de lyse RA1 (isothiocyanate de guanidine) contenant 3,5 µl de β-mercaptoéthanol (1 %). Ce lysat est ensuite homogénéisé et transféré dans une colonne « NucleoSpin[®] Filter » qui est centrifugée 1 min à 11 000 x g. L'éluat est additionné de 350 µl d'éthanol à 70 %. Ce mélange est déposé dans une colonne « NucleoSpin[®] RNA II » puis celle-ci est centrifugée 1 min à 11 000 x g. L'éluat est éliminé et 350 µl de tampon de lavage MBD sont ajoutés ; l'ensemble est centrifugé 1 min à 11 000 x g. L'éluat est de nouveau éliminé et 95 µl d'un mélange composé de 10 µl de rDNase et de 90 µl du tampon de l'enzyme sont déposés sur le filtre. Le tout est incubé 15 min à T°amb. Ensuite, 200 µl de tampon de lavage RA2 sont ajoutés et la colonne est mise à centrifuger 30 s à 11 000 x g. L'éluat est éliminé, 600 µl de tampon de lavage RA3 sont déposés sur la colonne. Après 30 s de centrifugation à 11 000 x g, l'éluat est éliminé et 250 µl de tampon RA3 sont de nouveau ajoutés. La colonne

est mise à centrifuger 2 min à 11 000 x *g* puis une rapide centrifugation à vide de 1 min à 11 000 x *g* permet d'éliminer les traces d'éthanol. La colonne est ensuite transférée dans un nouveau microtube et 60 µl d'eau *RNase free* sont déposés dans la colonne. Cette étape est suivie d'une centrifugation de 1 min à 11 000 x *g* afin de collecter l'éluat. Les ARN obtenus sont conservés à -80 °C.

La concentration des échantillons est déterminée par mesure de la densité optique (DO) avec un spectrophotomètre NanoDrop. La détermination des DO à 230, 260, et 280 nm permet d'évaluer la pureté des échantillons par calcul des rapports suivants : DO 260 nm / DO 280 nm (contamination par des protéines) et DO 260 nm / DO 230 nm (contamination par des sels ou des solvants).

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

III.2.1. Reverse Transcription : synthèse de l'ADNc

La synthèse de l'ADNc est réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux mis en présence d'1 µl d'amorce oligo(dT)₁₅ (Promega) dans un volume final de 14 µl. Après une incubation de 5 min à 70 °C, 5 µl de dNTPs, 5 µl de tampon 5X de l'enzyme, 1 µl de reverse transcriptase M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (Promega), 14 µl d'eau stérile sont additionnés au mélange. L'ensemble est incubé 1 h à 42 °C puis 5 min à 94 °C et enfin placé 5 min sur glace. La conservation des ADNc se fait à - 80°C.

III.2.2. Amplification de l'ADNc par PCR

La PCR est réalisée sur 2,5 µl d'ADNc selon les protocoles décrits par Perrais *et al.* (2001) pour le gène *MUC1* et *MUC4* et Lahm *et al.* (2000) pour le gène *LGALS3*. Le transcrit 28S sert de contrôle interne. Le tableau V reprend les paires d'oligonucléotides spécifiques de chaque gène étudié.

Tableau V : Séquences des oligonucléotides utilisés en RT-PCR.

Gène	Taille de l'amplifiat (pb)	Amorces (5'→3')	Température d'hybridation (°C)	Nombre de cycles d'amplification
MUC4	596	sens : CGCGGTGGTGGAGGCGTTCTT antisens : GAAGAATCCTGACAGCCTTCA	60	30
MUC1	447	sens : GAACTACGGGCAGCTGGACATC antisens : GCTCTCTGGGCCAGTCCTCCTG	60	30
LGALS3	719	sens : ATGGCAGACAATTTTTCGCTCC antisens : ATGTCACCAGAAATTCCCAGTT	60	33
28S	231	sens : GCAGGGCGAAGCAGAAGGAAACT antisens : TGAGATCGTTTCGGCCCCAA	60	30

L'amplification se déroule dans les conditions suivantes sur le thermocycleur « MJ Mini™ » (BioRad) :

Cycles :

MUC1/MUC4/28S : 94 °C, 2 min ; 30 cycles [94 °C, 45 s ; 60 °C, 1 min ; 72 °C, 1 min] ; 72°C, 10 min puis 4 °C à l'infini.

LGALS3 : 94 °C, 4 min ; 33 cycles [94 °C, 1 min ; 60 °C, 1 min ; 72 °C, 2 min] ; 72 °C, 10 min puis 4 °C à l'infini.

Enfin, la visualisation des amplicons est réalisée après migration en gel d'agarose 1 % (m/v) dans du tampon Tris borate EDTA 1X pH 8,3 (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM) en présence de 0,7 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). Les bandes obtenues sont quantifiées par densitométrie grâce au logiciel « Gel Analyst » et la normalisation est faite en rapportant l'intensité du signal mesuré sur celui de l'ARN 28S de l'échantillon correspondant.

IV. Etude de la demi-vie des transcrits

Le protocole a été mis au point à partir de celui décrit par Debailleul *et al.* (1998). Les cellules post-confluentes cultivées en flacon de culture de 25 cm² sont traitées par 8 µg/ml d'actinomycine D (Sigma Aldrich), un antibiotique inhibiteur de l'ARN polymérase, pendant toute la durée de la manipulation. Les ARN sont récupérés avant traitement (temps zéro) puis après différents temps d'incubation avec la drogue (3, 6, 9, 12, 24 et 30 h). Ils sont ensuite soumis à une transcription inverse. Les ADNc obtenus sont conservés à -80 °C jusqu'à leur analyse par PCR quantitative en temps réel.

V. Quantification de *MUC1* et de *MUC4* par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La quantification de *MUC4* est réalisée par PCR quantitative en temps réel par méthode TaqMan à l'aide du kit « Absolute™ QPCR ROX mix » (ThermoScientific). Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation d'une sonde marquée à son extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (*reporter* : FAM) et à son extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (*quencher* : TAMRA), qui inhibe l'émission du *reporter* lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, alors elle est hydrolysée par l'activité 3'-5' exonucléasique de l'ADN polymérase. Le *reporter*, ainsi séparé du *quencher*, émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation (figure 52).

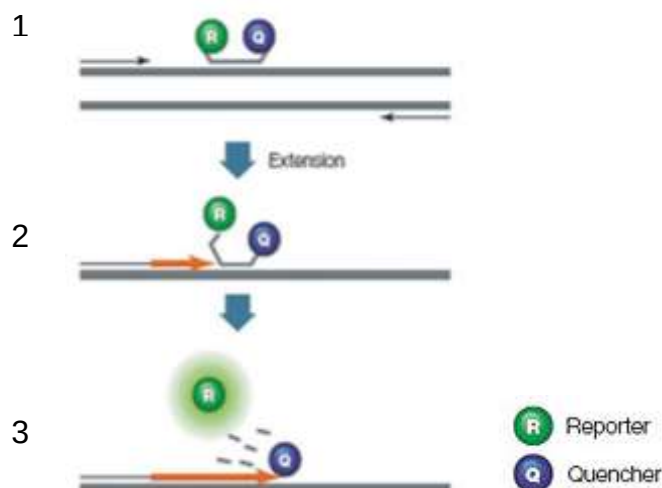


Figure 52 : Principe de la technique Taqman (d'après BioRad).

(1) L'émission du *reporter* (R) est inhibée par la proximité du *quencher* (Q)

(2 et 3). La polymérase se déplace et hydrolyse la sonde. Le clivage de la sonde permet l'éloignement de ses extrémités 5' et 3', permettant ainsi au fluorochrome situé en 5' d'émettre une fluorescence.

La technique utilisée permet une quantification absolue puisqu'une droite de calibration est construite à partir de dilutions des plasmides contenant un fragment de *MUC4* ou de *MUC1* sous-cloné en vecteur pCR®2.1 (TA cloning Kit, invitrogen) et reconnu par les sondes utilisées dans la technique de qPCR (Tableau VI). Les sondes ont été choisies de telle façon qu'elles reconnaissent la majorité des variants de *MUC1* et de *MUC4*. Chaque échantillon est dosé trois fois. Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau VII.

Tableau VI : Sondes et amorces utilisées en qPCR.

Gène	Amorces
MUC4	Sens : 5' TCAGCTGAGGCCTTGCCTT 3' Antisens : 5' TCAGTCACCTTCCCTTTTCCA 3'
Sonde MUC4	5' FAM-TAAGGCGCCATTGCTTTTGGGAGA-Tamra 3'
MUC1	Sens : 5' CAGACGTCAGCGTGAGTGAGTGATG 3' Antisens : 5' CTGACAGACAGCCAAGGCAAT 3'
Sonde MUC1	5' FAM-TGCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCT-Tamra 3'

Tableau VII : Composition du mélange réactionnel par puits lors d'une qPCR Taqman.

