



HAL
open science

Implication de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de la mucine membranaire MUC1 et de son récepteur associé, l'EGFR , dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines

Johann Merlin

► **To cite this version:**

Johann Merlin. Implication de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de la mucine membranaire MUC1 et de son récepteur associé, l'EGFR , dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S039 . tel-00841880

HAL Id: tel-00841880

<https://theses.hal.science/tel-00841880>

Submitted on 5 Jul 2013

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

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

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ – LILLE II

THÈSE de DOCTORAT d'UNIVERSITÉ

pour l'obtention du titre de

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

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée par

Johann MERLIN

**Implication de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire
de la mucine membranaire MUC1 et de son récepteur associé, l'EGFR,
dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines**

Thèse dirigée par le Docteur Guillemette HUET

soutenue le 14 décembre 2012

devant le jury composé de :

Présidente : Docteur Isabelle Van Seuningen
Rapporteurs : Docteur Christian Gespach
Docteur Françoise Poirier
Examinatrice : Docteur Guillemette Huet

RESUME

L'adénocarcinome pancréatique canalaire est un cancer de mauvais pronostic avec une survie à 5 ans d'environ 5 % et une médiane de survie d'environ 6 mois. Dès les stades précoces de la carcinogenèse pancréatique, la mucine membranaire MUC1, glycoprotéine de haute masse moléculaire, est surexprimée et présente des anomalies de localisation cellulaire : une perte de polarité de distribution cellulaire avec expression au niveau de l'ensemble de la membrane plasmique et une rétention à l'intérieur de la cellule qui est utilisée par les pathologistes comme indicateur de malignité après ponction à l'aiguille fine sur des lésions pancréatiques. Sachant que MUC1 est capable d'interagir avec l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) et de jouer un rôle sur la transduction des signaux, nous avons émis l'hypothèse que ces anomalies de distribution cellulaire pouvaient être à l'origine de signaux oncogéniques. Cependant, les mécanismes permettant cette rétention cytoplasmique ne sont pas connus. Des études antérieures du laboratoire au sein de cellules épithéliales exprimant un phénotype entérocytaire ont montré que le trafic de certaines glycoprotéines vers la membrane apicale était régulé par une lectine endogène : la Galectine-4. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à un autre membre de la famille des galectines : la Galectine-3, exprimée au niveau des cellules pancréatiques. La Galectine-3 interagit avec des motifs glycosylés contenant un motif N-acétyl-lactosamine. Ce type de motif est présent au niveau de nombreuses structures glycaniques, qu'elles soient de type *N*- ou *O*-glycaniques. Les mucines et les récepteurs membranaires sont substitués par ces deux types de chaînes oligosaccharidiques. La Galectine-3 est surexprimée dans le cancer pancréatique et son expression est corrélée à une forte agressivité tumorale dans d'autres cancers.

Le but de ce travail a été dans un premier temps d'établir des lignées cellulaires pancréatiques humaines polarisées CAPAN-1 invalidées pour la Galectine-3 et dans un second temps d'étudier l'implication de la Galectine-3 (i) au niveau du trafic intracellulaire de MUC1 et l'EGFR, (ii) de l'interaction entre MUC1 et l'EGFR et (iii) des voies de signalisation en aval de l'EGFR.

Les résultats montrent que la lignée tumorale pancréatique CAPAN-1 présente les anomalies de distribution cellulaire de MUC1 similaires à celles observées dans les tumeurs pancréatiques humaines, notamment la rétention de MUC1 à l'intérieur des cellules. Le

silencing de la Galectine-3 entraîne la disparition de cette anomalie de distribution cellulaire, MUC1 retrouvant une localisation membranaire. Nous montrons que l'inhibition de l'expression de la Galectine-3 est associée à une augmentation de la translocation nucléaire de l'EGFR et à une inhibition de l'endocytose de MUC1 et de l'EGFR. Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation de l'interaction entre MUC1 et l'EGFR et d'une activation accrue de ce récepteur tyrosine kinase lorsqu'il est soumis à l'EGF : augmentation de la phosphorylation de l'EGFR et de la phosphorylation des MAPK Erk1 et 2.

Mots clés : Galectine, Mucine, EGFR, cancer, endocytose, translocation nucléaire

ABSTRACT

MUC1 is a transmembrane glycoprotein which is typically expressed at the apical membrane of normal epithelial cells. In cancer cells, the over-expression of MUC1 and its aberrant localization around the cell membrane and in the cytoplasm favours its interaction with different protein partners such as epidermal growth factor receptor (EGFR) and can promote tumour proliferation through the activation of oncogenic signalling pathways.

The aims of this work were to determine whether galectin-3 has a role in the trafficking of MUC1 and EGFR in pancreatic cancer cells and whether this lectin could affect the oncogenic signalling pathways downstream of MUC1 and EGFR.

Our results showed that galectin-3, an endogenous lectin, is coexpressed with MUC1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma, and that it favours the endocytosis of MUC1 and EGFR. Depletion of galectin-3 by RNA interference increased the interaction between MUC1 and EGFR, EGFR and ERK-1,2 phosphorylation, and translocation of EGFR to the nucleus. On the contrary, silencing of galectin-3 led to a decrease of cyclin-D1 levels and of cell proliferation.

The galectin-3-dependent regulation of MUC1/EGFR functions may represent an interesting mechanism modulating the EGFR-stimulated cell growth of pancreatic cancer cells.

Keywords: pancreatic cancer; galectin-3; MUC1; EGFR; intracellular localization; endocytosis

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES FIGURES	3
ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	9
1. Le pancréas	9
2. L'adénocarcinome pancréatique canalaire	9
2.1 Les facteurs de risque	9
2.2 La carcinogenèse pancréatique	12
2.2.1 Les lésions précancéreuses	13
2.2.2 Les altérations génétiques.....	14
2.3 Les symptômes	16
2.4 Le diagnostic	17
2.4.1 Les examens d'imagerie médicale	17
2.4.2 Les examens sanguins et les marqueurs tumoraux.....	18
2.5 Le pronostic	19
2.6 Le traitement curatif et la prise en charge	19
2.6.1 La chirurgie	19
2.6.2 Les thérapies adjuvantes.....	20
2.6.3 Les thérapies néo-adjuvantes.....	22
2.6.4 Les autres thérapies	22
3. Les mucines	22
3.1 Les mucines sécrétées	23
3.1.1 Les gènes	23
3.1.2 La structure	24
3.2 Les mucines membranaires	24
3.2.1 La mucine membranaire MUC1	25
3.2.1.1 La régulation transcriptionnelle	25
3.2.1.2 Le patron d'expression.....	27
3.2.1.3 La structure	27
3.2.1.4 Le rôle de MUC1	29
3.2.1.5 La glycosylation de MUC1	30
3.2.2 MUC1 et le cancer	31
3.2.2.1 L'expression de MUC1.....	31
3.2.2.2 Le rôle de MUC1 dans la polarité cellulaire	31
3.2.2.3 MUC1 et les voies de signalisations	32
3.2.2.4 MUC1 et les interactions intercellulaires.....	35
3.2.2.5 La glycosylation de MUC1 dans le cancer.....	35
3.2.3 Les anomalies d'expression et de localisation de MUC1 dans le PDAC	36
4. Les galectines	36
4.1 La Galectine-3	37
4.1.1 <i>LGALS3</i>	37
4.1.2 La régulation de la transcription de <i>LGALS3</i>	38
4.1.3 Le patron d'expression de la Galectine-3	38
4.1.4 La Galectine-3.....	39

4.1.5	La distribution cellulaire de la Galectine-3.....	40
4.2	Les rôles physiologiques des galectines.....	41
4.2.1	L'adhésion cellulaire	41
4.2.2	L'épissage.....	41
4.2.3	La réponse immunitaire	41
4.2.4	Le trafic intracellulaire.....	41
4.2.5	Le trafic intracellulaire de MUC1.....	45
4.3	Les galectines en pathologie tumorale	46
4.3.1	L'apoptose	46
4.3.2	La prolifération cellulaire.....	48
4.3.3	L'angiogenèse.....	50
4.3.4	Le processus métastatique.....	50
RÉSULTATS.....		
.....		53
DISCUSSION.....		
.....		68
PERSPECTIVES.....		
.....		73
MATÉRIEL ET		
MÉTHODES.....		
.....		75
RÉFÉRENCES		
BIBLIOGRAPHIQUES.....		
.....		95

TABLE DES FIGURES

INTRODUCTION.....	p. 9
Figure 1 : Localisation et morphologie du pancréas	p. 9
Figure 2 : Histologie des canaux pancréatiques intralobulaires et des différents stades PanIN	p. 13
Figure 3 : Cancérogenèse pancréatique	p. 15
Figure 4 : Pancréato-duodénectomie	p. 20
Figure 5 : Représentation schématique des mucines codées par les gènes <i>MUCs 11p15</i>	p. 23
Figure 6 : Mucines membranaires	p. 24
Figure 7 : ADNc de trois isoformes de MUC1 : MUC1, MUC1/SEC et MUC1/Y	p. 25
Figure 8 : Cartographie du promoteur de MUC1	p. 26
Figure 9 : Structure de la mucine membranaire MUC1	p. 28
Figure 10 : Séquence en acides aminés et sites d'interaction de MUC1CT	p. 29
Figure 11 : Expression de MUC1 durant la carcinogenèse pancréatique	p. 31
Figure 12 : Rôle de MUC1 dans les jonctions serrées	p. 32
Figure 13 : Rôle de MUC1 dans les jonctions adhérentes	p. 32
Figure 14 : MUC1 et la voie RAS	p. 33
Figure 15 : MUC1 et la voie PI3K/AKT	p. 34
Figure 16 : MUC1 et les voies STAT1/3 et NFκB	p. 35
Figure 17 : <i>LGALS3</i>	p. 38

Figure 18 : Voies de trafic intracellulaire dans les cellules polarisées	p. 43
Figure 19 : Trafic intracellulaire de MUC1	p. 45
Résultats.....	p. 53
Figure 20 : Expression de MUC1 et de la Galectine-3 dans le pancréas	p. 53
Figure 21 : Analyse de l'expression de Galectine-3 par RT-PCR et western-blot Galectine-3 sur les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour l'expression de Galectine-3	p. 54
Figure 22 : Expression de la cycline D1 et prolifération cellulaire dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour l'expression de Galectine-3	p. 55
Figure 23 : Pourcentage de cellules invasives dans le collagène de type I dans les cellules Capan-1 contrôles et invalidées pour Galectine-3 en condition contrôle et après traitement par l'EGF	p. 55
Figure 24 : Etude qPCR de l'expression de <i>MUC1</i> dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour Galectine-3	p. 56
Figure 25 : Western-blot de MUC1 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour Galectine-3	p. 56
Figure 26 : Western-blot de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour Galectine-3	p. 56
Figure 27 : Rôle de Galectine-3 dans l'interaction MUC1-EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 57
Figure 28 : Cinétique de traitement à l'EGF sur les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 57
Figure 29 : Rôle de Galectine-3 dans la localisation de MUC1CT et de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 58
Figure 30 : Fraction nucléaire d'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 58
Figure 31 : Expression et localisation de Galectine-3 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 59
Figure 32 : Interaction cytoplasmique Galectine-3/EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 59

Figure 33 : Localisation cellulaire de MUC1 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine	p. 60
Figure 34 : Localisation cellulaire de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 61
Figure 35 : Expression de MUC1 membranaire et totale des lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 61
Figure 36 : Colocalisation MUC1/EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 62
Figure 37 : Endocytose de MUC1 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 63
Figure 38 : Endocytose de MUC1 restaurée dans la lignée Capan-1 invalidée pour Galectine-3 après ajout de Galectine-3 recombinante	p. 63
Figure 39 : Endocytose de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 64
Figure 40 : Trafic intracellulaire de MUC1 dans la lignée Capan-1 contrôle	p. 64
Figure 41 : Etude de la fluorescence après clonage et transfection de la construction MUC1-M1-GFP dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3	p. 65
Figure 42 : Adressage membranaire de MUC1 et MUC1-M1-GFP dans la lignée Capan-1 contrôle	p. 65
Figure 43 : Adressage membranaire de MUC1 et MUC1-M1-GFP dans la lignée Capan-1 invalidée pour Galectine-3	p. 66
Figure 44 : Schéma récapitulatif des rôles de la Galectine-3 dans les cellules Capan-1	p. 67

ABBREVIATIONS

- 5-FU : 5-fluoro-uracile
a.a. : Acide aminé
aPKC : Protéine kinase C atypique
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AEE : Endosomes de tri apical
AP : Protéine adaptatrice
APC : *Adenomatous Polyposis Coli*
ARE : Endosome de recyclage apical
ARN : Acide ribonucléique
BEE : Endosomes de tri basolatéral
BSA : Sérumalbumine bovine
CEA : Antigène carcino-embryonnaire
CHO : Cellules ovariennes d'Hamster
CRD : Domaine de reconnaissance des carbohydrates
CRE : Endosomes de recyclage commun
CRM : *Chromosome maintenance region 1*
CT : Tomographie assistée par ordinateur
CTP : Cytidine triphosphate
DPP-IV : Dipeptidyl-peptidase IV
EDTA : Acide éthylènediaminotétraacétique
EGF : *Epidermal Growth Factor*
ER α : Récepteur α à l'œstradiol
FGFR-3 : *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*
GL : Glycolipide
GP : Glycoprotéine
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

HGFR : *Hepatocyte Growth Factor Receptor*
IFN- γ : Interféron γ
IPMN : Néoplasme mucineux papillaire intracanaux
LDL-R : *Low Density Lipids Receptor*
LEF1 : *Leukocyte enhancing factor 1*
LPH : Lactase phlorizine hydrolase
m/v : masse/volume
MCN : Néoplasme kystique mucineux
MDCK : Cellules canines de rein Madin–Darby
MEC : Matrice extracellulaire
MPMR : *Mucin Purin pyrimidine Mirror Repeat*
MUC1CT : Queue cytoplasmique de MUC1
NSE : *Leucine-rich nuclear export signal*
Nup62 : *Nucleoporin p62*
PA : Pôle apical
PanIN : Néoplasme pancréatique intracanaux
PAR3/6 : *Partitioning defective 3 homolog 3/6*
PBL : Pôle basolatéral
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PDAC : Adénocarcinome pancréatique canalaux
PDGFR : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*
PET : Tomographie par émission de positron
PET-CT : Tomographie assistée par ordinateur associée à la tomographie par émission de positron
PFA : Paraformaldéhyde
pIgR : Récepteur aux IgA
PKC δ : *Protein Kinase C δ*
PMSF : Flurorure de phénylméthanesulfonyle
RE : Réticulum endoplasmique
RT : Reverse transcriptase
SDS : Sodium dodecyl sulfate
shRNA : *short hairpin RNA*
SH2 : *Src homology 2*
SL : Sphingolipides

SMC : Cellule musculaire lisse vasculaire

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

SOS : *Son Of Sevenless*

SVF : Sérum de veau fœtal

TGF- β : *Transforming Growth Factor β*

TGF- β 2 : *Transforming Growth Factor β 2*

TGN : Réseau trans-Golgien

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor α*

TR : Répétitions en tandem

TRAIL : *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TTF-1 : *Nuclear thyroid-specific transcription factor1*

v/v : volume/volume

VNTR : *Variable Number Tandem Repeat*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

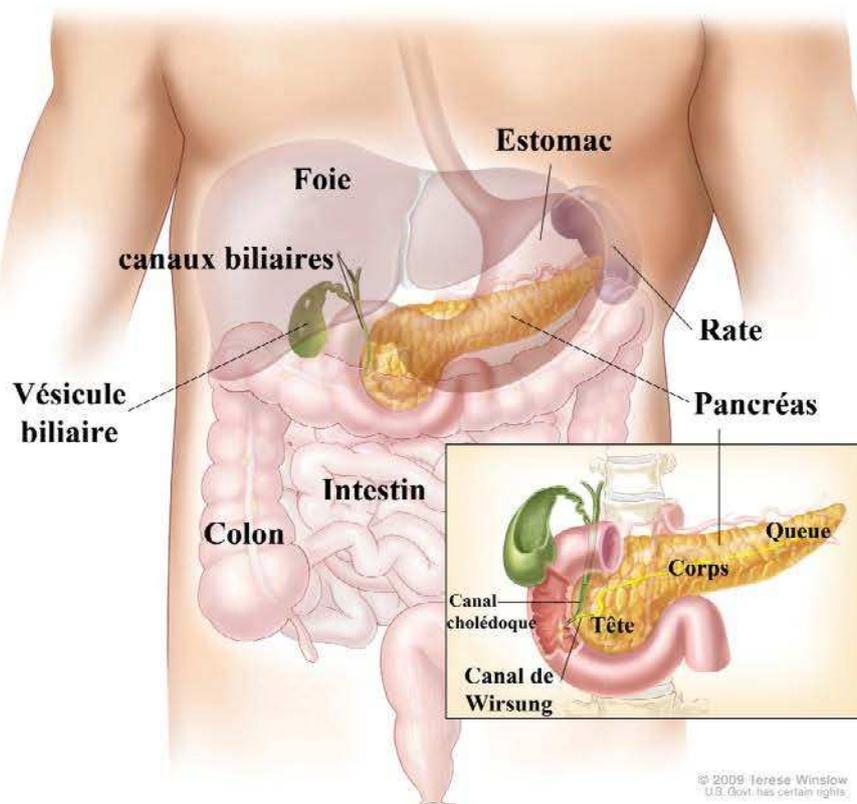


Figure 1 : **Localisation et morphologie du pancréas.** Le pancréas est situé derrière le foie, entre la rate et la vésicule biliaire. Il est composé de trois parties : la tête, le corps et la queue. Les enzymes digestives sont libérés dans l'intestin au niveau du duodénum *via* le canal de Wirsung. *D'après <http://www.uchospitals.edu>.*

INTRODUCTION

1. Le pancréas

Le pancréas est une glande amphicrine qui mesure environ 15 cm de long et 3 cm de large composée de trois parties : la tête, le corps et la queue. Elle est située dans l'abdomen derrière l'estomac, devant les reins et à proximité du foie et de la vésicule biliaire. Le pancréas comprend une partie exocrine, les acini, et une partie endocrine, les îlots de Langerhans (environ 2 % du volume glandulaire), dispersée dans le tissu exocrine. **La partie endocrine**, qui est plus développée dans la queue du pancréas, libère des hormones, l'insuline et le glucagon, permettant la régulation du métabolisme glucidique. **La partie exocrine** synthétise et libère des enzymes nécessaires à la digestion dans le duodénum *via* le canal collecteur pancréatique, le canal de Wirsung (**Figure 1**).

2. L'adénocarcinome pancréatique canalaire

L'adénocarcinome pancréatique canalaire, PDAC, est la forme majoritaire de cancer pancréatique (85 %). Il est la sixième et quatrième cause de mort par cancer respectivement en Europe et aux Etats-Unis et est responsable de 227 000 décès par an dans le monde. Ce cancer d'origine multifactorielle touche préférentiellement les hommes. L'apparition se fait généralement après 55 ans, le pic d'apparition se situant entre 60 et 70 ans. En 2002, le rapport mortalité/incidence de 98 % met en évidence à quel point ce cancer est de mauvais pronostic puisqu'il signifie le décès pour presque tous les patients. La médiane de survie est d'environ 6 mois et la survie à 5 ans ne dépasse pas 5 %. Lorsque la tumeur est résecable, le taux de survie et la médiane de survie atteignent respectivement 10 % et 23 mois au maximum.

2.1 *Les facteurs de risque*

Plusieurs facteurs de risque sont connus ou suspectés.

Le tabagisme semble multiplier par 2 à 3 fois les risques de développer un PDAC (Mack *et al.*, 1986, Hart *et al.*, 2008). Plusieurs études ont mis en évidence que l'inhalation de

fumée de cigarette était, dans un premier temps, responsable de dommages au niveau des cellules acineuses pancréatiques entraînant l'apparition de différents types d'anomalies tels que la dysplasie, l'hyperplasie (Longnecker *et al.*, 1980) ou encore des lésions atypiques marquées par la présence de cellules acidophiles ou basophiles (Tanaka *et al.*, 1988). Les cellules canalaire pancréatiques sont également touchées puisqu'elles présentent plus d'anomalies nucléaires chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (Tomioka *et al.*, 1990). Le tabagisme perturbe également la physiologie des cellules pancréatiques en altérant la synthèse (Lindkvist *et al.*, 2008) et la sécrétion d'enzymes (Bynum *et al.*, 1972) par un mécanisme qui n'est pas encore clairement défini. Dans un second temps, les dérivés de la nicotine tels que les nitrosamines sont capables de former des complexes au niveau de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pancréatique (Zhu J *et al.*, 2006) interférant ainsi sur l'expression de certains gènes. De même, les carcinogènes issus du tabac sont capables d'induire des mutations de l'ADN au niveau du pancréas. Les hypothèses scientifiques actuelles seraient que le tabagisme, *via* ces deux modes d'action, entrainerait des dommages induisant la transdifférenciation des cellules acineuses du pancréas débouchant sur la formation d'un adénocarcinome pancréatique.

Le sexe masculin, est préférentiellement touché par le cancer pancréatique (Wahi *et al.*, 2009). Cela pourrait notamment s'expliquer par le fait qu'il existe un plus grand pourcentage de fumeurs au sein de la population masculine.

L'âge semble être un facteur important. En effet, selon une étude réalisée à l'échelle mondiale, seulement 5 à 10 % des patients touchés par un PDAC sont âgés de moins de 50 ans (Raimondi *et al.*, 2007, Deutsch *et al.*, 1999).

Les prédispositions familiales représentent également un facteur de risque. Des études ont mis en évidence une augmentation du risque de développer un PDAC au sein des familles dont certains membres avaient été atteints d'un PDAC. Le risque semble augmenter s'il s'agit de membres de la famille de premier degré de parenté. En effet, lorsqu'un individu a une, deux ou trois personnes de premier degré touchées, le risque est augmenté d'un facteur respectif de 4,6, 6,4 et 32 (Klein *et al.*, 2004). De plus, la présence dans la famille d'un individu atteint très précocement d'un PDAC augmente aussi le risque du développement d'un PDAC au sein de cette famille (Brune *et al.*, 2010).

Les régimes alimentaires riches en lipides et l'obésité. En 1993, Lyon et collaborateurs ont effectué une étude sur des habitants de l'Utah, aux Etats-Unis, et ont mis en évidence que la nourriture riche en lipides, qu'elles soient d'origine animale ou végétale, augmentait de trois fois le risque de développer un PDAC chez les hommes. Chez les femmes, il semble que les graisses d'origine non animale et non succédanées augmentent les risques d'un facteur 3,4 (Lyon *et al.*, 1993). Plus récemment, les observations sur plusieurs cohortes d'individus ont permis d'individualiser les acides gras saturés et d'origine animale comme principaux acides gras nocifs (Zhang *et al.*, 2005, Chan *et al.*, 2007, Thiébaud *et al.*, 2009, Nöthlings *et al.*, 2005). Enfin, en 2010, une étude a établi une forte corrélation entre un indice de masse corporelle élevé et la présence de PDAC (Arslan *et al.*, 2010).

L'acide folique a été proposé comme jouant un rôle dans le PDAC. Il est impliqué dans les phénomènes de méthylation de l'ADN, dans la synthèse nucléotidique et dans la réparation de l'ADN. Des études semblent montrer une association inverse entre l'acide folique ingéré dans la nourriture et l'apparition de cancers pancréatiques (Larsson *et al.*, 2006, Oaks *et al.*, 2010). Ces résultats ne sont cependant pas retrouvés dans toutes les études (Skinner *et al.*, 2004, Keszei *et al.*, 2009).

Certains métiers sont susceptibles de favoriser l'apparition de cancers pancréatiques. Le recoupement d'études effectuées entre 1968 et 2010 a mis en évidence que l'exposition aux hydrocarbures chlorés des solvants, utilisés en métallurgie, dans le nettoyage à sec ou retrouvés dans certains plastiques et pesticides, ou aux hydrocarbures aromatiques polycycliques utilisés en métallurgie sont des facteurs à risques (Andreotti *et al.*, 2012).

Le groupe sanguin A, B ou AB a été rapporté comme un facteur de risque du PDAC. Depuis les années 1960, des travaux ont rapporté que la fréquence d'apparition de cancers du tractus digestif variait en fonction du groupe sanguin (Aird *et al.*, 1960). Plus récemment, Wolpin et collaborateurs ont effectué deux études, regroupant plus de 900 000 personnes, qui ont permis de confirmer que les personnes de groupe sanguin non O ont plus de risques de développer un cancer pancréatique (Wolpin *et al.*, 2009). Ces résultats ont été confirmés un peu plus tard par une étude génomique sur 2000 personnes mettant en évidence qu'un *single nucleotide polymorphism*, le SNP rs505922, situé au locus 9p34 était fortement associé au cancer pancréatique. Ce SNP est dans le premier intron du gène *ABO* codant les enzymes responsables de la formation des antigènes A et B (Amundadottir *et al.*, 2009).

L'origine afro-américaine est associée à un risque plus grand de développer un PDAC par rapport aux populations caucasiennes. L'origine asiatique présente le plus faible risque (Vincent *et al.*, 2011).

Le diabète de type 2 représente un facteur de risque de nombreux cancers dont celui du pancréas. Des études montrent qu'il existe 50 % de risque supplémentaire de développer cette pathologie lorsque l'individu est touché par un diabète de type 2 depuis au moins 10 ans (Huxley *et al.*, 2005, Everhart *et al.*, 1995). En 2009, Stocks et collaborateurs montrent qu'un taux de glycémie et d'insuline élevés ainsi qu'une résistance à l'insuline sont corrélés à un risque plus important de développer certains cancers dont celui du pancréas chez la femme (Stocks *et al.*, 2009, Stolzenberg-Solomon *et al.*, 2005).

La pancréatite chronique est également un facteur de risque. La recherche de PDAC au sein des personnes atteintes de pancréatite chronique dans six pays différents a révélé une forte incidence (multipliée par 20) des PDAC dans cette population (Lowenfels *et al.*, 1993). De plus, ce risque accru est retrouvé chez les patients touchés par une pancréatite chronique, qu'elle soit engendrée ou non par la consommation d'alcool. **La cholangite sclérosante primaire** accroît aussi le risque de PDAC de 14 fois (Schrumpf *et al.*, 2003, Bergquist *et al.*, 2002).

D'autres maladies semblent favoriser l'apparition de PDAC. C'est le cas des *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*, FAMMM, qui peuvent présenter ou non une mutation de *CDKN2A*. Les personnes portant la mutation ont un risque plus important de développer un cancer pancréatique (Vasen *et al.*, 2000). De même, le syndrome de Peutz-Jeghers (Hearle *et al.*, 2006), de Lynch (Geary *et al.*, 2008) et de Li-Fraumeni (Kleihues *et al.*, 1997) semblent favoriser l'apparition d'un PDAC.

2.2 La carcinogenèse pancréatique

Trois lésions précurseurs du PDAC ont été caractérisées à l'heure actuelle : les néoplasmes intracanaux pancréatiques (**PanIN**), les néoplasmes mucineux papillaires intracanaux (**IPMN**) et les néoplasmes kystiques mucineux (**MCN**) (Brugge *et al.*, 2004, Maitra *et al.*, 2005).

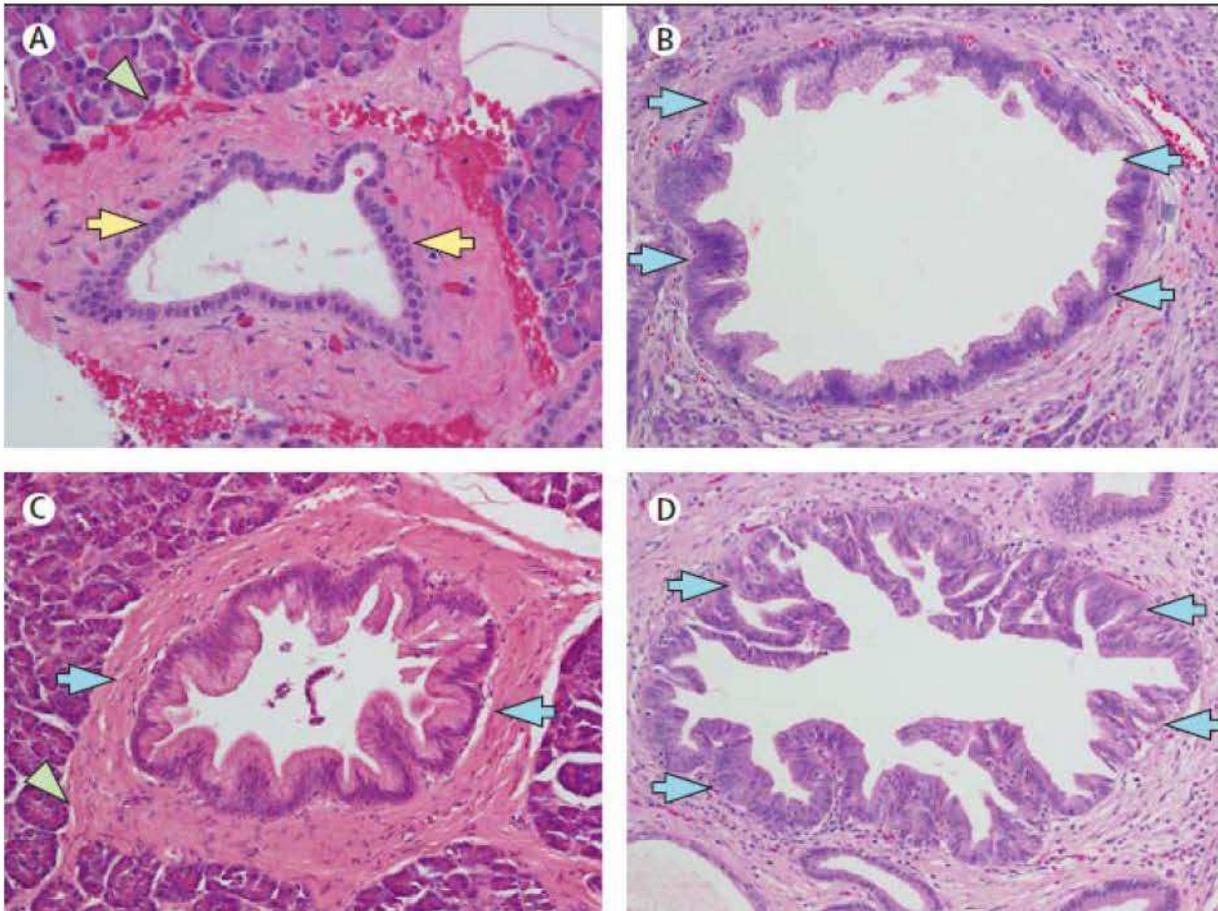


Figure 2 : **Histologie des canaux pancréatiques intralobulaires et des différents stades PanIN.** (A) Canal pancréatique sain. (B) PanIN-1, (C) PanIN 2, (D) PanIN-3. Les flèches jaunes correspondent à un canal pancréatique sain. Les têtes de flèches vertes ciblent du tissu acineux normal. Les flèches bleues montrent les différents stades de néoplasmes intracanalaires pancréatiques. *D'après Vincent et al., 2011.*

2.2.1 Les lésions précancéreuses

Les PanIN sont les lésions les plus étudiées jusqu'à maintenant. Elles sont retrouvées dans les canaux pancréatiques intralobulaires avec une fréquence plus élevée chez les personnes présentant des PDAC. Ce sont de petites lésions dont la taille est inférieure à 5 mm et qui ne sont pas observables en imagerie pancréatique. Les PanIN sont classées en plusieurs stades au cours desquels on peut observer une progression des altérations morphologiques par rapport aux canaux pancréatiques sains : PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 et PanIN-3 (Hruban *et al.*, 2001) (**Figures 2 et 3**).

PanIN-1A : les lésions sont plates et formées par des cellules de morphologie allongée. Le cytoplasme contient une quantité de mucines plus importante que dans les cellules normales. Le noyau est petit, de forme ronde ou ovale. Ce type d'anomalie est couramment retrouvé avec l'âge.

PanIN-1B : les altérations sont identiques au stade précédent. Cependant, les lésions deviennent pseudostratifiées, de forme micropapillaire ou papillaire (**Figure 2B**)

PanIN-2 : les lésions peuvent être plates mais sont souvent papillaires. Les cellules présentent quelques anomalies nucléaires dont l'hyperchromatisme ou encore une augmentation de la taille du noyau (**Figure 2C**).

PanIN-3 : les lésions sont presque toujours papillaires ou micropapillaires. On observe la formation d'un bourgeon et d'une nécrose dans la lumière du canal. Il y a une perte de polarité nucléaire, des mitoses anormales, des anomalies nucléaires ou encore un nucléole proéminent. L'invasion à travers la lame basale n'est pas présente. Cette anomalie est souvent retrouvée dans le pancréas touché par un PDAC. Lorsque la lésion envahit l'environnement au-delà de la lame basale, il est alors dénommé PDAC (**Figure 2D**).

Les IPMN sont le deuxième type de lésion le plus retrouvé. Ils sont beaucoup moins fréquents que les PanIN, mais sont de plus en plus observés avec les améliorations de l'imagerie pancréatique. Contrairement aux PanIN qui sont uniquement localisés dans les canaux intralobulaires, les IPMN peuvent toucher tous les types de canaux pancréatiques : intralobulaires, interlobulaires et extralobulaire. Ces lésions mesurent un peu plus de 5 mm

dans les petits canaux et plus de 10 mm dans le canal principal pancréatique. Elles sont décrites comme étant des proliférations intracanalaires de cellules épithéliales sécrétant du mucus (Grützmann *et al.*, 2011). Chez les patients qui développent des IPMN, une tumeur maligne est retrouvée dans le canal principal dans 57 à 92 % des cas ou dans les canaux ramifiés dans 6 à 46 % des cas (Tanaka *et al.*, 2006).

Les MCN ont été caractérisés pour la première fois en 1978. Ils sont observés au niveau du corps et de la queue du pancréas. De manière générale, ces lésions ne sont pas en communication avec les canaux pancréatiques. Cependant, quelques exceptions ont été décrites (Masia *et al.*, 2011, Hruban *et al.*, 2007). Ils sont décrits comme des épithélia à cellules cylindriques, sécrétant du mucus, recouvrant un stroma de type ovarien (Tanaka *et al.*, 2006).

Des études sur les différentes lésions précoces du PDAC ont permis d'établir une séquence carcinogénétique durant laquelle les apparitions de certaines altérations génétiques (délétions, mutations et raccourcissements télomériques) sont souvent corrélées à des stades histopathologiques bien précis. Bien que cette séquence carcinogénétique soit validée par tous, des questions concernant l'implication de ces modifications sur l'évolution cancéreuse restent encore en suspens. Enfin, des études du profil génétique des différents stades a permis de mettre en évidence la progression des PanIN vers le PDAC (Hruban *et al.*, 2000, 2001, Yamano *et al.*, 2000, Maitra *et al.*, 2003).

2.2.2 Les altérations génétiques

La première mutation génique observée dans le cancer pancréatique est celle du gène **K-RAS**. L'oncogène *K-RAS* code un membre de la famille RAS qui permet la fixation du GTP. Cette famille de protéines est impliquée dans des voies de signalisation modulant la prolifération, l'invasion, la survie et la différenciation (Malumbres *et al.*, 2003, Campbell *et al.*, 1998). Une substitution du résidu glycine, codé par le codon 12, par un autre acide aminé (a.a.) qui peut être un résidu d'arginine, valine ou aspartate, permet la synthèse d'une protéine constitutivement active. Cette mutation sporadique, dont la fréquence d'apparition dans les stades précoces de néoplasmes se situe aux environs de 30 %, est retrouvée dans presque 100 % des PDAC (Almoguera *et al.*, 1988). L'utilisation d'un modèle murin exprimant un K-RAS

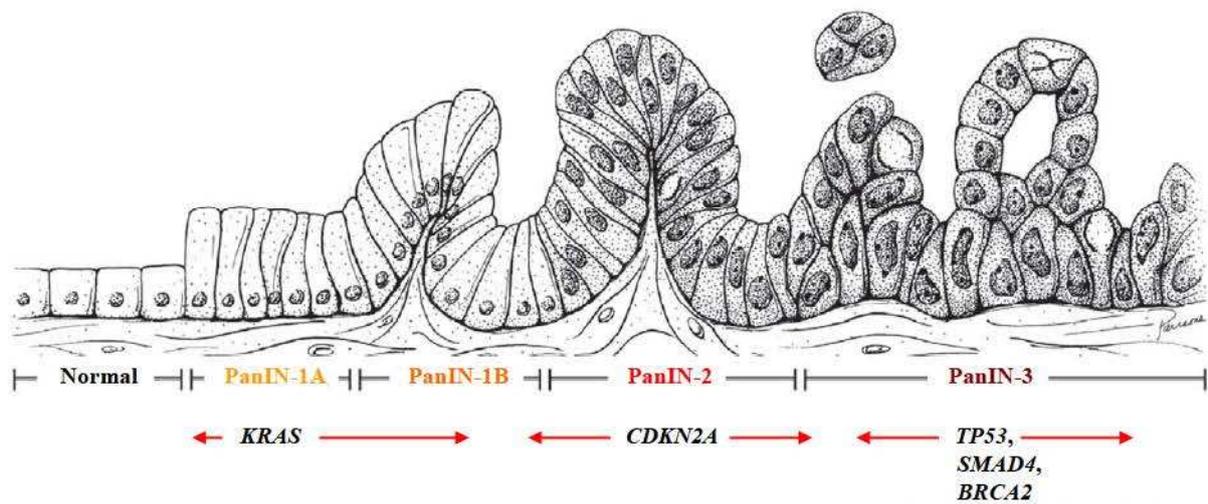


Figure 3 : **Cancérogenèse pancréatique.** Dès les stades précoces de PanIN-1A, *KRAS* est retrouvé muté. Durant les stades plus tardifs PanIN-2 et -3, ce sont les gènes suppresseurs de tumeurs *CDKN2A* puis *TP53*, *SMAD4* et *BRCA2* qui sont inactivés. D'après Hruban et al., 2000.

constitutivement actif dans le pancréas a permis de mettre en évidence l'implication de K-RAS muté dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique (**Figure 3**).

Une autre altération observée précocement dans la cancérogenèse épithéliale pancréatique est le **raccourcissement télomérique** qui favorise l'apparition d'anomalies chromosomiques (van Heek *et al.*, 2002, Hong *et al.*, 2010).

Des inactivations de gènes suppresseurs de tumeur sont également observées au niveau de stades plus tardifs. C'est le cas pour *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* ou encore *BRCA2*.

Des études ont mis en évidence que les mutations germinales de *CDKN2A* augmentent d'un facteur 13 les risques de développer un cancer pancréatique (Whelan *et al.*, 1995). De plus, dans 80 à 95 % des PDAC, une perte de fonction de *CDKN2A* est observée soit par mutation, délétion ou hyperméthylation de son promoteur (Rozenblum *et al.*, 1997). Ce gène, situé au locus 9q21, code grâce à la présence de cadres de lecture alternatifs et de deux premiers introns distincts, deux suppresseurs de tumeur : **INK4A** et ARF (Sherr *et al.*, 2001). *INK4A* régule l'entrée en phase S du cycle cellulaire en modulant indirectement la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome. ARF est responsable de la protéolyse du suppresseur de tumeur p53 en inhibant MDM2. Cependant, il semble que c'est uniquement *INK4A* qui soit impliquée dans les stades tardifs de la cancérogenèse pancréatique (Rozenblum *et al.*, 1997, Lal *et al.*, 2000).

Dans plus de 50 % des cas de PDAC, le gène suppresseur de tumeur *TP53*, codant p53, contient une mutation non sens au sein de la séquence codant le domaine de fixation à l'ADN (Rozenblum *et al.*, 1997). La protéine p53 est impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. Retrouvée dans les stades tardifs, cette mutation de p53 facilite très probablement les réarrangements génomiques. En effet, le raccourcissement des télomères observé dès les stades précoces du PDAC (Gisselsson *et al.*, 2001) est associé dans un premier temps à une perte de fonction de p53. Dans un second temps, il va permettre une réexpression de la télomérase (Suehara *et al.*, 1997) permettant l'immortalisation des cellules cancéreuses qui accumulent des altérations chromosomiques après perte de la fonction suppresseur de tumeur de p53 (Artandi *et al.*, 2000, Chin *et al.*, 1999).

Dans 50 % des PDAC, une délétion ou des mutations inactivatrices au sein du gène **SMAD4/DPC4** de la région q21 du chromosome 18 sont observées (Hahn *et al.*, 1996). Ce gène code le facteur de transcription SMAD4 impliqué dans la voie du *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) (Massague *et al.*, 2000). Cette anomalie est retrouvée dans les stades tardifs de PanIN et son impact sur la cancérogenèse épithéliale pancréatique n'est pas clairement défini. En effet, des études ont obtenu des conclusions contradictoires concernant l'impact de la perte de SMAD4 sur la survie des patients ayant un PDAC (Tascilar *et al.*, 2001, Biankin *et al.*, 2002). Le rôle de SMAD4 dans la carcinogenèse dépendrait de son rôle dans la voie du facteur TGF- β . Ce dernier permet d'inhiber la croissance cellulaire en bloquant les cellules à la transition G1/S ou en promouvant l'apoptose. Il a été évoqué que l'absence de SMAD4 induirait une résistance des cellules cancéreuses pancréatiques à la voie anti-proliférative du TGF- β . Cependant, la restauration de SMAD4 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques ne semble pas avoir un impact important sur la croissance cellulaire *in vitro* (Peng *et al.*, 2002).

En ce qui concerne le gène suppresseur de tumeur **BRCA2**, les mutations germinales sont associées à un risque significatif de développement d'un PDAC. En effet, environ 17 % des PDAC observés dans un contexte familial présentent une mutation de **BRCA2** (Murphy *et al.*, 2002). En 2000, Goggins et collaborateurs ont mis en évidence que la perte du second allèle sauvage dans un contexte familial est un événement tardif observé uniquement dans les lésions PanIN présentant une dysplasie ou dans les PDAC (Goggins *et al.*, 2000). BRCA2 est impliquée dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. La perte de ce système entraîne l'accumulation d'aberrations chromosomiques après la perte préalable de la voie p53 (Venkitaraman *et al.*, 2002).

D'autres oncogènes, dont **EGFR**, **AKT2**, **MYB**, **BRAF**, ou gènes suppresseurs de tumeurs, dont **MAP2K4**, **STK11**, **TGF- β R2**, **TGF- β R1**, **FBXW7**, **EP300**, sont également mutés dans moins de 20 % des PDAC (Jones *et al.*, 2008).

2.3 Les symptômes

Le mauvais pronostic du PDAC est en partie dû au fait que cette pathologie, durant ses stades précoces, ne présente aucun symptôme particulier. La détection de la pathologie se fait donc tardivement lorsque le cancer est déjà devenu invasif ou lorsqu'il a déjà généré des

métastases au niveau d'autres organes. Il est à noter que lorsque le PDAC est diagnostiqué, 25 % des personnes ont un diabète de type 2 et environ 40 % ont une intolérance au glucose (Chari *et al.*, 2008, Pannala *et al.*, 2008).

Les différents symptômes observés au niveau des stades tardifs sont variés. Les plus courants sont des douleurs abdominales ou dans le milieu du dos, une perte de poids ou encore une thrombose veineuse superficielle ou profonde. Un ictère dû à l'obstruction des voies biliaires est observé dans 90 % des cas. Dans 20 % des stades très avancés, des sténoses pyelo-duodénales avec nausées et vomissements consécutifs à une invasion duodénale sont retrouvées. On peut également observer des cas d'anémie ou encore une thrombocytose. Enfin, une faible partie des malades souffrent de dépression ou de panniculite (Lueangarun *et al.*, 2011).

2.4 Le diagnostic

L'examen le plus utilisé pour effectuer le diagnostic du cancer pancréatique est la tomographie assistée par ordinateur (CT). Néanmoins, d'autres techniques d'imagerie médicale ou d'autres examens tels que les tests sanguins ou la recherche de marqueurs spécifiques peuvent donner des informations supplémentaires en attendant le diagnostic définitif.

2.4.1 Les examens d'imagerie médicale

L'imagerie médicale est le meilleur moyen pour diagnostiquer la présence ou non d'un PDAC. Ce domaine de spécialité permet également de déterminer si la tumeur est chirurgicalement opérable ou non. Plusieurs techniques sont utilisées.

Les échographies de la région abdominale permettent d'observer les canaux biliaires et pancréatiques de manière non invasive et sûre. Des dilatations simultanées de l'ordre de 7 mm et 2 mm respectivement pour les canaux biliaires et pancréatiques peuvent être des signes de cancer pancréatique. L'échographie permet également d'étudier d'autres critères comme l'existence de métastases hépatiques. Cependant, la présence de petites masses tumorales inférieures à 3 cm restent souvent non détectées.

La tomographie assistée par ordinateur, CT, est la meilleure technique de détection de néoplasies au niveau pancréatique. Malgré une sensibilité de détection des tumeurs approchant les 69 % (Müller *et al.*, 1994), elle permet de déterminer dans 90 % des cas si la tumeur est résécable chirurgicalement.

L'échographie couplée à l'endoscopie présente une sensibilité de détection des cancers pancréatiques avoisinant 96 % (Iglesias Garcia *et al.*, 2009), soit une sensibilité meilleure que celle de la CT. Cette technique semble également être plus sensible vis-à-vis des tumeurs de petite taille. Des ponctions à l'aiguille fine peuvent être effectuées afin de réaliser des examens cytologiques des lésions. Cependant, cette technique est considérée comme utile uniquement pour les patients dont la tumeur est non résécable puisqu'elle rend possible l'optimisation de la prise en charge des malades en permettant des examens complémentaires de ces lésions.

L'imagerie par résonance magnétique est employée depuis que les avancées technologiques récentes permettent l'acquisition rapide d'images pancréatiques de haute résolution. Elle est utilisée pour détecter les masses tumorales de petite taille, avec 83 % de sensibilité, ainsi que pour déterminer si la masse est opérable ou non.

La tomographie par émission de positron, PET, utilise le F-fluorodésoxyglucose, FDG, comme traceur radioactif. Elle met en évidence la localisation de la tumeur primaire ainsi que l'éventuelle présence de métastases. De plus, cette technique peut-être associée à la CT (PET-CT) afin d'augmenter la sensibilité respective de ces deux techniques et ainsi localiser les métastases extra-hépatiques.

La cholangiopancréatographie par endoscopie rétrograde permet, après prélèvement, de confirmer dans 95 % des cas la présence d'un cancer pancréatique. Cependant cette technique invasive présente un taux de complications d'environ 10 %.

2.4.2 Les examens sanguins et les marqueurs tumoraux

Les analyses sériques mettent éventuellement en évidence la présence de perturbations au niveau hépatique, d'une thrombocytose ou d'une anémie.

L'antigène CA 19-9, communément appelé antigène sialyl-Lewis A, est utilisé comme marqueur tumoral sérique dans beaucoup de cancers. Il a été découvert en premier lieu dans le cadre du cancer pancréatique en 1981. Ce marqueur est exprimé par les cellules du tractus biliaire de manière normale et son taux sérique augmente dans de nombreux cas pathologiques dont la pancréatite chronique. La sensibilité et la spécificité de ce marqueur pour le cancer pancréatique sont respectivement de 80 % et 73 %. Ce marqueur est utilisé pour estimer la survie du patient (Goggins *et al.*, 2007).

Tous ces examens permettent de caractériser la masse tumorale (taille, invasion au delà de la lame basale, présence de nodules lymphatiques, présence de métastases) et de situer le PDAC dans la classification selon 4 stades : **résécable**, **à la limite du résécable**, **non résécable ou localement avancé** et **métastatique**. Ces situations représentent respectivement environ 10 %, 10 %, 30 % et 60 % des cas de PDAC (Vincent *et al.*, 2011).

2.5 *Le pronostic*

Pour chaque stade, les médianes de survie sont respectivement :

- **résécable** : entre 17 et 23 mois,
- **à la limite du résécable** : au maximum 20 mois,
- **non résécable ou localement avancé** : entre 8 et 14 mois,
- **métastatique** : entre 4 et 6 mois.

Lorsque la tumeur est opérable, l'étude macroscopique, microscopique ou encore biochimique du fragment tumoral retiré permet d'affiner le pronostic. Par exemple, la présence de cellules cancéreuses peu différenciées, de marges de résection présentant du tissu tumoral ou de nodules lymphatiques envahis sont des critères de mauvais pronostic. De même, la perte d'expression du facteur SMAD4 ou l'expression de SPARC, anomalies que l'on peut observer par immunohistochimie au niveau du fragment tumoral retiré ne sont pas favorables à la survie du patient (Blackford *et al.*, 2009, Infante *et al.*, 2007).

2.6 *Le traitement curatif et la prise en charge*

2.6.1 La chirurgie

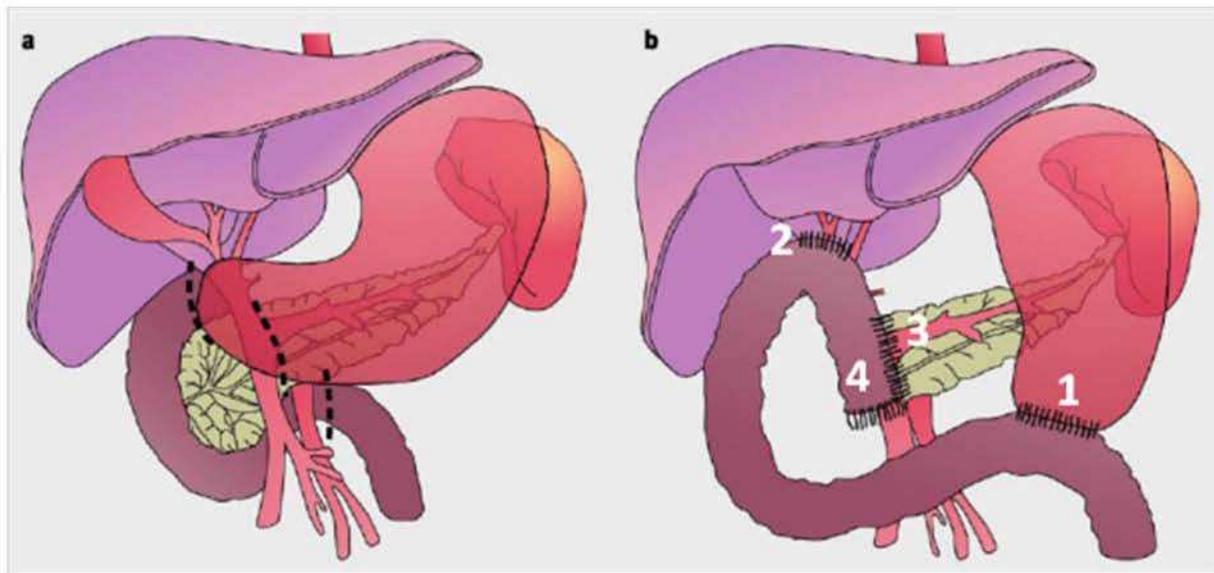


Figure 4 : **Pancréato-duodénectomie.** (a) Les pointillés délimitent les zones enlevées durant l'acte chirurgical : tête du pancréas, duodénum, partie distale de l'estomac et des canaux biliaires et vésicule biliaire. (b) Les différentes anastomoses sont localisées au niveau des zones hachurées : (1) une gastro-jéjunostomie, (2) une cholédocho-jéjunostomie, (3) une pancréatojéjunostomie, (4) une pancréato-gastrotomie. *D'après Bond-Smith et al., 2012.*

A l'heure actuelle, le seul traitement curatif existant pour le PDAC est **la résection chirurgicale** qui est possible dans environ 20 % des cas. La survie à 5 ans et la médiane de survie peuvent notamment atteindre respectivement 25 % et environ 20 mois dans le cas de résection de la tête pancréatique. Après résection chirurgicale, il existe un risque de récurrence systémique supérieur à 70 % et un risque supérieur à 20 % de récurrence locale (Vincent *et al.*, 2011).

Il existe deux actes chirurgicaux différents :

La pancréato-duodénectomie est la plus fréquente des chirurgies, caractérisée par une mortalité opératoire assez faible (environ 2,4 %) (McPhee *et al.*, 2007). Elle est réalisée lorsque le PDAC est situé au niveau de la tête ce qui représente 78 % des PDAC opérés. Les possibles complications sont des fuites après l'anastomose pancréatique, une vidange gastrique retardée ou encore une insuffisance pancréatique (Yeo *et al.*, 1997). Cette opération consiste en une résection de la partie proximale du pancréas, de la partie distale de l'estomac, du duodénum, de la partie distale du canal biliaire et de la vésicule biliaire. La continuité du tractus sera restaurée par une gastro-jéjunostomie, cholédocho-jéjunostomie, une pancréatojéjunostomie et pancréato-gastrotomie (**Figure 4**).

La seconde chirurgie de résection possible est la **pancréatectomie distale**. Elle est réalisée lorsque le PDAC est situé dans le corps et la queue du pancréas. Cette opération présente une mortalité opératoire de 1,2 % (Kelly *et al.*, 2011). La principale complication observée est la formation de fistules pancréatiques résultant de fuites de liquide pancréatique au niveau de la marge de résection (Zhou *et al.*, 2010).

2.6.2 Les thérapies adjuvantes

Un ou deux mois après l'opération chirurgicale, **une thérapie adjuvante** est souvent réalisée. Avant 2004, le traitement était basé sur **le 5-fluoro-uracile**, 5-FU, ainsi que la radiothérapie. Le 5-FU, un analogue de l'uracile, agit après avoir été métabolisé en 5-FU triphosphate (5-FU-TP) et en 5-fluoro-désoxyuridine monophosphate (5-dFU-MP). Sous la première forme, il est incorporé dans les acides ribonucléiques, ARN, et induit des erreurs de

transcription ; sous sa seconde forme, il inhibe la thymidylate synthase et la formation de thymidine triphosphate nécessaire à la synthèse de l'ADN.

En 2004, les essais ESPAC-1 ont mis en évidence que la chimiothérapie basée sur le 5-FU était plus performante que la chimio-radiothérapie (Koshy *et al.*, 2005). Plus tard, ESPAC-3 montre qu'il n'y a aucune différence entre une thérapie adjuvante basée sur le 5-FU associé à l'acide folinique et celle basée sur la **gemcitabine** (Neoptolemos *et al.*, 2010). La gemcitabine est l'isomère β de la 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine, un analogue de la déoxycytidine. Elle est métabolisée en difluorocytidine diphosphate et triphosphate par des nucléosides kinases après son entrée dans la cellule. Sous sa première forme diphosphate, elle va inhiber la cytidine triphosphate synthase et la formation de cytidine triphosphate (CTP) qui s'intègre dans l'ADN. Sous sa seconde forme triphosphate, elle va remplacer la CTP dans l'ADN lors de sa réplication et générer des erreurs. Ces deux mécanismes aboutissent à une inhibition de la phase S du cycle cellulaire et à l'apoptose de la cellule.

Chez les patients opérables

Les bénéfices qui sont tirés de ces thérapies sont plus importants pour les patients ayant subi une résection et dont les marges de résections sont négatives microscopiquement (R0). En effet, la médiane de survie passe de 18 mois à 25 mois pour les cas de résections dont les marges sont négatives macroscopiquement (R1) (Vincent *et al.*, 2011). Lorsque c'est possible, la radiothérapie est utilisée en complément après une chimiothérapie adjuvante afin de diminuer les risques de récurrence systémique, voire de récurrence locale.

Chez les patients dont le stade est avancé et non opérable

Dans les cas avancés localement ou métastatiques, les thérapies standards utilisées sont basées sur la gemcitabine. Elles peuvent être couplées à la radiothérapie. Elles procurent une amélioration partielle chez certains patients (Burriss *et al.*, 1997, Stornolio *et al.*, 1999). Parfois, elles permettent de rétrograder le stade de la tumeur (Gillen *et al.*, 2010). Plusieurs essais cliniques sur des stades métastatiques associent différents composés afin d'améliorer les bénéfices des thérapies adjuvantes. C'est notamment le cas de la combinaison de la gemcitabine avec la capecitabine qui semble augmenter la réponse à la thérapie (Cunningham *et al.*, 2009).

2.6.3 Les thérapies néo-adjuvantes

Les thérapies néo-adjuvantes sont, quant à elles, réalisées avant la résection chirurgicale. Aucun bénéfice sur la survie ne semble être obtenu par rapport aux thérapies adjuvantes (Gillen *et al.*, 2010). Le taux de réponse à ces thérapies n'est pas très élevé. Cependant, ces dernières peuvent dans certains cas permettre de rétrograder des patients à un stade à la limite du résécable vers un stade résécable (Callery *et al.*, 2009). De plus, la thérapie n'est plus retardée par d'éventuelles complications post-opératoires.

2.6.4 Les autres thérapies

Lorsque la chirurgie n'est pas possible, différentes possibilités peuvent être mises en œuvre :

- **la radiochirurgie** qui permet de traiter de manière non invasive une tumeur. Elle consiste à envoyer une grande quantité de rayons sur une région inférieure à 3 cm avec précision sans aucun acte chirurgical.

- **la pose d'une endoprothèse par endoscopie** ou **d'un bypass des voies biliaires** peut permettre de rétablir la sécrétion de bile lorsque la voie biliaire est comprimée. Ainsi, le taux de bilirubine diminue après sécrétion de la bile et une chimiothérapie qui était non réalisable peut être effectuée.

3. Les mucines

Certaines mucines, MUC1 et MUC4, sont décrites comme étant surexprimées ou néoexprimées dans le PDAC. Ainsi, se pose la question du rôle éventuel de ces glycoprotéines dans la progression du PDAC.

Les mucines sont des protéines de **masse moléculaire élevée** composées d'une longue chaîne peptidique, appelée « **apomucine** », richement glycosylée. La région centrale de l'apomucine est composée de **répétitions en tandem (TR)**, riches en résidus **proline, sérine et thréonine**. Les résidus sérine et thréonine portent **les motifs O-glycanniques** qui peuvent

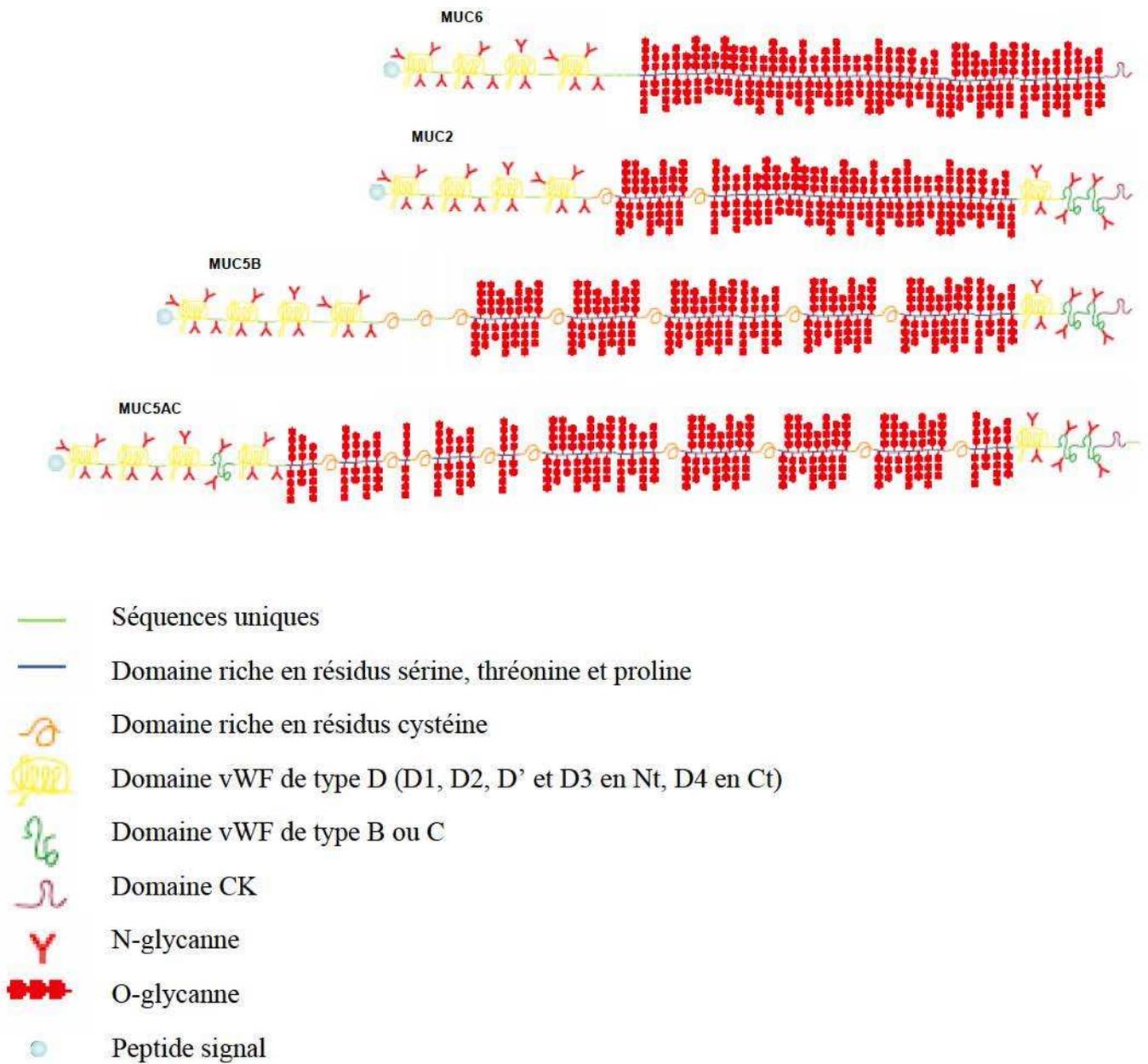


Figure 5 : Représentation schématique des mucines codées par les gènes *MUCs 11p15*.
 D'après Dekker et al., 2002.

représenter entre 50 à 80 % de la masse moléculaire totale de la mucine en fonction des enzymes de glycosylation présentes dans la cellule.

Les mucines sont classées en deux familles en fonction de leur localisation cellulaire : les mucines sécrétées et les mucines membranaires.

3.1 Les mucines sécrétées

La famille des mucines sécrétées comprend **MUC2**, **MUC5AC**, **MUC5B**, **MUC6**, **MUC7** et **MUC19**. Ces mucines, exprimées et sécrétées par des cellules épithéliales spécialisées, sont les principaux constituants protéiques du mucus auxquels s'ajoutent de l'eau et des ions. Ce mucus a pour rôle de protéger l'épithélium qu'il recouvre. Les mucines lui confèrent ses propriétés physiques et rhéologiques.

3.1.1 Les gènes

Les ADN complémentaires, ADNc, de *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6* ont été clonés autour des années 1990 (Gum *et al.*, 1989, Aubert *et al.*, 1991, Dufossé *et al.*, 1993 Toribara *et al.*, 1993). Quelques années plus tard, au laboratoire, ces quatre gènes ont été localisés sur le **bras court du chromosome 11, en p15.5** où ils sont organisés en un cluster de 400 kb : *MUC6* est en position télomérique suivi par *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B* (Pigny *et al.*, 1996). Ces gènes présentent une homologie de structure mais aussi du nombre d'exons, de localisation d'introns et de jonctions intron-exon (Buisine *et al.*, 1998, Escande *et al.*, 2001, Rousseau *et al.*, 2004) suggérant qu'ils ont pour origine commune un gène ancestral (Desseyn *et al.*, 1998). Ces quatre gènes présentent un exon central de plus de 10 kb codant les TR (Desseyn *et al.*, 1997, Escande *et al.*, 2001, Rousseau *et al.*, 2004). L'interposition régulière de séquences de 330 pb, codant des domaines riches en résidus cystéine, dans les gènes de *MUC5AC* et *MUC5B* et non celui de *MUC2* et *MUC6* a engendré la création de deux sous-groupes. La présence de ces séquences permettrait une meilleure stabilité génique de la séquence codant les TR (Vinall *et al.*, 1998). Une forte homologie de séquence a été observée en 5' et 3' des extrémités de la séquence codant les TR. En effet, on retrouve respectivement dans ces régions les séquences codantes des domaines **D1/D2/D'/D3** et **D4/B/C** homologues de ceux du pro-facteur von Willebrand (pro-vWF) (Desseyn *et al.*, 1997, 1998, Buisine *et al.*, 1998, Escande *et al.*, 2001, Rousseau *et al.*, 2004). Enfin, *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B*

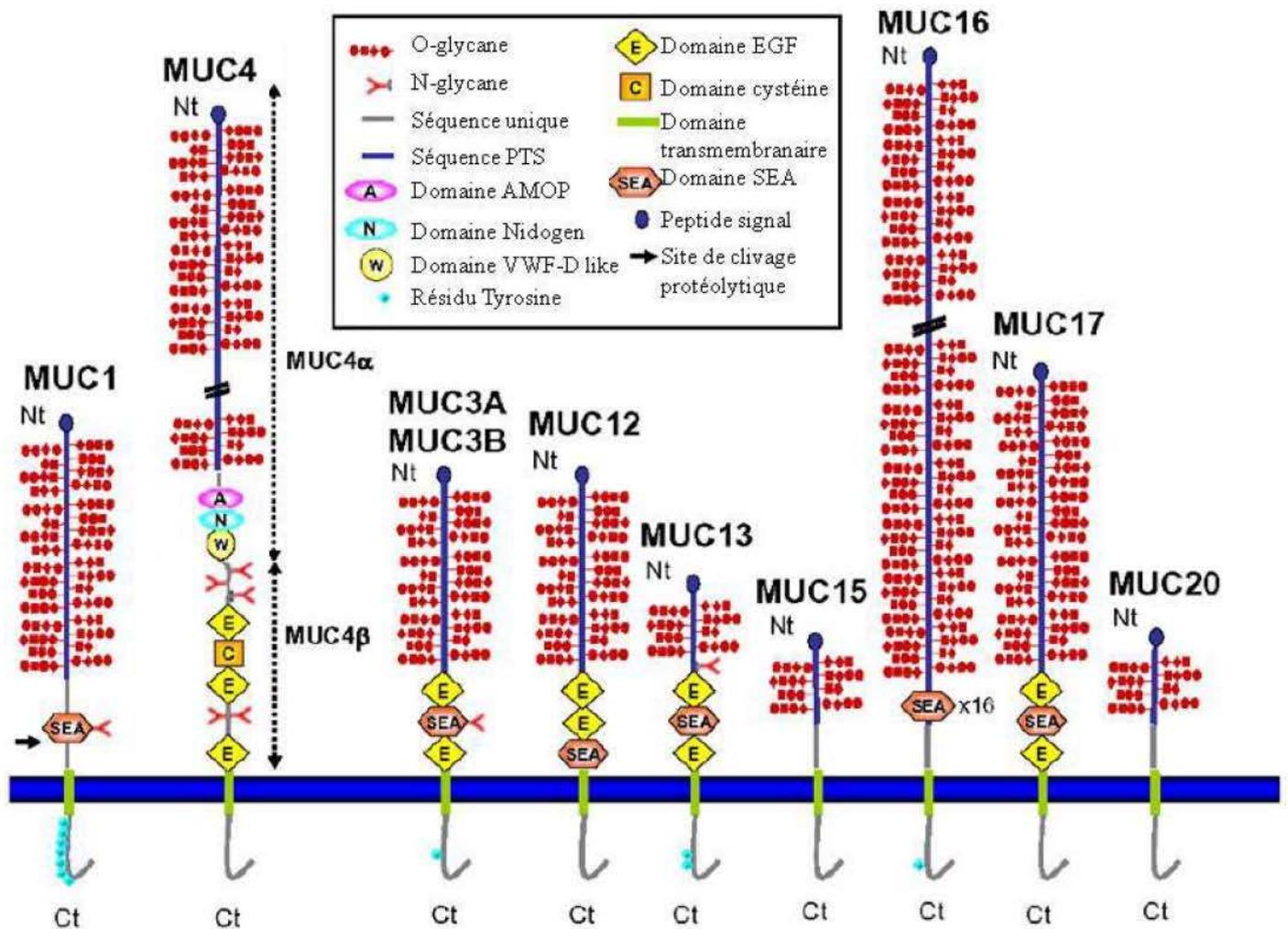


Figure 6 : **Structure des mucines membranaires.** Schéma des mucines membranaires MUC1, MUC4, MUC3A/B, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 et MUC20. D'après Jonckheere et Van Seuningen (2008).

possèdent une séquence codant le domaine **CK** homologue du domaine du même nom retrouvé dans le *Transforming Growth Factor β 2* (TGF- β 2) (McDonald et Hendrickson, 1993).

3.1.2 La structure

La région centrale hautement glycosylée de certaines mucines est sujette à un polymorphisme inter-individuel et inter-allélique de type VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (**Figure 5**). On note également la présence de quelques sites de *N*-glycosylation au niveau de la partie C-terminale de ces mucines. Comme évoqué précédemment, il existe une forte similarité entre les extrémités C-terminale et N-terminale des mucines sécrétées et celles du pro-vWF. En effet, toutes les mucines sécrétées possèdent les domaines riches en cystéines D1/D2/D'/D3 homologues à ceux du pro-vWF au niveau de leur partie N-terminale. En ce qui concerne la partie C-terminale, MUC5AC, MUC5B et MUC2, qui partagent une similarité plus forte avec le pro-vWF, possèdent les domaines D4/B/C/CK, comprenant les cystéines et les sites de *N*-glycosylation, retrouvés dans le pro-facteur alors que MUC19 et MUC6 ne présentent respectivement que les domaines C/C/CK et CK. Ce dernier est indispensable à l'homo-dimérisation de l'apomucine MUC2 chez l'Homme (Lidell *et al.*, 2003). Ainsi, la formation de ponts disulfure au niveau du domaine CK lors de la biosynthèse dans le réticulum endoplasmique permettrait l'homo-dimérisation des monomères d'apomucines. (Lidell *et al.*, 2003). Une fois dans l'appareil de Golgi, ces dimères subissent une multimérisation *via* le domaine D3 de l'extrémité N-terminale (Van Klinken *et al.*, 1998).

3.2 *Les mucines membranaires*

La classe des mucines membranaires comprend **MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 et MUC20** (**Figure 6**). Tout comme les mucines sécrétées, ces mucines permettent la protection des épithélia. De plus, au vu de leur localisation membranaire et de leur grande taille (jusqu'à 2 μ m pour MUC4), ces mucines jouent également un rôle dans les interactions cellule/cellule, cellule/MEC ou dans la signalisation cellulaire. Les mucines membranaires les mieux caractérisées sont MUC4 et MUC1. Cette dernière est plus particulièrement présentée dans ce mémoire.

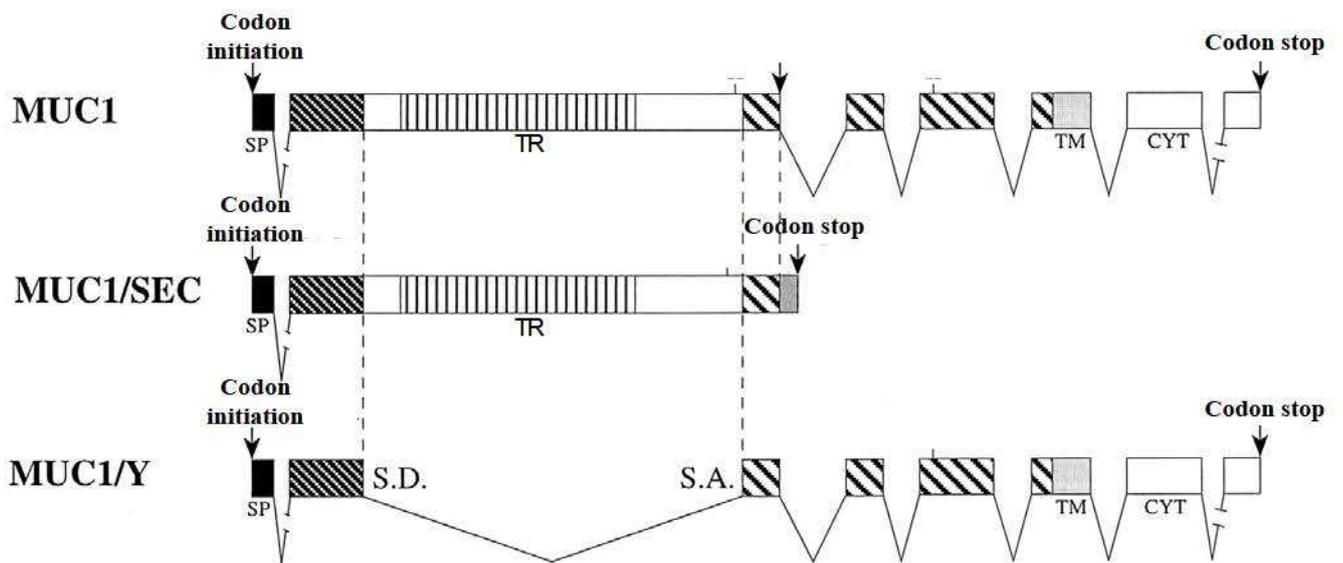


Figure 7 : ADNc de trois isoformes de MUC1 : MUC1, MUC1/SEC et MUC1/Y. Les espaces entre exons correspondent aux introns épissés. SP : séquence codant le peptide signal. TR : séquence codant les répétitions en tandem. TM : séquence codant le domaine transmembranaire. CYT : séquence codant la queue cytoplasmique. *D'après Baruch et al., 1999.*

3.2.1 La mucine membranaire MUC1

3.2.1.1 MUC1

MUC1 est le premier gène de mucine à avoir été caractérisé en 1990 à partir de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines (Gendler *et al.*, 1990, Lan *et al.*, 1990, Wreschner *et al.*, 1990). Il est localisé au niveau du **chromosome 1 au locus q21-q24** et est composé de 7 exons dont les tailles varient entre 4 à 7 kb en raison des VNTR (**Figure 7**). Le premier exon code le peptide signal qui permet l'adressage de cette mucine à la membrane cellulaire. Le deuxième exon qui est le plus grand code le domaine central composé des répétitions en tandem d'une séquence de 20 a.a., AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP, dont le nombre varie entre 20 et 120 unités dans les populations du nord de l'Europe (Gendler *et al.*, 1990). Enfin, les exons 5, 6 et 7 codent le domaine transmembranaire d'une trentaine d'a.a. et la queue cytoplasmique de 69 a.a.. Plusieurs *splicing* alternatifs de *MUC1* existent ; ils permettent la formation de plusieurs variants tels que MUC1/SEC et MUC1/Y. L'isoforme MUC1/Y est dépourvu de répétitions en tandem mais contient le domaine transmembranaire. Le variant MUC1/SEC possède les répétitions en tandem et une partie C-terminale, mais il est exempt de la queue cytoplasmique et du domaine transmembranaire, en conséquence ce variant n'est pas ancré dans la membrane plasmique.

3.2.1.2 La régulation transcriptionnelle

La régulation de la transcription de *MUC1* a été très étudiée (**Figure 8**). Le promoteur de *MUC1* contient de nombreux sites de fixation pour différents facteurs de transcription. On retrouve notamment des *E-boxes*, des *CAAT-boxes* ou encore des *GC-boxes*. Kovarik et collaborateurs ont déterminé que la séquence 5' minimale pour obtenir l'expression maximale comprend 743 pb et que le fragment -150/-60, incluant un domaine de fixation Sp1 et une E-Box (E-MUC1), est essentiel à l'expression tissu spécifique (Kovarik *et al.*, 1993). La boîte TATA se situe en amont du site d'initiation de la transcription en -28/-24. En plus de ce site d'initiation de la transcription, dans la lignée cancéreuse mammaire humaine T47D, deux sites d'initiation supplémentaires en -520 et -130 sont observés après stimulation par le facteur *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1).

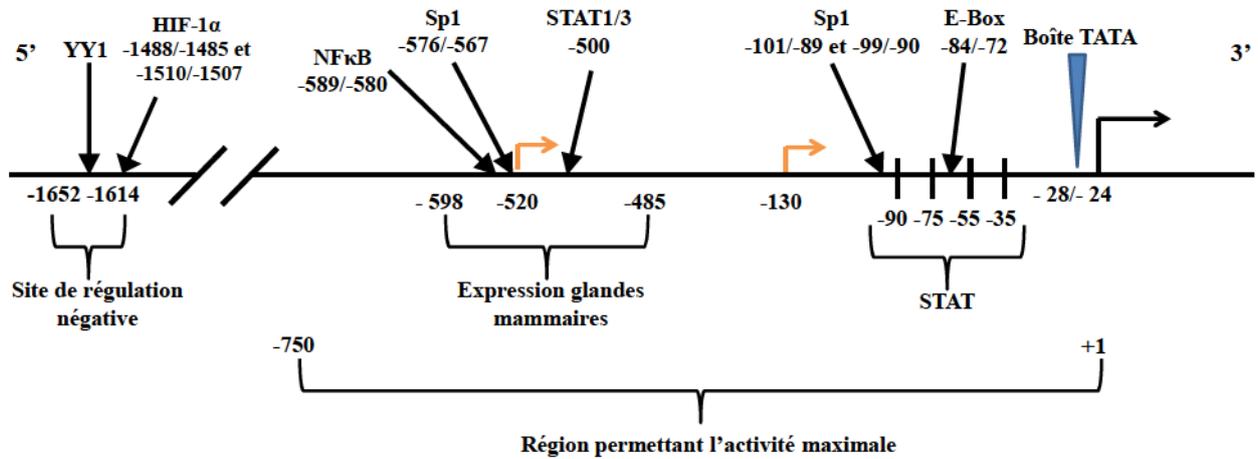


Figure 8 : **Cartographie du promoteur de *MUC1***. Le promoteur est schématisé par une flèche noire en +1 alors que les promoteurs alternatifs en -130 et -520 sont en orange. Les sites de fixation des différents facteurs de transcription sont signalés par des flèches noires. Quatre régions particulières de régulation sont localisées par des parenthèses.

Plusieurs sites de fixation fonctionnels pour le facteur de transcription Sp1 ont été étudiés dans différentes lignées cellulaires humaines. Le site distal en -576/-568 dans la lignée tumorale mammaire ZR75 (Kovarik *et al.*, 1993) et le site proximal en -99/-90 permettent la transcription de *MUC1* dans les lignées tumorales épithéliales pancréatiques HPAF ou mammaires ZR75 et la répression dans les lignées non épithéliales. Ces deux sites, une fois mutés, entraînent une diminution de la transcription de *MUC1* dans les lignées épithéliales évoquées précédemment. De plus, le site Sp1 proximal -99/-90 est chevauché par un autre site de fixation -101/-89 qui peut être occupé par le facteur inhibiteur SpA. Ainsi, il existe une compétition avec Sp1 pour la fixation au niveau de cette région génomique (Kovarik *et al.*, 1996).

Des études sur la lignée cancéreuse mammaire humaine T47D ont révélé la présence d'un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille STAT, environ 500 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Gaemers *et al.*, 2001). Quatre autres sites STAT proximaux en -90, -75, -55 et -35, proches de la boîte TATA et des GC-boxes, sont présents dans le promoteur de *MUC1*. Enfin, dans les glandes mammaires saines, il a été caractérisé une région importante pour la régulation de la transcription de *MUC1*. Cette région se situe entre -589 et -495 et contient des sites pour les facteurs de transcription NF- κ B et STAT-1 respectivement en -589/-580 et -503/-495. Les deux facteurs NF- κ B p65 et STAT-1 α interviendraient en synergie après stimulation des cellules par l'interféron γ (IFN- γ) et le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α) (Lagow *et al.*, 2002).

Des sites putatifs de fixation de facteurs de transcription de la famille GATA sont également retrouvés dans le promoteur de *MUC1* : un site de fixation pour GATA-1, un pour GATA-3 et 4 sites *GATA like*. Une étude a identifié une régulation *via* le facteur de transcription GATA-3. Ces travaux ont mis en évidence la fixation de GATA-3 sur son site putatif de fixation au sein du promoteur de *MUC1* et une diminution de la transcription de *MUC1* par inhibition de GATA-3 dans la lignée cancéreuse mammaire humaine MCF-7 (Abba *et al.*, 2006).

Deux sites de fixation pour le facteur induit par l'hypoxie, HIF-1 α , sont présents en -1488/-1485 et -1510/-1507 du promoteur de *MUC1* et régulent l'expression de cette mucine dans les carcinomes rénaux à cellules claires.(Aubert *et al.*, 2009).

Le clonage d'un fragment de 2,5 kb comprenant un morceau de la région 5' du promoteur du gène *Muc1* de Hamster a permis de mettre en évidence la présence d'un site de fixation pour le facteur de transcription Yin Yang 1 (YY1) au sein de la région -1652/-1614 (Lee *et al.*, 2003). Ce site qui permettrait une régulation négative de la transcription de *Muc1* est également présent au sein du gène *MUC1* humain (Zaretsky *et al.*, 1999).

Des régions appelées *Mucin Purin pyrimidine Mirror Repeat* (MPMR) retrouvées en 641/-615, -253/-237 et -133/-102 du promoteur de *MUC1* sont riches en purines sur l'un des brins et en pyrimidines sur l'opposé. Ces séquences particulières permettent la formation d'une hélice d'ADN qui pourrait être impliquée dans la régulation de la transcription de *MUC1* (Hollingsworth *et al.*, 1994). En effet, malgré les résultats de Pahwa et collaborateurs, qui montrent que la MPMR-3 n'influence pas la transcription de *MUC1* (Pahwa *et al.*, 1996), une étude ultérieure a corrélé la structure de la région MPMR-2 au taux de transcription de *MUC1* dans différents modèles cellulaires cancéreux (Shiraga *et al.*, 2002).

3.2.1.3 Le patron d'expression

Chez l'Homme, *MUC1* est aussi exprimée dans de nombreux tissus épithéliaux. C'est notamment le cas de l'épithélium cilié et des glandes séreuses des bronches, des acini et des canaux intralobulaires des glandes mammaires, de l'endomètre utérin ou encore de l'épithélium glandulaire de la prostate (Ho *et al.*, 1993). Dans le système digestif, son expression est observée dans les glandes salivaires, au niveau de l'épithélium de l'œsophage, de l'estomac et du pancréas (Ho *et al.*, 1993). Enfin, *MUC1* est également exprimée par des cellules non épithéliales telles que les lymphocyte B ou T (Treon *et al.*, 1999, Agrawal *et al.*, 1998).