Composants	Quantité (µl)
Amorce MUC1 ou MUC4 sens diluée au 1/10	1
Amorce MUC1 ou MUC4 antisens diluée au 1/10	1
Sonde MUC1 ou MUC4 diluée au 1/10	1
Amorce 18S sens diluée au 1/10	0,375
Amorce 18S antisens diluée au 1/10	0,375
Sonde 18S	0,125
Absolute™ QPCR ROX mix	12,5
Eau stérile	6,625
ADNc	2

Le gène 18S sert de standard interne et est co-amplifié lors de la même réaction de PCR grâce au kit « Ribosomal RNA Control Reagents » (Applied Biosystems). Les cycles seuils sont déterminés à l'aide du thermocycleur « ABI 7900 » (Applied biosystems) et sont convertis en nanogramme. Le ratio entre la quantité de gène cible et la quantité de 18S est calculé pour chaque échantillon.

VI. Sous-clonage de produits PCR en vecteur plasmidique pCR®2.1

Le sous-clonage est une technique permettant l'insertion d'un fragment d'ADN (un produit de PCR par exemple) dans un vecteur.

VI.1. Ligation

La ligation en vecteur pCR®2.1 s'effectue grâce au kit « TA Cloning kit » (Invitrogen) en incubant une nuit à 14 °C le mélange réactionnel suivant :

- x µl du produit PCR
- 2 µl du vecteur pCR2.1 (25 ng/µl)
- 1 µl de T4 DNA ligase
- 1 µl de tampon de ligation 10X
- Eau stérile qsp 10 µl

avec x le volume correspondant à la quantité du produit de PCR (y) tel que :

$y = (\text{taille en pb du produit PCR}) \times (50 \text{ ng du vecteur pCR}^{\circledR}2.1) / (\text{taille en pb du vecteur pCR}^{\circledR}2.1)$

L'enzyme utilisée additionne une désoxyadénosine aux extrémités 3' du produit de PCR. Le vecteur linéaire fournit dans le kit possède une désoxythymidine à son extrémité 3', permettant ainsi l'insertion du produit de PCR (figure 53).

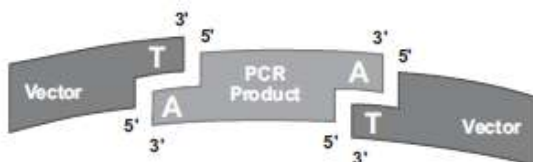


Figure 53 : Principe du « TA cloning kit » (d'après Invitrogen).

Les extrémités du produit de PCR à insérer sont rendues complémentaires à celles du vecteur.

VI.2. Transformation bactérienne par choc thermique

Les bactéries compétentes INV α F' (*One Shot competent cells*, Invitrogen) sont transformées de la façon suivante : 50 μ l de bactéries sont mises en présence de 2 μ l de produit de ligation et le tout est placé 30 min dans la glace. Le choc thermique est réalisé en incubant ce mélange 30 s à 42 °C. Les bactéries sont ensuite de nouveau placées 2 min sur la glace avant d'être mises sous agitation douce à 37 °C pendant 1 h après l'ajout de 250 μ l de milieu SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) (tryptone 2 % (m/v), extrait de levure 0,5 % (m/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucose 20 mM). Les bactéries transformées sont ensuite étalées (50 μ l) sur des boîtes de Pétri contenant un milieu LB-Agar (tryptone 1 % (m/v), extrait de levure 0,5 % (m/v), NaCl 0,5 % (m/v), agar 1,5 % (m/v)) additionné de 50 μ g/ml de l'antibiotique kanamycine et sur lequel 40 μ l d'une solution de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) à 40 mg/ml ont été préalablement répartis.

VI.3. Sélection des clones

La sélection des clones ayant intégré le produit de PCR s'effectue *via* le changement de coloration du substrat X-Gal. En effet, ce dernier devient bleu suite à une hydrolyse réalisée par la β -galactosidase. L'insertion du produit de PCR dans le gène codant cette enzyme (LacZ) présent dans le vecteur empêche sa production, les colonies restent donc blanches (figure 54A et B).

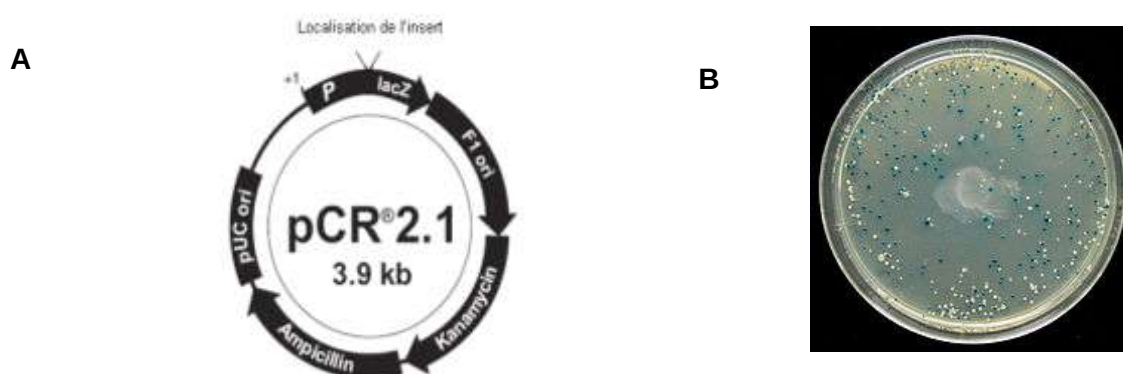


Figure 54 : Principe de l'utilisation du X-Gal lors du sous-clonage en vecteur pCR[®]2.1.
(A) En cas de présence de l'insert, le gène LacZ est interrompu et l'enzyme n'est pas produite. Le X-Gal n'est alors plus métabolisé (d'après Invitrogen).
(B) Les bactéries bleues ont métabolisé le X-Gal. L'enzyme est donc produite, ce qui indique que les bactéries n'ont pas intégré l'insert (d'après wikipédia).

Les clones blancs sont repiqués dans 5 ml de milieu LB contenant 50 μ g/ml de kanamycine avant une incubation sous agitation douce durant une nuit à 37 °C.

VI.4. Extraction du plasmide

L'étape suivante consiste à purifier l'ADN plasmidique de chaque colonie afin de vérifier la présence de l'insert grâce au kit « NucleoSpin Multi-8 Plus Plasmid » (Macherey Nagel). Le principe repose sur l'adsorption de l'ADN plasmidique, après lyse des bactéries, sur une membrane de silice. Celui-ci est ensuite élué après différents lavages.

Pour cela, dans un tube à centrifuger de 1,5 ml, 1,4 ml de la suspension bactérienne obtenue après la nuit d'incubation à 37°C sont centrifugés 10 min à 1 000 x *g*. Le culot bactérien est repris par 250 µl de tampon de resuspension A1. Puis, 250 µl de tampon de lyse A2 sont ajoutés, le tout est mélangé par retournement et incubé 5 min à T°amb. Après l'ajout de 350 µl de tampon de neutralisation, les tubes sont de nouveaux mélangés par retournement et le lysat est vidé dans la barrette filtrante « NucleoSpin Plasmid *Filter Strips* » située dans la partie supérieure du collecteur « NucleoVac ». Le vide est appliqué et le filtrat est récupéré dans la barrette « NucleoSpin Plasmid *Binding Strips* », initialement placée dans la zone inférieure du « NucleoVac ». Cette barrette est transférée dans la partie supérieure et le vide est de nouveau appliqué afin de fixer l'ADN plasmidique sur la silice. Une série de lavage avec différents tampons est réalisée, avec application du vide entre chaque étape : 600 µl de tampon AW, 900 µl de tampon A4 (2 lavages). Le vide est appliqué 10 min. Enfin, 100 µl de tampon d'élution NE sont déposés sur la membrane et, suite à une incubation de 1 min à T°amb., l'ADN plasmidique est élué grâce au vide appliqué pendant 5 min.

La concentration et la qualité des ADN plasmidiques obtenus sont déterminées au spectrophotomètre (NanoDrop).

VI.5. Séquençage

La présence de l'insert et l'absence d'erreur générée dans sa séquence au cours de la réaction de PCR sont vérifiées par séquençage nucléotidique en collaboration avec l'entreprise GATC. Pour cela, 20 µl d'une amorce (10 pmol/µl : 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') et 20 µl de la construction plasmidique ayant une concentration comprise entre 30 et 100 ng/µl leur sont fournis.

VII. Préparations des constructions plasmidiques pour transfections cellulaires transitoires

Les différentes constructions plasmidiques contenant des fragments des promoteurs de *MUC1* et de *MUC4*, préalablement mises en place au laboratoire, sont sous-clonées en vecteur pGL3 basique (Promega). Ce vecteur contient le gène codant la luciférase et est dépourvu de toute séquence régulatrice (figure 55) (Perrais *et al.*, 2001).