3.2.1.4 La structure

La mucine *MUC1* est également appelée *polymorphic epithelial mucin* (PEM), épisialine, DUPAN-2, DF3, *human milk fat globule* (HMFG), *epithelial membrane antigen* (EMA) ou encore CD227. Sa taille varie entre 250 à 500 nm (**Figure 9**). Contrairement aux autres mucines transmembranaires, *MUC1* est une évolution de la mucine sécrétée *MUC5B*. C'est un hétérodimère composé de deux sous-unités. Lors de sa biosynthèse, *MUC1* est sous forme monomérique puis, lors de son passage dans le réticulum endoplasmique, un clivage

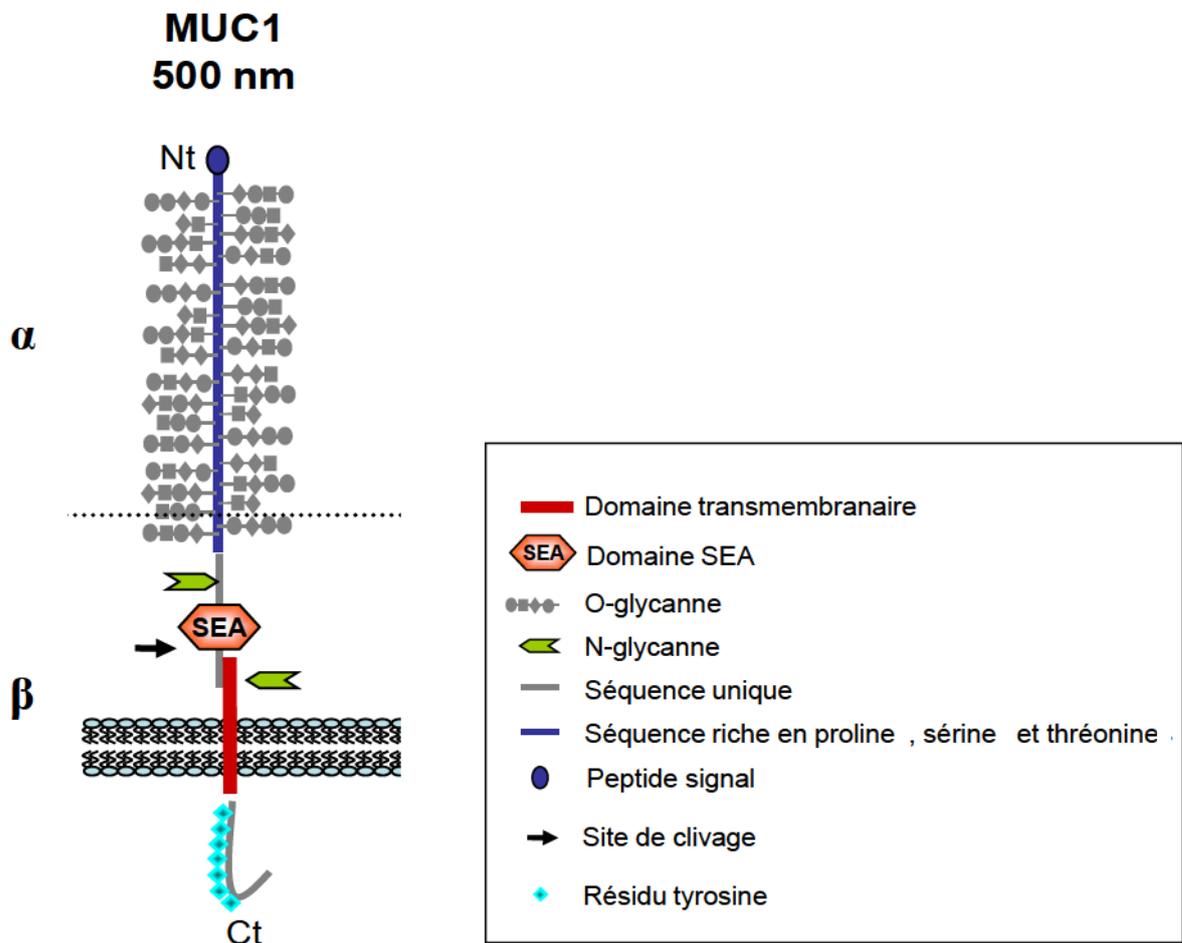


Figure 9 : **Structure de la mucine membranaire MUC1.** MUC1 est composée de deux sous-unités. La sous-unité extracellulaire α composée par le peptide signal et les répétitions en tandem, portant les O-glycannes, et du domaine SEA dans lequel se situe le site de clivage peptidique. La sous-unité β est composée d'un court domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique portant plusieurs résidus tyrosine.

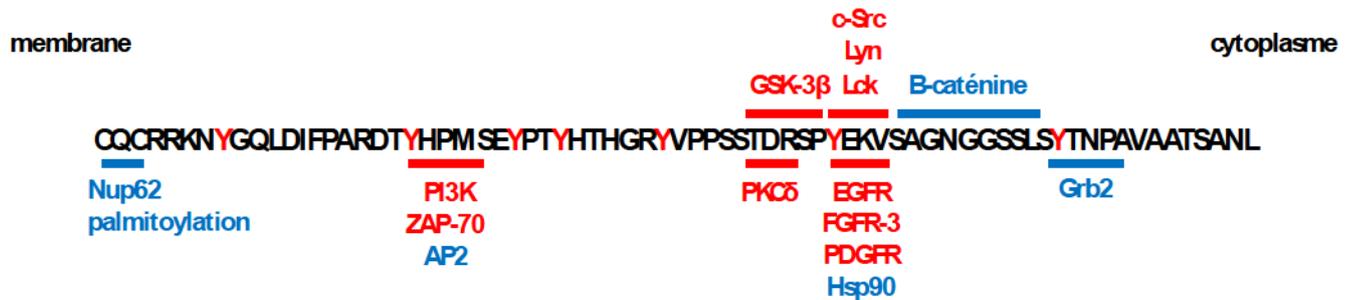
amène la formation de l'hétérodimère composé des sous-unités alpha et beta liées de manière non covalente (Ligtenberg *et al.*, 1992). Le site de clivage se trouve dans le domaine SEA extracellulaire (*Sea urchin sperm protein, Enterokinase and Agrin*) au niveau de la séquence FRPG|SVVV (Macao *et al.*, 2006). Ce site est le seul domaine d'homologie de MUC1 avec les autres membres de la classe des mucines membranaires (Duraisamy *et al.*, 2007). MUC1 est libérée dans le milieu extracellulaire après **son clivage par la métalloprotéase ADAM17 (Figure 19 voie 5)** (Thathiah *et al.*, 2003). MUC1 a été aussi retrouvée dans le milieu extracellulaire et semble pouvoir emprunter **une voie exosomiale**. En effet, MUC1 est observée dans les exosomes de cellules cancéreuses épithéliales mammaires. Staubach et collaborateurs suggèrent que les exosomes contenant MUC1 seraient issus de zones membranaires particulières des cellules mammaires, les rafts MUC1+. L'étude de la composition protéique de ces rafts et des exosomes ont montré une similitude partielle mettant en évidence un lien entre ces deux structures (Staubach *et al.*, 2009).

La longue **sous-unité alpha** de MUC1, N-terminale, est **extracellulaire**. Elle comprend le peptide signal, composé de 20 a.a. environ, qui permet d'adresser MUC1 à la membrane. Cette sous-unité comporte également des répétitions en tandem constituées par une séquence de 20 a.a. (**AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP**). Le nombre d'unité de répétition dépend de l'allèle et de l'individu, ce sont les VNTR. Les TR comportent énormément de résidus sérine et thréonine qui peuvent être le support de motifs *O*-glycosylés. La masse moléculaire de l'apomucine MUC1 varie entre 120 et 300 kDa. La glycosylation entraîne ensuite jusqu'à un doublement de la masse de la mucine en fonction du type cellulaire. MUC1 ne présente pas le domaine de type EGF commun aux autres membres de la classe des mucines membranaires.

La **sous-unité beta**, C-terminale, est composée **d'un court domaine extracellulaire** de 58 a.a., **d'un court domaine transmembranaire** de 31 a.a. et **d'une queue cytoplasmique** de 69 a.a. (**MUC1CT**) (**Figure 10**). On note la présence de 5 sites putatifs de *N*-glycosylation au niveau du domaine SEA et de quelques sites de *O*-glycosylation dans la partie juxtamembranaire extracellulaire. Cette sous-unité mesure environ 14 kDa avant que la glycosylation des différents sites ne la fasse passer à environ 25 kDa. **MUC1CT** possède des motifs juxtamembranaires **RRK** et **CQC** qui permettent sa localisation nucléaire *via* la *Nucleoporin p62* (Nup62). Ces motifs sont indispensables à son oligomérisation et à son interaction avec Nup62 (Li *et al.*, 2003, Leng *et al.*, 2007). Le motif CQC est également

Figure 10 : **Séquence en acides aminés et sites d'interaction de MUC1CT**. Les partenaires

MUC1CT



de MUC1CT écrits en rouge sont dotés d'une activité kinase contrairement à ceux écrits en bleu. Les 7 résidus tyrosines de MUC1CT sont schématisés en rouge.

impliqué dans la rétention membranaire de MUC1 après palmitoylation de chacun de ces trois résidus (Kinlough *et al.*, 2006). MUC1CT compte également sept résidus tyrosine phosphorylables, dont ceux des motifs **YHPM** et **YTNP** impliqués dans la régulation de l'endocytose de MUC1 (Kinlough *et al.*, 2004), ainsi que de nombreux domaines d'interactions avec des protéines impliquées dans différentes voies de signalisation (Singh *et al.*, 2008). Six parmi les sept résidus phosphorylables sont conservés entre espèces, ce qui met en avant l'importance de ces résidus. Le deuxième résidu tyrosine est la cible de phosphorylation par la protéine kinase ZAP-70 alors que le sixième résidu peut être phosphorylé par c-Src, Lck, ou encore en réponse à l'activation de certains récepteurs membranaires tels que le *Fibroblast Growth Factor Receptor 3* (FGFR-3) (Ren *et al.*, 2006), le *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR) (Singh *et al.*, 2007) ou les récepteurs de la famille ErbB (Schroeder *et al.*, 2001). Une fois phosphorylé, ce résidu devient alors un site d'ancrage pour des protéines au domaine *Src homology 2* (SH2) (Li *et al.*, 2001). La *Protein Kinase C δ* (PKCδ) et la *Glycogen Synthase Kinase 3β* (GSK-3β) sont également capables de phosphoryler respectivement la queue cytoplasmique de MUC1 sur les résidus thréonine et sérine du motif **TDRSPYEKV** localisé en amont du sixième résidu tyrosine. Ces phosphorylations vont favoriser, dans le cas de la PKCδ, ou inhiber, dans le cas de GSK-3β, l'interaction de la β-caténine avec MUC1 qui implique la séquence **SAGNGGSSLS** en aval du motif phosphorylé. La protéine HSP-90 est également capable d'interagir avec la région C-terminale de MUC1CT après phosphorylation du sixième résidu tyrosine. MUC1CT peut aussi interagir *via* sa partie N-terminale avec le récepteur à l'œstradiol, ERα, *via* son domaine de fixation à l'ADN (Wei *et al.*, 2006), la protéine Bcr (Kawano *et al.*, 2007) ou encore la *IκB kinase β* (IKKβ). (Ahmad *et al.*, 2007). Un second membre de la famille, IKKγ est capable, quant à lui, d'interagir avec la partie N-terminale de MUC1CT (Ahmad *et al.*, 2007).

3.2.1.5 Le rôle de MUC1

MUC1 joue un rôle au niveau des épithélia en favorisant d'une part son hydratation et sa lubrification grâce au pouvoir hydrophile apporté par la riche glycosylation extracellulaire. D'autre part, MUC1 joue un rôle dans la protection épithéliale vis-à-vis de différents types d'agression tel que les pathogènes en formant une barrière physique (Knowles *et al.*, 2002, Gendler, 2001). En effet, Sheehan et collaborateurs ont mis en évidence que l'encombrement stérique provoqué par MUC1 et MUC4 participe à l'immunité innée au niveau de l'épithélium pulmonaire en empêchant le passage de petits corps dans l'espace interciliaire et intervillaire

(Sheehan *et al.*, 2006). De plus, la forte charge négative que représente la glycosylation des mucines favorise la répulsion de différents corps comme c'est le cas dans la défense des voies pulmonaires. MUC1 est également exprimée au niveau de l'utérus où elle participe à la défense de l'épithélium utérin vis-à-vis de la flore bactérienne normale (DeSouza *et al.*, 1999). L'implantation utérine du blastocyste issu de la fécondation semble être également régulée par la présence de MUC1, une diminution de l'expression de cette mucine étant observée au site d'implantation du blastocyste (Brayman *et al.*, 2004).

En fonction de son environnement, MUC1 peut présenter des propriétés antiadhésives ou pro-adhésives. Dans certains cas, l'encombrement stérique généré par les longues chaînes glycaniques peut empêcher les interactions intercellulaires (Wesseling *et al.*, 1996). Dans d'autres cas, la structure tridimensionnelle générée par les répétitions en tandem peut être reconnue par des molécules de surface cellulaire tel qu'ICAM-1 et favoriser l'adhésion de cellules entre elles (Regimbald *et al.*, 1996).

3.2.1.6 La glycosylation de MUC1

Il existe 5 sites de *N*-glycosylation au niveau de la région extracellulaire juxtamembranaire et 5 a.a. *O*-glycosylables par répétition en tandem (AHGVT**S**APD**T**RPAPG**S**TAPP). La *N*-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique, RE, alors que l'initiation et l'élongation des motifs *O*-glycosylés débutent dans le *cis*- et *trans*-Golgi (Hilkens *et al.*, 1988). La glycosylation terminale se déroule également dans le *trans*-Golgi. Litvinov et collaborateurs ont proposé que MUC1 soit en premier lieu adressée à la membrane cellulaire sous une forme incomplète sur le plan de la glycosylation puis que la glycosylation terminale par sialylation de MUC1 se produise lors d'étapes successives d'endocytose et de recyclage (Litvinov *et al.*, 1993). Ainsi, il existerait un pool de MUC1 mature et immature à la membrane cellulaire.

Quelques études sur la glycosylation de MUC1 ont été publiées. Les *O*-glycannes peuvent appartenir à quatre cores différents sur lesquels sont ajoutés des chaînes polylactosaminiques, plus ou moins longues, terminées par des motifs sialylés et/ou fucosylés. La nature des noyaux et leur longueur varient en fonction du tissu (Hanisch *et al.*, 1999, Bhavanandan *et al.*, 1998).

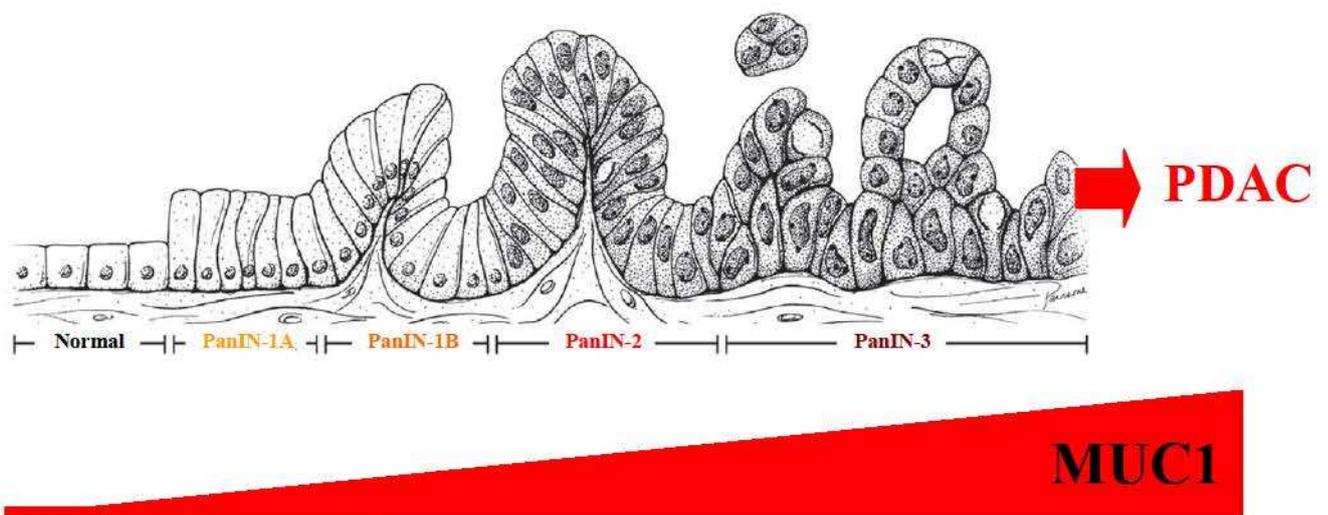


Figure 11: **Expression de MUC1 durant la carcinogénèse pancréatique.** MUC1 est exprimée au pôle apical des cellules canalaire pancréatique. Durant la carcinogénèse pancréatique, MUC1 est surexprimée et cela est observé dès les stades précoces de PanIN-1A.

3.2.2 MUC1 et le cancer

Dans le cancer, de nombreuses altérations touchant MUC1 sont observées.

3.2.2.1 L'expression de MUC1

MUC1 est surexprimée dans de nombreux cancers. C'est par exemple le cas de l'adénocarcinome pulmonaire (Awaya *et al.*, 2004), de l'adénocarcinome de l'ampoule de Vater (Van Heek *et al.*, 2004), du cholangiocarcinome intra-hépatique (Aishima *et al.*, 2006), du PDAC (**Figure 11**) (Kim *et al.*, 2002) et des carcinomes du sein (Gendler, 2001). Dans ce dernier cas, l'expression de MUC1 augmente au fur et à mesure de la progression tumorale et est synonyme de mauvais pronostic (Balduş *et al.*, 2005).

La surexpression de MUC1 dans ces différents cancers peut en partie être expliquée par l'instabilité chromosomique de la région q21-24 du chromosome 1 (Merlo *et al.*, 1989) et également par l'existence d'une boucle d'autoinduction de la transcription de *MUC1* impliquant les facteurs STAT1/3 lors de réponses inflammatoires dans les cancers (Ahmad *et al.*, 2011). Récemment, plusieurs études sur les miARN (Rajabi *et al.*, 2010, Sachdeva *et al.*, 2010, Jin *et al.*, 2010) ont révélé que l'ARN messager de MUC1 est la cible des miR-125b, miR-145 et miR-1226 et que ce ciblage entraîne une diminution de l'expression de MUC1. L'expression de miR-125b et miR-145 sont diminuées dans les cellules cancéreuses mammaires et pourraient ainsi favoriser la surexpression de MUC1.

3.2.2.2 Le rôle de MUC1 dans la polarité cellulaire

Certaines mucines sont capables d'interagir et d'activer les différents membres de la famille de récepteur tyrosine kinase ErbB dont ErbB2. C'est notamment le cas de MUC1 dont l'interaction est renforcée en présence d'*Heregulin* (Li *et al.*, 2003). **Les jonctions serrées** qui empêchent la diffusion des protéines entre les deux pôles membranaires sont formées grâce à un complexe protéique composé de *Partitioning defective 3 homolog 3* et 6 (PAR3 et PAR6) et de la protéine kinase C atypique (aPKC) (**Figure 12**). Le récepteur ErbB2, une fois activé après interaction avec MUC1, est capable d'interagir avec les protéines PAR6 et aPKC et d'empêcher leur interaction avec PAR3, ceci débouchant sur une perte des jonctions serrées (Aranda *et al.*, 2006).

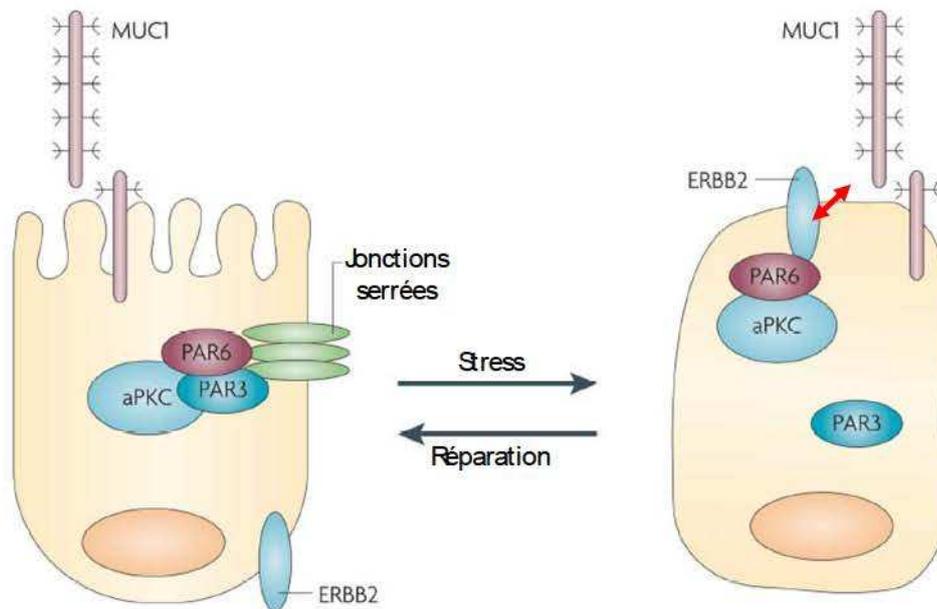


Figure 12 : **Rôle de MUC1 dans les jonctions serrées.** Les jonctions serrées sont formées par un complexe multiprotéique comportant PAR3, PAR6 et aPKC. Lorsque le récepteur ERbB2 est activé, notamment après interaction avec MUC1, la formation de ce complexe est inhibée après séquestration de PAR6 et de l'aPKC par ERbB2. *D'après Kufe, 2009.*

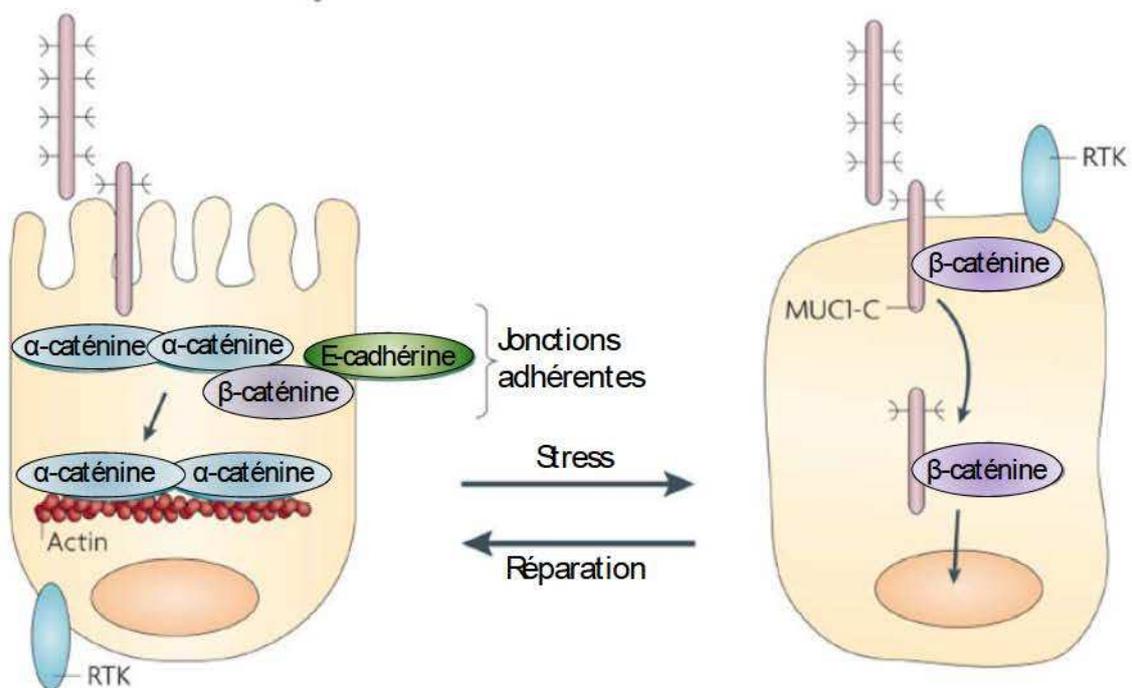


Figure 13 : **Rôle de MUC1 dans les jonctions adhérentes.** Les jonctions adhérentes sont composées des E-cadhérines qui interagissent avec les caténines. La β -caténine faisant le lien entre l'E-cadhérine et l' α -caténine qui interagit avec le cytosquelette. La β -caténine est séquestrée par MUC1 lorsque cette dernière est phosphorylée, comme après son interaction avec un récepteur tyrosine kinase. Le complexe peut ensuite être transloqué au noyau pour induire l'expression de gènes cibles. *D'après Kufe, 2009.*

Les jonctions adhérentes permettent le maintien de la morphologie épithéliale. Elles sont constituées de complexes de cadhérines qui assurent les interactions intercellulaires. Dans les cellules épithéliales, la E-cadhérine interagit sur le cytosquelette par l'intermédiaire de différents membres de la famille des caténines (Pokutta *et al.*, 2007) (**Figure 13**). En effet, la β -caténine, liée à l'E-cadhérine, effectue le lien entre cette dernière et l' α -caténine qui est liée au cytosquelette d'actine. Ainsi, il existe un réseau d'actine, régulé par les complexes cadhérine-caténines, dans les différentes cellules épithéliales qui permettent l'interaction entre les cellules adjacentes et donc la formation de l'épithélium. Des études ont mis en évidence que MUC1 est capable d'interagir avec la β -caténine *via* son domaine **SAGNGGSSLS** (Yamamoto *et al.*, 1997). Ainsi, la surexpression de MUC1 entraîne la séquestration de la β -caténine et empêche la formation des complexes cadhérine-caténines nécessaires à la formation des jonctions adhérentes.

3.2.2.3 MUC1 et les voies de signalisation

La perte de polarité cellulaire observée dans le cancer permet l'interaction de MUC1 avec de nombreux partenaires en particulier des récepteurs tyrosine kinase tels que les récepteurs de la famille ErbB : EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4 (Schroeder *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003). Il a été montré que l'interaction MUC1-EGFR peut être favorisée par la Galectine-3 (Ramasamy *et al.*, 2007). D'un autre côté, l'activation de l'*Heregulin* favorise l'interaction de MUC1 avec le récepteur ErbB2 (Schroeder *et al.*, 2001). Ces interactions, ainsi que celles observées avec le récepteur FGFR3 (Ren *et al.*, 2006), l'*Hepatocyte Growth Factor Receptor* (HGFR) (Singh *et al.*, 2008) ou le PDGFR (Singh *et al.*, 2007) entraînent la phosphorylation de MUC1CT sur les sites précédemment cités (**Figure 10**, cf paragraphe 3.3.1.4) (Li *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 2008, Ren *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2003, Singh *et al.*, 2007). De nombreuses voies de signalisation peuvent être modulées par MUC1 :

La voie RAS/RAF/MEK/ERK est impliquée dans la prolifération cellulaire. (Meerzaman *et al.*, 2001, Schroeder *et al.*, 2001, Horn *et al.*, 2009, Yao *et al.*, 2011). Lorsque le motif YTNP de MUC1CT est phosphorylé, la fixation de la protéine GRB2, possédant un domaine SH2, permet de faire le lien entre MUC1 et RAS *via* le recrutement de la protéine *Son Of Sevenless* (SOS) (Pandey *et al.*, 1995) (**Figure 14**).

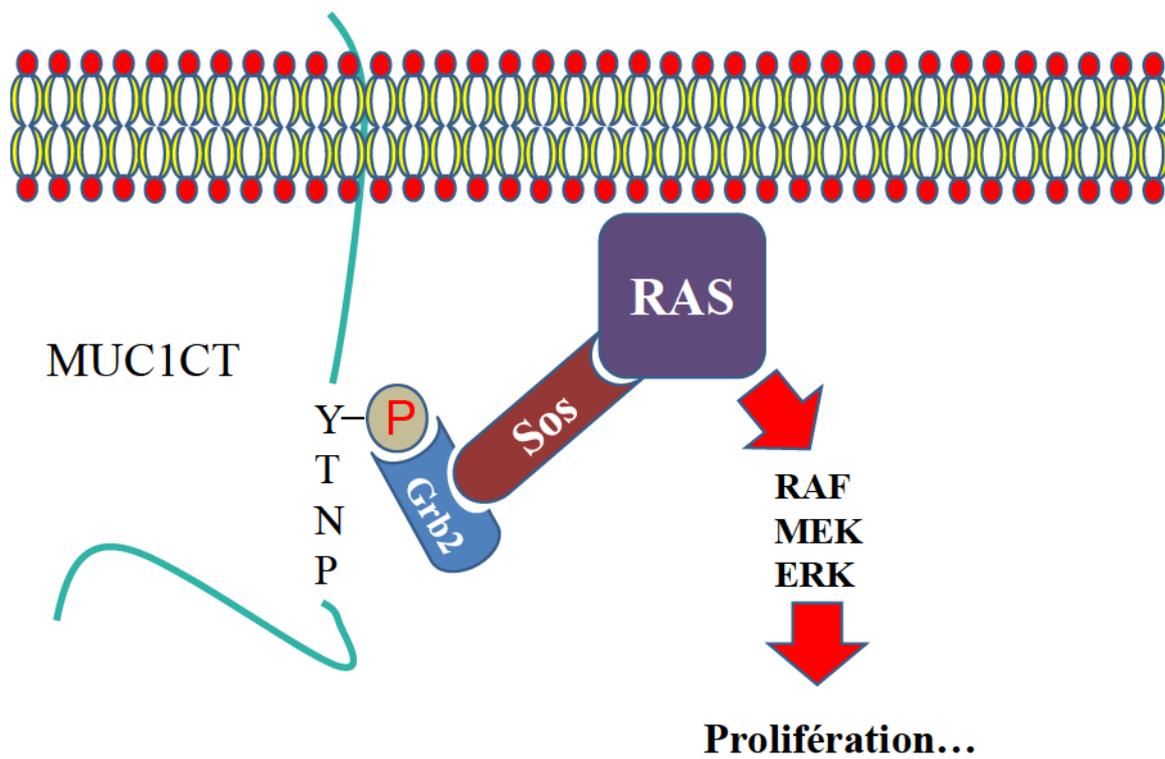


Figure 14 : **MUC1 et la voie RAS**. Lorsque MUC1 est phosphorylée sur le résidu tyrosine du motif YTNP, comme c'est le cas lorsqu'elle interagit avec un récepteur tyrosine kinase, la protéine adaptatrice Grb2 est capable de s'y fixer *via* son domaine SH2. Cette dernière est capable de permettre l'activation de la voie RAS après recrutement de la protéine Sos.

La voie PI3K/AKT est une voie connue pour son rôle dans la survie, la prolifération cellulaire, le métabolisme des cellules cancéreuses et dans la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (Liu *et al.*, 2009, Engelman *et al.*, 2009, Kosugi *et al.*, 2011, Woo *et al.*, 2012). La génération de phosphatidylinositol par la protéine PI3K p110 permet le recrutement et l'activation en aval d'effecteurs, dont AKT, jouant des rôles assez divers (Liu *et al.*, 2009). La fixation de la sous-unité inhibitrice PI3K p85, possédant un domaine SH2, sur le motif YHPM de MUC1CT phosphorylé, permet la levée de l'inhibition de cette sous-unité sur la sous-unité PI3K p110 (Kato *et al.*, 2007) (**Figure 15**).

La voie Wnt joue un rôle dans la prolifération, l'adhésion, la différenciation et la motilité cellulaires (MacDonald *et al.*, 2009). Cette voie est dépendante de la quantité et de la distribution intracellulaire de la β -caténine. Le pool cytoplasmique de β -caténine est contrôlée par la formation d'un complexe avec les protéines *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) et GSK-3 β . La phosphorylation de la β -caténine par la GSK-3 β permet sa dégradation *via* le protéasome. L'activation de la voie Wnt permet l'inhibition de la GSK-3 β , l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine puis la formation d'un complexe β -caténine/*T Cell factor/Leukocyte enhancing factor 1* (LEF1) et enfin la transcription des gènes régulés par ce complexe de facteurs de transcription.

Dans un premier temps, des études ont montré que MUC1CT peut être phosphorylé par la GSK-3 β (**Figure 10**) et que cette modification post-traductionnelle augmente la stabilité de la β -caténine qui n'est plus phosphorylée (Li *et al.*, 1998). Parallèlement à ce mécanisme, est observée une augmentation de la quantité de complexe E-cadhérine/ β -caténine. De même, les phosphorylations de MUC1CT par l'EGFR ou Src sur le motif YEKV ou par la PKC δ sur le motif TDR (**Figure 10**) augmentent l'interaction de MUC1CT, au motif SXXXXXSSL, avec la β -caténine et sa stabilité (Li *et al.*, 2001, Ren *et al.*, 2002). Dans un second temps, le complexe β -caténine/MUC1 a été observé dans les noyaux de cellules cancéreuses pancréatiques humaines transfectées par MUC1 (Wen *et al.*, 2003). Un rôle de coactivateur de transcription dans le noyau a ainsi été suggéré pour MUC1 qui est capable, après sa phosphorylation par l'EGFR ou Src, de moduler la transcription des gènes régulés par le complexe β -caténine/TCF (Li *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2003). Plus précisément, des études récentes sur le promoteur de la Cycline D1 ont démontré que, dans un premier temps, MUC1CT s'associe au facteur de transcription TCF4/TCF7L2 et que cette interaction empêche l'effet de facteur represser de la transcription et, dans un second temps, que MUC1

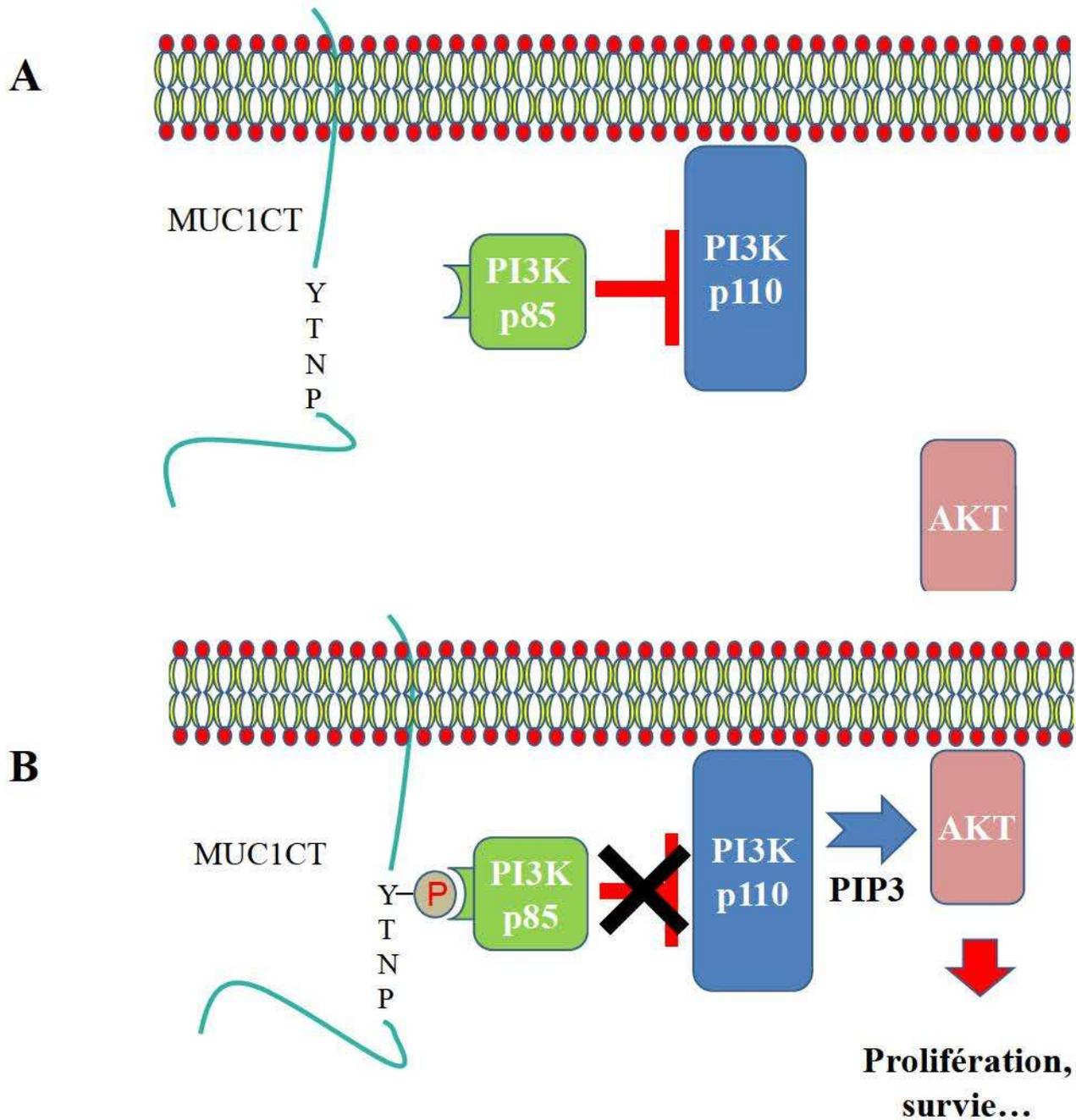


Figure 15 : **MUC1 et la voie PI3K/AKT.** (A) MUC1CT non phosphorylée, voie PI3K/AKT non active : la sous-unité p85 PI3K inhibe la production de PI3P par la sous-unité p110 PI3K, AKT n'est donc pas recrutée à la membrane. (B) MUC1CT phosphorylée, voie PI3K/AKT active : la sous-unité p85 PI3K est séquestrée par MUC1 en interagissant avec le résidu tyrosine phosphorylé. L'inhibition de la sous-unité p110 PI3K est ainsi levée et AKT est recrutée à la membrane, la voie PI3K/AKT est alors active.

permet le recrutement de la β -caténine et d'autres coactivateurs de la transcription (Rajabi *et al.*, 2012).

Enfin, la mutation du domaine de fixation de la β -caténine sur MUC1CT diminue fortement le pouvoir tumorigène ainsi que la croissance sans ancrage de cellules cancéreuses mammaires mettant en évidence l'importance de l'interaction MUC1/ β -caténine dans le cancer (Huang *et al.*, 2005).

Les voies STAT1/STAT3 sont impliquées dans le cancer *via* la réponse inflammatoire (Yu *et al.*, 2009). Ces deux facteurs de transcription sont activés dans beaucoup de carcinomes tels que les mélanomes (Yu *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2009) respectivement par les interférons et les interleukines-6, -10 et -22. Des études sur le cancer du sein ont mis en évidence que MUC1CT et STAT1 interagissent de manière constitutive *via* le domaine de fixation à l'ADN de ce dernier (Khodarev *et al.*, 2010). Le complexe STAT1/MUC1 active la transcription de certains gènes dont celle de *MUC1*. En effet, il existe un *STAT-responsive element* dans le promoteur de *MUC1* qui permet notamment la surexpression de *MUC1* observée dans plusieurs cancers (Gaemers *et al.*, 2001). Le facteur de transcription STAT3 interagit également avec MUC1CT *via* son domaine de fixation à l'ADN. Ce complexe est retrouvé au niveau des promoteurs des gènes cibles de STAT3 mais également au niveau du promoteur de *MUC1*, tout comme le complexe MUC1/STAT1 (Ahmad *et al.*, 2011). La néoexpression de *MUC1* après fixation de STAT1 et -3 sur son promoteur est impliquée dans le phénotype invasif de cellules de nasopharynx infectées par le virus Epstein-Barr (Kondo *et al.*, 2007). La coexpression de ces deux protéines est associée à une diminution de la survie des patients atteints de tumeurs primaires mammaires (**Figure 16**).

La voie NF κ B est impliquée dans la réponse inflammatoire mais également dans la tumorigenèse en induisant la survie et la prolifération cellulaires (Hayden *et al.*, 2008). L'utilisation de MUC1CT muté pour ses résidus tyrosine dans un modèle mammaire a mis en évidence que MUC1CT favorise la localisation nucléaire de NF κ B p65 et sa propre transcription en plus des gènes cibles de NF κ B p65 (Thompson *et al.*, 2006). Dans les modèles cancéreux, il semble que MUC1CT interagisse de manière constitutive avec les kinases responsables de la dégradation des facteurs inhibiteurs du NF κ B contrairement au tissu sain où l'interaction est stimulée par le TNF α (Ahmad *et al.*, 2007, Lagow *et al.*, 2002) (**Figure 16**).