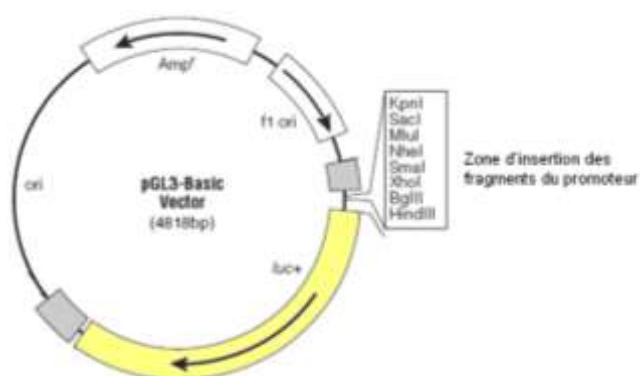


Figure 55 : Carte du vecteur pGL3-basique (d'après Proméga).

Les constructions des promoteurs de *MUC1* et de *MUC4* y ont été clonées en amont du gène codant la luciférase (représenté en jaune). Le gène de résistance à l'Ampicilline (Amp) est utilisé pour la sélection des clones bactériens.

Les différentes constructions plasmidiques ainsi que les vecteurs d'expression ont été préparés avec le kit « NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant après transformation de bactéries *Escherichia coli* compétentes (JM109) (Promega).

VII.1. Transformation des bactéries *E coli* JM109

La transformation bactérienne est réalisée en mélangeant 100 µl de bactéries *E. coli* JM109 (Promega) et 100 ng du plasmide d'intérêt dans un tube à centrifuger de 15 ml. Celui-ci est placé 30 min dans la glace puis le choc thermique est effectué en mettant le tube à 42 °C pendant 45 s. Celui-ci est de nouveau placé 2 min dans la glace et 900 µl de milieu SOC sont ajoutés. Le tube à centrifuger est placé 1 h sous agitation douce à 37 °C. Suite à cette étape, un volume de 50 µl de bactéries transformées est étalé sur une boîte de Pétri contenant un milieu LB-Agar additionné d'un antibiotique (50 µg/ml d'ampicilline) et celle-ci est placée une nuit à 37 °C.

VII.2. Extraction plasmidique

Le lendemain matin, un clone isolé prélevé sur la boîte de Pétri est déposé dans 5 ml de milieu liquide LB en présence de 50 µg/ml d'ampicilline ; le mélange est ensuite incubé toute la journée à 37 °C sous agitation douce. Le soir même, 300 µl de la suspension bactérienne obtenue sont transférés dans 100 ml de milieu liquide LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline et le tout est placé une nuit à 37 °C sous agitation douce.

Ensuite, l'ADN plasmidique bactérien est purifié avec le kit « NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF » (Macherey Nagel). Le principe consiste à adsorber l'ADN plasmidique bactérien sur une résine de silice tout en retenant le reste du lysat bactérien sur un filtre. Après différentes étapes de lavage, l'ADN est élué, précipité puis solubilisé dans de l'eau. Celui-ci est préparé sans endotoxine (*EF : Endotoxine Free*), ce qui assure une meilleure efficacité de transfection cellulaire.

Pour cela, la suspension bactérienne obtenue est centrifugée 10 min à 5 000 x *g* à 4 °C. Le culot bactérien obtenu est resuspendu dans 12 ml de tampon de resuspension (RES-EF). Le tout est transféré dans un tube à centrifuger de 50 ml et 12 ml de tampon de lyse sont additionnés (LYS-EF). Après agitation par retournement du tube, le mélange est incubé 5 min à T°amb. Pendant ce temps, le filtre de la colonne est équilibré avec 35 ml de tampon EQU-EF. A l'issue de l'incubation, 12 ml de tampon de neutralisation (NEU-EF) sont ajoutés au lysat, le tube à centrifuger est retourné une dizaine de fois pour agiter le contenu puis est placé 5 min dans la glace. Le tout est versé dans la colonne. Celle-ci est lavée avec 10 ml de tampon FIL-EF. Puis, le filtre est jeté et successivement 90 ml de tampon de lavage ENDO-EF suivis de 45 ml de tampon de lavage WASH-EF sont versés dans la colonne. L'ADN plasmidique, élué par l'ajout de 15 ml de tampon ELU-EF, est récupéré dans un tube à centrifuger de 50 ml dans lequel sont ajoutés 10,5 ml d'isopropanol afin de précipiter l'ADN. Le tout est transféré dans une seringue munie d'un filtre sur lequel va venir se fixer le matériel plasmidique après passage du liquide. L'ajout de 5 ml d'éthanol à 70 % permet de laver le précipité. Enfin, l'ADN est élué par 500 µl d'H₂O-EF.

La concentration et la qualité des ADN plasmidiques obtenus sont déterminées au spectrophotomètre (NanoDrop).

VIII. Transfections transitoires

VIII.1. Préparation du vecteur dépourvu de l'insert codant la galectine-3

VIII.1.1. Digestion du vecteur par l'enzyme de restriction Not I

Afin de préparer le vecteur contrôle des transfections cellulaires transitoires, le vecteur pCMV6-XL4 (Origene) contenant le gène codant la galectine-3, est digéré par l'enzyme de restriction *Not I* (Invitrogen).

Pour cela, 2 µg du vecteur commercial sont incubés une nuit à 37 °C en présence de 2 µl de tampon 10X de l'enzyme et de 20 unités d'enzyme dans un volume final de 20 µl.

VIII.1.2. Purification vecteur vide linéaire

Le lendemain, ce vecteur vide linéarisé est purifié après migration en gel d'agarose à 0,8 % (m/v) en présence de BET selon le protocole décrit dans le kit « Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system » (Promega). Le principe consiste à dissoudre le gel d'agarose et l'ADN qu'il contient s'adsorbe sur une membrane de silice. Après différents lavages, l'ADN est élué.

Pour cela, la bande d'intérêt visualisée sous UV est découpée de façon précise à l'aide d'un scalpel et transférée dans un microtube de 1,5 ml préalablement pesé. L'ensemble est de nouveau pesé pour en déduire la masse de gel. Le tampon *membrane binding solution* est ajouté avec un ratio de 10 µl de solution pour 10 mg de gel d'agarose. Le tout est agité vivement et incubé 10 min à 55 °C. Ensuite, le contenu du microtube est transféré dans une colonne avant une incubation de 1 min à T° amb suivie d'une centrifugation de 1 min à 16 000 x g. L'éluat est éliminé et 700 µl de tampon de lavage sont ajoutés. Après une nouvelle centrifugation de 1 min à 16 000 x g, 500 µl du même tampon sont ajoutés. La colonne est centrifugée 5 min à 16 000 x g, l'éluat est éliminé. Cette étape est suivie d'une centrifugation à vide de 1 min à 16 000 x g. La colonne est transférée dans un nouveau microtube et 50 µl d'eau « Nuclease free » sont déposés sur la membrane. Après 1 min d'incubation, la colonne est centrifugée 1 min à 16 000 x g. L'éluat est conservé à 4 °C.

VIII.1.3. Ligation des extrémités du vecteur

Les extrémités du vecteur pCMV6-XL4 sont réassociées en présence de l'enzyme T4 DNA ligase selon le protocole du kit « Rapid DNA ligation » (Roche).

Dans un microtube de 1,5 ml, 100 ng du vecteur pCMV6-XL4 sont mélangés à un volume adapté d'eau afin d'obtenir un volume final de 10 µl. Puis, 2 µl de tampon de dilution de l'échantillon 5X, 10 µl de tampon de l'enzyme 2X et 1 µl d'enzyme T4 DNA ligase sont ajoutés. Le mélange est incubé 2 h à T° amb. Le produit de ligation peut directement être utilisé pour une transformation bactérienne (JM109) ou être conservé à -20 °C en attendant une transformation bactérienne.

VIII.2. Transfections transitoires à l'Effectene®

La veille des transfections à l'Effectene® (Qiagen) (figure 56), les cellules sontensemencées dans des plaques à six puits à raison de 4.10^5 cellules par puits dans 2 ml de milieu complet.

Chaque transfection est contrôlée par trois témoins :

- le vecteur pGL3 contrôle (contenant l'*enhancer* et le promoteur du virus SV40) permet de vérifier l'efficacité de la transfection ;

- le vecteur pGL3 basique, dépourvu de séquence promotrice ou d'*enhancer* d'eucaryote, donne l'activité basale du vecteur vide ;
- une transfection sans ADN sert de témoin négatif.

Chaque construction de promoteur est testée trois fois lors de deux manipulations indépendantes.

Dans un microtube stérile de 1,5 ml, 1 µg de la construction promotrice et 0,2 µg du vecteur d'expression de la galectine-3 (ou du témoin vecteur vide) sont mélangés avec du tampon EC (tampon de condensation) afin d'obtenir un volume final de 100 µl. Puis 3,2 µl d'*Enhancer* (qui condense l'ADN) sont ajoutés au mélange, celui-ci est tapoté, incubé 5 min à T°amb. et centrifugé quelques secondes. Enfin, 5 µl d'Effectene® (mélange de lipides cationiques favorisant la haute efficacité du transfert d'ADN dans les cellules) sont ajoutés et le tout est homogénéisé par pipetage puis incubé 15 min à T°amb. Pendant ce temps, le milieu de culture est aspiré, les cellules sont rincées avec du D-PBS stérile 1X avant d'être recouvertes par 1,6 ml de milieu neuf complet. A la fin de l'incubation, 0,6 ml de milieu neuf complet sont ajoutés au mélange ADN/*Enhancer*/Effectene et celui-ci est homogénéisé par pipetage. Immédiatement, ce mélange est transféré goutte à goutte sur les cellules. A la fin des transfections, les plaques sont inclinées de droite à gauche et d'avant en arrière pour répartir le mélange sur le tapis cellulaire avant une incubation de 48 h à 37 °C.

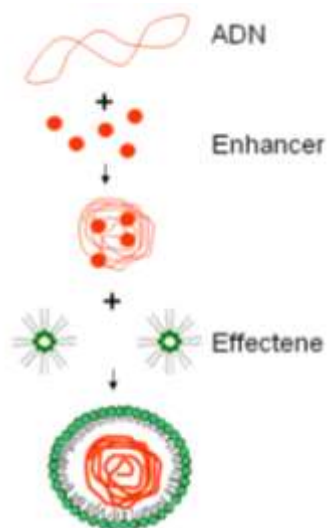


Figure 56 : Principe des transfections cellulaires transitoires à l'Effectene.

L'*Enhancer* permet la condensation de l'ADN. L'ajout d'Effectene recouvre ces « complexes » par des lipides cationiques favorisant le transfert de l'ADN dans les cellules eucaryotes.

VIII.3. Préparation des extraits cellulaires totaux

A la suite des 48 h d'incubation, les cellules sont rincées avec du D-PBS 1X stérile avant l'apport de 110 µl de « reporter lysis buffer » 1X (RLB) (Promega). Après 15 min d'incubation à T°amb., le tapis cellulaire est gratté et les extraits cellulaires totaux sont transférés dans des microtubes de 1,5 ml conservés dans la glace. Ils sont mélangés sous agitation vive 15 s puis centrifugés à 4 °C à 15 500 x g pendant 3 min. Les surnageants sont

transférés dans de nouveaux microtubes et conservés à -80 °C en attendant le dosage protéique et la mesure de l'activité luciférase.

VIII.4. Dosage protéique

Le dosage protéique repose sur l'utilisation de l'acide bichinchoninique (BCATM protein Assay Reagent, Pierce) qui permet une détection colorimétrique et une quantification des protéines (figure 57). Une gamme étalon est réalisée grâce à des concentrations croissantes de sérumalbumine bovine. Le dosage est effectué en microplaque de 96 puits : 4 µl d'échantillon sont déposés en double et 200 µl du réactif BCA (reconstitué extemporanément : 5 ml de solution A pour 0,1 ml de solution B, Pierce) sont ajoutés dans chaque puits. Après 1 h d'incubation à 37 °C, sous agitation douce, la mesure est réalisée à 570 nm avec le lecteur de microplaque Biorad Model 680 ; les concentrations protéiques sont déduites de la droite d'étalonnage.

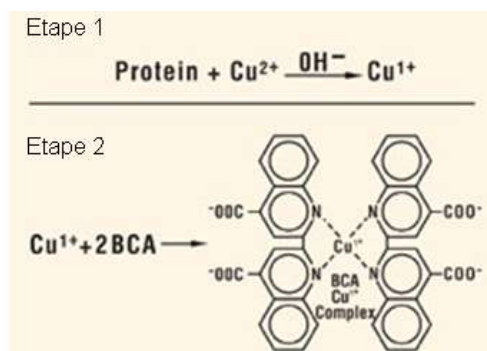


Figure 57 : Principe de la réaction du dosage BCA (d'après Chabriere).

(1) Les protéines réduisent les ions cuivriques (Cu²⁺) en ions cuivreux (Cu¹⁺) en milieu alcalin.
(2) Les ions cuivreux forment avec le BCA un complexe stable et intensément coloré en pourpre.

VIII.5. Mesure de l'activité luciférase

La mesure de l'activité enzymatique de la luciférase au sein des lysats cellulaires est effectuée en présence du substrat de l'enzyme, la luciférine, grâce au « Luciferase assay System » (Promega). Celle-ci correspond à la mesure de la quantité de lumière relative (RLU) émise en 15 s par le mélange comprenant 20 µl d'extrait cellulaire et 100 µl de luciférine par le luminomètre Mithras de la plateforme de l'Institut Fédératif de Recherche (IFR114)/ Institut de Médecine Prédictive et de Recherche (IMPRT) (figure 58).

Les résultats d'activité luciférase sont ensuite rapportés à la quantité de protéines (RLU/mg de protéines) et sont finalement exprimés en facteur d'induction par rapport aux résultats obtenus avec le vecteur d'expression vide dont le niveau d'activité luciférase par milligramme de protéines est fixé arbitrairement à 1.

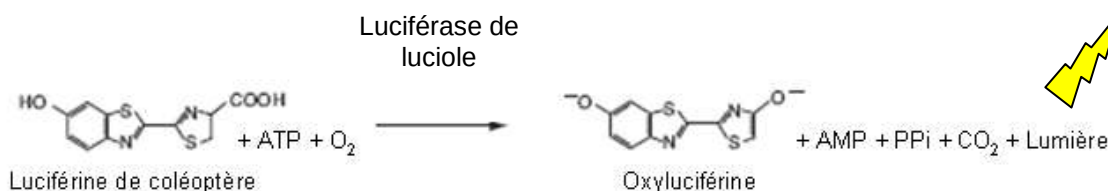


Figure 58 : Principe de la réaction mise en jeu pour la mesure de l'activité luciférase (adapté de J. Hanrahan).

La quantité de lumière détectée dépend de la quantité de luciférase produite par les cellules, cette activité enzymatique étant directement reliée à l'activité du promoteur.

IX. Préparation d'extraits cellulaires totaux

Les extraits cellulaires totaux sont préparés à partir de cellules post-confluentes (confluence + 2 jours) cultivées en flacon de culture de 75 cm². Pour cela, les cellules sont grattées en présence de leur milieu de culture puis transférées dans un tube à centrifuger de 50 ml. Le flacon de culture est rincé avec du D-PBS 1X froid. La suspension est centrifugée 5 min à 535 x g à 4 °C, le surnageant est éliminé ; le culot est repris dans 0,5 ml de D-PBS 1X et transféré dans un microtube de 1,5 ml. Le lavage par du D-PBS 1X est renouvelé une fois. Le culot cellulaire est repris par du tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, aprotinine et leupeptine hémi-sulfate 1 µg/ml, PMSF 1 mM, NP-40 1 % (v/v), fluorure de sodium 5 mM, orthovanadate de sodium 5 mM, désoxycholate de sodium 0,25 % (m/v)) et incubé pendant 30 min dans de la glace, avec toutes les 10 min un frottement des tubes sur un portoir métallique. Le lysat cellulaire est centrifugé 10 min à 16 000 x g à 4 °C; le surnageant est conservé à -80 °C. Un dosage protéique par la méthode BCA est ensuite réalisé.

X. Western-blot

X.1. *Principe*

Cette technique permet d'identifier immunologiquement les protéines selon leur poids moléculaire suite à leur séparation lors d'une migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, un détergent anionique. Les protéines séparées sont ensuite transférées sur une membrane où elles sont exposées à un anticorps primaire spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt. Celui-ci est ensuite reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme, par exemple la peroxydase de Raifort. Le substrat additionné à l'étape finale permet de révéler cette activité enzymatique. La figure 59 schématise les différentes étapes du *Western Blot*.

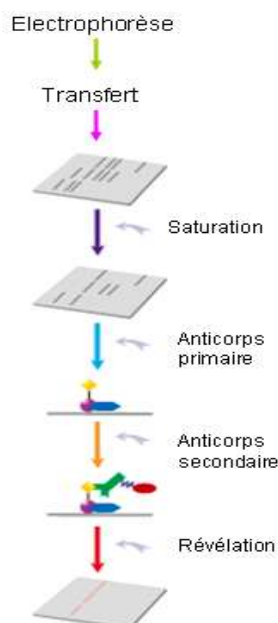


Figure 59 : Schéma représentant les différentes étapes d'un *Western Blot* (d'après GenScript).