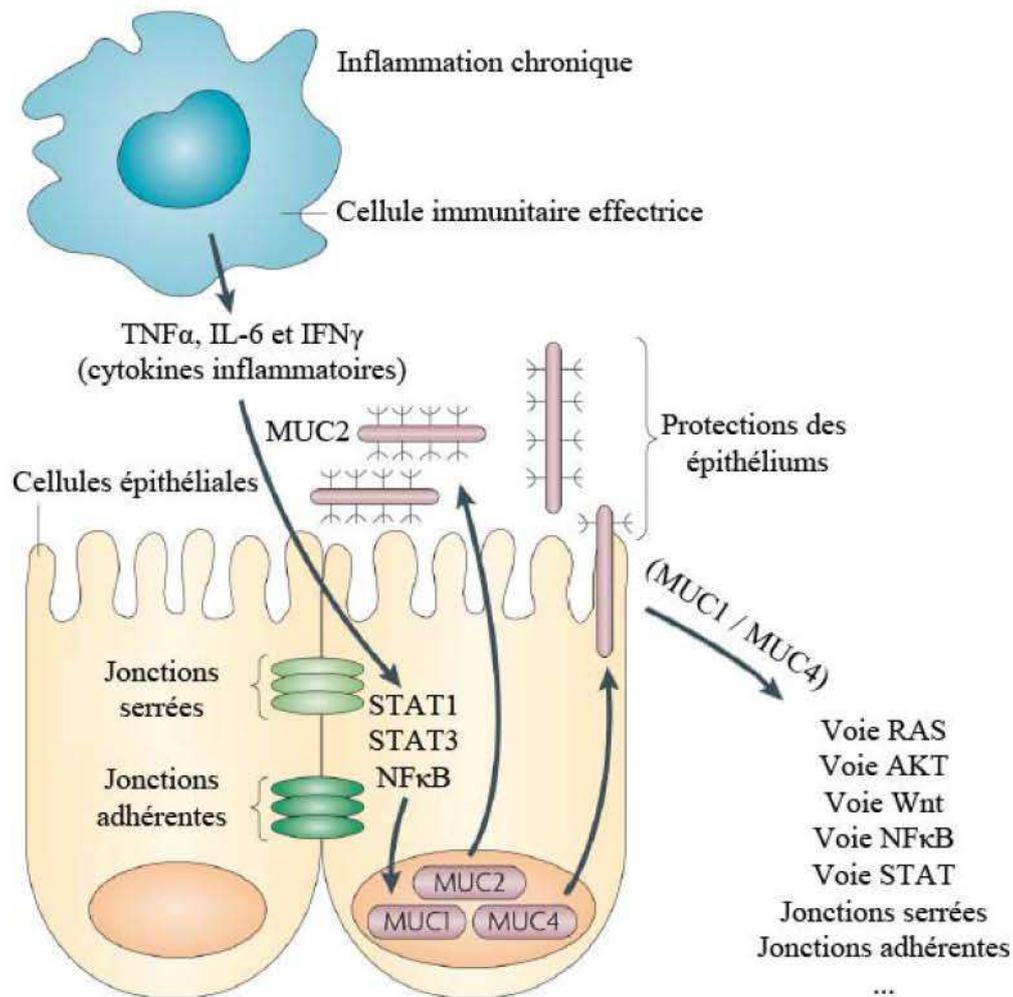


Figure 16 : **MUC1 et les voies STAT1/3 et NF κ B**. En condition inflammatoire, des cytokines sont libérées par les cellules immunitaires effectrices et permettent l'activation de facteurs de transcription. STAT1, STAT3 et NF κ B ainsi activés vont permettre l'expression de gènes cibles dont ceux de certaines mucines (MUC1, MUC4 et MUC2). La surexpression des mucines va alors permettre la modulation de voies oncogéniques. *D'après Kufe, 2009.*

La voie ER α , dans des cellules cancéreuses mammaires exprimant le récepteur aux œstrogènes α (ER α), est modulée par MUC1. En effet, l'interaction d'ER α , *via* son domaine de fixation à l'ADN, avec MUC1CT, après stimulation à l'œstradiol, diminue l'ubiquitinylation et la dégradation du récepteur. De plus, le complexe est retrouvé fixé au promoteur des différents gènes cibles d'ER α dont celui de *MUC1* (Zaretsky *et al.*, 2006). Ainsi, MUC1 favorise la croissance et la survie des cellules tumorales mammaires (Wei *et al.*, 2006).

3.2.2.4 MUC1 et les interactions intercellulaires

Outre son rôle sur la voie Wnt qui module l'adhésion cellulaire, MUC1, *via* son domaine extracellulaire, module les interactions intercellulaires. La Galectine-3 lorsqu'elle interagit avec MUC1 permet de favoriser la formation d'agrégats homotypiques de cellules coliques favorisant leur survie (Zhao *et al.*, 2010). De même, l'interaction de la Galectine-3 avec MUC1 favorise la formation de clusters de MUC1 permettant le démasquage de protéines d'adhésion tel que la E-sélectine sur les cellules mammaires humaines HCA1.7+ (Yu *et al.*, 2007).

3.2.2.5 La glycosylation de MUC1 dans le cancer

Dans les cellules cancéreuses, une glycosylation aberrante est observée. Elle est caractérisée par un raccourcissement des chaînes glycaniques ou par la néo-expression de certains motifs glycaniques portés par les protéines, en raison notamment de la modification du profil d'expression des glycosyltransférases. Ces anomalies de glycosylation ont été mises en évidence dans le cancer mammaire (Lloyd *et al.*, 1996). La reconnaissance des nouveaux motifs glycosylés portés par MUC1, notamment par des lectines, peut moduler les propriétés d'adhésion des cellules cancéreuses. C'est le cas de l'antigène Thomsen-Friedenreich porté par MUC1 reconnu par la Galectine-3 qui favorise l'adhésion des cellules cancéreuses de mélanomes sur les cellules endothéliales (Zhao *et al.*, 2010).

3.2.3 Les anomalies d'expression et de localisation de MUC1 dans le PDAC

Dans le PDAC, **MUC1 est surexprimée et présente une distribution cellulaire altérée au niveau de l'ensemble de la surface cellulaire** et dans le **cytoplasme des cellules tumorales pancréatiques**. Dans les cellules épithéliales normales, sa distribution cellulaire est strictement apicale. Lors d'études histologiques, ces anomalies de distribution cellulaire représentent **un argument en faveur de la malignité** (Monges *et al.*, 1999). Ces anomalies de localisation sont aussi susceptibles de favoriser les interactions entre MUC1 et différents récepteurs et ainsi d'activer de multiples voies de signalisation.

Les galectines sont susceptibles d'interagir avec les motifs glycaniques de MUC1 et ainsi de moduler les propriétés de MUC1. Ainsi, des travaux ont montré le rôle de la Galectine-3 dans l'interaction MUC1/EGFR.

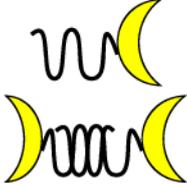
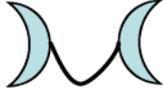
4. Les galectines

Les galectines constituent une famille de lectines très conservée durant l'évolution ayant une forte affinité pour les motifs β -galactosyls, notamment les résidus *N*-acétyllactosaminiques présents à la fois sur les *N*- et *O*-glycannes (Barondes *et al.*, 1994). La reconnaissance de ces motifs par les galectines se fait au niveau C-terminal de la protéine par une séquence peptidique particulière d'environ 130 a.a. appelée domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD). Le polymorphisme des CRD des différentes galectines va permettre l'établissement d'une certaine spécificité vis-à-vis des différents glycoconjugués (Hirabayashi *et al.*, 2002).

En 1993, Hirabayashi et Kazai proposent un regroupement des galectines en 3 classes par rapport à leur organisation structurale ne reflétant pas dans tous les cas une homologie de séquence peptidique (**Tableau 1**) :

- **La classe des galectines contenant un CRD** comporte les Galectines-1 (Hirabayashi *et al.*, 1988), -2 (Gitt *et al.*, 1986), -5 (Gitt *et al.*, 1995), -7 (Madsen *et al.*, 1995), -10, -11, -13, -14 et -15. Ces galectines forment des homodimères et des hétérodimères dont

Tableau 1 : Les trois classes de galectines

Type	Structure	Galectines
Un CRD		1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14
		3
Deux CRD		4, 6, 8, 9, 12

les deux sous-unités sont liées de manière non covalente. Cette particularité permet une plus grande variété d'interactions entre les glycoconjugués et la famille des galectines.

- **La classe des galectines à deux CRD** comporte les Galectines-4, -8 (Hadari *et al.*, 1995), -9 (Tureci *et al.*, 1997) et -12 (Yang *et al.*, 2001). Ces galectines contiennent deux CRD bien distincts reliés par une courte séquence peptidique de 70 a.a.. La présence de plusieurs CRD permettrait notamment à la Galectine-4 d'être impliquée dans des phénomènes de pontage moléculaire entre différents glycoconjugués (Stechly *et al.*, 2009).

- **La classe de la Galectine-3** qui possède un CRD ainsi que des répétitions en tandem riches en résidus proline et glycine dans sa région N-terminale permettant son homodimérisation. De plus, la Galectine-3 peut former *in vitro* des pentamères en présence de ligands bivalents (Ahmad *et al.*, 2004).

Selon le type de galectine, l'affinité des galectines pour leurs substrats glycaniques varie. Comme énoncé précédemment, de manière générale, les galectines reconnaissent des motifs β -galactosyls, cependant la grande taille du CRD permet d'accueillir des motifs saccharidiques adjacents qui peuvent entraîner une diminution ou une augmentation de l'affinité en fonction de la nature des saccharides. De plus, la bivalence ou la multivalence des galectines résultant de la présence d'un ou plusieurs CRD par galectine ou de la capacité d'hétéro/homodimérisation des galectines va également moduler leurs affinités.

4.1 La Galectine-3

4.1.1 LGALS3

La Galectine-3 est codée par le gène **LGALS3** localisé sur le chromosome 14 au locus q21-22 (**Figure 17**). Ce gène, qui mesure environ 17 kb chez l'Homme, est composé de six exons et cinq introns. L'intégralité de la séquence 5' non traduite de l'ARNm est codée par les exons I et II. La partie N-terminale de la protéine qui contient les *tandem repeats* est codée par les exons II et III. Plus précisément, les six premiers a.a. de la protéine dont la méthionine sont codés par la fin de l'exon II, alors que le reste de la partie N-terminale est codé par l'exon III. Chez l'Homme, la partie C-terminale qui contient le CRD est intégralement codée par l'exon V, alors que chez la souris il est contenu dans les exons IV, V et VI du gène. Il

Chromosome 14 q21-22

ADN



ARNm

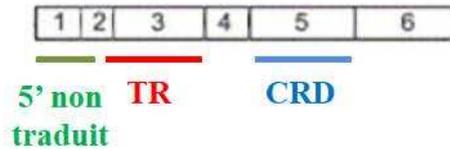


Figure 17 : *LGALS3*. Le gène *LGALS3* est localisé sur le chromosome 14 en q21-22. Il est composé de 6 exons et de 5 introns (In1-5). L'exon 1 et la majeure partie de l'exon 2 correspondent au 5' non traduit de l'ARNm. Enfin l'exon 3 et l'exon 5, chez l'Homme, correspondent respectivement aux répétitions en tandem (TR) et au CRD.

existe deux sites d'initiation de la transcription « 1a » et « 1b » situés respectivement 52 et 51 nucléotides en amont de la limite entre l'exon 1 non traduit et l'intron 1.

4.1.2 La régulation de la transcription de LGALS3

La régulation de la transcription du gène est peu connue. Cependant, on retrouve de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription dans le promoteur de LGALS3 dont cinq sites SP1, cinq sites *cAMP dependent Response Element* (CRE), quatre sites AP-1, un site AP-4, un site *Sis-Inducing Element* (SIE), deux sites « NF- κ B like » et deux sites *basic Helix Loop Helix* (bHLH).

4.1.3 Le patron d'expression de la Galectine-3

Chez l'Homme, **jusqu'aux trois premiers mois de vie de l'individu, l'expression de la Galectine-3** est principalement limitée aux **épithélia**. De nombreuses études ont montré son expression au niveau de l'épithélium de la peau, de l'épithélium respiratoire, de l'urothélium, du système tubulaire rénal et également au niveau des cellules épithéliales des tractus digestif et respiratoire. La Galectine-3 est aussi exprimée dans les cellules myocardiques, la notochorde, les hépatocytes et les chondrocytes hypertrophiques (Van den Brule *et al.*, 1997).

Chez l'adulte, la Galectine-3 est exprimée de **manière ubiquitaire**. Son expression est retrouvée au niveau des **tissus épithéliaux**. C'est notamment le cas de l'épithélium bronchique et intestinal, de l'urothélium, du système tubulaire rénal, des kératinocytes de la peau (Flotte *et al.*, 1983), de l'épithélium colique (Lotz *et al.*, 1993), ou encore dans les cellules épithéliales du thymus (Villa-Verde *et al.*, 2002), du sein (Castronovo *et al.*, 1996), de la prostate (Pacis *et al.*, 2000), de l'œil (Fautsch *et al.*, 2003) ou encore du pancréas (Wang *et al.*, 2000). On la retrouve également dans de nombreuses **cellules immunitaires** telles que les neutrophiles (Truong *et al.*, 1993), les éosinophiles (Truong *et al.*, 1993), les basophiles (Frigeri *et al.*, 1993), les mastocytes (Craig *et al.*, 1995), les cellules dendritiques (Dietz *et al.*, 2000), les monocytes (Liu *et al.*, 1995) et les macrophages (Saada *et al.*, 1996). En ce qui concerne les lymphocytes, la Galectine-3 n'est pas exprimée de manière constitutive mais est induite par de nombreux stimuli. Enfin, elle est également présente dans les **cellules du tissu conjonctif** tel que les fibroblastes (Moutsatsos *et al.*, 1987), les ostéoblastes (Stock *et al.*,

2003), les ostéoclastes (Niida *et al.*, 1994) et les chondrocytes (Colnot *et al.*, 1999), les cellules de Schwann (Reichert *et al.*, 1994) ou encore les **cellules endothéliales** de plusieurs tissus et organes (Lotan *et al.*, 1994).

4.1.4 La Galectine-3

La Galectine-3, d'une masse moléculaire de 33 kDa, est composée de deux parties importantes :

- Le domaine N-terminal de 110 à 130 a.a.. C'est un domaine flexible avec **7 à 14 répétitions en tandem** contenant le motif consensus **PGAYPG**. Il existe une certaine homologie de cette région avec des ribonucléoprotéines et avec le collagène α -1 bovin (Wang *et al.*, 1991). Cette région n'a pas d'activité propre de fixation des glycanes même si elle semble participer à la fixation du saccharide au niveau du CRD (Barboni *et al.*, 2000). Ce domaine N-terminal est responsable de la multimérisation de cette galectine. Cette fonction est également régulée par le clivage au niveau de la région Ala⁶²-Tyr⁶³ par des métalloprotéases (MMP-2 et -9) (Ochieng *et al.*, 1998) ainsi que par des phosphorylations sur les résidus sérine présents dans cette région. Enfin, on retrouve deux résidus sérine (Ser⁶ et Ser¹²) qui peuvent être phosphorylés et qui semblent importants dans le trafic intracellulaire de cette galectine (Tsay *et al.*, 1999). *In vitro*, il a été mis en évidence que les caséine kinases 1 et 2 sont capables de phosphoryler la Galectine-3 (Huflejt *et al.*, 1993). La nature de la/des kinases responsables de ce phénomène *in vivo* est encore inconnue.

- Le domaine C-terminal comporte 130 a.a.. De forme globulaire, il contient le **CRD** qui assure la fixation des motifs glycaniques (Ochieng *et al.*, 1993). Au sein de ce CRD, un motif **NWGR**, possédé par les protéines de la famille Bcl-2, assure la fonction anti-apoptique de la Galectine-3 (Yang *et al.*, 1996). Cette fonction est possible uniquement lorsque le CRD n'est pas impliqué dans une interaction avec un motif glycanique. De plus, certains acides aminés de ce motif NWGR semblent impliqués dans la multimérisation des galectines (Yang *et al.*, 1998).

La **N-acétyl-lactosamine** est le ligand préférentiel de la Galectine-3 (Agrwal *et al.*, 1993). La taille de la poche de fixation étant plus grande que nécessaire, elle peut également accueillir des sucres adjacents à ce motif pouvant entraîner une diminution ou une

augmentation de l'affinité de la Galectine-3 pour la *N*-acétyl-lactosamine (Knibbs *et al.*, 1993). La fixation d'un ligand au niveau du CRD entraîne un changement conformationnel de la Galectine-3. La fixation des sucres est aussi modulée par la phosphorylation sur le résidu Ser⁶ (Mazurek *et al.*, 2000).

4.1.5 La distribution cellulaire de la Galectine-3

La Galectine-3 est synthétisée dans le cytoplasme des cellules. A partir de là, elle peut être sécrétée dans **le milieu extracellulaire** mais de manière non conventionnelle (Hughes, 1999). Plusieurs voies ont été proposées dont la translocation *via* un transporteur membranaire, l'ectocytose ou la voie exosomiale. La Galectine-3 extracellulaire est susceptible d'exercer des effets paracrines et autocrines et de moduler les propriétés d'adhésion cellulaire, de prolifération ou de mort cellulaire.

La Galectine-3 est également présente **au niveau nucléaire**. Son rôle dans ce compartiment a été très étudié malgré le fait que le transporteur permettant sa translocation soit encore inconnu. En ce qui concerne le signal d'adressage nucléaire, les études sont discordantes : les 11 premiers a.a. (Gong *et al.*, 1999) ou certains a.a. du domaine C-terminal seraient impliqués dans le processus de translocation (Davidson *et al.*, 2006). Dans la poche du CRD, le **motif IXLT** et certains a.a. lui faisant face semblent nécessaires à la localisation nucléaire de la Galectine-3 (Nakahara *et al.*, 2006). De plus, la translocation nucléaire de la Galectine-3 nécessite **sa fixation à l'Importine- α et la présence de l'Importine- β** (Nakahara *et al.*, 2006).

Le mécanisme permettant **l'export nucléaire** est quant-à lui connu. Il fait appel à une séquence ***leucine-rich nuclear export signal (NSE)*** située dans la partie C-terminale et au récepteur d'export nucléaire ***chromosome maintenance region 1 (CRM1)***. De plus, il semble que seule la **Galectine-3 nucléaire phosphorylée** soit capable de sortir du noyau (Tsay *et al.*, 1999).

4.2 *Les rôles physiologiques des galectines*

4.2.1 **L'adhésion cellulaire**

Les galectines sont capables **d'inhiber ou de favoriser la fixation des cellules sur différents substrats**. En effet, des études montrent que la fixation de myoblastes (Cooper *et al.*, 1991) ou de cellules musculaires lisses vasculaires (SMC) (Gu *et al.*, 1994) est inhibée en présence de Galectine-1. Cette dernière se fixe à la fois sur la laminine et sur certaines intégrines ($\alpha7\beta1$ et $\alpha1\beta1$) empêchant ainsi leur interaction avec leurs substrats respectifs. A l'inverse, cette même galectine favorise la fixation des SMC au niveau de composés de la MEC. Elle faciliterait l'adhésion des cellules en interagissant avec des molécules telle que l'ostéopontine ou encore la vitronectine (Moiseeva *et al.*, 2000).

4.2.2 **L'épissage**

Dans le noyau, les Galectine-1 et -3 jouent un rôle dans **l'épissage des pré-ARNm et la stabilisation du complexe d'épissage**. Ainsi, il a été décrit que la Galectine-3 stabilise certains facteurs de transcription dont le *nuclear thyroid-specific transcription factor1* (TTF-1) avec lequel elle interagit de manière directe au niveau de son homéodomaine (Paron *et al.*, 2003).

4.2.3 **La réponse immunitaire**

La Galectine-3 est capable d'activer un grand nombre de cellules effectrices du système immunitaire et de jouer le rôle de chimiokine, attirant les macrophages et les monocytes là où le besoin s'en fait sentir (Sano *et al.*, 2000).

4.2.4 **Le trafic intracellulaire**

Des travaux récents ont mis en évidence l'implication des galectines dans le trafic intracellulaire dans les cellules épithéliales.

Les cellules épithéliales sont polarisées et caractérisées par l'existence de deux domaines membranaires distincts : le domaine apical, qui est en contact avec la lumière des différents organes ou avec le milieu extérieur, et le domaine basolatéral, qui est en relation

avec la lame basale et les cellules adjacentes. Le pôle apical (PA) se distingue morphologiquement du pôle basolatéral (PBL) par la présence de microvillosités. L'établissement de la polarité cellulaire amène également une répartition asymétrique des lipides et des protéines entre ces deux domaines membranaires. En effet, les protéines essentielles aux fonctions biologiques de l'épithélium sont adressées au niveau du PA. Le PBL, quant à lui, est enrichi en protéines intervenant dans les jonctions cellule/cellule comme les cadhérines, les desmoglénines, les desmocollines, les connexines mais également en intégrines qui permettent les interactions cellule/matrice extracellulaire (MEC). Au niveau lipidique, le PA est enrichi en sphingolipides (SL) alors que le PBL est enrichi en phosphatidylcholines.

La mise en évidence de signaux d'adressage basolatéral et apical distincts a permis de valider l'hypothèse de l'existence d'un trafic intracellulaire polarisé au sein des cellules épithéliales permettant la distribution asymétrique des différents constituants cellulaires. Après leur translocation à travers la membrane du RE et leur maturation post-traductionnelle dans l'appareil de Golgi, les protéines membranaires ou sécrétées doivent être triées au niveau golgien ou post-golgien pour pouvoir être dirigées spécifiquement vers la surface basolatérale ou apicale.

4.2.4.1 L'adressage à la membrane basolatérale

Les protéines triées au niveau du réseau trans-golgien (TGN) peuvent être directement adressées à la membrane basolatérale ou transiter *via* les endosomes de recyclage communs (CRE) avant d'atteindre leur localisation finale (**voie basolatérale directe ou basolatérale indirecte, Figure 18, voie 1 et 2**, Keller *et al.*, 2001, Ang *et al.*, 2004).

L'adressage à la membrane basolatérale est un processus dépendant de signaux peptidiques situés dans le domaine cytosolique des protéines. En effet, dans les années 1990, il a été mis en évidence que des résidus tyrosine (Matter *et al.*, 1992) ou des motifs hydrophobes composés de résidus leucine (Lock *et al.*, 2005) et d'isoleucine étaient nécessaires à l'adressage basolatéral de certaines protéines telles que le récepteur aux IgA (pIgR), le *Low Density Lipids Receptor* (LDL-R) ou l'E-cadhérine. Récemment, de nouveaux signaux juxta-membranaires tels que des noyaux composés de résidus proline ont été mis en évidence (He *et al.*, 2002). Ces signaux sont reconnus par des complexes hétérotétramériques

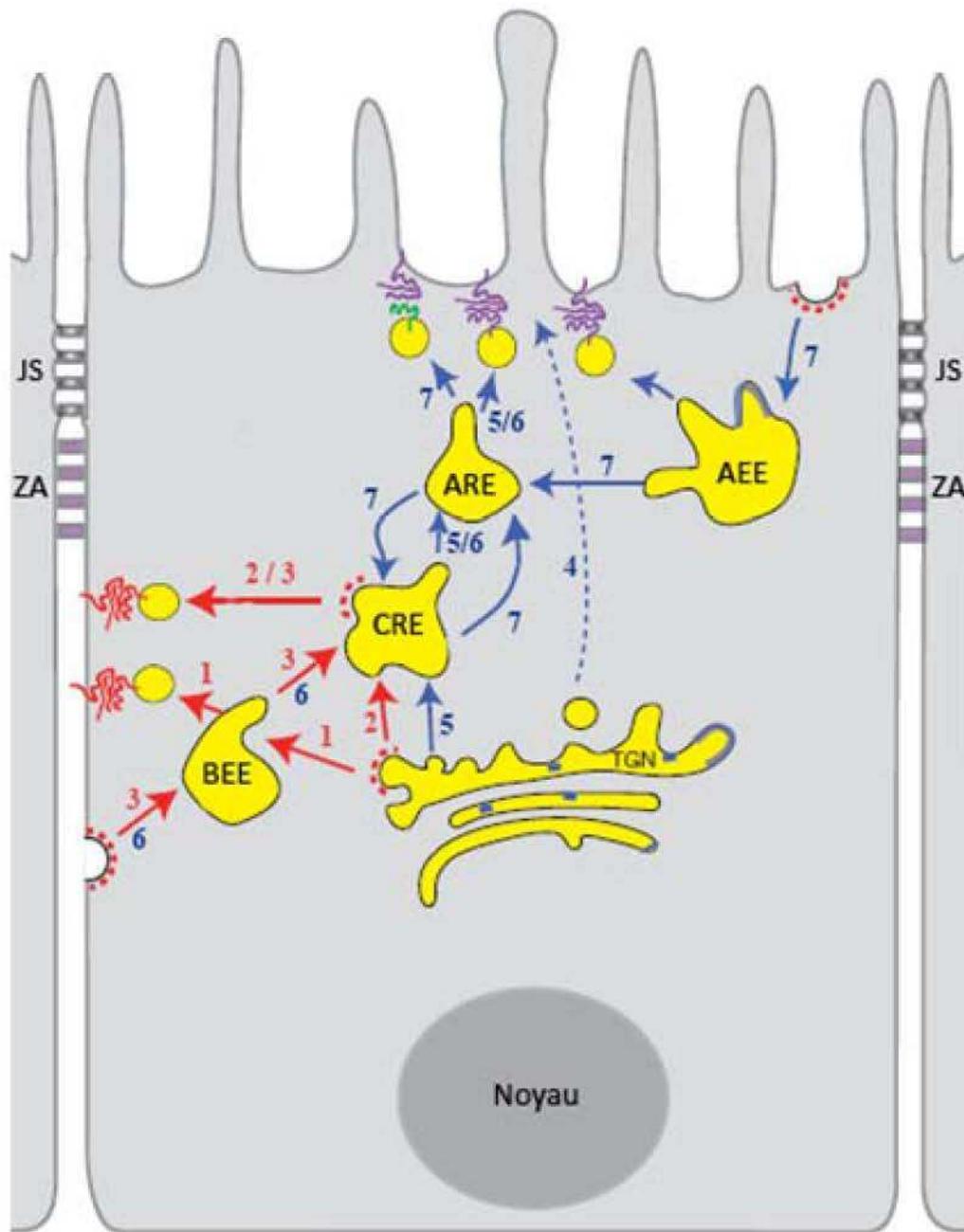


Figure 18 : **Voies de trafic intracellulaire dans les cellules polarisées.** (1) voie basolatérale directe, (2) voie basolatérale indirecte, (3) recyclage après endocytose basolatérale, (4) voie apicale directe, (5) voie apicale indirecte, (6) transcytose, (7) recyclage après endocytose apicale. ARE : endosomes de recyclage apicaux. CRE : endosomes de recyclage communs. BEE : endosomes précoces basolatéraux. AEE : endosomes précoces apicaux. TGN : réseau trans-golgien. JS : jonctions serrées. ZA : zona adhérens. (Weisz *et al.*, 2009)

composés de protéines adaptatrices cytosoliques (AP) permettant la formation de vésicules recouvertes de clathrine qui vont migrer le long du cytosquelette et fusionner avec la membrane basolatérale. A l'heure actuelle, les complexes AP1B et AP4 ont été identifiés dans l'adressage basolatéral (Folsch *et al.*, 1999, Simmen *et al.*, 2002).

4.2.4.2 L'adressage à la membrane apicale

Les voies d'adressage à la membrane apicale sont assurées par des processus complexes qui varient selon les protéines et les types cellulaires. L'adressage apical apparaît ainsi présenter une grande diversité au niveau **des voies de trafic, des mécanismes de transport et des signaux d'adressage**. Il existe deux types de voies :

- **La voie apicale directe**. Les protéines triées au niveau du TGN peuvent être directement adressées à la membrane apicale (**Figure 18, voie 4**, Keller *et al.*, 2001) ou peuvent transiter *via* les CRE puis les endosomes de recyclage apicaux (ARE) avant d'atteindre leur localisation finale (**Figure 18, voie 5**, Cresawn *et al.*, 2007).

- **La transcytose**. Les protéines sont adressées au PBL puis internalisées dans des vésicules avant d'être redistribuées au niveau de la membrane apicale (**Figure 18, voie 6**, Mostov, 1994). Durant la transcytose, les protéines transitent par les CRE et les ARE avant de gagner la membrane apicale (Brown *et al.*, 2000).

Plusieurs mécanismes de transport ont été décrits :

- **Le transport raft-dépendant**. La présence de microdomaines membranaires riches en SL et glycolipides (GL) au niveau de la membrane apicale a été décrite pour la première fois par van Meer et Simons (van Meer *et al.*, 1988). En 1997, Simons a émis l'hypothèse du rôle de ces microdomaines dans le transport apical. Ces microdomaines, appelés rafts ou radeaux lipidiques résistants aux détergents, présents au niveau de l'appareil de Golgi, seraient le lieu de recrutement des glycoprotéines (GP) à destination apicale. Les GP seraient ensuite transportées à la membrane apicale après bourgeonnement de vésicules de type raft (Verkade *et al.*, 1997).

La localisation apicale des glycoprotéines à ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) a soulevé l'hypothèse de l'ancrage GPI comme signal d'incorporation dans les rafts et d'adressage apical. Cependant par la suite, des glycoprotéines à ancrage GPI ont été identifiées au niveau du PBL de certains types cellulaires (Mayor *et al.*, 2004, Sarnataro *et al.*, 2002, Zurzolo *et al.*, 1993). La poursuite des travaux a ensuite montré qu'une étape supplémentaire de *clustering* des rafts était nécessaire pour engendrer l'adressage apical. En effet, notre équipe a montré que la Galectine-4 était impliquée dans l'adressage apical raft-dépendant de la dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV), de l'antigène de carcinome embryonnaire (CEA) et de la mucine MUC1 dans les cellules entérocytaires de la lignée HT-29 (Stechly *et al.*, 2009, Delacour *et al.*, 2005).

Bien que de multiples travaux aient été entrepris sur l'étude des rafts et des signaux d'adressage apical, les mécanismes de régulation du trafic raft-dépendant sont encore peu connus à l'heure actuelle.

- **Le transport raft-indépendant.** Cette voie a été décrite en particulier pour l'adressage de la lactase phlorizine hydrolase (LPH) *via* la Galectine-3. Elle a été décrite comme interagissant avec la LPH de manière glycanne dépendante (Delacour *et al.*, 2006). Cette galectine serait responsable de la présence au niveau du PA des cellules canines rénales MDCK de clusters de glycoprotéines, sensibles aux détergents à basse température, mettant ainsi en évidence que cette voie n'implique pas les microdomaines de type raft (Delacour *et al.*, 2007).

Contrairement au signal d'adressage basolatéral, clairement identifié, plusieurs types de signal d'adressage apical ont été proposés jusqu'à présent.

Les signaux d'adressage apical peuvent être intracellulaires, transmembranaires ou encore extracellulaires (Weisz *et al.*, 2009). L'implication des galectines dans différentes voies de trafic, raft indépendants ou raft dépendants, suggérait en particulier l'existence de signaux d'adressage apical de type glycanne.

Effectivement, plusieurs études ont mis en évidence le rôle **des motifs O-glycosylés ou N-glycosylés** comme signal d'adressage apical (Yeaman *et al.*, 1997, Stechly *et al.*, 2009, Kinlough *et al.*, 2011).

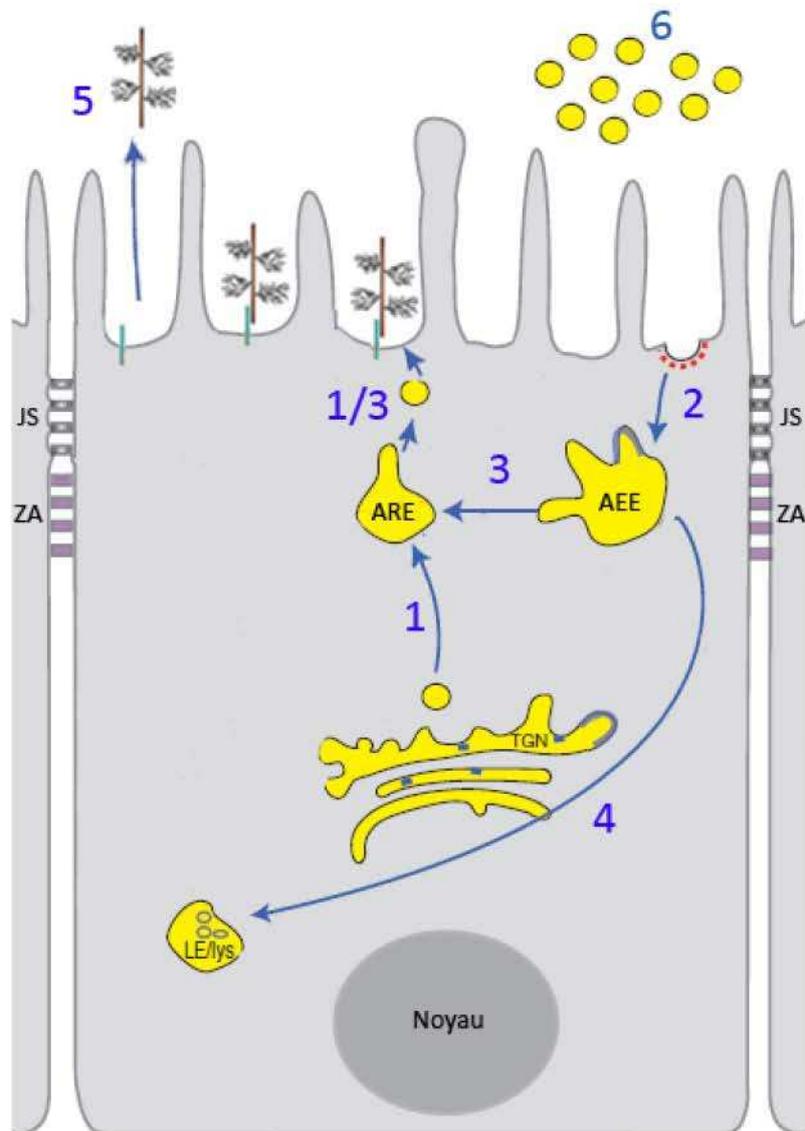


Figure 19 : **Trafic intracellulaire de MUC1.** Schéma récapitulant les différentes voies de trafic intracellulaire utilisées par MUC1. (1) Voie d'adressage apical de MUC1, (2) Endocytose de MUC1, (3) Recyclage de MUC1, (4) Dégradation lysosomiale de MUC1. (5) Libération extracellulaire de MUC1 après clivage, (6) Exosomes comportant MUC1.

Des signaux peptidiques transmembranaires et cytoplasmiques ont également été décrits. C'est le cas du domaine transmembranaire de l'hémagglutinine du virus de la grippe (Scheiffele *et al.*, 1997) ou de la séquence peptidique cytoplasmique de la mégaline (Marzolo *et al.*, 2003). Les motifs observés ont des tailles variant de quelques a.a. à 80 a.a. environ (Chmelar *et al.*, 2006, Braiterman *et al.*, 2009).

4.2.5 Le trafic intracellulaire de MUC1

L'adressage apical de MUC1

Dans les cellules entérocytaires humaines HT-29, la Galectine-4 est impliquée dans l'adressage apical raft-dépendant de MUC1 (Stechly *et al.*, 2009, Delacour *et al.*, 2005). Dans les cellules rénales canines MDCK, il a été montré qu'après sa biosynthèse dans le RE et sa glycosylation, MUC1 est dirigée dans un premier temps vers les **endosomes apicaux de recyclage (ARE)** puis adressée à **la membrane cellulaire apicale (Figure 19, voie 1)** (Mattila *et al.*, 2009). Cette voie particulière d'adressage est associée à la présence de signaux glycaniques sur les protéines membranaires apicales. Récemment, Kinlough et collaborateurs ont mis en évidence que **les TR de MUC1 richement O-glycosylés jouent un rôle de signal d'adressage** permettant la localisation apicale de MUC1 (Kinlough *et al.*, 2011). De même, la présence d'O-glycannes plus court sur les TR de MUC1 semblent diminuer la vitesse d'adressage à la membrane apicale dans les cellules CHO (Altschuler *et al.*, 2000). Une fois adressée à la membrane apicale, MUC1 est ensuite endocytée puis recyclée ou dégradée (**Figure 19, voie 4**).

Dans les cellules épithéliales, l'endocytose se produit au niveau apical et basolatéral. Les protéines, endocytées au PA de la cellule, gagnent les endosomes de tri apicaux (AEE) avant d'être regroupées dans les CRE puis les ARE et enfin être dirigées vers la membrane apicale (**Figure 18, voie 7**, Tanos *et al.*, 2008). Les protéines, endocytées au PBL de la cellule, gagnent les endosomes de tri basolatéraux (BEE) avant d'être regroupées dans les CRE puis dirigées vers la membrane basolatérale (**Figure 18, voie 3**) (Tanos *et al.*, 2008).

En ce qui concerne MUC1, il a été montré dans les cellules ovariennes de Hamster CHO que la présence de **motifs O-glycaniques courts sur les TR** de MUC1 favorise son endocytose médiée par la clathrine (**Figure 19, voie 2**) (Altschuler *et al.*, 2000). L'utilisation

de construction particulière de MUC1 ne comportant que MUC1CT a permis de mettre en évidence que beaucoup d'interactions *via* la queue cytoplasmique modulent également l'endocytose. C'est notamment le cas des fixations respectives de **Grb2** et du complexe protéique *Adaptator complex 2 (AP2)*, sur les résidus tyrosines phosphorylés du motif YTNP et du motif YHPM de MUC1CT, qui favorisent l'endocytose (Kinlough *et al.*, 2004).

Le recyclage de MUC1 (Figure 19, voie 3) est dépendant de la **palmitoylation des résidus cystéine** du motif CQC juxtamembranaire de MUC1CT et de la fixation du complexe protéique *Adaptator complex 1 (AP1)* dans une plus faible mesure. L'absence de ces événements entraînent une accumulation de MUC1 dans les ARE des cellules ovariennes de Hamster CHO (Kinlough *et al.*, 2006).

4.3 *Les galectines en pathologie tumorale*

Dans certains cancers dont le PDAC, **une surexpression** de la Galectine-3 est observée dans les cellules tumorales (Lavra *et al.*, 2011). Dans d'autres cancers, c'est **une diminution d'expression** de la Galectine-3 qui est observée (Lotz *et al.*, 1993, van den Brule *et al.*, 1996) alors que les cellules saines expriment la Galectine-3. Un phénomène similaire est observé pour les autres galectines.

Une délocalisation de la Galectine-3 du noyau vers le cytoplasme est souvent associée à ces modulations d'expression. Ces anomalies sont susceptibles de moduler les différentes étapes de la cancérogénèse.

4.3.1 L'apoptose

Les Galectine-7 (Bernerd *et al.*, 1999) et -12 (Hotta *et al.*, 2001) favorisent l'apoptose dans des lignées fibroblastiques et adipocytaire. **L'apoptose** est la réponse biologique pour laquelle l'implication de la Galectine-3 est la mieux décrite. Son activité peut être soit **anti-apoptotique** (Yu *et al.*, 2002) ou **pro-apoptotique** (Fukumori *et al.*, 2004) en fonction du contexte cellulaire mais aussi de sa localisation.

La Galectine-3 intracellulaire

Une fonction anti-apoptotique de la Galectine-3 a été mise en évidence par l'utilisation d'une forme tronquée de la protéine au niveau de la région N-terminale en guise de dominant négatif : celle-ci permet d'augmenter la sensibilité aux stimuli apoptotiques dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Hoyer *et al.*, 2004). Le mécanisme d'action n'est pas clairement compris cependant il semblerait que plusieurs voies de signalisation soient impliquées. Une translocation vers la mitochondrie à partir du cytosol ou du noyau est associée à ce rôle anti-apoptotique. En effet, cette localisation péri-mitochondriale préviendrait les dommages mitochondriaux et la libération du cytochrome C qui régule l'activation des caspases aboutissant à l'apoptose (Yu *et al.*, 2002, Matarrese *et al.*, 2000). Ce mécanisme est dépendant de la synexine (ou annexine VII) qui lorsqu'elle est absente entraîne une localisation cellulaire non mitochondriale de la Galectine-3 et une augmentation de la sensibilité aux stimuli apoptotiques. Il dépend également de la phosphorylation du résidu Ser⁶ du domaine N-terminal qui semble essentielle à la fonction anti-apoptotique de cette lectine (Tsay *et al.*, 1999).

Des interactions entre la Galectine-3 et certains représentants de la famille Bcl-2 ont été mises en évidence (Yang *et al.*, 1996). Cette interaction passerait par le motif NWGR présent au sein du CRD, interaction qui est inhibée par l'utilisation *in vitro* de lactose. Cette association des deux protéines permettrait à Bcl-2 de se localiser au niveau de la mitochondrie où elle pourrait ainsi jouer son rôle inhibiteur de la mort cellulaire programmée. Des interactions avec d'autres acteurs de la voie apoptotique ont pu être récemment mises en évidence. En effet, la Galectine-3 est capable d'interagir avec la Nucling (Liu *et al.*, 2004) ou encore le récepteur de mort CD95 (Fukumori *et al.*, 2004). Dans ce dernier cas, la Galectine-3 joue un rôle dans la modulation de la réponse : une voie pro-apoptotique de type I avec recrutement de *death inducing signaling complex* (DISC) très efficace en présence de Galectine-3 et une voie de type 2 moins efficace en absence de Galectine-3.

Il a aussi été montré que la Galectine-3 joue un rôle crucial dans l'apoptose induite par le *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL. La Galectine-3 est capable de moduler la voie Akt afin d'induire soit la mort soit la survie cellulaire. Ainsi, dans la lignée mammaire cancéreuse BT549, cette galectine permettrait la déphosphorylation d'Akt et la suppression de son activité afin d'induire la mort cellulaire (Lee *et al.*, 2003) alors que

dans la lignée biliaire cancéreuse humaine J8 surexprimant la Galectine-3, Akt est fortement actif, protégeant ainsi les cellules de l'apoptose induite par TRAIL (Oka *et al.*, 2005). Le contexte cellulaire pourrait expliquer les différences observées quand au rôle de la Galectine-3 dans la mort cellulaire. En effet, la protéine KRAS, protéine en amont de nombreuses voies de signalisation dont la voie Akt, est retrouvée mutée dans certaines lignées cancéreuses. De plus, K-Ras présente une activité modulée par la Galectine-3, ce qui pourrait expliquer les différences d'activation de la voie AKT et les différences de réponses observées.

Enfin, Kim et collaborateurs ont montré que la Galectine-3 était capable d'induire une résistance à l'anoïkis en arrêtant le cycle cellulaire au niveau de la phase G1 dans les cellules mammaires BT549. Ce phénomène est associé à la diminution de l'expression des Cyclines E et A et à une augmentation de leurs inhibiteurs p21^{WAF1/CIP1} et p27^{KIP1} (Kim *et al.*, 1999). Dans le cas de stimuli pro-apoptotiques où la génistéine est exprimée, un arrêt à la transition G2/M est observé en présence de Galectine-3 (Lin *et al.*, 2000).

La Galectine-3 extracellulaire et nucléaire

Le rôle pro-apoptotique de la Galectine-3 extracellulaire a été clairement décrit dans plusieurs lignées cellulaires humaines différentes dont les lymphocytes T (Fukumori *et al.*, 2003). La seule étude mécanistique montre que l'induction de l'apoptose passe par l'interaction de CD29 et CD7 avec la Galectine-3 au niveau de la membrane cellulaire, ce qui amène à l'activation de la Caspase 3 et à la libération du Cytochrome C (Nakahara *et al.*, 2005). La Galectine-3 nucléaire est également pro-apoptotique cependant les mécanismes d'actions sont encore inconnus (Califice *et al.*, 2004).

4.3.2 La prolifération cellulaire

La Galectine-1 favorise la localisation membranaire et l'activation de HRAS initiant une réponse proliférative (Paz *et al.*, 2001). De même, la Galectine-3 en fonction de sa localisation module la prolifération cellulaire.

La Galectine-3 intracellulaire

La prolifération, en fonction du type cellulaire étudié, peut être soit stimulée par la Galectine-3 comme pour la lignée Jurkat (Yang *et al.*, 1996) soit inhibée dans le cas de la lignée cancéreuse prostatique LNCaP (Ellerhost *et al.*, 2002).

L'une des voies par laquelle la Galectine-3 pourrait influencer la prolifération et la transformation cellulaire serait la modulation de voies de signalisation notamment celles induites par KRAS. La Galectine-3 et KRAS sont capables d'interagir entre elles. L'interaction de ces deux dernières favorise les voies PI3K et Raf-1 au détriment de la voie Erk et semble déterminer l'intensité d'activation de la voie de signalisation mais également sa durée (Elad-Sfadia *et al.*, 2004).

La Galectine-3 extracellulaire

La Galectine-3 extracellulaire va en fonction du type cellulaire induire (Sasaki *et al.*, 1999) ou inhiber (Krugluger *et al.*, 1997) **la prolifération cellulaire**. L'ajout de Galectine-3 dans le milieu de culture de différentes cellules et l'utilisation de lactose a montré que son action sur la prolifération est dépendante de son CRD. En effet, l'utilisation de cellules MDCK ne possédant pas de transporteurs de galactose fonctionnels inhibe l'effet observé sur les cellules MDCK non invalidées (Bao *et al.*, 1999). De plus, ces expériences laissent fortement supposer que la Galectine-3 interagirait avec des récepteurs membranaires portant ces motifs glycaniques.

La Galectine-3 nucléaire

D'autres études ont mis en évidence que la Galectine-3 peut interagir avec des complexes de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de gène de prolifération comme la Cycline D1 ou encore *c-myc*. C'est le cas du complexe β -caténine/Tcf (Shimura *et al.*, 2004) ou encore du facteur de transcription TTF-1 dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes (Paron *et al.*, 2003).

4.3.3 L'angiogenèse

La Galectine-1 sécrétée par les cellules tumorales permet la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Thijssen *et al.*, 2010). La Galectine-3 a été décrite comme ayant une **activité pro-angiogénique**. En effet, il a été montré que cette dernière est impliquée dans le chimiotactisme des cellules endothéliales et qu'elle est capable d'induire la formation de capillaires par les HUV-EC-C *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* (Nangia-Makker *et al.*, 2000).

4.3.4 Le processus métastatique

Les galectines, sont impliquées dans la **modulation des interactions indispensables au processus métastatique**.

L'adhésion cellulaire

Certaines galectines sont capables d'inhiber la fixation des cellules sur différents substrats. La Galectine-1 est capable dans des conditions particulières de diminuer la fixation des cellules de mélanome humain sur la laminine (van den Brule *et al.*, 1995). De même, *in vitro*, la Galectine-8 soluble est capable de diminuer l'adhésion des cellules CHO, de kératinocytes humains (HaCaT), de cellules cancéreuses utérines (HeLa) ou encore de cellules cancéreuses pulmonaires (Hadari *et al.*, 2000). Dans le cas de la Galectine-8, le mécanisme d'inhibition se ferait par des interactions avec différents types d'intégrines exprimées à la surface cellulaire. Ces interactions empêcheraient la fixation des ligands conventionnels des intégrines sur ces dernières. L'utilisation d'ions de Manganèse, augmentant l'affinité des intégrines pour ses substrats conventionnels, abolit l'effet inhibiteur de la Galectine-8 (Levy *et al.*, 2001).

In vivo, la Galectine-3 est capable de moduler l'adhésion et l'invasion des cellules tumorales (Takenaka *et al.*, 2004, Bresalier *et al.*, 1998). La Galectine-3 favorise le détachement des cellules du site tumoral primaire puisqu'elle inhibe *in vitro* l'adhésion de plusieurs lignées cellulaires aux protéines de la MEC (Hughes, 2001, Ochieng *et al.*, 2004).

Certaines galectines sont également capables de favoriser la fixation de cellules cancéreuses à d'autres cellules cancéreuses (agrégats homotypiques), à des types cellulaires différents (agrégats hétérotypiques) ou encore à des molécules de la MEC favorisant ainsi leur survie durant le phénomène métastatique. C'est notamment le cas de la Galectine-1 qui augmente la fixation des cellules cancéreuses ovariennes de Hamster chinois (CHO) et des cellules F9 de tératocarcinome murin à la laminine (Zhou *et al.*, 1993). Les Galectines-2, -4 et -8 favorisent également la fixation de cellules cancéreuses coliques aux cellules endothéliales (Barrow *et al.*, 2011). La Galectine-3 est observée au site d'adhésion des cellules cancéreuses formant des amas homotypiques ou hétérotypiques (Glinsky *et al.*, 2003). L'antigène T est impliqué dans ces phénomènes d'adhésion (Glinsky *et al.*, 2000). Dans les tumeurs du sein exprimant fortement la Galectine-3 a été observée une adhésion des cellules tumorales plus importante au niveau des cellules endothéliales (Khaldoyanidi *et al.*, 2003). De même, *in vitro*, des études ont montré que l'expression de la Galectine-3, dans un modèle cellulaire mammaire cancéreux, favorisait la formation de clusters de MUC1 et la fixation des cellules cancéreuses au niveau des cellules endothéliales pouvant permettre l'intravasation ou l'extravasation de ces cellules cancéreuses (Yu *et al.*, 2007). Il a été aussi montré que la Galectine-3 pouvait interagir avec l'intégrine $\alpha 1\beta 1$. De plus, l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est régulée par la Galectine-3 (Mataresse *et al.*, 2000). Le rôle de la Galectine-3 dans l'adhésion cellulaire pourrait impliquer les intégrines.

L'invasion cellulaire

La Galectine-3 est capable de moduler les processus permettant l'invasion cellulaire. En effet, l'ajout de Galectine-3 exogène dans le milieu extracellulaire de cellules cancéreuses mammaires favorise le passage de ces cellules à travers une matrice de Matrigel® (Le Marer *et al.*, 1996). Des résultats opposés ont cependant été observés dans le cas de cellules coliques cancéreuses humaines (Hittelet *et al.*, 2003). L'expression de Galectine-3 intracellulaire dans une lignée cancéreuse pulmonaire humaine favorise également la motilité et l'invasion cellulaires (O'Driscoll *et al.*, 2002). L'augmentation de la motilité en présence de Galectine-3 est associée à un remodelage du cytosquelette (Mataresse *et al.*, 2000). Les mécanismes par lesquels cette galectine modulerait le processus invasif au niveau intracellulaire restent non déterminés. Au niveau extracellulaire, l'interaction avec les intégrines est citée comme une hypothèse mécanistique.

La migration cellulaire

La Galectine-1 favorise la migration de cellules cancéreuses astrocytaires (Camby *et al.*, 2002) alors que la Galectine-8 diminue le pouvoir migratoire de certaines lignées cancéreuses coliques (Nagy *et al.*, 2002).

Des effets opposés ont aussi été observés pour une même galectine. C'est notamment le cas de la Galectine-3 exogène qui augmente la migration de cellules cancéreuses mammaires (Le Marer *et al.*, 1996) ou qui diminue la migration de cellules cancéreuses coliques (Hittelet *et al.*, 2003). Cette différence pourrait s'expliquer par les variations d'expressions des différents partenaires possibles de la Galectine-3.

Dans le PDAC, on observe une surexpression de la mucine membranaire MUC1 ainsi qu'une localisation membranaire circonférentielle de la protéine. De plus, MUC1 est localisée dans le cytoplasme des cellules tumorales, localisation associée à un mauvais pronostic par les anatomopathologistes. Outre ces anomalies, il existe une surexpression de la Galectine-3 dans les cellules tumorales pancréatiques. Les travaux antérieurs de l'équipe avaient montré le rôle de la Galectine-4 dans l'adressage apical de MUC1 au sein de cellules épithéliales de phénotype entérocytaire. La Galectine-4 est spécifiquement exprimée dans le tractus gastro-intestinal. Dans la littérature, les travaux de D. Delacour et collaborateurs avaient ensuite montré le rôle de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire des glycoprotéines des cellules MDCK. L'objectif de ce travail a ainsi été d'étudier l'implication de la Galectine-3 dans la distribution cellulaire et le rôle fonctionnel de MUC1, notamment son interaction avec l'EGFR, son récepteur associé, au sein de cellules tumorales pancréatiques humaines.

RÉSULTATS

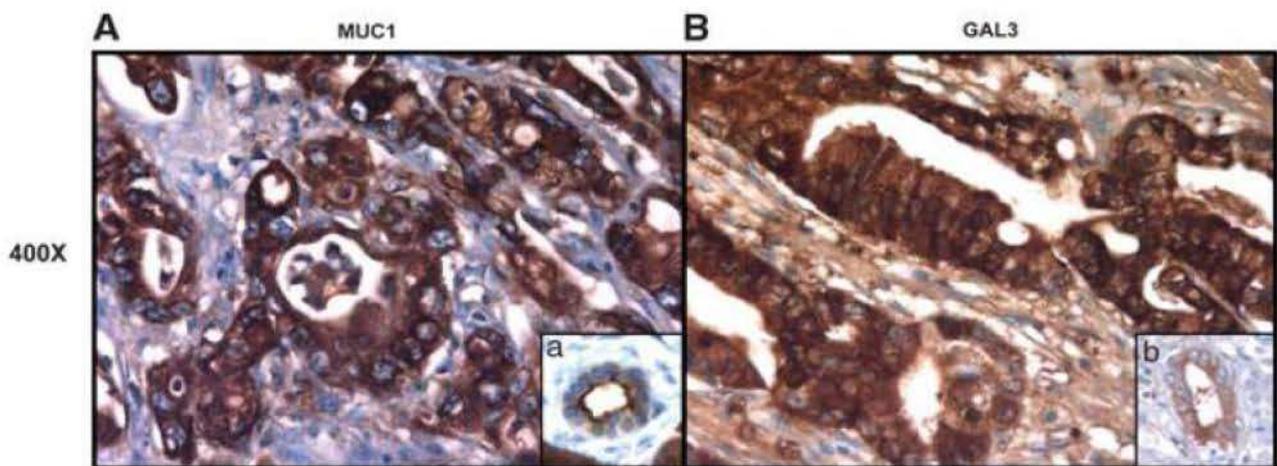


Figure 20 : **Expression de MUC1 et de la Galectine-3 dans le pancréas.** (A) Expression de MUC1 (214D4) dans le PDAC. (a) Expression de MUC1 dans le tissu pancréatique sain. (B) Expression de la Galectine-3 dans le PDAC. (b) Expression de la Galectine-3 dans le tissu sain. (X400)

RÉSULTATS

I. MUC1 et Galectine-3 dans le PDAC

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de MUC1 et de Galectine-3, par immunohistochimie sur une série de 16 PDAC humains. Deux images caractéristiques des marquages obtenus sont illustrées dans la figure 20 en comparaison avec des tissus contrôles.

La Galectine-3 et MUC1 sont toutes deux exprimées dans le tissu pancréatique sain (**Figure 20, a et b**). MUC1 est faiblement exprimée dans les cellules épithéliales canalaire pancréatiques et présente une distribution cellulaire polarisée avec une localisation essentiellement au pôle apical. MUC1 est également présente dans le cytoplasme (**Figure 20, a**). La Galectine-3 est, quant à elle, exprimée faiblement à la fois dans les cellules épithéliales canalaire pancréatiques et les cellules du stroma pancréatique. Elle est retrouvée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules (**Figure 20, b**).

En conclusion, dans le PDAC, MUC1 est surexprimée par les cellules pancréatiques cancéreuses et présente une distribution circonférentielle sur toute la membrane cellulaire, traduisant la perte de polarité dans la distribution membranaire de MUC1 au sein des cellules tumorales pancréatiques. MUC1 est aussi présente dans le cytoplasme. La Galectine-3 est surexprimée dans le tissu tumoral pancréatique par rapport au tissu sain. Elle présente une localisation cytoplasmique et nucléaire en condition normale et pathologique.

II. Etablissement de modèles cellulaires du cancer du pancréas invalidés pour la Galectine-3

Afin d'étudier le rôle éventuel de Galectine-3 dans l'expression et la distribution cellulaire de MUC1 dans le PDAC, nous avons établi des modèles cellulaires de PDAC dans lesquels l'expression de Galectine-3 a été inhibée par la technique de l'ARN interférence.



Figure 21 : Analyse de l'expression de Galectine-3 par RT-PCR et western-blot Galectine-3 sur les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour l'expression de Galectine-3. (a) RT-PCR sur les lignées Capan-1 invalidées pour Galectine-3. (b) Western-blot sur les lignées Capan-1 invalidées pour l'expression de Galectine-3. Sh1, Sh2 et Sh3 : *small hairpin RNA* 1, 2 et 3. Rs : vecteur vide. Sc : *scramble*.

Pour cette étude, nous avons sélectionné la lignée cellulaire humaine Capan-1, cellules de PDAC ayant conservé une morphologie de cellules épithéliales polarisées. Cette caractéristique était indispensable pour l'étude des aspects de trafic intracellulaire. La technique de *small hairpin RNA* (*shRNA*) a été utilisée afin d'inhiber l'expression de Galectine-3 de façon stable. Trois constructions *shRNA*, associées à un gène de résistance à la puromycine, ont été transfectées séparément de manière stable dans la lignée Capan-1 par infection rétrovirale. Les cellules transfectées ont ensuite été sélectionnées grâce à leur résistance à la puromycine. Trois lignées ont été ainsi établies : Capan-1 Sh1, Sh2 et Sh3.

L'efficacité d'inhibition de la transcription et de l'expression a été évaluée par RT-PCR semi quantitative et western-blot.

L'étude par RT-PCR a mis en évidence une inhibition du taux de transcrite du gène *LGALS3* pour les constructions Sh1 et Sh3 mais pas pour la construction Sh2. Les pourcentages d'inhibition obtenus par intégration densitométrique est respectivement de 99 % pour Sh1 et 90 % pour Sh3 (**Figure 21, a**).

L'étude par western-blot, quant à elle, a mis en évidence une inhibition d'expression de Galectine-3 pour les 3 constructions Sh1, Sh2 et Sh3. Ainsi, il semble que la construction Sh2 entraîne un blocage de la traduction de l'ARNm de *LSGAL3* visible uniquement en western-blot alors que les constructions Sh1 et -3 entraînent une dégradation de l'ARNm de *LGALS3* visible en RT-PCR. Au niveau protéique, les pourcentages d'inhibition évalués après intégration densitométrique sont de **95 %** pour Sh1, **68 %** pour Sh2 et **100 %** pour Sh3 (**Figure 21, b**). Une analyse transcriptomique a été effectuée afin de rechercher une éventuelle non spécificité de nos constructions vis-à-vis des autres galectines. Aucune variation du taux de transcription des autres galectines n'a été observée (non montré).

Ainsi, les modèles cellulaires Sh1 et Sh3 étaient satisfaisants pour envisager l'étude du rôle de la Galectine-3.

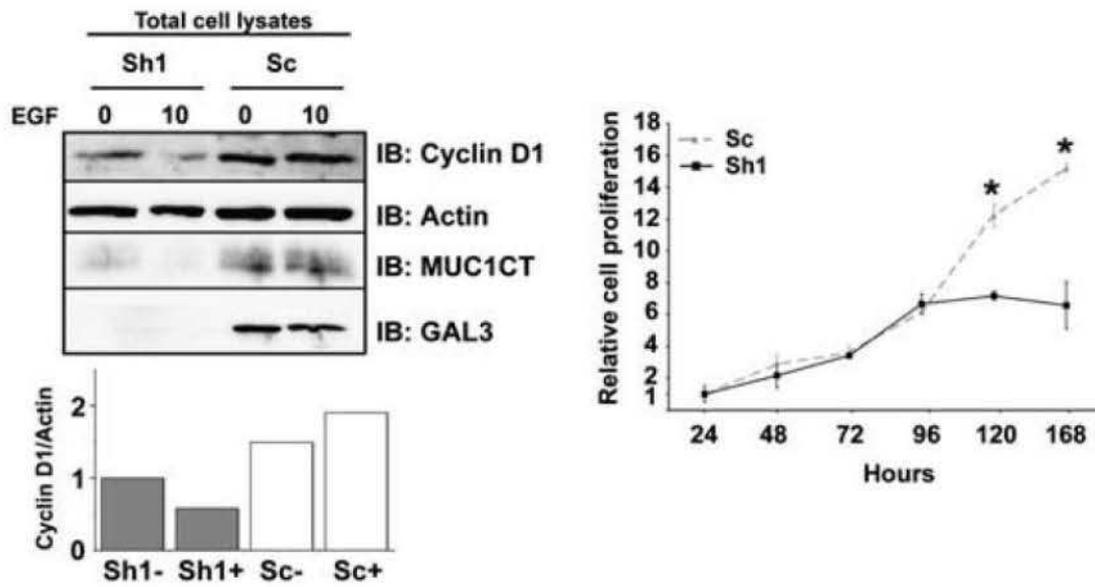


Figure 22 : Expression de la cycline D1 et prolifération cellulaire dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour l'expression de Galectine-3.

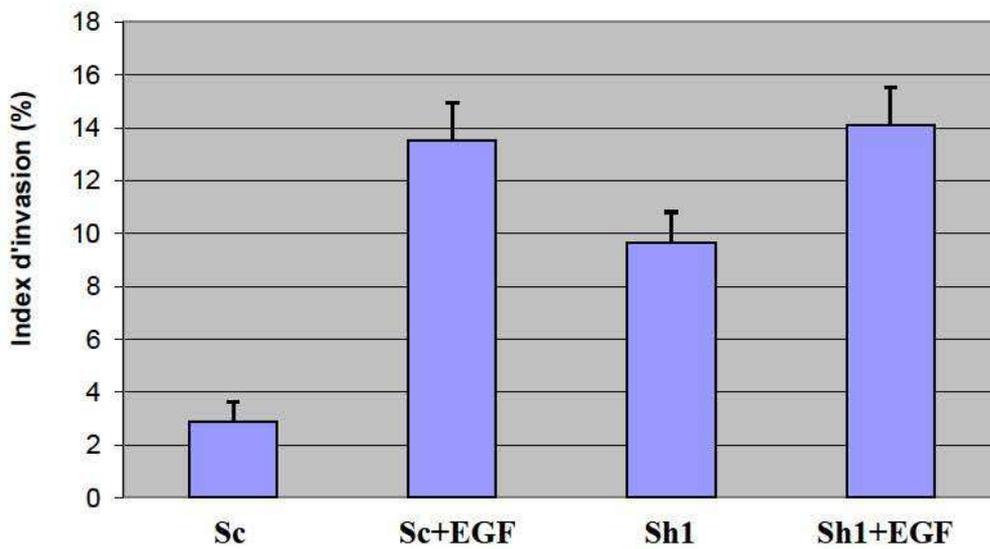


Figure 23 : Pourcentage de cellules invasives dans le collagène de type I dans les cellules Capan-1 contrôles et invalidées pour Galectine-3 en condition contrôle et après traitement par l'EGF.

III. Etude du rôle de Galectine-3 sur la prolifération cellulaire et les capacités invasives des cellules tumorales pancréatiques

L'expression de la cycline D1 qui est associée à la prolifération cellulaire est régulée notamment par la localisation nucléaire de l'EGFR, de MUC1CT et de Galectine-3 (Lin et al., 2001). Le mécanisme est dépendant d'interactions entre MUC1CT et Galectine-3 avec la β -caténine, de son accumulation et de sa stabilisation (Wen et al., 2003, Song et al., 2009). Dans les modèles traités préalablement ou non par l'EGF, nous avons réalisé une étude de l'expression de la Cycline D1 par western-blot ainsi que des tests de prolifération.

Dans nos modèles cellulaires, la Cycline D1 est plus fortement exprimée en présence de Galectine-3 avec ou sans traitement préalable à l'EGF (**Figure 22, A**). Ces résultats sont concordants avec la diminution de la prolifération cellulaire observée dans les cellules invalidées pour l'expression de la Galectine-3 par rapport à la lignée Capan-1 Sc (**Figure 22, B**). Enfin, en présence de Galectine-3, le taux de MUC1CT observé est plus important qu'en absence de Galectine-3 (**Figure 22, A**).

En conclusion la présence de la Galectine-3 régule positivement l'expression de la cycline D1 et la prolifération cellulaire.

En collaboration avec le Docteur Olivier de Wever du laboratoire de cancérologie expérimentale de l'université libre de Gand, des tests d'invasion en matrice de collagène de type 1 ont été réalisés avec ou sans traitement préalable par l'EGF. Les cellules contrôles présentent un indice d'invasion faible de 3 %. La stimulation des cellules par l'EGF induit une augmentation de l'invasion cellulaire (13,5 %). En absence de Galectine-3, les cellules ont un potentiel invasif supérieur sans stimulation par l'EGF (10 %). Le pourcentage de cellules invasives après traitement par l'EGF (14,2 %) rejoint le taux observé dans les cellules contrôles traitées par l'EGF (**Figure 23**).

Ainsi l'absence de Galectine-3 semble augmenter le potentiel invasif des cellules.

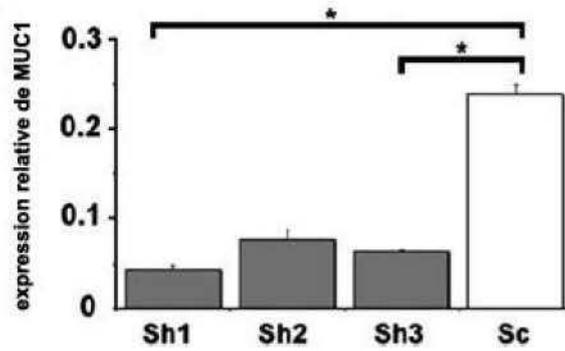


Figure 24 : Etude qPCR de l'expression de *MUC1* dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour Galectine-3.

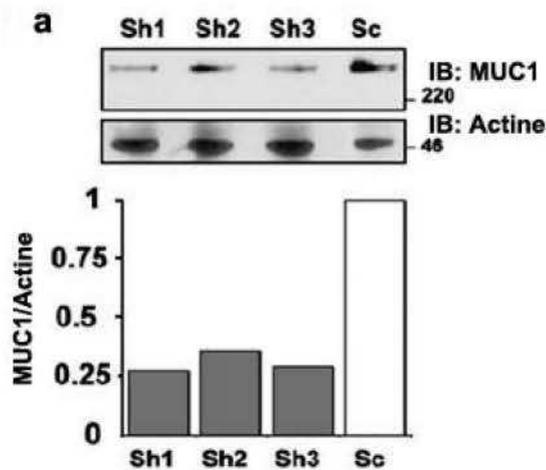


Figure 25 : Western-blot de MUC1 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour Galectine-3.

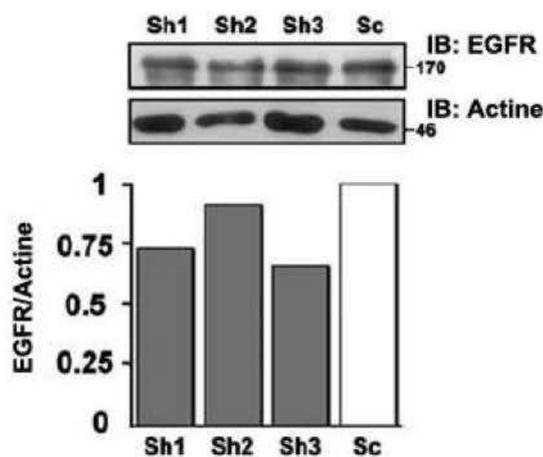


Figure 26 : Western-blot de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidées pour Galectine-3

IV. Effet de l'inhibition de l'expression de la Galectine-3 sur l'expression et la distribution cellulaire de MUC1 et de l'EGFR

Nous avons étudié l'expression de MUC1 et de l'EGFR dans les modèles cellulaires invalidés ou non pour Galectine-3.

L'étude par qPCR a révélé une diminution du taux du transcrit *MUC1* pour les constructions Sh1 (83 %), Sh2 (69 %) et Sh3 (74 %) par rapport au témoin Sc (**Figure 24**).

L'étude par western-blot de MUC1 a mis en évidence une forte diminution d'expression pour les trois constructions (Sh1, Sh2 et Sh3) par rapport au témoin Sc. Les pourcentages d'inhibition évalués après intégration densitométrique étaient de 75 % pour Sh1, 67 % pour Sh2 et 72 % pour Sh3 (**Figure 25**). Ainsi l'inhibition de l'expression de la Galectine-3 s'accompagne d'une inhibition de l'expression de MUC1.

En ce qui concerne l'EGFR, l'étude par western-blot a mis en évidence une légère diminution d'expression pour les trois constructions (Sh1, Sh2 et Sh3). Les pourcentages d'inhibition évalués après intégration densitométrique étaient de 26 % pour Sh1, 10 % pour Sh2 et 30 % pour Sh3 (**Figure 26**).

Suite à ces résultats, nous avons sélectionné la lignée Capan-1 Sh1 et le témoin Sc pour le reste de l'étude.

V. Influence de la Galectine-3 sur l'interaction MUC1-EGFR et sur l'activation de l'EGFR

Il a été décrit que MUC1 peut interagir avec l'EGFR et ainsi moduler les voies de signalisation en aval de ce récepteur. L'interaction entre MUC1 et l'EGFR semble être modulée par l'activation du récepteur (Li et al., 2001). Nous avons donc étudié le rôle de la Galectine-3 dans cette interaction à l'aide des modèles établis après traitement par l'EGF ou

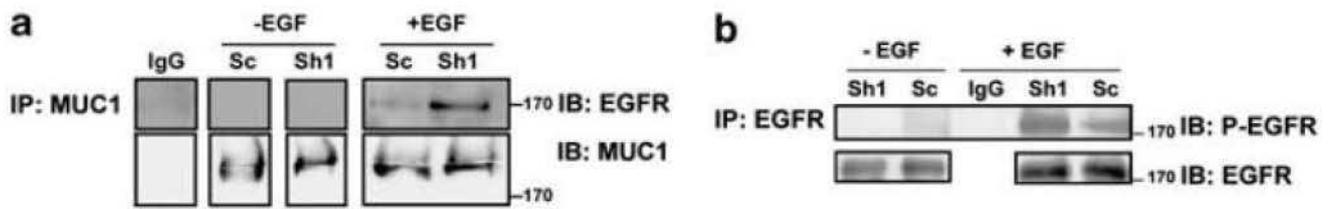
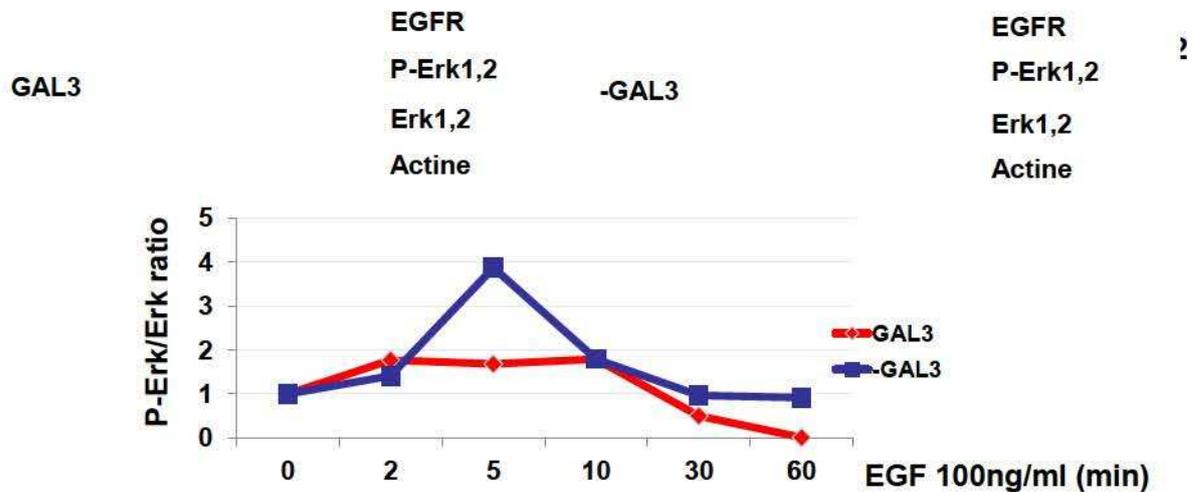


Figure 27 : Rôle de Galectine-3 dans l'interaction MUC1-EGFR dans les lignées Capan-1 contrôlée et invalidée pour Galectine-3. (a) Immunoprécipitation de MUC1 et western-blot de l'EGFR sur des lysats cellulaires traités au non par l'EGF. (b) Immunoprécipitation de l'EGFR

Interaction MUC1-EGFR (2)



Augmentation de l'intensité de la voie ERK1,2 en absence de GAL3

(Merlin et al., Oncogene, 2011)

10, 30 et 60 minutes.

sans traitement préalable. Nous avons effectué une immunoprécipitation de MUC1 puis le complexe a été analysé par immunoblot avec un anticorps anti-EGFR.

La présence de l'EGFR dans l'immunoprécipité de MUC1 n'a pas été détectée à partir des cellules non stimulées par l'EGF, que ce soit dans les cellules contrôles ou les cellules invalidées pour Galectine-3. En revanche, après stimulation par l'EGF, l'EGFR a pu être détecté dans l'immunoprécipité de MUC1, en quantité faible dans les cellules contrôles mais beaucoup plus importante dans les cellules invalidées pour Galectine-3. **Ce résultat suggère que la présence de Galectine-3 inhibe l'interaction MUC1/EGFR (Figure 27, a).** A la vue de ces résultats, nous avons ensuite décidé d'étudier l'état d'activation de ce récepteur. Nous avons effectué une immunoprécipitation de l'EGFR puis l'activation du récepteur a été analysée par immunoblot avec un anticorps anti-Phospho-EGFR (Tyr¹¹⁷³ qui permet l'activation de la voie Erk). **En absence de Galectine-3 et après stimulation par l'EGF, le récepteur est activé de façon plus importante (Figure 27, b).**

Nous avons ensuite envisagé l'étude de l'activation de l'EGFR et des kinases en aval de cette voie de signalisation, Erk1, -2 suite au traitement par l'EGF. Le temps de stimulation par l'EGF a été de 10 min et le suivi a été réalisé en cinétique jusqu'à 60 min.

Les résultats montrent que le taux maximal de phosphorylation de Erk1, -2, représentatif de l'activation de la voie Erk, est plus important en absence de Galectine-3 (ratio pErk/Erk \approx 3,8). L'activation maximale est atteinte à environ 5 min et revient à un taux basal (\approx 30 min) (Figure 28). En présence de Galectine-3, la voie Erk est activée de façon moindre, le taux maximal d'activation (ratio pErk/Erk étant de 1,8. Le maximum est obtenu rapidement à environ 2 min et reste stable jusqu'à environ 10 min puis redescend lentement pour retrouver un taux basal au bout de 20 min environ (Figure 28).

Ainsi, l'inhibition de l'expression de la Galectine-3 semble favoriser une activation longue et forte de la voie Erk1, -2.

VI. Rôle de la Galectine-3 dans la localisation de MUC1 et de l'EGFR

L'EGFR, outre son rôle dans l'activation de la voie RAS/RAF/MAPK, a été observé dans le noyau et décrit comme facteur activateur de la transcription de certains gènes cibles

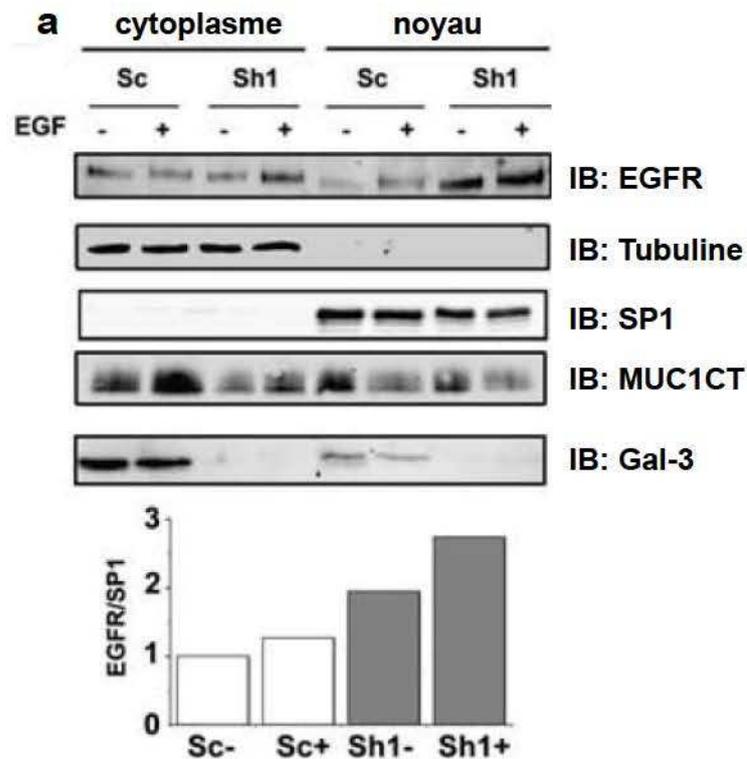


Figure 29 : Rôle de Galectine-3 dans la localisation de MUC1CT et de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3. Western-blot de l'EGFR, MUC1CT et Galectine-3 sur des lysats nucléo-cytoplasmiques traités au non à l'EGF.

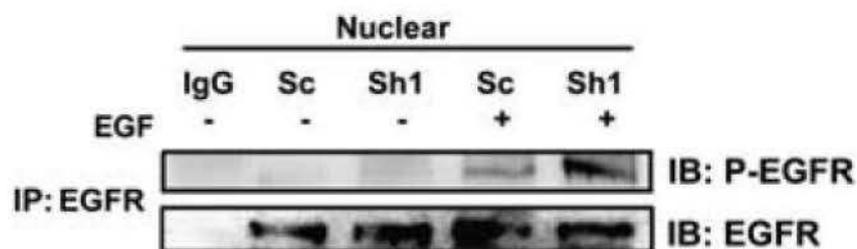


Figure 30 : Fraction nucléaire d'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3. Immunoprécipitation de l'EGFR nucléaire et western-blot P-EGFR sur des lysats nucléaires traités ou non à l'EGF.

dont celui codant la cycline D1, le gène *CCND1* (Lin et *al.*, 2001). De même, la queue cytoplasmique de MUC1, MUC1CT, peut-être retrouvée dans le noyau où elle joue également un rôle dans la transcription de certains gènes cibles. Nous avons ainsi étudié si la Galectine-3 jouait un rôle dans la localisation nucléaire de l'EGFR et de MUC1.

Des fractions nucléaires et cytoplasmiques ont été recueillies à partir des différents types cellulaires avec ou sans traitement à l'EGF et étudiées par western-blot. L'EGFR a été retrouvé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des différents types cellulaires. Cependant en absence de Galectine-3, **une translocation nucléaire plus importante de l'EGFR est observée** (x2,2). Le traitement par l'EGF favorise cette localisation nucléaire dans les cellules contrôles et dans les cellules invalidées pour la Galectine-3 (**Figure 29**).

MUC1CT est aussi retrouvée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Contrairement à l'EGFR, **aucune modification de localisation** n'est observée en absence de Galectine-3 par rapport à la lignée cellulaire contrôle (**Figure 29**).

Ainsi, l'inhibition de Galectine-3 semble jouer un rôle dans la localisation nucléaire de l'EGFR mais pas celle de MUC1CT. Le phénomène de translocation nucléaire de l'EGFR est amplifié suite à un traitement par l'EGF.

Afin d'étudier si l'EGFR nucléaire était phosphorylé, une immunoprécipitation de l'EGFR nucléaire a été réalisée. **Les résultats ont montré que l'EGFR nucléaire est composée à la fois d'EGFR non phosphorylé et phosphorylé.** Le traitement par l'EGF augmente la proportion d'EGFR phosphorylé dans le noyau (**Figure 30**).

Par la suite, nous nous sommes intéressé au mécanisme dépendant de la Galectine-3 impliqué dans la modulation de la translocation nucléaire de l'EGFR. L'une des hypothèses serait une séquestration de l'EGFR dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'être transloqué dans le noyau. Afin de mettre en évidence une éventuelle interaction entre ces deux

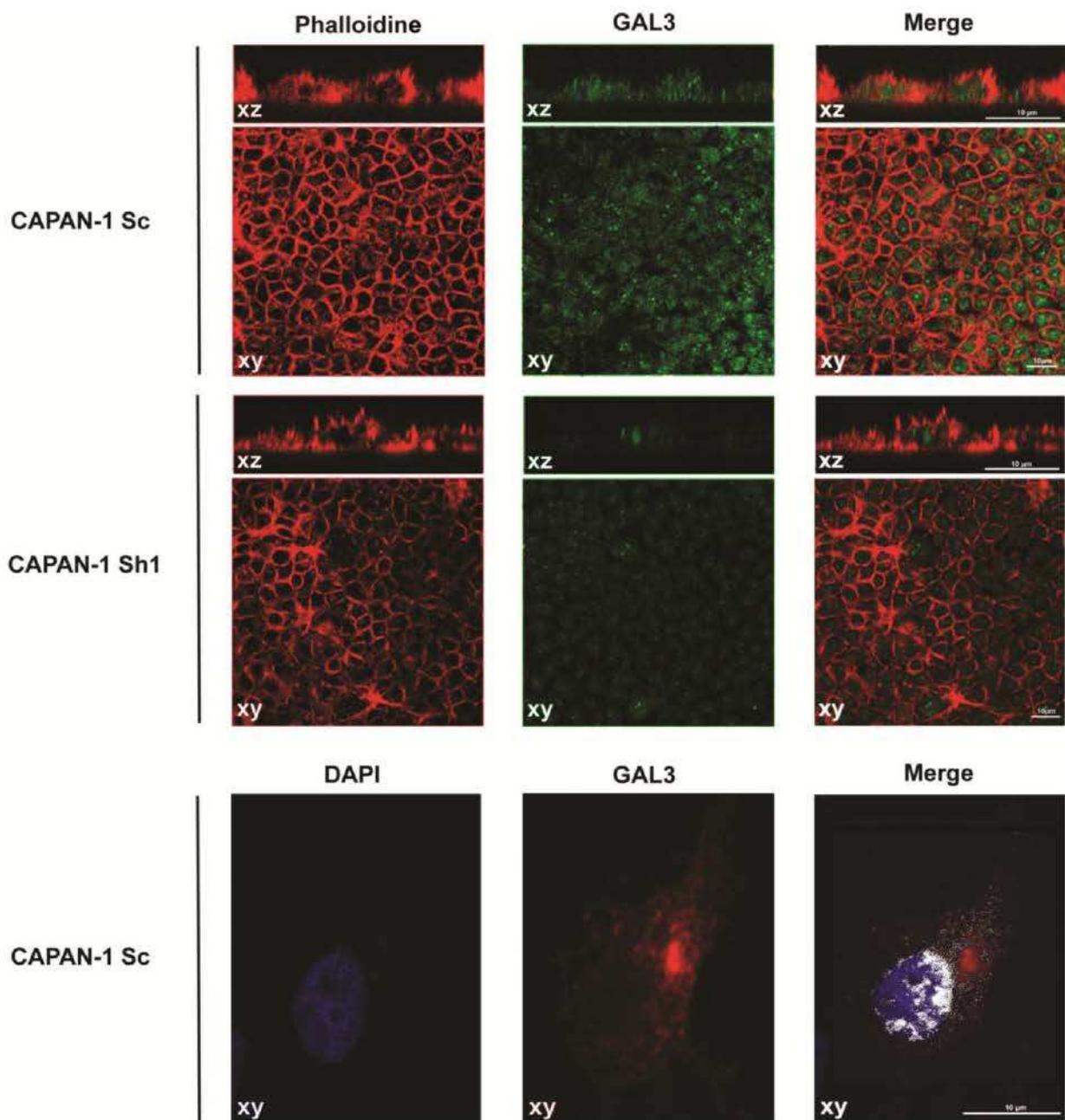


Figure 31 : Expression et localisation de Galectine-3 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3. Etude de la distribution cellulaire de Galectine-3 dans nos modèles cellulaires pancréatiques en microscopie confocale. Des co-marquages avec la phalloïdine (actine) et le DAPI (noyau) ont été réalisés. Des sections XZ allant du pôle apical au pôle basolatéral des cellules et des sections transversales XY ont été réalisées.

partenaires dans le cytoplasme, nous avons réalisé une immunoprécipitation de la Galectine-3 cytoplasmique et nous avons cherché la présence d'un éventuel complexe EGFR/Galectine-3 à l'aide d'un anticorps anti-EGFR.