X.2. Réalisation du Western Blot

Les protéines (25 µg) sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant en présence de SDS, la réticulation du gel étant dépendante de la taille de la protéine à détecter. Les échantillons sont préalablement dénaturés 5 min à 100 °C après l'ajout (v/v) d'une solution dénaturante 2X faisant office également de tampon de charge (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, glycérol 20 % (v/v), β-mercaptoéthanol 10 % (v/v), bleu de bromophénol 0,05 % (m/v) et SDS 0,1 % (m/v)). Le mélange est déposé sur le gel et l'électrophorèse est réalisée en tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,01 % (m/v) sous un courant constant de 35 mA par gel pendant 1 h 30 environ.

Après la migration, les protéines sont transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose (0,22 µm, Whatman) en présence de tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1 % (v/v), méthanol 20 % (v/v)) sous un voltage constant de 100 volts pendant 1 h.

Suite à cette étape, la membrane est rincée dans du tampon Tris-HCl Salin contenant du Tween® 20 (TBS-T) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween® 20 0,05 % (v/v)). Les sites de fixation aspécifiques sont saturés par incubation de la membrane dans du tampon TBS-T contenant 5 % (m/v) de lait en poudre écrémé pendant 3 h sous agitation à T°amb. La membrane est ensuite lavée trois fois 5 min par 10 ml de TBS-T avant d'être incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Les dilutions d'anticorps utilisées sont résumées dans le tableau VIII.

Le lendemain la membrane est rincée pendant 15 min puis trois fois 5 min dans le TBS-T. Elle est ensuite incubée pendant une durée variable (tableau VIII) à T°amb. avec l'anticorps secondaire spécifique couplé à la peroxydase de Raifort. L'activité enzymatique

est détectée par chimioluminescence après 5 min d'incubation dans le mélange luminol-H₂O₂ du kit « SuperSignal® West PICO » (Pierce).

Les bandes visualisées sont quantifiées par densitométrie grâce au logiciel « Gel Analyst » et la normalisation est faite en rapportant l'intensité du signal protéique sur celui obtenu pour l'actine.

Tableau VIII : Conditions expérimentales utilisées pour les *Western Blot*.

Anticorps primaire	Dilutions	Temps d'incubation
GAL-3 Polyclonal de lapin, Abcam ab31707	Primaire : 1/300 Secondaire : 1/4000	Primaire : une nuit à 4 °C Secondaire : 1 h 30 à T°amb.
MUC1 Monoclonal de souris Cell Signaling 214D4	Primaire : 1/1000 Secondaire : 1/5000	Primaire : une nuit à 4 °C Secondaire : 2 h à T°amb.
β-actine Monoclonal de souris, Sigma A5441	Primaire : 1/5000 Secondaire : 1/20000	Primaire : une nuit à 4 °C Secondaire : 1 h à T°amb.

XI. Western Blot MUC4

La migration est réalisée en gel d'agarose 2 % (m/v) dans le même tampon de migration que celui décrit précédemment dans la technique de *Western Blot* : 20 µg de protéines sont ajoutés à la solution dénaturante 2X (volume à volume) servant de tampon de charge et le tout est dénaturé 5 min à 100 °C. Les échantillons migrent pendant 5 à 7 h à 100 volts. A l'issue de la migration, les protéines sont transférées de manière passive sur une membrane de nitrocellulose de 0,22 µm. Pour cela, le gel est placé sur un pont de papier Whatman 3 trempant dans le tampon de transfert (même composition que celui du *Western Blot* classique). La membrane est placée au dessus du gel, une épaisseur de papier Whatman 3 est déposée au dessus et le tout est recouvert par une plaque de verre sur laquelle est posé un poids. Le pouvoir absorbant du papier Whatman va permettre le transfert des protéines. Celui-ci dure toute la nuit. Le lendemain, la membrane est saturée dans une solution de lait écrémé à 5 % (m/v) dans du TBS-T pendant 2 h. Elle est ensuite lavée trois fois dans du TBS-T pendant 5 min, puis incubée 2 h avec l'anticorps primaire anti-MUC4 à T°amb. (8G7 Santa Cruz, dilution 1/200). Après trois lavages dans le TBS-T, l'incubation avec l'anticorps secondaire anti-souris (1/10 000) couplé à la peroxydase de Raifort est réalisée durant 1 h à T°amb. Enfin, la membrane est de nouveau rincée dans du TBS-T et la révélation est réalisée par la détection de l'activité de l'enzyme couplée à l'anticorps secondaire grâce au kit « SuperSignal® West PICO » (Pierce).

XII. Immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines

Le protocole suivi est celui décrit par Peritz *et al.* (2006) (figure 60). Le principe consiste à immunoprécipiter la protéine supposée se lier aux ARNm à l'aide d'un anticorps spécifique. Pour cela, le lysat obtenu en tampon polysome (HEPES 10 mM, pH 7,0, KCl 60 mM, MgCl₂ 5 mM, NP-40 0,5 % (v/v), DTT 1 mM, RNasin 100 U/ml, vanadyl ribonucleoside complexes solution 2 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases 25 µg/ml) est prétraité par des billes de protéine A afin d'éliminer les liaisons aspécifiques (figure 60a) avant l'addition de 2 µg d'un anticorps spécifique (Tableau IX) (figure 60b) afin de former des complexes ARNm-antigènes-anticorps qui sont secondairement précipités par des billes de protéine A (figure 60c). Les protéines sont ensuite dissociées des complexes, dénaturées et les ARN sont séparés par extraction phénol-chloroforme-alcool isoamylique avant d'être précipités (figure 60d). Les ARN purifiés sont solubilisés puis soumis à une transcription inverse avec une amorce oligo(dT)₁₅. L'amplification par PCR est ensuite réalisée avec des amorces dirigées contre l'ADNc de l'ARNm interagissant potentiellement avec la protéine.

Tableau IX : Anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines.

Anticorps	Caractéristiques	Références
Galectine-3	polyclonal, lapin	Sc-20157 (Santa Cruz)
U1	monoclonal, souris	U1 70k (Synaptic Systems)
IgG irrelevante	polyclonal, lapin	12-370 (Millipore)

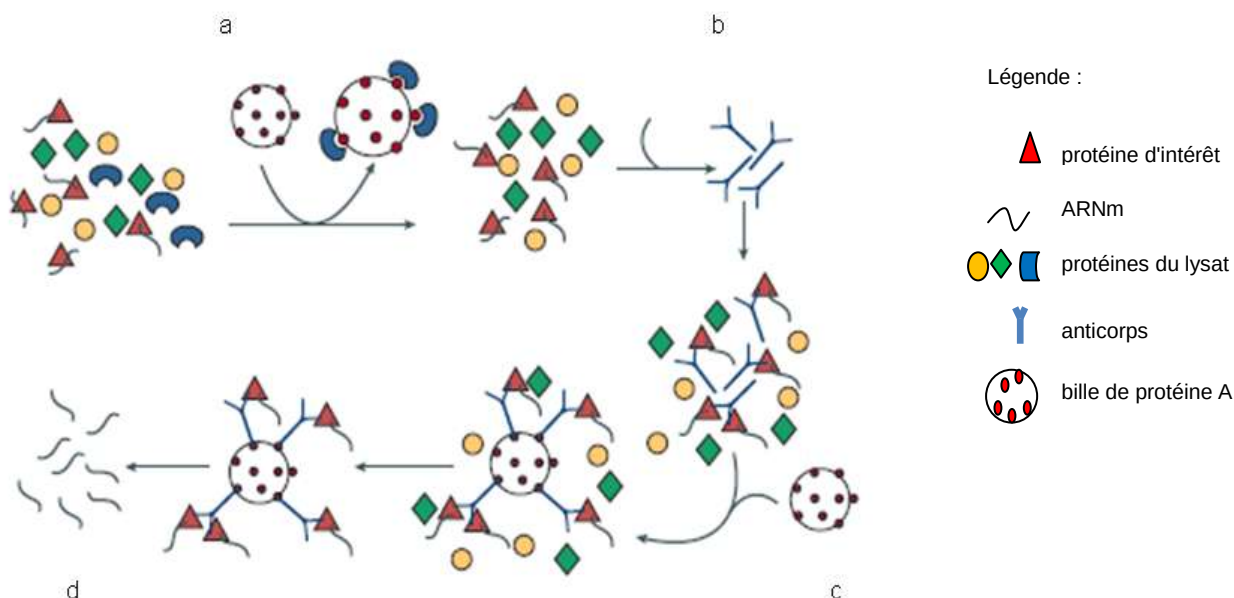


Figure 60 : Principe de l'immunoprécipitation des complexes ARNm-protéines (Peritz *et al.*, 2006).