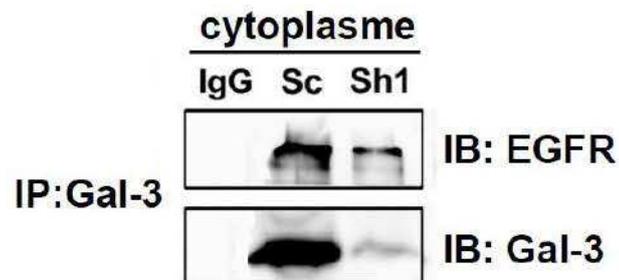


Figure 32 : **Interaction Galectine-3/EGFR dans le cytoplasme des lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3.** Immunoprécipitation de Galectine-3 cytoplasmique et western-blot EGFR.

Un complexe EGFR/Galectine-3 est observé dans le cytoplasme des cellules Capan-1. Comme attendu dans la lignée invalidée pour Galectine-3, seule une très faible quantité de Galectine-3 a été retrouvée dans l'immunoprécipité de l'EGFR exprimant encore une très faible quantité de Galectine-3 malgré l'ARN interférence (**Figure 32**).

Ainsi **Galectine-3 et l'EGFR semble interagir dans le cytoplasme.**

VII. Rôle de la Galectine-3 dans la localisation cellulaire de MUC1

Le fait que Galectine-3 module l'interaction MUC1/EGFR et les voies de signalisation en aval de l'EGFR pourrait s'expliquer par un changement de localisation des différents acteurs dans la cellule. La Galectine-3 est décrite comme une protéine synthétisée dans le cytoplasme, mais elle peut présenter ensuite différentes localisations suite à son trafic intracellulaire. Nous avons étudié la distribution cellulaire de la Galectine-3 dans les cellules Capan-1 en utilisant un double marquage par la phalloïdine (actine cytoplasmique) d'une part, et par le DAPI (noyau) d'autre part.

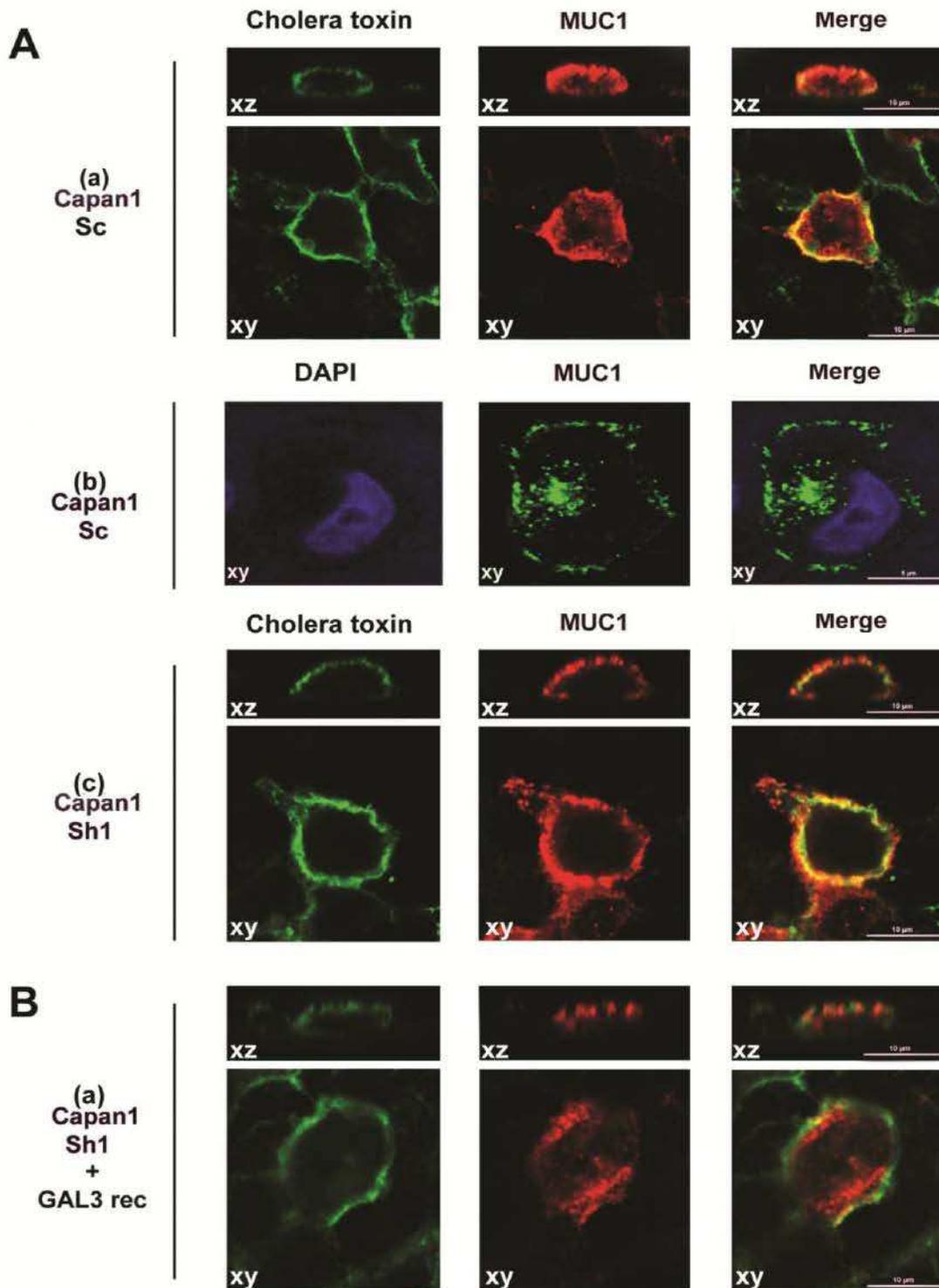


Figure 33 : Localisation cellulaire de MUC1 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3. (A) Etude de la distribution cellulaire de MUC1 en microscopie confocale. Des co-marquages par la toxine cholérique (membrane plasmique) et par le DAPI (noyau) ont été réalisés. Des sections XZ allant du pôle apical au pôle basolatéral des cellules et des sections transversales XY ont été réalisées. (B) Effet de la Galectine-3 recombinante sur la localisation de MUC1.

Les résultats montrent que la Galectine-3 est retrouvée à la surface cellulaire, dans le cytoplasme et le noyau des cellules Capan-1 Sc (**Figure 31**). Comme attendu, l'expression de la Galectine-3 est fortement inhibée dans la lignée Capan-1 Sh1.

Nous avons étudié l'impact de l'inhibition de la Galectine-3 sur la distribution cellulaire de MUC1 en utilisant d'une part un marquage de la membrane plasmique à l'aide de la toxine cholérique et d'autre part un marquage du noyau à l'aide du DAPI. MUC1 a été détectée à l'aide de l'anticorps 214D4 qui reconnaît la région extracellulaire de MUC1.

Dans les cellules Capan-1 exprimant Galectine-3, MUC1 est localisée à la **membrane cellulaire, de façon circonférentielle** comme le montre le co-marquage avec la toxine cholérique (**Figure 33, A (a)**). De plus, comme observé dans le PDAC, MUC1 est **présent dans le cytoplasme des cellules** (**Figure 33, A (a)**). Avec l'anticorps 214D4 qui reconnaît la partie extracellulaire de MUC1, aucun marquage n'est retrouvé au niveau nucléaire (**Figure 33, A (b)**). Dans les cellules Capan-1 invalidées pour Galectine-3 Sh1, MUC1 est retrouvée au niveau de la membrane cellulaire de façon circonférentielle, mais pas dans le cytoplasme (**Figure 33, A (c)**). Afin d'établir clairement la relation entre la Galectine-3 et la présence de MUC1 dans le cytoplasme, nous avons étudié l'effet de Galectine-3 recombinante ajoutée de façon exogène dans le milieu de culture des cellules Capan-1 invalidées pour Galectine-3. Au bout de 36 h d'incubation en présence de Galectine-3, **une redistribution cytoplasmique de MUC1 est observée dans les cellules** (**Figure 33, B (a)**).

Nous avons fait appel à une analyse complémentaire en cytométrie en flux pour étudier la localisation membranaire (**Figure 35, A**) et cytoplasmique (**Figure 35, B**) de MUC1 dans les cellules contrôle et invalidées pour Galectine-3 en comparant les profils obtenus avec et sans perméabilisation membranaire. Les résultats ont permis de mettre en évidence que **la mucine MUC1 est localisée dans le cytoplasme des cellules exprimant Galectine-3 mais pas dans le cytoplasme des cellules invalidées pour la Galectine-3** (**Figure 35, B**).

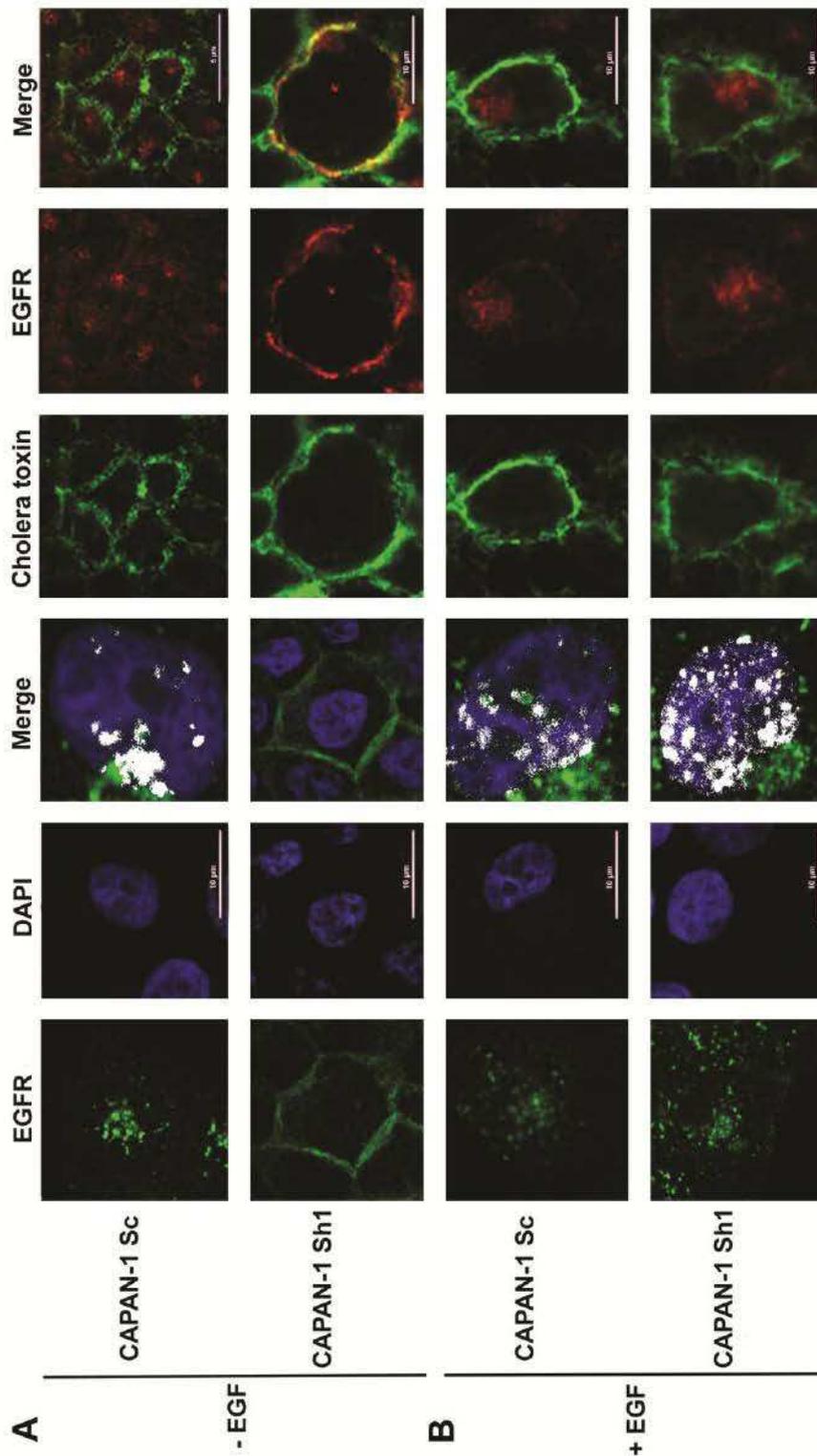


Figure 34 : Localisation cellulaire de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3. Etude de la distribution cellulaire de l'EGFR en microscopie confocale. Des co-marquages par la toxine cholérique (membrane plasmique) et par le DAPI (noyau) ont été réalisés : (A) Sans traitement par l'EGF et (B) Avec traitement par l'EGF.

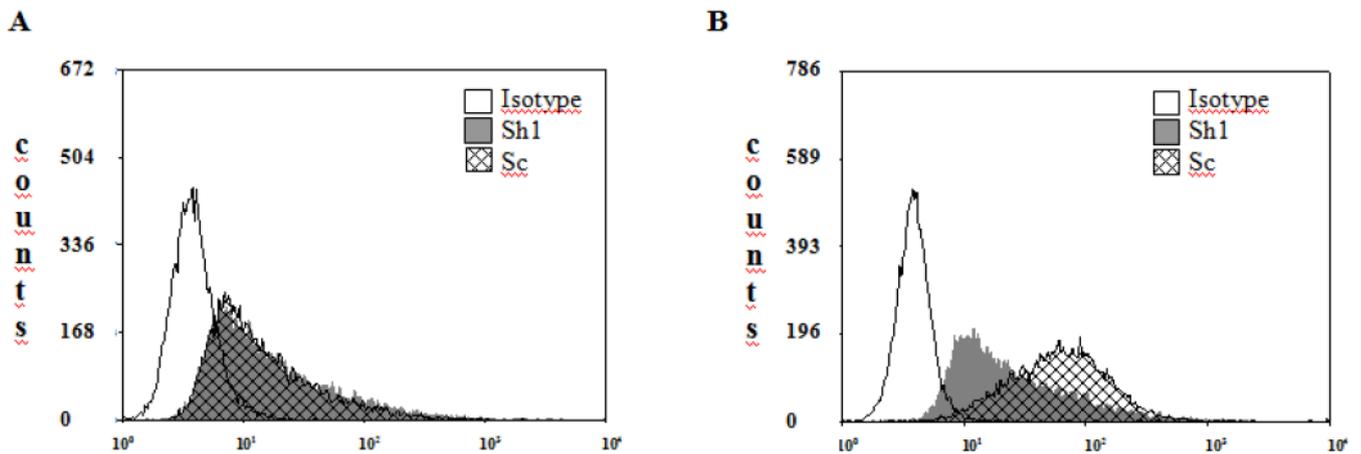


Figure 35 : Expression de MUC1 membranaire et totale des lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3. Etude de l'expression de MUC1 par cytométrie en flux : (A) sans perméabilisation et (B) avec perméabilisation.

Ainsi Galectine-3 est responsable de la présence intracytoplasmique de MUC1 dans les cellules Capan-1. Deux hypothèses peuvent expliquer la présence de MUC1, accumulée, dans le cytoplasme des cellules tumorales pancréatiques (i) un défaut d'adressage membranaire ou (ii) une intensification de l'endocytose de MUC1.

Etant donné les interactions mises en évidence entre la Galectine-3 et l'EGFR, nous avons également étudié l'influence de Galectine-3 sur la distribution cellulaire de l'EGFR en microscopie confocale sur nos lignées cellulaires préalablement traitées ou non à l'EGF.

VIII. Rôle de la Galectine-3 dans la localisation cellulaire de l'EGFR

En absence de traitement par l'EGF et en présence de Galectine-3, le récepteur est retrouvé dans le cytoplasme, dans la région périnucléaire ainsi que dans le noyau (**Figure 34 A**). Le traitement par l'EGF dans ces cellules ne change pas la distribution de l'EGFR. En absence de Galectine-3 et de traitement à l'EGF, l'EGFR perd sa localisation cytoplasmique et devient membranaire (**Figure 34 A**). Le traitement par l'EGF de ces cellules induit la localisation cytoplasmique et nucléaire du récepteur (**Figure 34 B**).

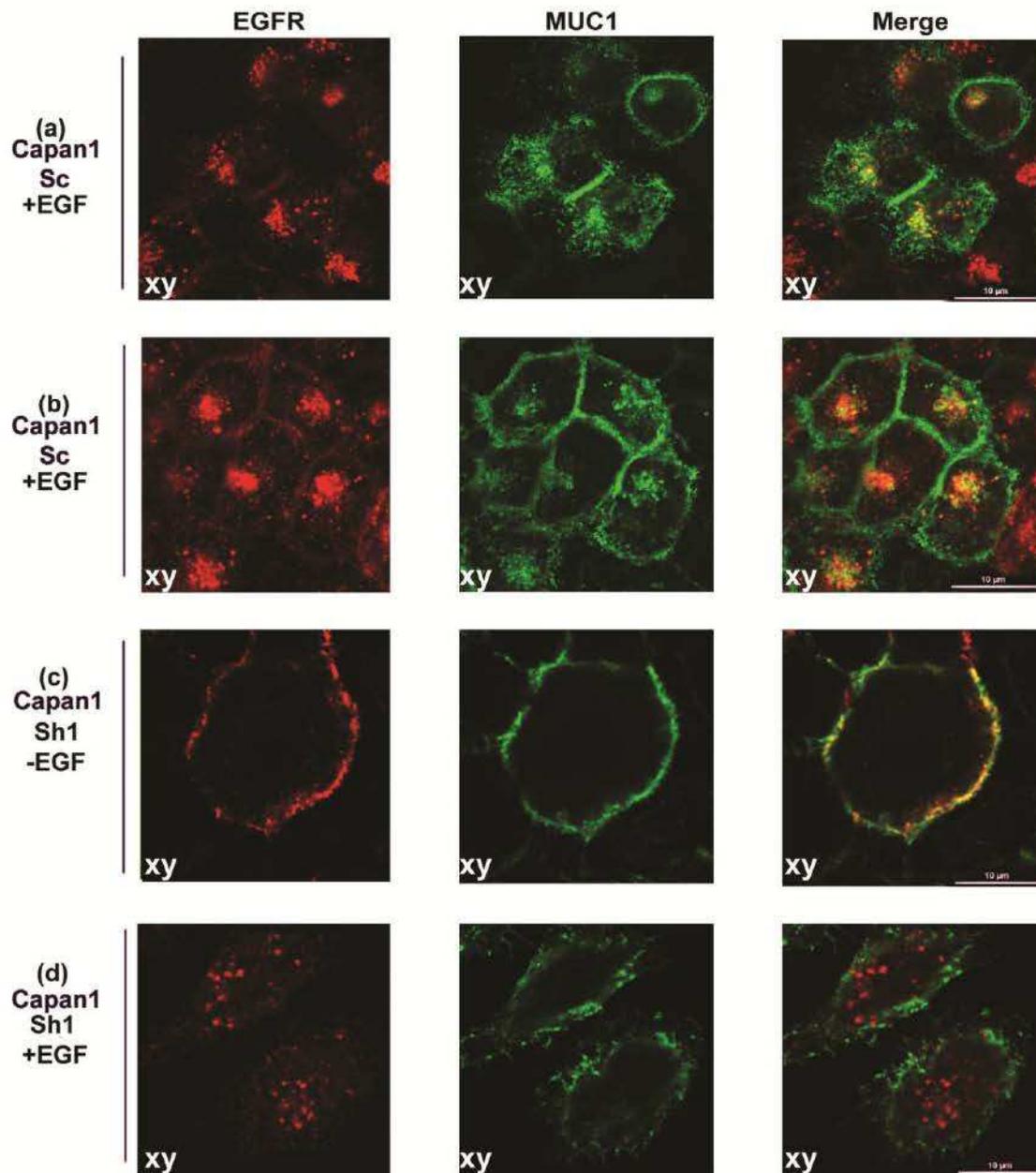


Figure 36 : **Colocalisation MUC1/EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3.** Etude de la distribution cellulaire de l'EGFR et de MUC1 en microscopie confocale. Des co-marquages de l'EGFR et MUC1 ont été réalisés : **(a)** dans la lignée Capan-1 contrôle sans traitement par l'EGF, **(b)** dans la lignée Capan-1 contrôle avec traitement par l'EGF, **(c)** dans la lignée Capan-1 invalidée Galectine-3 sans traitement par l'EGF et **(d)** dans la lignée Capan-1 invalidée Galectine-3 avec traitement par l'EGF.

Ainsi il est possible de suggérer que Galectine-3 induit l'endocytose de l'EGFR en absence de traitement à l'EGF dans les cellules tumorales pancréatiques Capan-1. Cette endocytose de l'EGFR est associée à une activation du récepteur comme observée lors de l'immuno-précipitation de l'EGFR (Figure 27).

IX. Localisation de MUC1 et l'EGFR

Les analyses biochimiques ont mis en évidence qu'en absence de Galectine-3, MUC1 et l'EGFR interagissent fortement. Les analyses de microscopie ont, quant à elles, montré que ces deux partenaires étaient localisés au niveau cytoplasmique et/ou à la membrane cellulaire dans les cellules contrôle et uniquement à la membrane cellulaire en absence de Galectine-3. Des co-marquages MUC1/EGFR ont été réalisés dans le but de mettre en évidence des co-localisations de ces partenaires.

En absence de traitement par l'EGF et en présence de Galectine-3, MUC1 et l'EGFR sont colocalisés au niveau cytoplasmique dans des compartiments intracellulaires (**Figure 36, (a)**). Le traitement par l'EGF semble induire une augmentation de la colocalisation cytoplasmique des deux partenaires (**Figure 36, (b)**). En absence de traitement par l'EGF et de Galectine-3, MUC1 et l'EGFR sont colocalisés à la membrane cellulaire (**Figure 36, (c)**). Comme observé précédemment, le traitement par l'EGF induit l'endocytose du récepteur et la perte de la colocalisation de ces partenaires (**Figure 36, (d)**).

Ainsi, en présence de Galectine-3, MUC1 et l'EGFR sont colocalisés dans des compartiments intracellulaires alors qu'en absence de Galectine-3 ils sont colocalisés à la membrane cellulaire.

X. Endocytose de MUC1 et l'EGFR

Ainsi, l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer la localisation intracellulaire de MUC1 et de l'EGFR dans les cellules contrôles est l'endocytose. Selon cette hypothèse,

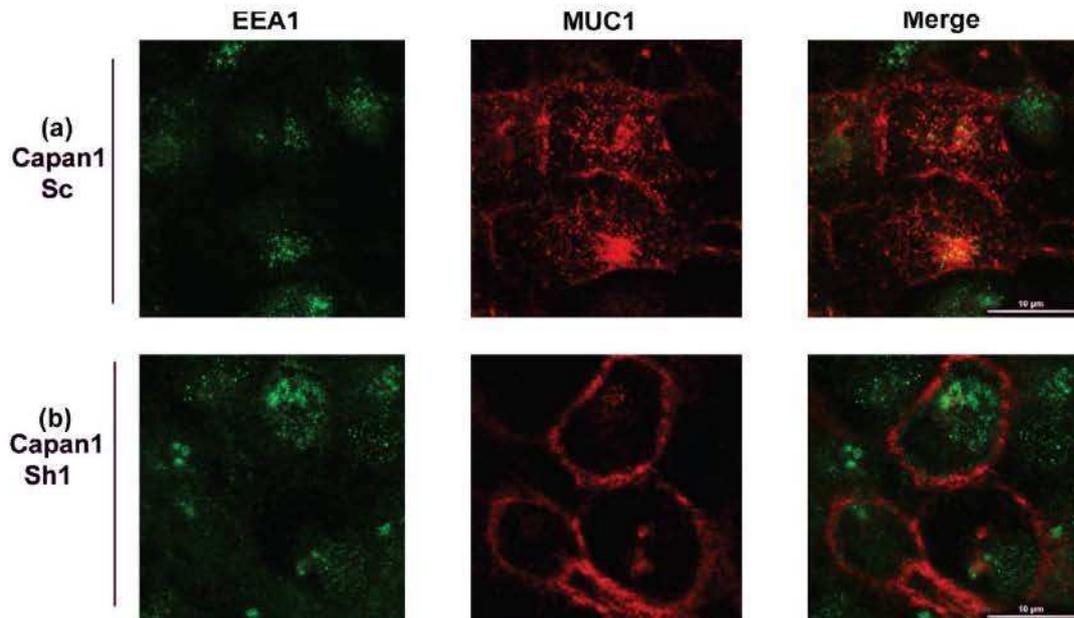


Figure 37 : **Endocytose de MUC1 dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3.** Etude de l'endocytose de MUC1 en microscopie confocale. Un co-marquage avec EEA1 (endosomes précoces) a été réalisé : **(a)** dans la lignée Capan-1 contrôle et **(b)** dans la lignée Capan-1 invalidée Galectine-3.

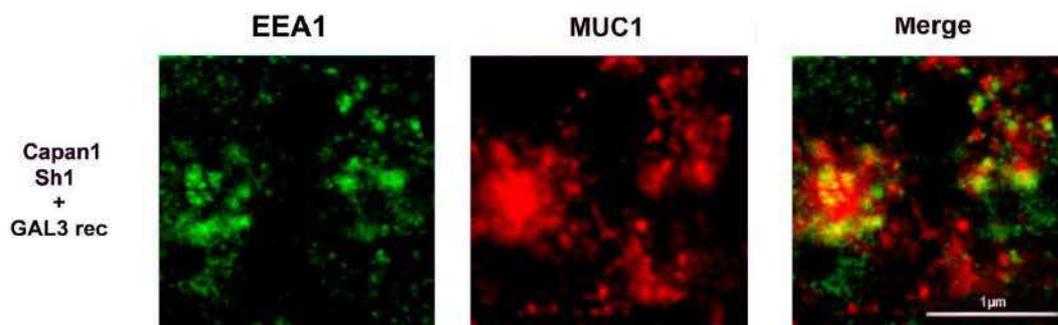


Figure 38 : **Endocytose de MUC1 restaurée dans la lignée Capan-1 invalidée pour Galectine-3 après ajout de Galectine-3 recombinante.** Etude de l'endocytose de MUC1 en microscopie confocale. Un co-marquage avec EEA1 (endosomes précoces) a été réalisé après ajout de Galectine-3 recombinante dans le milieu extracellulaire durant 36 heures.

l'endocytose de MUC1 et de l'EGFR serait régulée par Galectine-3. Nous avons ainsi étudié le phénomène d'endocytose de MUC1 et de l'EGFR en utilisant un co-marquage des endosomes précoces avec le marqueur EEA1.

En présence de Galectine-3, MUC1 est colocalisée à l'intérieur des cellules avec EEA1 marqueur d'endosomes précoces (**Figure 37, (a)**) contrairement aux cellules invalidées pour Galectine-3 où MUC1 est uniquement membranaire (**Figure 37, (b)**). Afin d'établir clairement la relation entre la Galectine-3 et l'endocytose de MUC1, nous avons étudié l'effet provoqué par l'addition de Galectine-3 recombinante dans le milieu de culture des cellules Capan-1 invalidées pour Galectine-3. Au bout de 36 h, MUC1 est colocalisée dans les endosomes précoces (**Figure 38**). Ainsi, la présence de Galectine-3 est nécessaire pour l'endocytose de MUC1. Nous avons ensuite étudié l'EGFR.

En présence de Galectine-3, la colocalisation de l'EGFR avec EEA1 dans les cellules contrôles et traitées met en évidence que l'EGFR est endocyté en condition sans EGF et avec traitement par l'EGF (**Figure 39, (a) et (b)**). En ce qui concerne le récepteur, en absence de Galectine-3 et de traitement par l'EGF, aucune colocalisation n'est visible puisque le récepteur est localisé essentiellement à la membrane (**Figure 39, (c)**). Le traitement par l'EGF, comme attendu, provoque la colocalisation de l'EGFR et de EEA1 mettant en évidence l'endocytose du récepteur (**Figure 39, (d)**).

Ainsi MUC1 et l'EGFR sont bien endocytés en présence de Galectine-3. De plus, en présence de Galectine-3, l'EGFR semble activé de manière constitutive, comme vu précédemment (Figure 27), ce qui expliquerait sa localisation cytoplasmique dans les cellules tumorales pancréatiques Capan-1. En absence de Galectine-3, MUC1 et l'EGFR ne sont pas endocytés en conditions basales. En revanche, le traitement par l'EGF induit l'endocytose de l'EGFR.

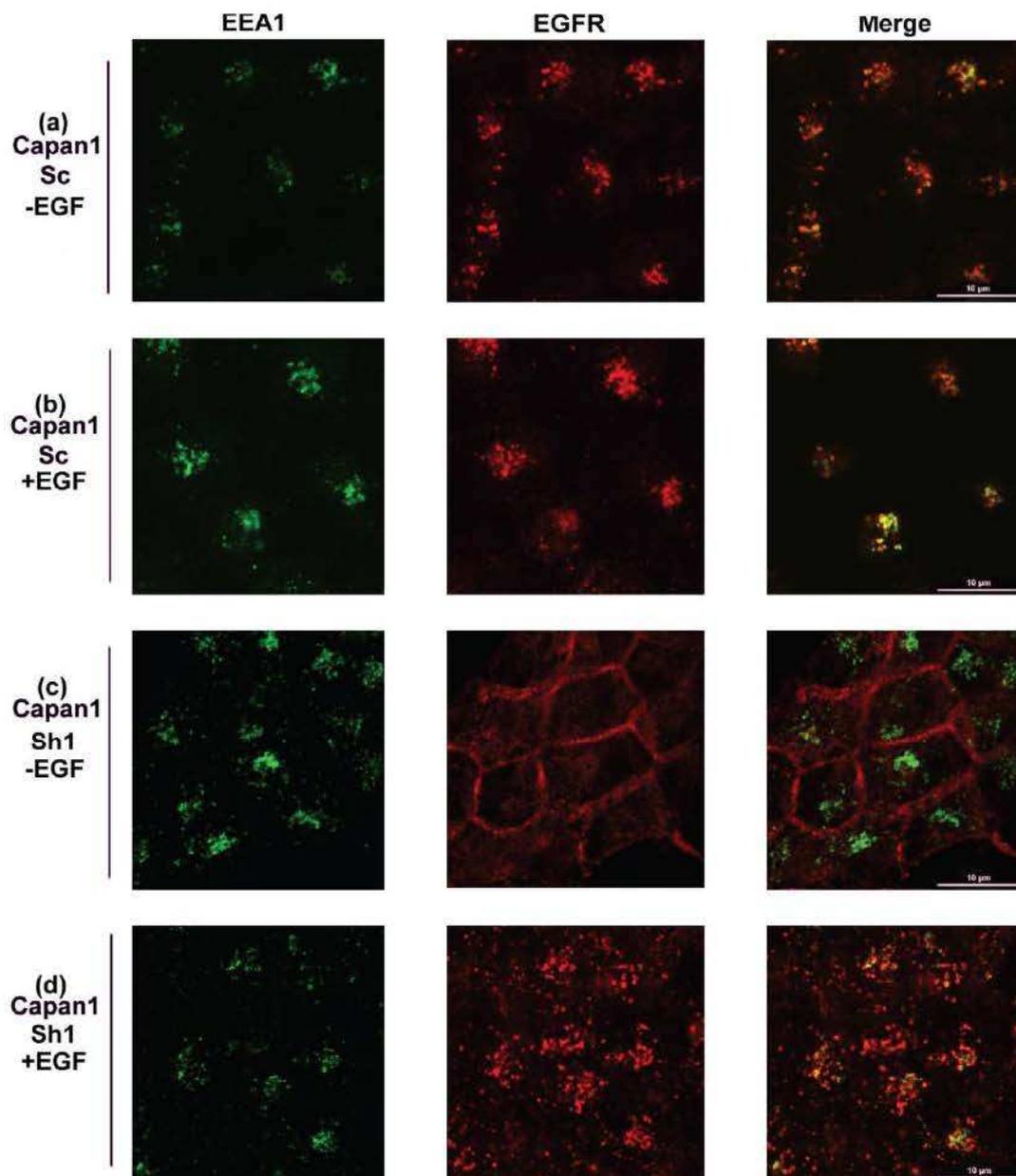


Figure 39 : **Endocytose de l'EGFR dans les lignées Capan-1 contrôle et invalidée pour Galectine-3.** Etude de l'endocytose l'EGFR en microscopie confocale. Un co-marquage avec EEA1 (endosomes précoces) a été réalisé : **(a)** dans la lignée Capan-1 contrôle sans traitement par l'EGF, **(b)** dans la lignée Capan-1 contrôle avec traitement par l'EGF, **(c)** dans la lignée Capan-1 invalidée Galectine-3 sans traitement par l'EGF et **(d)** dans la lignée Capan-1 invalidée Galectine-3 avec traitement par l'EGF.

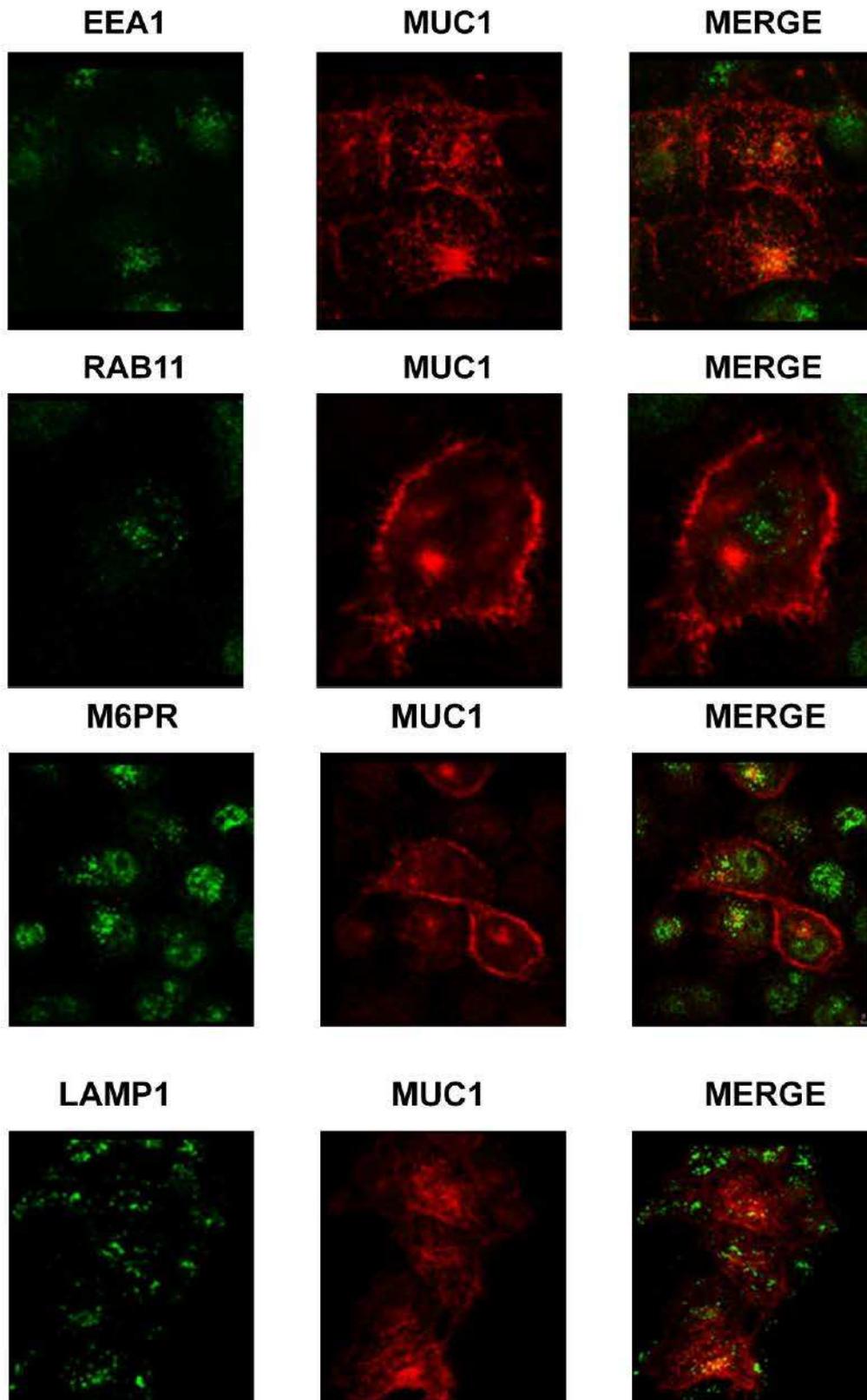


Figure 40 : **Trafic intracellulaire de MUC1 dans la lignée Capan-1 contrôle.** Etude du trafic intracellulaire de MUC1 en microscopie confocale. Des co-marquages avec EEA1 (endosomes précoces), M6PR (endosomes tardifs), Rab11 (endosomes de recyclage) et LAMP1 (lysosomes) ont été réalisés.

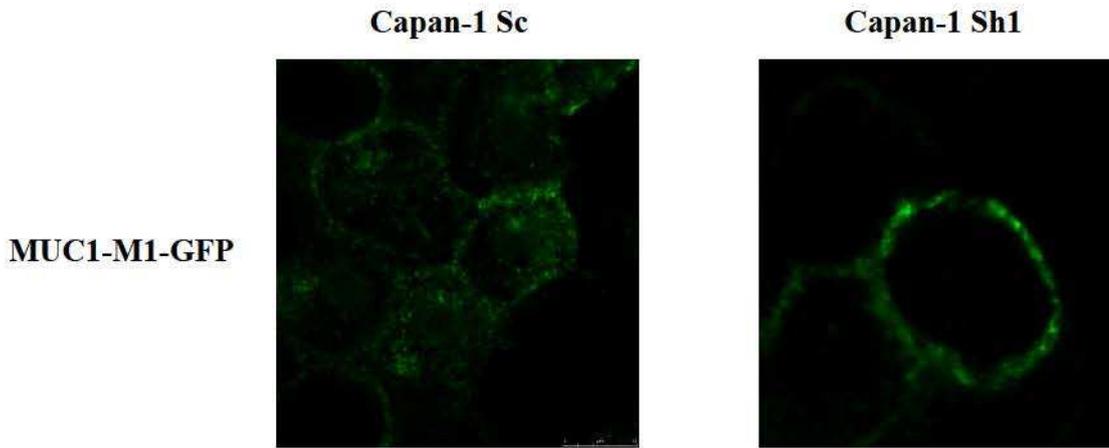


Figure 41 : Etude de la fluorescence après clonage et transfection de la construction **MUC1-M1-GFP** dans les lignées **Capan-1** contrôle et invalidée pour **Galectine-3**. Etude de la fluorescence de **MUC1-M1-GFP** en microscopie confocale.

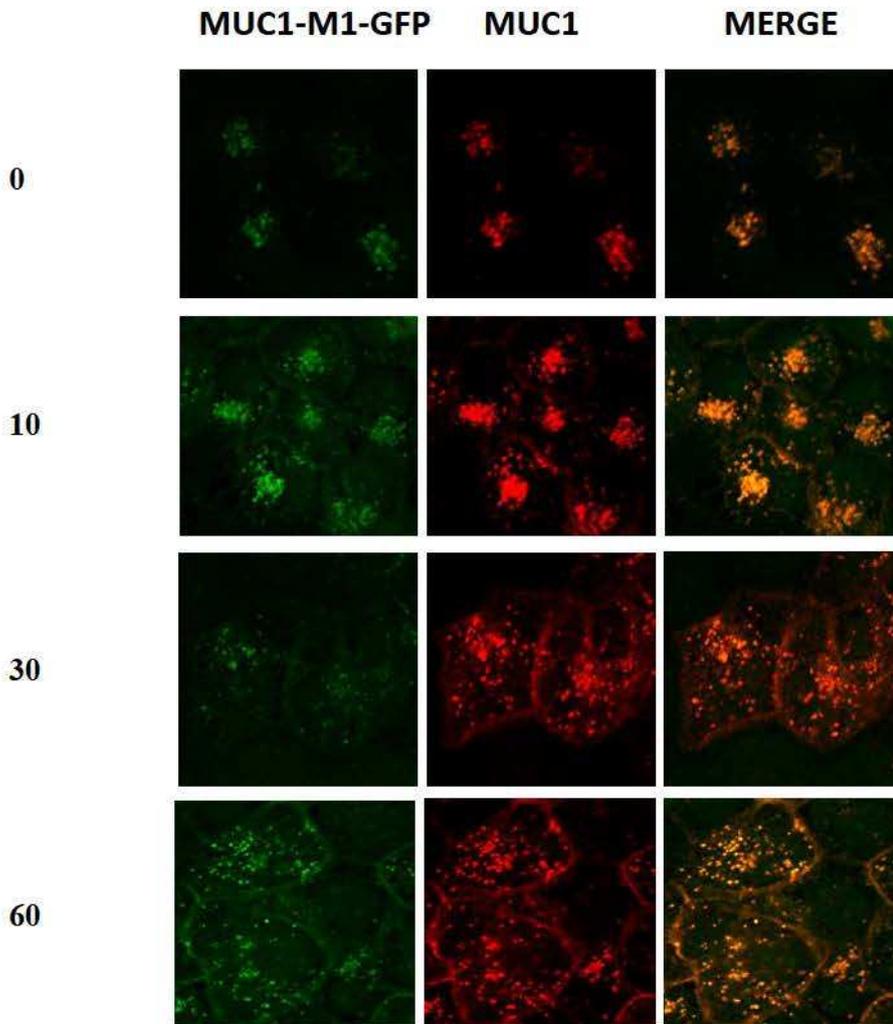


Figure 42 : Adressage membranaire de **MUC1** et **MUC1-M1-GFP** dans la lignée **Capan-1** contrôle. Etude du trafic intracellulaire de **MUC1** et **MUC1-M1-GFP** en microscopie confocale au temps 0, 10, 30 et 60 minutes. Un marquage de **MUC1** endogène avec l'anticorps 214D4 a été réalisé.

Nous avons étudié les étapes ultérieures de l'endocytose dans les cellules témoins Capan-1, en utilisant des co-marquages avec différents marqueurs de compartiments subcellulaires de la voie de l'endocytose : Rab11 marqueur des endosomes de recyclage, M6PR marqueur des endosomes tardifs et Lamp1 marqueur des lysosomes.

MUC1 est colocalisée avec EEA1 marqueur des endosomes précoces, M6PR marqueur des endosomes tardifs et LAMP1 marqueur des lysosomes (**Figure 40**). Ceci montre que MUC1 suit une voie de dégradation lysosomiale. Aucune colocalisation de MUC1 avec Rab11 n'a été observée, ce qui est en adéquation avec certaines données de la littérature décrivant un recyclage de MUC1 depuis la membrane plasmique vers l'appareil de Golgi.

Ainsi MUC1 semble emprunter une voie de dégradation lysosomiale suite à son endocytose dans les cellules Capan-1 (Figure 40).

XI. Etude du trafic intracellulaire de MUC1 à l'aide d'une construction fluorescente

Dans le but d'étudier le trafic intracellulaire, nous avons utilisé une construction de MUC1 couplée à la GFP, constituée de six répétitions en tandem et d'un site de clivage SEA non fonctionnel. Cette construction n'est donc pas clivée pour libérer le fragment C-terminal de MUC1. Cette construction (MUC1-M1-GFP) a été transfectée dans les cellules Capan-1 Sc et Sh. Un clonage cellulaire a ensuite été effectué afin de sélectionner les clones présentant la plus forte fluorescence. Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation de cette construction.

La construction MUC1-M1-GFP présente une localisation membranaire circonférentielle et cytoplasmique en présence de Galectine-3. En absence de Galectine-3, la construction est uniquement membranaire circonférentielle. **Ces localisations sont similaires à celles observées précédemment pour MUC1 avec l'anticorps 214D4. Ainsi la construction semble à première vue adéquate pour étudier le trafic intracellulaire de MUC1 (Figure 41).**

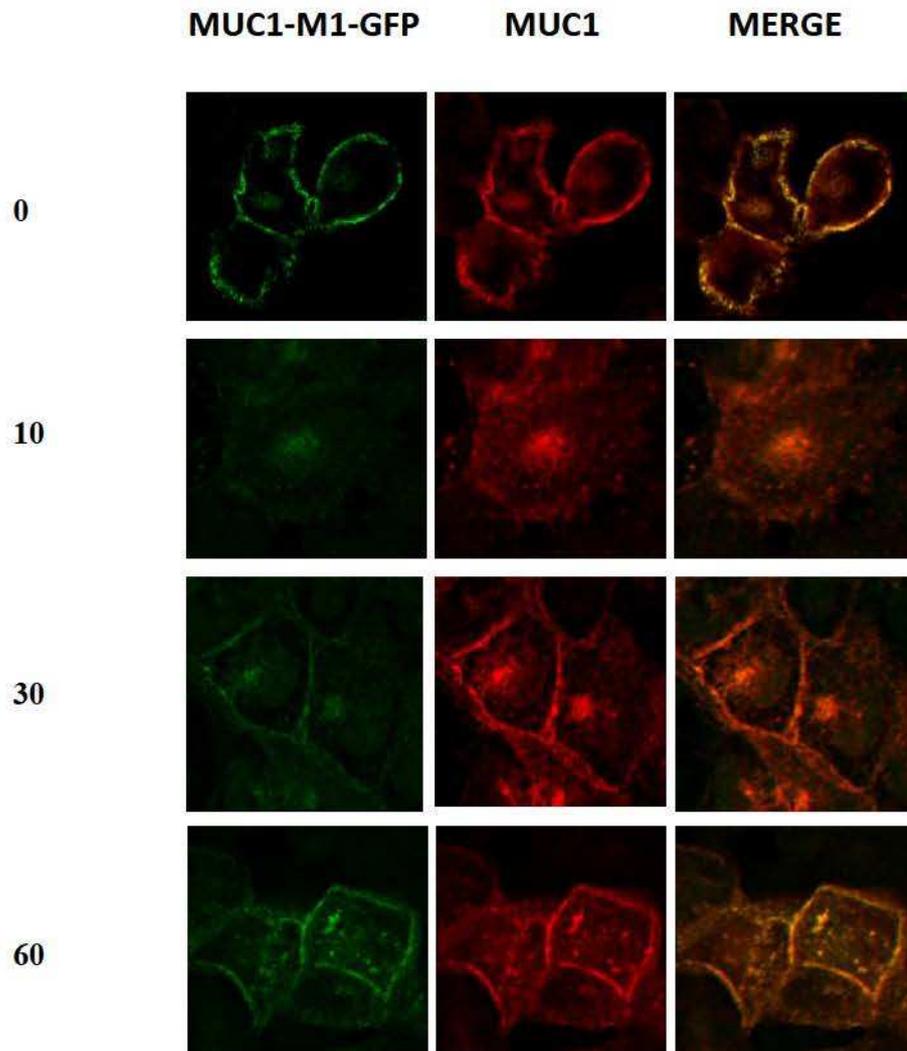


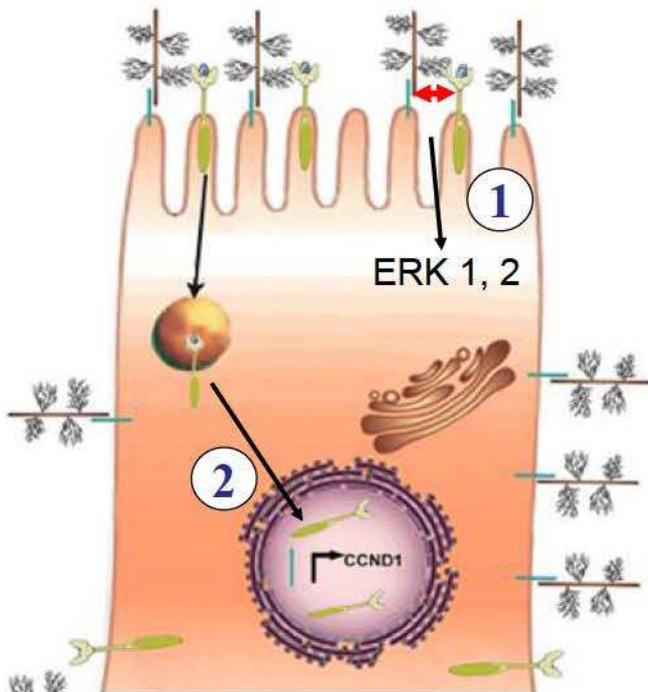
Figure 43 : Adressage membranaire de MUC1 et MUC1-M1-GFP dans la lignée Capan-1 invalidée pour Galectine-3. Etude du trafic intracellulaire de MUC1 et MUC1-M1-GFP en microscopie confocale au temps 0, 10, 30 et 60 minutes. Un marquage de MUC1 endogène avec l'anticorps 214D4 a été réalisé.

Ensuite, nous avons étudié le trafic intracellulaire de cette construction en microscopie confocale en utilisant un double-marquage avec MUC1 endogène. Les cellules ont subi un traitement avec de la cycloheximide pour bloquer la synthèse protéique et ont été placées à 20 °C afin de bloquer les protéines dernièrement synthétisées dans le Golgi. Les cellules sont ensuite remises à 37°C pour relancer le trafic intracellulaire des protéines. La fluorescence de la construction a été comparée à la distribution cellulaire de MUC1 endogène, visualisée avec l'anticorps 214D4

En présence de Galectine-3, MUC1-M1-GFP et MUC1 sont localisées dans l'appareil de Golgi de la cellule au temps 0 min. Aux temps 10 min et 30 min, elles apparaissent dans le cytoplasme puis petit à petit à la membrane où un léger marquage apparaît (**Figure 42**).

En absence de Galectine-3, au temps 0 min, MUC1-M1-GFP et MUC1 sont localisées dans l'appareil de Golgi. Elles sont également à la membrane. Cette localisation pourrait être liée à l'inhibition de l'endocytose de MUC1 en absence de Galectine-3 témoignant d'un moindre *turnover* de ces protéines membranaires. Aux temps 10 min, 30 min et 60 min, MUC1-M1-GFP et MUC1 apparaissent dans le cytoplasme de la cellule puis à la membrane cellulaire (**Figure 43**).

Ainsi, ces modèles cellulaires transfectés par la construction MUC1-M1-GFP apparaissent intéressants pour étudier de façon plus approfondie le rôle de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de MUC1. En effet, ces modèles exprimant une construction fluorescente de MUC1 vont permettre de suivre le trafic intracellulaire en temps réel depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane cellulaire ainsi que l'endocytose de la construction des cellules contrôles. Nous pourrions également étudier le rôle de l'addition exogène de Galectine-3 couplée à un fluorochrome afin de suivre en parallèle l'endocytose de MUC1 et de la Galectine-3.



L'absence de GAL-3 favorise :

- 1** : la formation du complexe EGFR-MUC1 et l'activation de la voie Erk1, 2
- 2** : la translocation nucléaire de l'EGFR

La présence de GAL-3 favorise :

- 1** : l'endocytose de l'EGFR en sevrage et de MUC1 et leur colocalisation
- 2** : la prolifération cellulaire via l'expression de la cycline D1

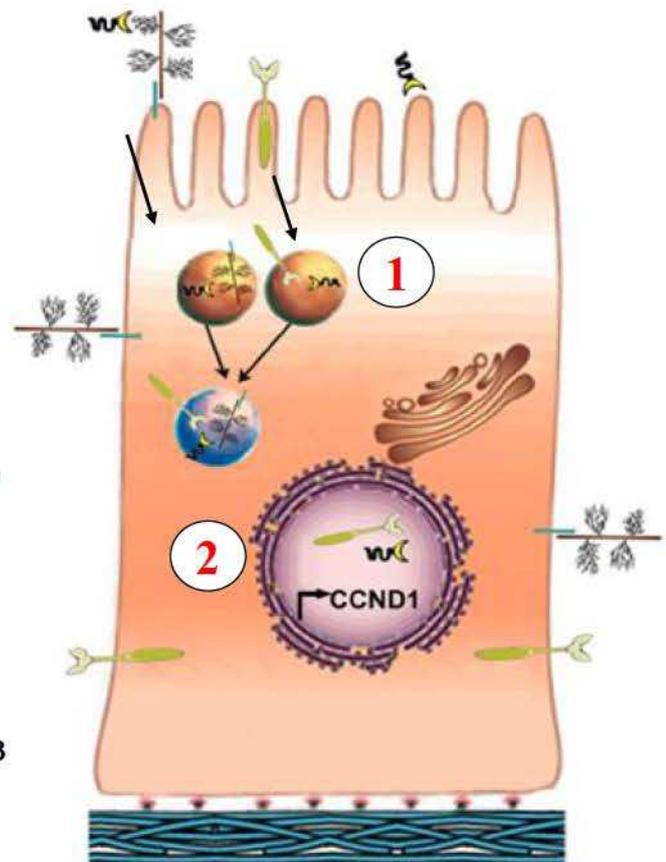


Figure 44 : Schéma récapitulatif du rôle de la Galectine-3 dans les cellules Capan-1.

XII. Conclusion

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de MUC1 et l'EGFR et dans leurs interactions moléculaires. En effet, la Galectine-3 semble favoriser l'endocytose de MUC1 et l'EGFR et leur colocalisation intracellulaire. De plus, cette Galectine favorise l'expression de la Cycline D1 et la prolifération cellulaire dans les cellules tumorales pancréatiques Capan-1 (**Figure 44**). En absence de Galectine-3, l'interaction de MUC1 et l'EGFR à la membrane, l'activation de l'EGFR, l'activation de la voie de signalisation Erk 1, 2 en aval de l'EGFR et la translocation nucléaire du récepteur sont augmentés (**Figure 44**). Enfin, en absence de Galectine-3, les cellules tumorales pancréatiques Capan-1 présentent un pouvoir invasif plus important en absence de stimulation par l'EGF.

DISCUSSION GÉNÉRALE
ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

La mucine membranaire MUC1 est observée au pôle apical des cellules épithéliales. Dans beaucoup de cancers dont le PDAC, cette mucine est à la fois surexprimée mais également délocalisée circonférentiellement à la membrane et/ou dans le cytoplasme (Awaya *et al.*, 2004, Van Heek *et al.*, 2004, Aishima *et al.*, 2006). La rétention cytoplasmique de la mucine membranaire MUC1 au niveau des cellules ponctionnées à l'aiguille fine à partir des lésions pancréatiques est utilisée par les pathologistes comme indicateur de malignité. De nombreuses études ont été publiées sur les anomalies de distribution cellulaire de MUC1, cependant aucune d'entre elles n'apporte d'éléments sur les mécanismes impliqués dans cette rétention cytoplasmique ni sur les effets fonctionnels au niveau de la progression tumorale. Le but de ce travail a été d'étudier l'éventuel rôle d'une lectine endogène, la Galectine-3, dans ces mécanismes.

Notre étude en immunohistochimie sur une série de tissus pancréatiques a mis en évidence la surexpression de MUC1 et les anomalies de distribution cellulaire de MUC1 dans les cellules tumorales pancréatiques. Des études antérieures du laboratoire au sein de cellules épithéliales entérocytaires avaient montré que le trafic intracellulaire de certaines glycoprotéines dont MUC1 était dépendant d'un membre de la famille des galectines. Des études publiées par le Dr D. Delacour et collaborateurs ont aussi mis en évidence le rôle de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de la LPH dans les cellules MDCK. De plus, ces travaux avaient révélé l'affinité de la Galectine-3 pour des glycoprotéines apicales telles que MUC1 et le CEA. En effet, dans le cas de MUC1, la Galectine-3 peut interagir avec les *O*-glycannes portés par les TR ou les *N*-glycannes fixés sur le résidu Asn-36 de la région C-terminale de MUC1 (Ramasamy *et al.*, 2007). Ainsi nous avons étudié le rôle de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de MUC1 et d'autres glycoprotéines dans les cellules tumorales pancréatiques. Deux hypothèses pouvaient expliquer les anomalies de localisation de MUC1 dans les cellules tumorales : un défaut d'adressage membranaire qui serait accompagné de l'accumulation de MUC1 dans les vésicules de transport ou une intensification de l'endocytose de MUC1 dans les corps endosomaux. Nos résultats ont montré que l'inhibition d'expression de la Galectine-3 entraîne une diminution de l'expression de MUC1. Ces

résultats suggèrent que la Galectine-3 nucléaire stimule la transcription de *MUC1*. D'autre part, l'inhibition de l'expression de la Galectine-3 entraîne une redistribution de MUC1 à la membrane plasmique et une disparition de sa distribution intracellulaire. Ces modifications de distribution cellulaire sont abolies par le traitement des cellules invalidées pour la Galectine-3 avec de la Galectine-3 recombinante ajoutée dans le milieu de culture. Nos résultats montrent donc que la Galectine-3 exogène induit l'endocytose de MUC1 mettant en évidence l'implication de cette Galectine dans l'internalisation de MUC1 dans les cellules tumorales pancréatiques. Il est possible que la Galectine-3 interagisse avec MUC1 à la surface cellulaire par l'intermédiaire de son affinité lectinique, et que le complexe MUC1/Galectine-3 soit internalisé ensuite par endocytose. En effet, les galectines peuvent être sécrétées *via* une voie de sécrétion non conventionnelle dans le milieu extracellulaire (Hughes, 1999). D'autre part, elles présentent la propriété de se fixer rapidement aux glycolipides ou aux glycoprotéines de la surface cellulaire et d'être ainsi endocytées (Furtak *et al.*, 2001, Stechly *et al.*, 2009). Dans les cellules contrôles, la Galectine-3 sécrétée de manière constitutive pourrait de la même façon se fixer à MUC1 et entraîner son endocytose. MUC1 endocytée pourrait ensuite suivre deux voies : la dégradation par voie endo-lysosomiale ou le recyclage *via* l'appareil de Golgi. En effet, MUC1 est décrit comme étant constitutivement internalisée et recyclée via le TGN (Litvinov et Hilkens, 1993) expliquant ainsi son absence dans les endosomes de recyclage. Il a été décrit que la glycosylation incomplète de MUC1 favorise son endocytose *via* des puits coâtés de clathrine (Altschuler *et al.*, 2000). Dans les cellules tumorales pancréatiques, comme dans toute cellule tumorale, une glycosylation aberrante de MUC1 avec des glycannes immatures est probable. On peut donc proposer que l'interaction MUC1/Galectine-3 soit ainsi renforcée. Nos travaux décrivent le trafic intracellulaire de MUC1 et aussi vraisemblablement ses interactions moléculaires.

Plusieurs études ont montré l'existence d'interactions entre MUC1 et EGFR. En effet, MUC1 inhibe la dégradation de l'EGFR et favorise son recyclage à la membrane cellulaire et sa localisation nucléaire (Pochampalli *et al.*, 2007, Bitler *et al.*, 2010). De même, l'activation de l'EGFR par l'EGF induit la phosphorylation de MUC1CT, ce qui favorise l'interaction de MUC1 CT avec la β -caténine (Singh and Hollingsworth, 2006). D'autre part, MUC1 induit l'expression de la Galectine-3 qui favorise l'interaction entre MUC1 et l'EGFR dans les lignées cellulaires tumorales mammaires (Ramasamy *et al.*, 2007). Toutes ces données suggèrent que les interactions entre MUC1, l'EGFR et la Galectine-3 ont un rôle important

dans la régulation de l'activité transcriptionnelle et des voies de signalisation dans les cellules épithéliales. En absence de stimulation par l'EGF, l'EGFR est constitutivement internalisé et recyclé vers la surface cellulaire (Resat *et al.*, 2003) ce qui explique la localisation membranaire du récepteur observée dans les cellules invalidées pour la Galectine-3 non traitées par l'EGF. Lorsque les cellules sont traitées par l'EGF, l'EGFR est internalisé essentiellement par endocytose *via* des puits recouverts de clathrine et est adressé dans les endosomes précoces. Durant la maturation des endosomes, le complexe EGF/EGFR est soit recyclé vers la membrane cellulaire soit adressé vers les lysosomes pour être dégradé (Sorkin et Goh, 2009). Tout comme MUC1, le récepteur EGFR est substitué par des chaînes *N*- et *O*-glycanniques auxquelles la Galectine-3 est susceptible de se fixer. Nos résultats suggèrent qu'en absence de stimulation par l'EGF, la Galectine-3 pourrait activer l'endocytose de l'EGFR et que l'EGFR pourrait être soit dégradé ou recyclé. Etant donné l'effet similaire de la Galectine-3 sur MUC1 et l'EGFR et de l'absence de formation du complexe MUC1/EGFR en présence de Galectine-3, il semble que MUC1 et l'EGFR soient endocytés de manière indépendante en présence de Galectine-3.

Des travaux de la littérature ont également montré que le traitement par l'EGF induit la translocation nucléaire de l'EGFR de la membrane cellulaire à la région périnucléaire et nucléaire (Emlet *et al.*, 1997, Hsu et Hung, 2007). Cet import nucléaire dépend d'un signal tripartite localisé dans la région juxtamembranaire de l'EGFR (Hsu et Hung, 2007). Le signal de localisation nucléaire de l'EGFR est reconnu par l'importine α qui forme un complexe avec l'importine $\beta 1$ afin de permettre l'import nucléaire du récepteur (Lo *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2010). De plus, MUC1 induit l'accumulation nucléaire et l'interaction avec l'ADN (Bitler *et al.*, 2010) de l'EGFR dans les cellules tumorales mammaires. Dans notre étude, nous avons montré que le traitement par l'EGF favorise l'internalisation de l'EGFR et sa translocation périnucléaire et nucléaire dans les cellules tumorales pancréatiques. De plus l'inhibition de l'expression de la Galectine-3 augmente la translocation nucléaire de l'EGFR et sa phosphorylation. De manière intéressante, la Galectine-3 voyage entre le noyau et le cytoplasme (Davidson *et al.*, 2006) et son import nucléaire implique également le complexe importine $\alpha/\beta 1$ (Nakahara *et al.*, 2006). Nous avons mis en évidence que l'EGFR est un nouveau partenaire protéique glycosylé de la Galectine-3 dans les cellules tumorales pancréatiques et que la quantité d'EGFR nucléaire est inversement corrélée à la présence de Galectine-3. Les mécanismes par lesquels la Galectine-3 contrôle la localisation nucléaire ou

cytoplasmique de l'EGFR sont encore indéterminés. Cependant nos résultats suggèrent que la Galectine-3 se fixe de manière directe à l'EGFR et pourrait le séquestrer dans le cytoplasme, ce qui empêcherait son import nucléaire. Cependant d'autres mécanismes ne sont pas à exclure.

Nos travaux ont aussi montré que la Galectine-3 module l'activation du récepteur de l'EGF et les voies de signalisation en aval. En effet, la présence d'un pool important d'EGFR à la membrane cellulaire en absence de Galectine-3 permet l'activation importante de l'EGFR et de la voie Erk 1, 2 après stimulation par l'EGF, en accord avec l'expression plus forte de l'EGFR à la membrane cellulaire. Par contre, en présence de Galectine-3, l'EGFR, en partie dans le cytoplasme et donc en plus faible quantité à la membrane cellulaire, induit une activation plus faible de la voie Erk 1, 2 après stimulation par l'EGF. D'autre part, l'implication de MUC1 dans l'activation de l'EGFR en absence de Galectine-3 est mise en évidence par l'augmentation importante de complexe EGFR/MUC1 observée dans les cellules invalidées par Galectine-3. De plus, la Galectine-3 est décrite comme pouvant se fixer à KRAS une fois activée et ainsi atténuer l'activation d'ERK en aval de l'EGFR dans les cellules exprimant KRAS muté G12V (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Comme les cellules Capan-1 portent cette mutation (Loukopoulos *et al.*, 2004), nous proposons que la Galectine-3 pourrait affecter la voie de signalisation EGFR/MUC1/RAS/RAF/Erk à différents niveaux dans les cellules tumorales pancréatiques en inhibant l'expression de MUC1 et de l'EGFR à la membrane cellulaire, leurs interactions et/ou l'activité de KRAS.

Nous avons mis en évidence que la Cycline D1 est régulée positivement par la Galectine-3 et que son taux d'expression est corrélé à celui de MUC1CT en accord avec des données antérieures (Song *et al.*, 2009, Bitler *et al.*, 2010). La Galectine-3 joue un rôle dans la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de l'augmentation de l'expression de la Cycline D1. En revanche, la présence de Galectine-3 semble diminuer le pouvoir invasif des cellules tumorales pancréatiques en conditions basales. En effet, les cellules invalidées pour la Galectine-3 présentent un taux d'invasion tumorale sur collagène similaire à celui des cellules contrôles stimulées par l'EGF. Ceci suggère que le récepteur soit activé constitutivement dans les cellules invalidées par l'interaction entre MUC1 et l'EGFR. Cette hypothèse est en accord avec les observations mettant en évidence une augmentation brève et forte de la voie Erk 1, 2.

Il est intéressant de souligner que dans les modèles murins, l'invalidation de la Galectine-3 n'empêche pas la progression tumorale (Eude-Le Parco *et al.*, 2009).

En conclusion, nous avons apporté des éléments mettant en évidence le rôle de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de MUC1 et de l'EGFR, leurs interactions moléculaires et dans leurs effets cellulaires au niveau des cellules tumorales pancréatiques humaines.

PERSPECTIVES

Les perspectives de ce travail se situent au niveau :

des rôles de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire de MUC1 et de l'EGFR

La mise au point des mini-constructions de MUC1 (MUC1-M1-GFP et MUC1-M2-GFP) possédant 6 TR ainsi qu'un site de clivage non fonctionnel (M1) ou fonctionnel (M2) dans notre modèle cellulaire **confirmerait nos premiers résultats et permettrait d'étudier le trafic de MUC1 de manière dynamique** à l'aide de la microscopie *Time-lapse*. La transfection de MUC1-M1-GFP dans notre modèle cellulaire a déjà montré que l'outil présente une localisation similaire à la mucine MUC1 endogène et qu'il était donc adéquat pour cette étude. Un travail identique avec MUC1-M2-GFP permettrait d'étudier l'implication fonctionnelle du clivage du domaine SEA avec libération du fragment C-terminal de MUC1. Dans un deuxième temps, l'utilisation de ces constructions et de marqueurs de compartiments cellulaires pourrait permettre de mettre en évidence un éventuel **rôle de Galectine-3 dans l'adressage membranaire de MUC1, son recyclage ou encore sa dégradation**. Enfin, la présence de tags aux extrémités C-terminales et N-terminales de ces constructions **donne la possibilité de suivre le trafic intracellulaire des deux sous-unités de MUC1 (extracellulaire et MUC1CT) indépendamment l'une de l'autre**. Ainsi, le rôle de la Galectine-3 dans le trafic des sous-unités pourra être connu.

En ce qui concerne l'EGFR, un travail similaire est envisagé. En effet, l'obtention de construction EGFR-Cherry va permettre **d'étudier le rôle de la Galectine-3 dans le trafic intracellulaire du récepteur (endocytose, recyclage et dégradation) de manière dynamique** après transfection de cette construction. Les constructions et du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) vont quant à elles permettre **d'étudier les mécanismes régulant l'import et l'export nucléaire du récepteur** en évaluant les coefficients de diffusion.

le rôle de la Galectine-3 dans les voies de signalisation et les réponses biologiques

Nous avons mis en évidence que la Galectine-3 inhibe l'interaction entre MUC1 et l'EGFR et l'activation du récepteur après traitement par l'EGF, ce qui a pour effet de moduler l'intensité d'activation de la voie Erk1, 2. D'autres voies de signalisation (AKT, Src...) sont également activées par l'EGFR *via* des résidus autres que la Tyr¹¹⁷³. Ainsi, il serait intéressant **d'étudier l'effet de la Galectine-3 sur le recrutement de ces voies de signalisation**, ce qui pourrait expliquer les effets observés sur la prolifération ou le potentiel invasif de nos modèles cellulaires. En effet, la Galectine-3 favorise la prolifération cellulaire et inhibe le phénotype invasif des cellules tumorales pancréatiques. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'EGFR, des voies MAPK, PI3K/AKT et Src ou encore d'anticorps anti-Galectine-3 confirmerait nos premiers résultats et **déterminerait les voies impliquées dans la prolifération ou le potentiel invasif de nos modèles.**

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Obtention des vecteurs short hairpin RNA (shRNA) anti Galectine-3 (GAL-3)

Trois séquences ont été ciblées dans le gène *LGALS3* (Homo sapiens Lectin, galactoside-binding soluble 3, NM_002306) avec l'aide d'un logiciel d'alignement de séquences (BLAST) afin d'obtenir des *shRNA* spécifiques de 21 et 19 pb. La première (*shARN1*), selon Henderson *et al.*, (2006), est située dans la partie 3' de l'exon 5 (GAAGAAAGACAGTCGGTTT, % G+C=42,10 %), la deuxième (*shARN2*) est localisée dans la partie 3' de l'exon 4 (AAGCCCAATGCAAACAGAATT, % G+C=38,09 %) et la troisième (*shARN3*), selon Peng *et al.*, (2008), est située dans l'exon 5 (GAGAGTCATTGTTTGCAAT, % G+C=36,84 %) plus en amont que la première construction. L'appariement des deux oligonucléotides complémentaires dans le tampon d'appariement (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA disodique 1 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM) est faite durant 3 minutes à 90 °C en bain marie puis jusqu'au refroidissement du bain marie à 37 °C.

Les trois constructions sont ensuite clonées séparément dans le vecteur pSuper.retro.puro (Oligoengine Inc) permettant une expression forte de nos trois *shARN* grâce au promoteur du cytomégalovirus. Le vecteur est ouvert au niveau des sites *Bgl*III et *Hind*III par hydrolyse enzymatique durant 2 h à 37 °C pour chaque enzyme de restriction (Boehringer).

- Plasmide (2 µg)	20,5 µL
- Tampon de l'enzyme 10X	5 µL
- Enzyme <i>Bgl</i> III/ <i>Hind</i> III (40 U/µL)	6 µL
- Tris-HCl 10 mM, EDTA disodique 1mM	qsp 50 µL

Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1 % (p/v) en tampon TEA (Tris-Acétate 40 mM, EDTA 1 mM) puis sont extraits du gel à l'aide du kit « QIAquick[®] gel extraction » (Qiagen) de la manière suivante :

- Exciser l'insert du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel
- Transférer l'insert dans un microtube stérile et peser
- Ajouter trois volumes de tampon QG pour un volume de gel (soit 300 μ L pour 100 mg de gel d'agarose)
- Incuber le mélange 5 min à 60°C puis mélanger à l'aide du vortex. *Lorsque le gel est dissout, le mélange doit être jaune, dans le cas contraire 10 μ L de tampon acétate de sodium 3 M (pH 5,0) sont ajoutés.*
- Ajouter un volume d'isopropanol pur
- Déposer le mélange dans la colonne « QIAquick »
- Centrifuger 1 min à 17900 x g
- Eliminer l'éluat
- Appliquer 750 μ L de tampon PE dans la colonne
- Centrifuger 1 min à 17900 x g
- Eliminer l'éluat
- Centrifuger 1 min à 17900 x g
- Transférer la colonne « QIAquick » dans un microtube propre
- Appliquer 30 μ L de tampon EB au centre de la colonne
- Laisser incuber 1 min à température ambiante
- Centrifuger 1 min à 17900 x g

Le vecteur pSuper.retro.puro purifié est ensuite déphosphorylé en 3' par la phosphatase alcaline de crevette (GE Healthcare Life Sciences) selon le protocole suivant :

- | | |
|----------------------------|----------------|
| - Plasmide linéarisé | 500 ng |
| - Tampon 10x | 4 μ L |
| - Phosphatase alcaline | 5 U |
| - H ₂ O stérile | qsp 40 μ L |

Les inserts sont quant à eux phosphorylés à l'aide de la T4 PNK (Promega) selon le protocole suivant :

- Insert	360 ng
- ATP 50 mM	1 µL
- Tampon 10X	5µL
- T4 PNK	10 U
- H ₂ O stérile	qsp 50 µL

Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 37 °C puis 20 min à 65 °C pour inactiver la T4 PNK.

Le sous-clonage en vecteur pSuper.retro.puro s'effectue par ligation en présence de T4 DNA ligase pendant 2 h à température ambiante (« Rapid DNA Dephos and ligation kit », Roche Applied Science). Le mélange réactionnel est le suivant :

- Plasmide linéarisé déphosphorylé	50 ng
- Insert	20 ng
- Tampon de dilution 5X	2 µL
- H ₂ O stérile	qsp 10 µL
- Tampon de ligation 2X	10 µL
- T4 DNA Ligase	5 U
- Tampon phosphatase 10X	2 µL
- rAPid Alkaline Phosphatase	1 U

Les bactéries compétentes JM109 (100 µL, Promega) sont ensuite mises en présence de 2 µL de produit de ligation dans un tube 15 mL sur glace durant 10 min. Un choc thermique durant 45 s environ est effectué dans un bain-marie à 40 °C avant de laisser de nouveau les tubes sur glaces durant 2 min. Un volume de 900 µL de milieu SOC à 4 °C est rajouté aux bactéries transformées avant de les placer dans un incubateur pendant 1 h à 37 °C sous agitation. Des volumes de 10 µL et 100 µL des différentes transformations sont étalés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu LB/Agar Ampiciline (50 µg/mL). Les clones ainsi obtenus après 15 heures de pousse sont repiqués dans 5 mL de milieu LB Ampiciline (50 µg/mL) et placés sous agitation à 37 °C durant une nuit.

Les trois clones retenus après criblage et séquençage (GATC, Konstanz Allemagne) sont dénommés : pSRP-shGAL3#1, pSRP-shGAL3#2 et pSRP-shGAL3#3. Comme témoin

négatif, une construction *Scramble* (AAGTCAATCAACACGGTAACA) spécifique d'aucun ARNm a été mise au point à partir de la deuxième construction après criblage de banques d'ADN génomique et de transcrits humains. Un second témoin négatif, la construction *Mock*, est composé du vecteur pSuper.retro.puro sans insert.

L'infection rétrovirale permettant l'intégration des constructions dans les cellules CAPAN-1, lignée humaine d'adénocarcinome pancréatique canalaire polarisée, a été effectuée par Didier Monté (UMR-CNRS 8161, Institut de Biologie de Lille). La sélection des clones infectés, rendue possible par la résistance à la puromycine portée par le vecteur, est faite à l'aide de 5 µg/mL de puromycine.

II. Culture cellulaire

1) Lignée CAPAN-1

La lignée humaine CAPAN-1 (ATCC, HTB-79TM) a pour origine une métastase hépatique émanant de l'adénocarcinome pancréatique d'un patient caucasien de 40 ans. Ces cellules sont bien différenciées, polarisées, prismatiques et tumorigènes. Elles forment chez la souris immunodéprimée des adénocarcinomes comparables à un carcinome pancréatique canalaire (Fogh et al., 1977).

2) Conditions de culture cellulaire

Les cellules sont cultivées sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. Les milieux de culture et les différents réactifs sont de qualité culture cellulaire (Gibco, Invitrogen) et sont maintenus stériles. Les cellules CAPAN-1 invalidées pour la Galectine-3 (Sh1, Sh2 et Sh3) CAPAN-1 *Scramble* et CAPAN-1 *Mock* sont incubées à 37 °C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (5 %). Le changement du milieu de culture (RPMI-1640 supplémenté par 15 % de sérum de veau fœtal (SVF) (v/v), pénicilline et streptomycine 50 U/mL, 1 % de glutamine 200 mM (v/v) et 400 ng/mL de puromycine) est effectué quotidiennement. Chaque semaine, un ensemencement de chaque lignée cellulaire est effectué après décollement du tapis cellulaire par une solution de trypsine/EDTA (trypsine 0,05 %, EDTA 0,5 mM) à 37°C durant 10 min environ. La trypsinisation est arrêtée par l'ajout d'un volume de milieu de culture complet

quatre fois supérieur au volume de trypsine. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube 15 mL et centrifugées à 470 x g durant 5 min. Le culot est ensuite repris dans 10 mL de milieu de culture neuf afin de procéder au comptage des cellules sur lame de Malassez en présence de bleu Trypan. La viabilité des cellules est observée à l'aide du colorant d'exclusion lors de la numération. Un ensemencement de $1,5 \times 10^5$ ou $4,5 \times 10^5$ cellules est réalisé en flacon de culture T25 ou T75 (Falcon) respectivement pour chacune des lignées.

3) Gamme de résistance à la puromycine et au G418

Dans des plaques à 6 puits, 1×10^5 cellules sont ensemencées par puits et sont cultivées durant une semaine. L'ajout de puromycine à une concentration de 100 ng/mL à 2 µg/mL et de G418 à une concentration de 1 µg/mL à 10 µg/mL est effectué dès l'ensemencement. Le milieu de culture contenant l'agent de sélection est renouvelé quotidiennement. La concentration pour laquelle il ne reste plus aucune cellule au bout de 7 jours est retenue pour réaliser la sélection des cellules transfectées stablement avec les vecteurs possédant les différentes constructions (shRNA anti Galectine-3 pour la puromycine et MUC1-GFP pour le G418).

Concentration choisie pour -la puromycine : 1 µg/mL

-le G418 : 6 µg/mL

III. Construction MUC1M1-GFP et M2-GFP

Les constructions ont été réalisées à l'aide du kit *In-Fusion® Ready Vector Cloning* (Clontech) de la manière suivante :

Les ADNc des constructions MUC1M1 et M2 ont été amplifiées à l'aide des amorces Sens 5'-AAGGCCTCTGTCGAC-3' et antisens 5'-AGAATTCGCAAGCTT-3'. Les constructions ainsi amplifiées sont clonées dans le vecteur *In-Fusion Ready* selon le protocole suivant :

- Vecteur <i>In-Fusion</i> linéarisé (100 ng/μl)	1 μl
- Tampon de réaction <i>In-Fusion</i> 5X	2 μL
- Enzyme <i>In-Fusion</i>	1 μL
- Construction amplifiée	100 ng
- Eau	qsp 10 μL

La réaction se déroule 15 min à 37 °C puis 15 min à 50 °C. Une fois la réaction terminée, le tube est placé sur glace. Un volume de 40 μl de tampon TE est ajouté avant de mélanger le tout.

Les bactéries JM109 (Promega) sont transformées avec 2,5 μl de la préparation selon le protocole précédemment cité (cf p.78). Deux clones retenus après criblage et séquençage (GATC, Konstanz Allemagne) sont dénommés : MUC1-M1-GFP et MUC1-M2-GFP. Après extraction de l'ADN génomique, les constructions sont transfectées dans les lignées cellulaires Capan-1 contrôle et invalidée pour la Galectine-3.

IV. Transfection stable des constructions MUC1M1-GFP/M2-GFP et pAcGFP1

Les transfections sont effectuées sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. La veille de la transfection, $0,5 \times 10^6$ cellules ont étéensemencées par puits dans une plaque 6 puits. Afin de faciliter l'intégration des différentes constructions dans le génome, les vecteurs ont préalablement été linéarisés par digestion enzymatique selon le protocole suivant :

- Construction plasmidique	20 μg
- Tampon de l'enzyme 10X	5 μL
- Enzyme <i>Afl-III</i> (5 U/μL)	4 μL
- BSA (100 μg/mL)	0,5 μL
- Eau	qsp 50 μL

Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1% (p/v) et tampon TEA puis sont extraits du gel à l'aide du « QIAquick[®] gel extraction kit » (Qiagen) de la manière suivante :

Une fois, les vecteurs linéarisés, la transfection est effectuée en trois étapes comme suit :

Préparation du mélange ADN/*Enhancer*/Effectene®

- Diluer 1 µg d'ADN plasmidique dans le tampon de compaction EC pour un volume total de 30 µL
- Ajouter 0,8 µL d'*Enhancer* puis tapoter le tube
- Laisser incuber durant 2-5 minutes à température ambiante
- Centrifuger quelques secondes
- Ajouter 1,2 µL d'Effectene® (Qiagen) au mélange ADN/tampon EC/*Enhancer* et mélanger en pipetant
- Laisser incuber 5-10 minutes à température ambiante

Préparation des cellules

- Eliminer le milieu des cellules
- Rincer avec 2 mL de D-PBS 1X
- Ajouter 1,6 mL de milieu neuf complet par puits

Transfection cellulaire

- Ajouter 600 µL de milieu neuf complet au mélange ADN/tampon EC/*Enhancer*/Effectene® et mélanger en pipetant
- Transférer immédiatement le mélange goutte à goutte sur les cellules
- Répartir les complexes ADN/ Effectene® en inclinant la boîte de droite à gauche et de l'arrière vers l'avant.
- Incuber à 37 °C pendant 48 h

Après 48 h de culture, 6 µg/mL de l'antibiotique G418 sont rajoutés au milieu de culture afin de sélectionner les cellules ayant été transfectées par la construction. Une fois à confluence, les cellules sont transférées en T25 pour deux semaines durant lesquelles la sélection est maintenue. Un clonage est ensuite effectué par dilution limite en plaque à 96 puits pour chaque lignée et constructions transfectées. Pour amplifier les clones ainsi isolés, les passages se font ensuite en plaques 24 puits, 6 puits et enfin en T25.

V. Extraction d'ARN totaux à partir de culture cellulaire

Les ARN totaux sont extraits à partir de cellules post-confluentes.

1) NucleoSpin[®]RNA II (Macherey-Nagel)

Le tapis cellulaire est préalablement nettoyé deux fois avec du D-PBS puis lysé en présence de tampon de lyse RA1 contenant 1 % (v/v) de β -mercaptoéthanol (350 μ L de tampon RA1 pour 10^6 cellules). Le protocole est le suivant :

- Homogénéiser le lysat cellulaire en pipetant
- Appliquer le lysat dans la colonne « NucleoSpin[®] Filter »
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g
- Ajouter 350 μ L d'éthanol 70% à l'éluat et mélanger
- Appliquer le mélange dans la colonne « NucleoSpin[®] RNA II »
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g et éliminer l'éluat
- Appliquer 350 μ L de tampon de lavage MDB
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g et éliminer l'éluat
- Appliquer 95 μ L d'un mélange constitué de 10 μ L de rDNase et 90 μ L de tampon de réaction fournis
- Laisser incuber 15 min à température ambiante
- Appliquer 200 μ L de tampon de lavage RA2
- Centrifuger 30 s à 11 000 x g et éliminer l'éluat
- Appliquer 600 μ L de tampon RA3
- Centrifuger 30 s à 11 000 x g et éliminer l'éluat
- Appliquer 250 μ L de tampon RA3
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g et éliminer l'éluat
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g pour éliminer toute trace d'éthanol
- Transférer la colonne dans un nouveau microtube
- Appliquer 40 μ L d'eau DEPC
- Laisser incuber 1 min à température ambiante
- Centrifuger 1 min à 11 000 x g
- Transférer l'éluat contenant les ARN totaux dans un microtube propre

Les ARN totaux sont conservés à -80 °C jusqu'à utilisation. La qualité de l'ARN est vérifiée par la mesure de l'absorbance des échantillons à 230, 260 et 280 nm et par le calcul des rapports $A_{260/280}$ et $A_{260/230}$. à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop.