Le lysat cellulaire est prétraité par des billes de protéines A (a). L'anticorps spécifique est ensuite ajouté (b) afin de former des complexes anticorps-protéine-ARNm. Des billes de protéines A (c) permettent d'immunoprécipiter ces complexes. Après différents lavages, les ARNm sont dissociés des complexes (d) et analysés par RT-PCR.

XIII. Statistiques

Les données ont été analysées grâce au test de Student. Les résultats avec un p inférieur à 0,05 sont considérés comme statistiquement significatifs.

Références bibliographiques

- Albrecht, H. and Carraway, K.L. 3rd (2011) MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small. *Cancer Biother. Radiopharm.* 26, 261-271.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., Schmied, B.M., Ringel, J., Friess, H., Hollingsworth, M.A., Büchler, M.W., Aubert, J.P. and Batra, S.K. (2001) Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: A potential role of MUC4 as a tumor marker diagnostic significance. *Clin. Cancer Res.* 7, 4033-4040.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N. and Batra, S.K. (2006) Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1765, 189-222.
- Aubert, S., Fauquette, V., Hémon, B., Lepoivre, R., Briez, N., Bernard, D., Van Seuning, I., Leroy, X. and Perrais, M. (2009) MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res.* 69, 5707-5715.
- Audié, J.P., Janin, A., Porchet, N., Copin, M.C., Gosselin, B. and Aubert, J.P. (1993) Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by *in situ* hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1479-1485.
- Bafna, S., Kaur, S and Batra, S.K. (2010) Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 29, 2893-2904.
- Bardeesy, N. and DePinhi, R.A. (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 897-909.
- Berberat, P.O., Friess, H., Wang, L. Zhu, Z., Bley, Z., Frigery, L., Zimmerman, A. and Büchler, M.W. (2001) Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 539-549.
- Buscail, L and Bournet, B. (2007) Facteurs de risque du cancer pancréatique. *Presse Med.* 36, 1244-1248.
- Carraway, K.L.III, Rossi, E.A., Komatsu, M., Price-Schiavi, S., Huang, D., Guy, P.M., Carvajal, M.E., Fregien, N., Carraway, C.A., Carraway, K.L. (1999) An intramembrane modulator of the ErbB2 receptor tyrosine kinase that potentiates neuregulin signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 5263-5266.
- Carraway, K.L., Ramsauer, V.P., Hag, B. and Carothers Carraway, C.A. (2003) Cell signalling through membrane mucins. *Bioessays* 25, 66-71.
- Carraway, K.L., Theodoropoulos, G., Kozloski, G.A. and Carraway, C.A.C. (2009) Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncol.* 5, 1631-1640.
- Chatelain, D. and J.F. Flejou (2004) "Anatomie pathologique des cancers du pancreas exocrine." In Lledo, G. (sous la direction de) *Le cancer du pancréas exocrine*, Paris, John Libbey Eurotext, p. 11-26.
- Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V. Thomas-Tikhonenko, A. and Mendell, J.T. (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* 40, 43-50.
- Chaturvedi, P., Singh, A.J. and Batra, S.K. (2008) Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB J.* 22, 966-981.
- Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y., Werner, T., Ray, J., Do, L., Gorospe, M. and Becker, K.G. (2005) Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC genomics* 6, 1-16

- Choudhury, A., Moniaux, N., Winpenny, J.P., Hollingsworth, M.A., Aubert, J.P. and Batra, S.K. (2000) Human *Muc4* mucin cDNA and its variants in pancreatic carcinoma. *J. Biochem.* 128, 233-243.
- Dagher, S.F., Wang, J.L., and Patterson, R.J. (1999) Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 1213-1217.
- Danguy, A., Camby, I. and Kiss, R. (2002) Galectins and Cancer. *Biochem. Biophys. Acta.* 1572, 285-293.
- Debailleul, V., Laine, A., Huet, G., Mathon, P., d'Hooghe, M.C., Aubert, J.P. and Porchet, N. (1998) Human mucin genes MUC2, MUC3, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 express stable and extremely large mRNA and exhibit a variable length polymorphism. *J. Biol. Chem.* 273, 881-890.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H.Y. and Jacob, R. (2006) Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr. Biol.* 16, 408-414.
- Delestienne, N., Wauquier, C., Soin, R., Dierick, J.F., Gueydan, C. and Kruys, V. (2010) The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1 related/TIA-1-containing ribonucleoprotein complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression. *FEBS. J.* 277, 2496-2514.
- Dumic, J., Dabelik, S. and Flögel, M. (2006) Galectin-3: An open-ended story. *Biochem. Biophys. Acta.* 1760, 616-635.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Balan, E. and Kloog, Y. (2004) Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* 279, 34922-34930.
- Escande, F., Lemaitre, L., Moniaux, N., Batra, S.K., Aubert, J.P. and Buisine, M.P. (2002) Genomic organization of MUC4 mucin gene. Towards the characterization of splice variants. *Eur. J. Biochem.* 269, 3637-3644.
- Fauquette, V., Perrais, M., Cerulis, S., Jonckheere, N., Ducourouble, M.P., Aubert, J.P., Pigny, P. and Van Seuning, I. (2005) The antagonistic regulation of human *MUC4* and *ErbB-2* genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: implications for the proliferation/differentiation balance in the cells. *Biochem. J.* 386, 35-45.
- Fauquette, V., Aubert, S., Groux-Degroote, S., Hemon, B., Porchet, N., Van Seuning, I and Pigny, P. (2007) Transcription factor AP2- α represses both the mucin MUC4 expression and pancreatic cancer cell proliferation. *Carcinogenesis* 28, 2305-2312.
- Feldmann, G. and Maitra, A. (2008) Molecular genetics of pancreatic ductal adenocarcinomas and recent implications for translational efforts. *J. Mol. Diagn.* 10, 111-122.
- Fischer, B.M., Cuellar, J.G., Diehl, M.L., deFreytas, A.M., Zhang, J., Carraway, K.L. and Voynow, J.A. (2003) Neutrophil elastase increases MUC4 expression in normal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, 671-679.
- Fischer, A., Astier, A., Louvet, P., Joly, A.C. and Prugneau, J.L. (2007) Prise en charge actuelle des cancers du pancreas. *Journal de Pharmacie Clinique* 26, 25-32.
- Freelove, R. and Walling, A.D. (2006) Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am. Fam. Physician.* 73, 485-492.

- Fukumori, T., Kanayama, H. and Raz, A. (2007) The role of Galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resist. Updat.* 10, 101-108.
- Garzon, R., Marcucci, G. and Croce, C.M (2010) Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 775-789.
- Goggins, M. (2005) Molecular markers of early pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 4524-4531.
- Groux-Degroote, S., Harduin-Lepers, A. and Delannoy, P. (2008) "Biosynthesis of mucin O-glycan chains in normal and pathological states" In Van Seuningen, I. (sous la direction de). *Mucin book: The epithelial mucins, Structure/function. Roles in cancer and inflammatory diseases*. Trivandrum (IND), Research Signpost, p 39-54.
- Hammel, P. (2006) Pancreatic cancer : What is new in 2005? *Bull. Cancer.* 93, 67-72.
- Hanisch, F.G. and Müller, S. (2000) MUC1: The polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* 10, 439-449.
- Hartmann, C., Corre-Menguy, F., Boualem, A. Jovanovic, M. and Lelandais-Brière, C. (2004) MicroRNAs: A new class of gene expression regulators. *Med. Sci.* 20, 894-898.
- Hattrup, C.L. and Gendler, S.J. (2008) Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 431-457.
- Haudek, K.C., Patterson, R.J. and Wang, J.L. (2010) SR proteins and galectins: What's in a name? *Glycobiology.* 20, 199-1207.
- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N. and Depinho, R.A. (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 20, 1218-1249.
- Hingorani, S.R. and Izeradjene, K. (2007) Targets, trials and travails in pancreas cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 5, 1042-1053.
- Hollingsworth, M.A. and Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: Control and protection of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 45-60.
- Hruban, R.H., Wilentz, R.E. and Kern, S.E. (2000) Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J. Pathol.* 156, 1821-1825.
- Hughes, R.C. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1473, 172-185.
- Jhala, N., Jhala, D., Vickers, S.M., Eltoum, I., Bartra, S.K., Manne, U., Eloubeidi, M., Jones, J.J. and Grizzle, W.E. (2006) Biomarkers in diagnosis of pancreatic carcinoma in Fine-Needle Aspirates. *Am. J. Clin. Pathol.* 126, 572-579.
- Jin, C., Rajabi, H. and Kufe, D. (2010) miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. *Int. J. Oncol.* 1, 61-69.
- Jonckheere, N. and Van Seuningen, I. (2008a) The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit. Rev. Oncog.* 14, 177-196.
- Jonckheere, N. and Van Seuningen, I. (2008b), "The ever growing family of membrane-bound mucins" In Van Seuningen, I. (sous la direction de). *Mucin book: The epithelial mucins, Structure/function. Roles in cancer and inflammatory diseases*. Trivandrum (IND), Research Signpost, p 17-38.

- Jonckheere, N. Skrypek, N. and Van Seuning, I. (2010) Mucins and pancreatic cancer. *Cancers* 2, 1794-1812.
- Jonckheere, N. and Van Seuning, I. (2010) The membrane-bound mucins: From cell-signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*. 92, 1-11.
- Kaplan, J.C. and Delpech, M. (1989) *Biologie moléculaire et médecine*, Paris, (1^{ère} édition) Médecine Sciences, Flammarion, 310 p.
- Kishore, S., Lubner, S. and Zavolan, M. (2010) Deciphering the role of RNA-binding proteins in the post-transcriptional control of gene expression. *Brief Funct. Genomics*, 9, 391-404.
- Kohler, B.A., Ward, E., McCarthy, B.J., Schymura, M.J., Ries, L.A., Ehemann, C., Jemal, A., Anderson, R.N., Ajani, U.A. and Edwards, B.K. (2011) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, Featuring tumors of the brain and other nervous system. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1-23.
- Koido, S. Homma, S., Takahara, A., Namiki, Y., Tsukinaga, S. Mitobe, J., Odahara, S., Yukawa, T., Matsudaira, H., Nagtsuma, K., Uchiyama, K., Satoh, K., Ito, M., Komita, H., Arakawa, H., Ohkusa, T., Gong, J. And Tajiri, H. (2011) Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 1-15.
- Krzeslak, A. and Lipinska, A. (2004) Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9, 205-328.
- Kufe, D.W. (2009) Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 9, 874-885.
- Lahm, H., André, S. Hoeflich, A., Fischer, J.R., Sordat, B., Kaltner, H., Wolf, E. and Gabuis, H.J. (2000) Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implication for diagnostic and therapeutic procedures. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 375-386.
- Lévy, P. (sous la direction de) (2009) "Item 155 : tumeurs du pancréas" In *Abrégé d'hépatogastroentérologie*. Paris, Masson, p. 1-9.
- Levy, R., Biran, A., Poirier, F, Raz, A. and Kloog, Y. (2011) Galectin-3 mediates cross-talk between K-Ras and Let-7c tumor suppressor microRNA. *PLoS One*. 6, *in press*.
- Limacher, J.M. and Acres, B. (2007) MUC1, a therapeutic target in oncology. *Bull. Cancer*. 94, 253-257.
- Lin, H.M., Pestell R.G., Raz, A. and Kim, H.R. (2002) Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and c-AMP responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*. 21, 8001-8010.
- Liu, F.T., Patterson, R.J. and Wang, J.L. (2002) Intracellular functions of Galectins. *Biochem. Biophys. Acta*. 1572, 263-273.
- Liu, F.T and Rabinovich A.R. (2005) Galectins as modulator of tumor progression. *Nat. Rev. Cancer*. 5, 29-41.
- Merlin, J., Stechly, L., de Beaucé, S., Monté, D., Leteurtre, E., Van Seuning, I., Huet, G. and Pigny, P. (2011) Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 30, 2514-2525.

- Meyer, S. Temme, C. and Wahle, E. (2004) Messenger RNA turnover in eucaryotes: Pathways and enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39, 197-216.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, S., Landini, I. and Mazzei, T. (2006) Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann. Oncol.* 5, 7-12.
- Moniaux, N., Nollet, S., Porchet, N., Degand, P., Laine, A. and Aubert, J.P. (1999) Complete sequence of the human mucin MUC4: A putative cell membrane-associated mucin. *Biochem. J.* 338, 325-333.
- Nagata, K., Horinouchi, M., Saitou, M., Higashi, M., Nomoto, M., Goto, M. and Yonezawa, S. (2007) Mucin expression profile in pancreatic cancer and the precursors lesions. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 14, 243-254.
- Nakahara, S. and Raz, A. (2007) Regulation of cancer related gene expression by Galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev.*, 26, 605-610.
- Newlaczyl, A.U. and Yu, L.G. (2011) Galectin-3 – A jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett.* 313, 123-128.
- Nguyen-Chi, M and Morello, D. (2009) Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation. *Med. Sci.* 24, 290-296.
- Ottenhof, N.A., Milne, A.N., Morsink, S.H., Drillenbug, P., Ten Kate, F.J., Maitra, A. and Offerhaus, G.J. (2009) Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 133, 375-381.
- Parent, A. and Bisailon, M. (2006) Synergy between transcription and processing events. *Med. Sci.* 22, 626-632.
- Park, J.Y., Helm, J., Coppola, D., Kim, D., Malafa, M and Kim, S.J (2011) MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* 17, 817-827.
- Paron, I., Scaloni, A., Pines, A., Bachi, A., Liu, F.T., Puppini, C., Pandolfi, M., Ledda, L., Di Loreto, C., Damante, G. and Tell, G. (2003) Nuclear localization of galectin-3 in transformed thyroid cells: A role in transcriptional regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 545-553.
- Patterson, R.J., Wang W. and Wang, J.L. (2004) Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconj. J.* 19, 499-506.
- Peritz, T., Zeng, F., Kannanayakal, T., Kilk, K., Eiriksdottir, E., Langel, U. and Eberwine, J. (2006) Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes. *Nat. Protoc.* 1, 577-580.
- Perrais, M., Pigny, P., Ducourouble, M.P., Petitprez, D., Porchet, N., Aubert, J.P. and Van Seuning, I. (2001) Characterization of human mucin gene *MUC4* promoter. *J. Biol. Chem.* 276, 30923-30933.
- Pollard, T.D. and Earnshaw, W.C. (2004) *Biologie cellulaire*. Paris, Elsevier, Collection Campus reference, 880 p.
- Porchet, N., Nguyen, V.C., Dufosse, J., Audie, J.P., Guyonnet-Duperat, V., Gross, M.S., Denis, C., Degand, P., Bernheim, A. and Aubert, J.P. (1991) Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 414-422.

- Porchet, N. and Aubert, J.P. (2004) Les gènes MUC : Mucin or not mucin ? That is the question. *Med. Sci.* 20, 569-574.
- Pour, P.M., Pandey, K.K and Batra, S.K (2003) What is the origin of pancreatic adenocarcinoma ? *Mol. Cancer.* 2, 1-10.
- Price-Schiavi, S.A., Jepson, S., Li, P., Arango, M., Rudland, P.S., Yee, L. And Carraway, K.L. (2002) Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int. J. Cancer* 99, 783-791.
- Rachagani, S., Kumar, S and Batra, S.K. (2010) MicroRNA in pancreatic cancer: Pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 292, 8-16.
- Rajabi, H., Jin, C., Ahmad, R., McClary, C., Joshi, M.D. and Kufe, D. (2010) Mucin1 oncoprotein expression is suppressed by the miR-125b oncomir. *Genes Cancer.* 1, 62-68.
- Ross, J. (1996) Control of messenger RNA stability in higher eucaryotes. *Trends. Genet.* 12, 171-175.
- Rosty, C (2004) Towards the identification of new markers of pancreatic cancer by gene expression analysis. *Bull. Cancer* 91, 593-598.
- Sachdeva, M. and Mo, Y.Y. (2010) MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res.* 1, 378-387.
- Saif, M.W. (2011) Pancreatic neoplasm in 2011: an update. *J. Pancreas.* 12, 316-321.
- Saif, M.W and Chabot, J. (2011) Chemotherapy: Metastatic pancreatic cancer-is FOLFIRINOX the new standard? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 452-453.
- Schroeder, J.A., Masri, A.A., Adriance, M.C., Tessier, J.C., Kotlarczyk, L.L., Thompson, M.C. and Gendler, S.J. (2004) MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene* 23, 5739-5747.
- Senepati, S., Chaturvedi, P., Chaney, W.G., Chakraborty, S., Gnanapragassam, V.S., Sasson, A.R. and Batra, S.K. (2011) Novel interaction of MUC4 and galectin: Potential pathobiological implications for metastasis in lethal pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 267-274.
- Singh, P.K. and Holingsworth, M.A. (2006) Cell-surface associated mucins in signal transduction. *Trends Cell. Biol.* 16, 467-476.
- Song, S., Byrd, J.C., Mazurek, N., Liu, K., Koo, J.S. and Bresalier R.S. (2005) Galectin-3 modulates MUC2 mucin expression in human colon cancer cells at the level of transcription via AP-1 activation. *Gastroenterology* 129, 1581-1591.
- Srivastava, S.K., Bhardwaj, A., Singh, S., Arora, S., Wang, B., Grizzle, W.E. and Singh, A.P. (2011) MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behaviour of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 32, 1832-1839.
- Staton, J.M., Thomson, A.M. and Leedman, P.J. (2002) Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 17-34.
- Swartz, M.J., Batra, S.K., Varshney, G.C., Hollingsworth, M.A., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Wilentz, R.E., Hruban, R.H. and Argani, P. (2002) MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.* 117, 791-796.

- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H. and Goggins, M. (2011) Pancreatic cancer. *Lancet*, 378, 607-620.
- Wang, J.L., Gray, R.M., Haudek, K.C. and Patterson R.J. (2004) Nucleocytoplasmic lectins. *Biochem. Biophys. Acta*. 1673, 75-93.
- Wang, Y., Gao, J., Li, Z., Gong, Y. and Man, X. (2007) Diagnostic value of mucins (MUC1, MUC2, and MUC5AC) expression profile in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens of the pancreas. *Int. J. Cancer*. 121, 2716-2722.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. and Losick, R (2009) *Biologie moléculaire du gène*, Paris, (6^{ème} édition) Pearson Education, 688 p.
- Weed, D.T., Gomez-Fernandez, C., Pacheco, J., Ruiz, J., Hamilton-Nelson, K., Arnold, D.J., Civantos, F.J., Zhang, J., Yasin, M., Goodwin, W.J. and Carraway, K.L. (2004) MUC4 and ERBB2 expression in major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck* 26, 353-364.
- Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, M., Yokoyama, S and Goto, M. (2010) Significance of mucins expression in pancreaticobiliary neoplasms. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 17, 108-124.
- Zhao, Q., Guo, X., Nash, G.B., Stone, P.C., Hilken, J., Rhodes, J.M. and Yu, L.G. (2009) Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. *Cancer Res.* 69, 6799-6806.

Sites internet

André, T. : Thésaurus national de cancérologie digestive, chapitre 9 : Cancer du pancréas, 2011.

<http://www.snfge.org/01-Bibliotheque/0G-Thesaurus-cancerologie/publication5/cadre-5-refbiblio.asp?intidtitre=1072&URL=1072.htm>

Balas, D. : Histologie morphofonctionnelle des épithéliums, 2007.

http://homepage.mac.com/danielbalas/Public/cours_histo_P1/cours_epith_digestifs/Lecture%201.pdf

Catala, M. : Le pancreas exocrine, 2007.

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/histop2.pdf>

Chabriere, E. : Caractérisation et purification des protéines.

biologie.univ-mrs.fr/upload/p259/purification_des_prot_ines

Gilly, F.N. : Rapport duodéno-pancréatique, 2007.

http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/02464350/0/fiche___pagelibre/&RH=LS_CEL

Guide affections longues durée 30 (ALD 30) : cancer du pancréas, 2010.

http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1005133/ald-n-30-cancer-du-pancreas

Hanrahan, J : Epithelial Biology (2004).

<http://www.medicine.mcgill.ca/physio/hanrahanlab/epibiology.htm>

Houssier, C. and Raisonnier, A. Biologie moléculaire, 2009-2010.

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BMbioch/index.html>

Lunardi, J. : Les acides nucléiques et génomes, 2010.

http://umvf.biomedicale.univ-paris5.fr/wiki/index.php?title=Biochimie_Grenoble_1011

Massard, J. : Les pathologies du pancréas, 2005.

<http://images.ifi20072010.multiply.multiplycontent.com/>

Saumet J.L. : Pancréas endocrine, 2010.

<http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/cours-pancreas-endocrine-pr-j-l-saumet-pcem2-579393.kjsp?RH=1196427363463>

Société Nationale Française de Gastroentérologie (SNFGE) : Cancer du pancréas, 1999.

http://www.snfge.org/02-Connaitre-maladie/0G-pancreas/faq/pancreas_cancer.htm

Technologies, gènes suicides

http://www.invivogen-therapeutics.com/fr/technologies/genes_suicides.html

Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines : cours de Biologie Moléculaire

<http://www.e-campus.uvsq.fr/>

Yzet, T. and Lecareux, A. : Atelier pancreas, 2005.

<http://www.insitu.fr/web/Epu-H/Acrobat/FMC05/PANCREAS.PDF>

Sites internet des sociétés Proméga, Invitrogen, BioRad, GenScript

Les différents sites internet ont été consultés en novembre 2011.



Université Lille 2
Droit et Santé



Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE Cedex
Tél. 03.20.96.40.40 - Fax 03.20.95.90.09

DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Vu le Décret n° 88.996 du 19 Octobre 1988 modifié relatif aux études spécialisées du troisième cycle de Pharmacie
Vu le Décret n° 90810 du 10 Septembre 1990 fixant la réglementation du D.E.S. de Biologie Médicale
Vu la décision du Président de l'Université en date du 17 décembre 1999 relative aux délégations de signature :

DECIDE

Article 1er : **Mademoiselle COPPIN Lucie**

Est autorisé(e) à soutenir son mémoire en vue de l'obtention du D.E.S. de BIOLOGIE MEDICALE sur le sujet suivant :

ROLE DE LA GALECTINE – 3 DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES MUCINES MEMBRANAIRES MUC1 ET MUC4 DANS UN MODELE D'ADENOCARCINOME PANCREATIQUE CANALAIRE

Article 2 : Ce mémoire peut tenir lieu de thèse en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Article 3 : La soutenance aura lieu le
Mercredi 16 mai 2012 à 18 h 00 – Amphithéâtre Curie

Article 4 : Le jury est composé ainsi qu'il suit :

Président :

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, Faculté de Pharmacie de Lille, Centre de Biologie Pathologie, C.H.R.U, LILLE

Membres :

Monsieur le Professeur Pascal PIGNY, Faculté de médecine, Centre de Biologie Pathologie, C.H.R.U, LILLE

Madame Malika BALDUYCK, Faculté de Pharmacie, Centre de Biologie Pathologie, C.H.R.U, LILLE

Madame Fabienne ESCANDE, Centre de Biologie Pathologie, C.H.R.U, LILLE

Lille, le 13 mars 2012

Le Doyen


L. DUBREUIL

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2011/2012

Nom : COPPIN

Prénom : Lucie

Titre du mémoire / thèse :

Rôle de la galectine-3 dans la régulation de l'expression des mucines membranaires MUC1 et MUC4 dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique canalaire humain

Mots-clés : cancer, pancréas, galectine-3, MUC1, MUC4, promoteur, stabilité des ARNm

Résumé : Les mucines MUC1 et MUC4 sont des O-glycoprotéines membranaires de masse moléculaire élevée, exprimées au pôle apical des cellules épithéliales saines où elles exercent un rôle de protection des épithéliums et interviennent dans la transduction de signaux. MUC1 et MUC4 sont respectivement sur- et néoexprimées au cours de l'adénocarcinome pancréatique canalaire, cancer de mauvais pronostic en raison de son caractère agressif et d'une détection tardive. La transformation maligne s'accompagne d'une délocalisation de ces mucines : leur distribution n'est plus restreinte au pôle apical de la cellule épithéliale mais devient circonférentielle et cytoplasmique. La galectine-3, lectine endogène interagissant avec les β -galactosides, est également surexprimée au cours de ce cancer. Des travaux préalables entrepris au sein de l'équipe 5 de l'UMR 837 de l'Inserm ont mis en évidence une diminution de l'expression de *MUC1* et de *MUC4* dans des cellules cancéreuses pancréatiques humaines n'exprimant plus la galectine-3.

Notre objectif est de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu par la galectine-3 pour moduler l'expression de ces mucines dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Pour cela, nous disposons (i) de la lignée cellulaire cancéreuse pancréatique humaine CAPAN-1 invalidée spécifiquement pour le gène codant la galectine-3 par méthode de *sh*-RNA, (ii) d'un vecteur d'expression de cette protéine et (iii) de différentes constructions du promoteur de *MUC1* et du promoteur de *MUC4* clonées en amont du gène codant la luciférase.

Nos travaux permettent d'une part de montrer, par co-transfections cellulaires transitoires, que la galectine-3 n'exerce pas d'effet transactivateur sur les promoteurs de *MUC1* et de *MUC4*. D'autre part, l'étude de la demi-vie des transcrits de ces mucines en présence d'actinomycine D indique un raccourcissement de celle de *MUC4* en absence de galectine-3 alors que la demi-vie de *MUC1* reste inchangée. Ainsi, la galectine-3 pourrait être un facteur à l'origine de la surexpression de *MUC4* dans les cellules cancéreuses pancréatiques par le biais de la stabilisation de ses ARNm alors que le mécanisme intervenant dans la surexpression de *MUC1* reste à déterminer.

Membres du jury :

Président

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU
Faculté de Pharmacie, Université de Lille II

Assesseurs

Madame le Docteur Malika BALDUYCK
Faculté de Pharmacie, Université de Lille II

Madame le Docteur Fabienne ESCANDE
Centre de Biologie Pathologie, CHRU de Lille

Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Pascal PIGNY
Faculté de médecine, Université de Lille II