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

a) Synthèse de l'ADNc

L'ADNc est synthétisé à partir de 0,5 µg d'ARN totaux en présence d'oligo(dT)₁₅ et de la rétrotranscriptase MMLV (Promega) selon le protocole décrit par Vincent *et al.* (2007). Il est stocké à -80 °C.

b) Amplification de l'ADNc par Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'amplification de l'ADNc par PCR, à l'aide de Taq Polymerase (Roche), est effectuée selon le protocole décrit par Jonckheere *et al.* (2007) pour les gènes *MUC*. Les conditions d'amplification pour le gène *LGALS3* est décrit par Lahm *et al.* (2001). Les paires d'amorces spécifiques (MWG-Biotech, EUROGENTEC S.A) sont décrites ci-dessous dans le tableau I. Le transcrit ribosomique 28S est utilisé comme contrôle interne. L'analyse des amplicons est réalisée en gel d'agarose de 1,5 % (m/v) en tampon Tris 45 mM, Borate 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3, en présence de bromure d'éthidium à 10 µg/mL.

Tableau I				
Conditions utilisées dans le cadre de la PCR				
Gène	Amorces (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)	Nombre de cycles d'amplification	Température d'hybridation (°C)
<i>LGALS3</i>	S : ATG GCA GAC AAT TTT TCG CTC C AS : ATG TCA CCA GAA ATT CCC AGT T	719	36	60
<i>MUC1</i>	S : GAA CTA CGG GCA GCT GGA CAT C AS : GCT CTC TGG GCC AGT CCT CCT G	447	35	60
<i>MUC2</i>	S : CTG CAC CAA GAC CGT CCT CAT G AS : GCA AGG ACT GAA CAA AGA CTC AGA C	401	30	60
<i>MUC4</i>	S : CGC GGT GGT GGA GGC GTT CTT AS : GAA GAA TCC TGA CAG CCT TCA	596	35	60
<i>MUC5AC</i>	S : TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT AS : TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT	409	35	60
<i>28S</i>	S : GCA GGG CGA AGC AGA AGG AAA AS : TGA GAT CGT TTC GGC CCC AA	231	35	60

VII. Extraction des protéines totales à partir de culture cellulaire

a) Tampon d'extraction des protéines totales

Les protéines sont récupérées à partir de cellules post-confluentes. Les cellules sont grattées sur glace puis centrifugées pendant 5 minutes à 535 x g à 4 °C. Le culot est ensuite repris par 0,5 mL de D-PBS 1X stérile avant d'être une nouvelle fois centrifugé durant 1 minute à 7500 x g à 4 °C. Le culot est remis en suspension dans 0,5 mL de PBS 1X puis centrifugé comme précédemment.

Il est ensuite repris dans 1 mL de tampon de lyse :

- NaCl 150 mM, EDTA 1 mM
- Tris-HCl 50 mM, pH 7,4
- NP40 1% (v/v)
- aprotinine 1 µg/mL
- leupeptine 1 µg/mL
- fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF) 1 mM
- fluorure de sodium 5 mM
- orthovanadate de sodium 5 mM
- désoxycholate de sodium 0,25%

Les microtubes sont ensuite laissés sur la glace durant 30 min. Les microtubes sont agités toutes les 10 min afin de briser les membranes. Le lysat est ensuite centrifugé durant 10 min à 16 000 x g à 4 °C Le surnageant est récupéré puis conservé à -80 °C. Un dosage protéique est ultérieurement effectué par la méthode de l'acide bicinchonique (BCA).

b) Tampon d'extraction utilisé pour MUC1 (Tampon D1)

Les protéines sont récupérées à partir de cellules post-confluentes. Le tapis cellulaire est lavé 2 fois à l'aide de D-PBS 1X puis les cellules sont grattées sur glace dans 1 mL de tampon D1 (Tris 50 mM, dodécylsulfate de sodium (SDS) 2 % (m/v), glycérol 9,34 % (v/v)). La fragmentation des membranes plasmiques et nucléaires est effectuée par sonication sur glace. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 10 min à 5000 x g. Le surnageant est récupéré

puis conservé à -80 °C. Un dosage protéique est ultérieurement effectué par la méthode de l'acide bicinchonique (BCA).

Le surnageant cellulaire de chaque lignée est récupéré puis concentré 25 fois (Amicon Ultra-15 Millipore) avant d'être conservé à -80 °C.

c) Tampon d'extraction des protéines nucléo-cytoplasmiques

Les cellules sont cultivées en flasque de 75 cm² afin d'avoir une quantité importante de matériel pour chaque fraction protéique. Les cellules dans leur 15 mL de milieu de culture sont grattées sur glace et transférées dans un tube à centrifuger de 50 mL. La flasque est ensuite rincée avec 15 mL de D-PBS 1X glacé. Les 30 mL ainsi récupérés sont centrifugés pendant 5 minutes à 535 x g à 4 °C. Le culot est ensuite repris par 0,5 mL de D-PBS 1X, transféré dans un tube 1,5mL avant d'être une nouvelle fois centrifugé durant 1 minute à 7500 x g à 4 °C. Cette dernière étape est répétée deux fois.

Le culot est repris dans 1 mL de solution de lyse A froid en deux fois (2 x 0,5 mL) puis centrifugé à 7500 x g à 4° C.

Solution de lyse A

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

Le culot, repris dans 150 µL de solution A' de lyse, est bien homogénéisé puis laissé sur glace durant 10 min. Toutes les 5 min, le tube est « gratté » sur un portoir métallique afin de lyser par choc mécanique les cellules. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 16000 x g durant 10 min à 4° C.

Solution de lyse A'

- 1 mL de tampon A (HEPES/KOH 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM)
- DTT 0,5 mM
- PMSF 0,5 mM
- Leupeptine 10µg/mL
- Aprotinine 10 µg/mL
- Molybdate de sodium 0,1 mM
- Beta-glycérophosphate disodique 10 mM
- Fluorure de sodium 10 mM
- Orthovanadate de sodium 0,1 mM
- p-nitro-phénylphosphate 30 mM
- NP-40 0,1% v/v

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

Solution de lyse D

- 1 mL de tampon D (HEPES/KOH 20 mM, pH 7,9, KCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, glycérol 20% v/v)
- DTT 0,5 mM
- PMSF 0,5 mM

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

Solution de lyse C

- 1 mL de tampon A (HEPES/KOH 20 mM, pH 7,9, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glycérol 25% v/v)
- DTT 0,5 mM
- PMSF 0,5 mM
- Leupeptine 10 µg/mL
- Aprotinine 10 µg/mL
- Molybdate de sodium 0,1 mM
- Beta-glycérophosphate disodique 10 mM
- Fluorure de sodium 10 mM
- Orthovanadate de sodium 0,1 mM
- p-nitro-phénylphosphate 30 mM

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

VIII. Immunoprécipitation

Afin d'enrichir les échantillons étudiés en certaines protéines, il est nécessaire d'effectuer une immunoprécipitation de ces protéines selon le protocole suivant :

Une quantité de 150 µg (EGFR) ou 300 µg (MUC1) de protéines totales ou compartimentales non traités ou traités par l'EGF est mise en présence d'1 µg d'Anticorps anti EGFR (SantaCruz, Sc-03) ou MUC1 (SantaCruz, Sc-7313) dans des microtubes 2 ml en rotation à 4 °C toute la nuit. Un tube témoin avec 150 µg ou 300 µg de protéines et 1µg d'IgG non pertinente de la même espèce que l'anticorps servant à immunoprécipiter la protéine d'intérêt est également préparé.

Le reste du protocole (SIGMA, EZview Red protein A Affinity Gel) s'effectue sur glace et toutes les centrifugations sont effectuées à 4°C.

- Homogénéiser les billes (SIGMA, EZview Red protein A Affinity Gel) et en prélever 40 µl pour chaque tube
- Ajouter 750 µl de tampon de lyse (RIPA + 0,1 % de PMSF ajouté extemporanément) puis vortexer
- Centrifuger 30 secondes à 8200 x g et éliminer le surnageant. Cette étape est à effectuer deux fois
- Centrifuger les échantillons protéiques et les transférer dans les tubes contenant les billes
- Vortexer puis mettre les tubes en rotation pendant 1 h à 4 °C
- Centrifuger 30 secondes à 8200 x g et éliminer le surnageant
- Ajouter 750 µl de tampon de lyse, agiter 5 min au soleil à 4 °C, centrifuger 30 secondes à 8200 x g puis éliminer le surnageant. Cette étape est renouvelée 3 fois

Les échantillons peuvent être ensuite utilisés directement pour un western-blot ou conservés à -20 °C si ils sont utilisés assez rapidement

IX. Western-Blot

La migration est réalisée dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Tableau II). La dénaturation des échantillons s'effectue après l'ajout (v/v) d'une solution dénaturante faisant office également de tampon de charge (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 20 % glycérol (v/v), 10 % β-mercaptoéthanol (v/v), 0,05 % de bleu de bromophénol (m/v), 0,1 % de SDS (m/v)) et après chauffage à 100 °C pendant 5 min. La migration dure environ 1 h 30 environ sous courant constant (35 mA) dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,01% (m/v)). Les protéines sont transférées par électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose 0,22 µm (Schleicher and Schule) dans le tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1 % (v/v), méthanol 20 %) durant 1 h à tension constante (100 V). La membrane est lavée rapidement avec du tampon TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 % (v/v)). Le blocage des sites aspécifiques se fait par incubation de la membrane dans du tampon TBST + 20 % de lait écrémé (m/v) pendant au moins 2 h. La membrane est incubée pendant une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire puis l'anticorps secondaire approprié marqué à la peroxydase du Raifort (HRP) durant 2 heures (Tableau II). La révélation est faite à l'aide du kit West Pico

SuperSignal (Pierce, Thermo Scientific) selon les indications du fournisseur. Chaque incubation est séparée par une série de lavage au tampon TBST (1 x 5 min et 2 x 10 min pour les lavages entre anticorps et 3 x 7 min avant révélation). Les bandes sont quantifiées par densitométrie puis un ratio protéine spécifique sur β -actine a été calculé afin de normaliser les différentes conditions. Le pourcentage d'inhibition est obtenu en rapportant le ratio de la condition étudiée sur celui du contrôle sélectionné.

X. Cytométrie en flux

Les cellules sont cultivées comme expliquées précédemment et récupérées à confluence à partir de T25. Le protocole suivant est appliquée pour chaque lignée cellulaire :

- Laver le tapis cellulaire au PBS 1X stérile
- Trypsiniser doucement les cellules (1 mL de trypsine/EDTA, 4-5 min à l'étuve à 37 °C)
- Finir de décoller le tapis mécaniquement sans être trop brutal de manière à récupérer des cellules intactes
- Neutraliser la trypsine à l'aide de milieu complet
- Transférer dans un tube à centrifuger 50 mL
- Centrifuger 5 min à 1100 x g à température ambiante afin d'éliminer le surnageant
- Reprendre le culot par 10 mL de milieu complet
- Homogénéiser et réaliser une numération en cellule de Malassez
- Prévoir 100000 cellules par condition à analyser (contrôle, isotype, anticorps...)
- Laver les cellules 2 fois avec 10 mL de PBS-BSA 1 %
- Centrifuger 4 min à 1100 x g à température ambiante afin d'éliminer le surnageant
- Reprendre le culot par un volume $V=X$ fois 2 mL de PBS-BSA 1 % (m/v) où X correspond au nombre de conditions prévues
- Utiliser des tubes spéciaux dédiés à la cytométrie afin de transférer 2 mL de la suspension cellulaire pour chaque condition
- Centrifuger 4 min à 1100 x g à température ambiante afin d'éliminer le surnageant
- Introduire 50 μ L de PBS-BSA 1% (m/v) dans chaque tube
- Resuspendre le culot et ajouter si besoin le volume adéquat d'isotype ou d'anticorps (MUC1 : Sc-7313 PE 10 μ g/mL, isotype : Sc2866 PE 10 μ g/mL)

- Vortexer doucement et incuber durant 1 h à température ambiante et dans l'obscurité
- Laver les cellules avec 2 mL de PBS-BSA 1% (m/v) pour éliminer les anticorps non fixés
- Centrifuger 4 min à 1100 x g afin d'éliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire avec 700 µL de PBS-BSA 1% (m/v)
- Les cellules sont prêtes à être analysées

XI. Préparation des cellules pour l'analyse en microscopie confocale

Les lames utilisées sont soit des lames de verre soit des lames permanox à 8 chambres Lab-Tek (Nunc) et toutes les solutions sont faites dans le D-PBS+Ca²⁺+Mg²⁺ à pH 7,4 (Gibco). Les solutions préparées avec le D-PBS sont toutes filtrées (0,22 µm). Un ensemencement de 7,5 x 10⁴ cellules est réalisé par lame. Les différentes lignées cellulaires (CAPAN-1 invalidée pour la Galectine-3 et contrôle) sont cultivées jusqu'à confluence plus deux jours dans leur milieu respectif. Les immunomarquages sont effectués selon le protocole suivant :

- Laver les cellules à l'aide de D-PBS+Ca²⁺+Mg²⁺ avant de les mettre sur glace
- Fixer les cellules à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) 3 % (m/v) durant 20 min à 4 °C et à l'abri de la lumière
- Inactiver le PFA au niveau de son groupement aldéhyde par l'ajout de chlorure d'ammonium 50 mM (NH₄Cl) durant 20 min à température ambiante
- Perméabiliser les cellules à l'aide de saponine à 0,2 % (m/v) durant 20 min
- Saturer les sites aspécifiques à l'aide de saponine à 0,2 % /sérumalbumine bovine (BSA) 1 % durant 20 min

1) Cas de simple marquage

- Incuber les cellules avec la dilution d'anticorps primaire pendant 18 h à température ambiante (Tableau III)
- Laver les cellules par trois bains successifs de 10 min dans le D-PBS+Ca²⁺+Mg²⁺

- Incuber les cellules pendant 1 h 30 à température ambiante avec l'anticorps secondaire fluorescent spécifique (Jackson) dilué au 1/150^e dans la pénombre

Le reste du travail est effectué en limitant l'exposition des lames à la lumière pour éviter toute perte de fluorescence par *photobleaching*

- Laver les cellules avec deux bains rapides et un lavage final de 10 min

2) Cas de double marquage

- Incuber les cellules avec le premier anticorps primaire durant 1 h 30 à température ambiante (Tableau III)

- Laver les cellules avec trois bains successifs de 10 min dans le D-PBS+Ca²⁺+Mg²⁺

- Incuber les cellules durant 1 h 30 à température ambiante à l'obscurité avec l'anticorps secondaire fluorescent spécifique au premier anticorps primaire

Le reste du travail sera effectué en limitant l'exposition des lames à la lumière pour éviter toute perte de fluorescence par *photobleaching*

- Laver les cellules avec trois bains successifs de 10 min afin d'éliminer l'excédent d'anticorps fluorescent

- Incuber les cellules avec le deuxième anticorps primaire durant 1 h 30 à température ambiante

- Laver les cellules avec trois bains successifs de 10 min dans le D-PBS+Ca²⁺+Mg²⁺

- Incuber les cellules à température ambiante avec l'anticorps secondaire fluorescent spécifique du deuxième anticorps primaire pendant 1 h 30

Le montage est effectué à l'aide d'une solution de mowiol selon le protocole suivant dans les deux cas :

- Retirer les chambres en plastique de la lame avec précaution

- Oter délicatement le joint en silicone séparant la lame des chambres à l'aide d'une pince millipore
- Favoriser l'évaporation des dernières gouttes de réactifs présentes sur la lames par des va et vient dans l'air
- Réaliser le montage lame/lamelle à l'aide d'une solution de mowiol (glycérol 33 % (v/v), mowiol 13,3 % (m/v), Tris 0,13 M pH 8,5)

Les lames ont été observées à l'Institut de recherche interdisciplinaire de Lille sur le microscope confocal *LEICA SP5* de l'équipe de biophotonique cellulaire fonctionnelle dirigée par le Dr Laurent Héliot puis sur un microscope confocal Zeiss LSM 710 sur la plateforme d'imagerie de l'IFR 114 IMPRT dirigée par Meryem Tardivel.

XII. Cinétique de trafic intracellulaire

Les cellules sontensemencées de la même manière que pour les marquages classiques en microscopie confocale. Une fois à confluence, les cellules voit leur milieu changer par du milieu de culture frais auquel est ajouté du cycloheximide (20 mg/ ml). Elles sont ensuite placées pendant 2 heures à 19,5 °C. Les protéines sont ainsi accumulées dans le TGN. Enfin, les cellules sont incubées durant une durée particulière de la cinétique à 37 °C avant d'être mises sur glace pour interrompre le trafic intracellulaire. Le traitement des lames est ensuite effectué comme expliqué précédemment.

Tableau II							
Conditions utilisées pour le Western-blotting							
Antigène	Nom anticorps et fournisseur	Type	Spécificité	Référence	Quantité de protéines (µg)	Réticulation du gel (%)	Dilution des anticorps
MUC1	214 D4 (given by F.G. Hanisch)	Mab monoclonal	Mab monoclonal	1	20	2-10	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
UC1	M8 (LICR-LON-M8)	Mab monoclonal	répétitions en tandem	2, 3	20	2-10	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
MUC1	CT2 or Ab5 (Neomarkers)	AHab monoclonal	SSLSYTNPAV AATSANL	4		13	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
EGFR	2232 (Cell Signalling Technology)	Rab polyclonal	résidus autour d'Y1068	NA	30/300	8	1 ^{re} : 1/500 2 ^{re} : 1/5000
PhosphoEGFR	53A5 (CST-4407)	Rab monoclonal	AENAEpYLR VAP	5	150	8	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
Galectine-3	31707 (Abcam)	Rab polyclonal	extrémité C-terminale	NA	25	12	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
ERK	137F5 (CST-4695)	Rab monoclonal	extrémité C-terminale de ERK rat	NA	30	12	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
PhosphoERK	20G11 (CST-4376)	Rab monoclonal	phosphopeptide contenant T202/Y204	NA	30	12	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
Cyclin D1	M20 (sc-718)	Rab polyclonal	Extrémité C-terminale de la cycline D1 humaine	NA		12	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
Sp-1	PEP2 (sc-59)	Rab polyclonal	rat Sp1, acides aminés 528-546	6	30	8	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
Tubulin	DM1A (Sigma)	Mab monoclonal	Extrémité C-terminale, acides aminés 426-430	7	30	8	1 ^{re} : 1/1000 2 ^{re} : 1/10000
□-actin	AC-15 (Sigma)	Mab monoclonal	Extrémité N-terminale	8	15	10	1 ^{re} : 1/5000 2 ^{re} : 1/20000

NA : non attribuée

Références :

- (1) Summary Report on the ISOBM TD-4 workshop, *Tumor Biol* 1998; **19(S1)**:1-20
- (2) McIlhinney RAJ et al, *Biochem J* 1985; **227**:155-162
- (3) Price MR et al, *Int J Cancer* 1985; **36**:567-574
- (4) Schroeder JA et al, *JBC* 2001; **276**:13057-13064
- (5) Rojas M et al. *JBC* 1996; **271**:27456-27461
- (6) Jackson SP et al. *Cell* 1990; **63**:155-165
- (7) Serrano L et al. *Anal Biochem* 1986 ; **159** :253-259
- (8) North AJ et al. *J Cell Sci* 1994 ; **107** :445-455

Tableau III					
Conditions utilisées pour la microscopie confocale					
Antigène	Nom anticorps et fournisseur	Type	Spécificité	Référence	Dilution des anticorps
MUC1	214 D4 (given by F.G. Hanisch)	Mab monoclonal	Mab monoclonal	1	1/3
MUC1	CT2 or Ab5 (Neomarkers)	AHAb monoclonal	SSLSYTNPAVAATSANL	2	1/150
Galectine-3	fourni par H.J Gabius	Rab polyclonal	Gal-3 recombinante humaine	3, 4	1/150
EGFR	D38B1 (CST4267)	Rab monoclonal	Domaine cytoplasmique	NA	1/100
EEA1	610457 (BD Transduction Lab)	Mab monoclonal	Acides amines 3-281 d'EEA1 humain	NA	1/100
EEA1	2411S (CST)	Rab polyclonal	Région environnante de G14	NA	1/100
Toxine cholérique Alexa 488	Molecular Probes (Invitrogen)			NA	1/100
DyLight 488	Jackson	Dab anti-souris/ Gab anti-lapin		NA	1/150
DyLight 594	Jackson	Gab anti-lapin/ Dab anti-souris		NA	1/150
DAPI	(Invitrogen)			NA	1/45

NA : non attribuée

Références:

- (1) Summary Report on the ISOBM TD-4 workshop, *Tumor Biol* 1998; 19(S1):1-20
- (2) Schroeder JA et al, *JBC* 2001; 276:13057-13064
- (3) André S et al., *Bioorg Med Chem* 2006; 14:6314-6326
- (4) Langbein S et al., *Histopathology* 2007; 51:681-690

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abba, M. C., M. I. Nunez, A. G. Colussi, M. V. Croce, A. Segal-Eiras, and C. M. Aldaz. 2006. GATA3 protein as a MUC1 transcriptional regulator in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **8**:R64.

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

Agrwal, N., Q. Sun, S. Y. Wang, and J. L. Wang. 1993. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem* **268**:14932-14939.

Ahmad, N., H. J. Gabius, S. Andre, H. Kaltner, S. Sabesan, R. Roy, B. Liu, F. Macaluso, and C. F. Brewer. 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem* **279**:10841-10847.

Ahmad, R., D. Raina, V. Trivedi, J. Ren, H. Rajabi, S. Kharbanda, and D. Kufe. 2007. MUC1 oncoprotein activates the IkappaB kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. *Nat Cell Biol* **9**:1419-1427.

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

Aird, I., D. R. Lee, and J. A. Roberts. 1960. ABO blood groups and cancer of oesophagus, cancer of pancreas, and pituitary adenoma. *Br Med J* **1**:1163-1166.

Aishima, S., Y. Kuroda, Y. Nishihara, K. Taguchi, A. Taketomi, Y. Maehara, and M. Tsuneyoshi. 2006. Gastric mucin phenotype defines tumour progression and prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma: gastric foveolar type is associated with aggressive tumour behaviour. *Histopathology* **49**:35-44.

Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim, and M. Perucho. 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**:549-554.

Altschuler, Y., C. L. Kinlough, P. A. Poland, J. B. Bruns, G. Apodaca, O. A. Weisz, and R. P. Hughey. 2000. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol Biol Cell* **11**:819-831.

Amundadottir, L., P. Kraft, R. Z. Stolzenberg-Solomon, C. S. Fuchs, G. M. Petersen, A. A. Arslan, H. B. Bueno-de-Mesquita, M. Gross, K. Helzlsouer, E. J. Jacobs, A. LaCroix, W. Zheng, D. Albanes, W. Bamlet, C. D. Berg, F. Berrino, S. Bingham, J. E. Buring, P. M. Bracci, F. Canzian, F. Clavel-Chapelon, S. Clipp, M. Cotterchio, M. de Andrade, E. J. Duell, J. W. Fox, Jr., S. Gallinger, J. M. Gaziano, E. L. Giovannucci, M. Goggins, C. A. Gonzalez, G. Hallmans, S. E. Hankinson, M. Hassan, E. A. Holly, D. J. Hunter, A.

Hutchinson, R. Jackson, K. B. Jacobs, M. Jenab, R. Kaaks, A. P. Klein, C. Kooperberg, R. C. Kurtz, D. Li, S. M. Lynch, M. Mandelson, R. R. McWilliams, J. B. Mendelsohn, D. S. Michaud, S. H. Olson, K. Overvad, A. V. Patel, P. H. Peeters, A. Rajkovic, E. Riboli, H. A. Risch, X. O. Shu, G. Thomas, G. S. Tobias, D. Trichopoulos, S. K. Van Den Eeden, J. Virtamo, J. Wactawski-Wende, B. M. Wolpin, H. Yu, K. Yu, A. Zeleniuch-Jacquotte, S. J. Chanock, P. Hartge, and R. N. Hoover. 2009. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet* **41**:986-990.

Andreotti, G., and D. T. Silverman. 2012. Occupational risk factors and pancreatic cancer: a review of recent findings. *Mol Carcinog* **51**:98-108.

Ang, A. L., T. Taguchi, S. Francis, H. Folsch, L. J. Murrells, M. Pypaert, G. Warren, and I. Mellman. 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* **167**:531-543.

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

Arslan, A. A., K. J. Helzlsouer, C. Kooperberg, X. O. Shu, E. Steplowski, H. B. Bueno-de-Mesquita, C. S. Fuchs, M. D. Gross, E. J. Jacobs, A. Z. Lacroix, G. M. Petersen, R. Z. Stolzenberg-Solomon, W. Zheng, D. Albanes, L. Amundadottir, W. R. Bamlet, A. Barricarte, S. A. Bingham, H. Boeing, M. C. Boutron-Ruault, J. E. Buring, S. J. Chanock, S. Clipp, J. M. Gaziano, E. L. Giovannucci, S. E. Hankinson, P. Hartge, R. N. Hoover, D. J. Hunter, A. Hutchinson, K. B. Jacobs, P. Kraft, S. M. Lynch, J. Manjer, J. E. Manson, A. McTiernan, R. R. McWilliams, J. B. Mendelsohn, D. S. Michaud, D. Palli, T. E. Rohan, N. Slimani, G. Thomas, A. Tjonneland, G. S. Tobias, D. Trichopoulos, J. Virtamo, B. M. Wolpin, K. Yu, A. Zeleniuch-Jacquotte, and A. V. Patel. 2010. Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Arch Intern Med* **170**:791-802.

Artandi, S. E., and R. A. DePinho. 2000. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **10**:39-46.

Aubert, J. P., N. Porchet, M. Crepin, M. Duterque-Coquillaud, G. Vergnes, M. Mazzuca, B. Debuire, D. Petitprez, and P. Degand. 1991. Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences. *Am J Respir Cell Mol Biol* **5**:178-185.

Awaya, H., Y. Takeshima, M. Yamasaki, and K. Inai. 2004. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in atypical adenomatous hyperplasia, bronchioloalveolar carcinoma, adenocarcinoma with mixed subtypes, and mucinous bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol* **121**:644-653.

- Baldus, S. E., J. R. Wienand, J. P. Werner, S. Landsberg, U. Drebber, F. G. Hanisch, and H. P. Dienes.** 2005. Expression of MUC1, MUC2 and oligosaccharide epitopes in breast cancer: prognostic significance of a sialylated MUC1 epitope. *Int J Oncol* **27**:1289-1297.
- Bao, Q., and R. C. Hughes.** 1999. Galectin-3 and polarized growth within collagen gels of wild-type and ricin-resistant MDCK renal epithelial cells. *Glycobiology* **9**:489-495.
- Barboni, E. A., S. Bawumia, K. Henrick, and R. C. Hughes.** 2000. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology* **10**:1201-1208.
- Barondes, S. H., D. N. Cooper, M. A. Gitt, and H. Leffler.** 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* **269**:20807-20810.
- Barrow, H., X. Guo, H. H. Wandall, J. W. Pedersen, B. Fu, Q. Zhao, C. Chen, J. M. Rhodes, and L. G. Yu.** 2011. Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res* **17**:7035-7046.
- Bergquist, A., A. Ekbom, R. Olsson, D. Kornfeldt, L. Loof, A. Danielsson, R. Hultcrantz, S. Lindgren, H. Prytz, H. Sandberg-Gertzen, S. Almer, F. Granath, and U. Broome.** 2002. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* **36**:321-327.
- Bernerd, F., A. Sarasin, and T. Magnaldo.** 1999. Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11329-11334.
- Bhavanandan, V. P., N. J. Ringler, and D. C. Gowda.** 1998. Identification of the glycosidically bound sialic acid in mucin glycoproteins that reacts as "free sialic acid" in the Warren assay. *Glycobiology* **8**:1077-1086.
- Bhavanandan, V. P., Q. Zhu, K. Yamakami, N. A. Dilulio, S. Nair, C. Capon, J. Lemoine, and B. Fournet.** 1998. Purification and characterization of the MUC1 mucin-type glycoprotein, epitectin, from human urine: structures of the major oligosaccharide alditols. *Glycoconj J* **15**:37-49.
- Biankin, A. V., A. L. Morey, C. S. Lee, J. G. Kench, S. A. Biankin, H. C. Hook, D. R. Head, T. B. Hugh, R. L. Sutherland, and S. M. Henshall.** 2002. DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **20**:4531-4542.
- Bitler, B. G., A. Goverdhan, and J. A. Schroeder.** 2010. MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci* **123**:1716-1723.
- Blackford, A., O. K. Serrano, C. L. Wolfgang, G. Parmigiani, S. Jones, X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, J. R. Eshleman, M. Goggins, E. M. Jaffee, C. A. Iacobuzio-**

- Donahue, A. Maitra, J. L. Cameron, K. Olino, R. Schulick, J. Winter, J. M. Herman, D. Laheru, A. P. Klein, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, and R. H. Hruban.** 2009. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **15**:4674-4679.
- Braga, V. M., L. F. Pemberton, T. Duhig, and S. J. Gendler.** 1992. Spatial and temporal expression of an epithelial mucin, Muc-1, during mouse development. *Development* **115**:427-437.
- Braiterman, L., L. Nyasae, Y. Guo, R. Bustos, S. Lutsenko, and A. Hubbard.** 2009. Apical targeting and Golgi retention signals reside within a 9-amino acid sequence in the copper-ATPase, ATP7B. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G433-444.
- Brayman, M., A. Thathiah, and D. D. Carson.** 2004. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* **2**:4.
- Bresalier, R. S., N. Mazurek, L. R. Sternberg, J. C. Byrd, C. K. Yunker, P. Nangia-Makker, and A. Raz.** 1998. Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin 3. *Gastroenterology* **115**:287-296.
- Brown, D., and S. Breton.** 2000. Sorting proteins to their target membranes. *Kidney Int* **57**:816-824.
- Brugge, W. R., G. Y. Lauwers, D. Sahani, C. Fernandez-del Castillo, and A. L. Warshaw.** 2004. Cystic neoplasms of the pancreas. *N Engl J Med* **351**:1218-1226.
- Brune, K. A., B. Lau, E. Palmisano, M. Canto, M. G. Goggins, R. H. Hruban, and A. P. Klein.** 2010. Importance of age of onset in pancreatic cancer kindreds. *J Natl Cancer Inst* **102**:119-126.
- Buisine, M. P., J. L. Desseyn, N. Porchet, P. Degand, A. Laine, and J. P. Aubert.** 1998. Genomic organization of the 3'-region of the human MUC5AC mucin gene: additional evidence for a common ancestral gene for the 11p15.5 mucin gene family. *Biochem J* **332 (Pt 3)**:729-738.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens, and D. D. Von Hoff.** 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* **15**:2403-2413.
- Bynum, T. E., T. E. Solomon, L. R. Johnson, and E. D. Jacobson.** 1972. Inhibition of pancreatic secretion in man by cigarette smoking. *Gut* **13**:361-365.
- Califice, S., V. Castronovo, M. Bracke, and F. van den Brule.** 2004. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* **23**:7527-7536.

- Callery, M. P., K. J. Chang, E. K. Fishman, M. S. Talamonti, L. William Traverso, and D. C. Linehan.** 2009. Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol* **16**:1727-1733.
- Camby, I., N. Belot, F. Lefranc, N. Sadeghi, Y. de Launoit, H. Kaltner, S. Musette, F. Darro, A. Danguy, I. Salmon, H. J. Gabius, and R. Kiss.** 2002. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**:585-596.
- Campbell, S. L., R. Khosravi-Far, K. L. Rossman, G. J. Clark, and C. J. Der.** 1998. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**:1395-1413.
- Castronovo, V., F. A. Van Den Brule, P. Jackers, N. Clause, F. T. Liu, C. Gillet, and M. E. Sobel.** 1996. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol* **179**:43-48.
- Chan, J. M., F. Wang, and E. A. Holly.** 2007. Pancreatic cancer, animal protein and dietary fat in a population-based study, San Francisco Bay Area, California. *Cancer Causes Control* **18**:1153-1167.
- Chari, S. T., C. L. Leibson, K. G. Rabe, L. J. Timmons, J. Ransom, M. de Andrade, and G. M. Petersen.** 2008. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology* **134**:95-101.
- Chin, L., S. E. Artandi, Q. Shen, A. Tam, S. L. Lee, G. J. Gottlieb, C. W. Greider, and R. A. DePinho.** 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97**:527-538.
- Chmelar, R. S., and N. M. Nathanson.** 2006. Identification of a novel apical sorting motif and mechanism of targeting of the M2 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **281**:35381-35396.
- Colnot, C., S. S. Sidhu, F. Poirier, and N. Balmain.** 1999. Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**:1191-1202.
- Cooper, D. N., S. M. Massa, and S. H. Barondes.** 1991. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol* **115**:1437-1448.
- Cortegano, I., V. del Pozo, B. Cardaba, B. de Andres, S. Gallardo, A. del Amo, I. Arrieta, A. Jurado, P. Palomino, F. T. Liu, and C. Lahoz.** 1998. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol* **161**:385-389.
- Craig, S. S., P. Krishnaswamy, A. M. Irani, C. L. Kepley, F. T. Liu, and L. B. Schwartz.** 1995. Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils. *Anat Rec* **242**:211-219.

- Cresawn, K. O., B. A. Potter, A. Oztan, C. J. Guerriero, G. Ihrke, J. R. Goldenring, G. Apodaca, and O. A. Weisz.** 2007. Differential involvement of endocytic compartments in the biosynthetic traffic of apical proteins. *EMBO J* **26**:3737-3748.
- Davidson, P. J., S. Y. Li, A. G. Lohse, R. Vandergaast, E. Verde, A. Pearson, R. J. Patterson, J. L. Wang, and E. J. Arnoys.** 2006. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology* **16**:602-611.
- Delacour, D., C. I. Cramm-Behrens, H. Drobecq, A. Le Bivic, H. Y. Naim, and R. Jacob.** 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol* **16**:408-414.
- Delacour, D., V. Gouyer, J. P. Zanetta, H. Drobecq, E. Leteurtre, G. Grard, O. Moreau-Hannedouche, E. Maes, A. Pons, S. Andre, A. Le Bivic, H. J. Gabius, A. Manninen, K. Simons, and G. Huet.** 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* **169**:491-501.
- Delacour, D., C. Greb, A. Koch, E. Salomonsson, H. Leffler, A. Le Bivic, and R. Jacob.** 2007. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic* **8**:379-388.
- DeSouza, M. M., G. A. Surveyor, R. E. Price, J. Julian, R. Kardon, X. Zhou, S. Gendler, J. Hilkens, and D. D. Carson.** 1999. MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol* **45**:127-158.
- Desseyn, J. L., M. P. Buisine, N. Porchet, J. P. Aubert, P. Degand, and A. Laine.** 1998. Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J Mol Evol* **46**:102-106.
- Desseyn, J. L., V. Guyonnet-Duperat, N. Porchet, J. P. Aubert, and A. Laine.** 1997. Human mucin gene MUC5B, the 10.7-kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat. Structural evidence for a 11p15.5 gene family. *J Biol Chem* **272**:3168-3178.
- Deutsch, M., M. M. Rosenstein, and R. K. Ramanathan.** 1999. Pancreatic cancer in a young adult after treatment for Hodgkin's disease. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **11**:280-282.
- Dietz, A. B., P. A. Bulur, G. J. Knutson, R. Matasic, and S. Vuk-Pavlovic.** 2000. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* **275**:731-738.
- Dufosse, J., N. Porchet, J. P. Audie, V. Guyonnet Duperat, A. Laine, I. Van-Seuningen, S. Marrakchi, P. Degand, and J. P. Aubert.** 1993. Degenerate 87-base-pair tandem repeats create hydrophilic/hydrophobic alternating domains in human mucin peptides mapped to 11p15. *Biochem J* **293 (Pt 2)**:329-337.
- Duraisamy, S., T. Kufe, S. Ramasamy, and D. Kufe.** 2007. Evolution of the human MUC1 oncoprotein. *Int J Oncol* **31**:671-677.

- Elad-Sfadia, G., R. Haklai, E. Balan, and Y. Kloog.** 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.
- Ellerhorst, J. A., L. C. Stephens, T. Nguyen, and X. C. Xu.** 2002. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate* **50**:64-70.
- Emlet, D. R., D. K. Moscatello, L. B. Ludlow, and A. J. Wong.** 1997. Subsets of epidermal growth factor receptors during activation and endocytosis. *J Biol Chem* **272**:4079-4086.
- Engelman, J. A.** 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* **9**:550-562.
- Escande, F., J. P. Aubert, N. Porchet, and M. P. Buisine.** 2001. Human mucin gene MUC5AC: organization of its 5'-region and central repetitive region. *Biochem J* **358**:763-772.
- Eude-Le Parco, I., G. Gendronneau, T. Dang, D. Delacour, V. L. Thijssen, W. Edelmann, M. Peuchmaur, and F. Poirier.** 2009. Genetic assessment of the importance of galectin-3 in cancer initiation, progression, and dissemination in mice. *Glycobiology* **19**:68-75.
- Everhart, J., and D. Wright.** 1995. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* **273**:1605-1609.
- Fautsch, M. P., A. O. Silva, and D. H. Johnson.** 2003. Carbohydrate binding proteins galectin-1 and galectin-3 in human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* **77**:11-16.
- Flotte, T. J., T. A. Springer, and G. J. Thorbecke.** 1983. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am J Pathol* **111**:112-124.
- Fogh, J., J. M. Fogh, and T. Orfeo.** 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**:221-226.
- Fogh, J., W. C. Wright, and J. D. Loveless.** 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* **58**:209-214.
- Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino, and I. Mellman.** 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**:189-198.
- Frigeri, L. G., R. I. Zuberi, and F. T. Liu.** 1993. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry* **32**:7644-7649.
- Fukumori, T., Y. Takenaka, N. Oka, T. Yoshii, V. Hogan, H. Inohara, H. O. Kanayama, H. R. Kim, and A. Raz.** 2004. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer Res* **64**:3376-3379.

- Fukumori, T., Y. Takenaka, T. Yoshii, H. R. Kim, V. Hogan, H. Inohara, S. Kagawa, and A. Raz.** 2003. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* **63**:8302-8311.
- Furtak, V., F. Hatcher, and J. Ochieng.** 2001. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:845-850.
- Gaemers, I. C., H. L. Vos, H. H. Volders, S. W. van der Valk, and J. Hilkens.** 2001. A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells. *J Biol Chem* **276**:6191-6199.
- Geary, J., P. Sasieni, R. Houlston, L. Izatt, R. Eeles, S. J. Payne, S. Fisher, and S. V. Hodgson.** 2008. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Fam Cancer* **7**:163-172.
- Gendler, S. J.** 2001. Letter for Joyce. *Glycoconj J* **18**:839-840.
- Gendler, S. J.** 2001. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**:339-353.
- Gendler, S. J., C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, and D. Wilson.** 1990. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* **265**:15286-15293.
- Gillen, S., T. Schuster, C. Meyer Zum Buschenfelde, H. Friess, and J. Kleeff.** 2010. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med* **7**:e1000267.
- Gisselsson, D., T. Jonson, A. Petersen, B. Strombeck, P. Dal Cin, M. Hoglund, F. Mitelman, F. Mertens, and N. Mandahl.** 2001. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12683-12688.
- Gitt, M. A., and S. H. Barondes.** 1986. Evidence that a human soluble beta-galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:7603-7607.
- Gitt, M. A., M. F. Wiser, H. Leffler, J. Herrmann, Y. R. Xia, S. M. Massa, D. N. Cooper, A. J. Lusic, and S. H. Barondes.** 1995. Sequence and mapping of galectin-5, a beta-galactoside-binding lectin, found in rat erythrocytes. *J Biol Chem* **270**:5032-5038.
- Glinsky, V. V., G. V. Glinsky, O. V. Glinskii, V. H. Huxley, J. R. Turk, V. V. Mossine, S. L. Deutscher, K. J. Pienta, and T. P. Quinn.** 2003. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res* **63**:3805-3811.

- Glinsky, V. V., M. E. Huflejt, G. V. Glinsky, S. L. Deutscher, and T. P. Quinn.** 2000. Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Res* **60**:2584-2588.
- Goggins, M.** 2007. Identifying molecular markers for the early detection of pancreatic neoplasia. *Semin Oncol* **34**:303-310.
- Goggins, M., R. H. Hruban, and S. E. Kern.** 2000. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol* **156**:1767-1771.
- Gong, H. C., Y. Honjo, P. Nangia-Makker, V. Hogan, N. Mazurak, R. S. Bresalier, and A. Raz.** 1999. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res* **59**:6239-6245.
- Grutzmann, R., S. Post, H. D. Saeger, and M. Niedergethmann.** 2011. Intraductal papillary mucinous neoplasia (IPMN) of the pancreas: its diagnosis, treatment, and prognosis. *Dtsch Arztebl Int* **108**:788-794.
- Gu, M., W. Wang, W. K. Song, D. N. Cooper, and S. J. Kaufman.** 1994. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci* **107 (Pt 1)**:175-181.
- Gum, J. R., J. C. Byrd, J. W. Hicks, N. W. Toribara, D. T. Lamport, and Y. S. Kim.** 1989. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* **264**:6480-6487.
- Hadari, Y. R., R. Arbel-Goren, Y. Levy, A. Amsterdam, R. Alon, R. Zakut, and Y. Zick.** 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci* **113 (Pt 13)**:2385-2397.
- Hadari, Y. R., K. Paz, R. Dekel, T. Mestrovic, D. Accili, and Y. Zick.** 1995. Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4. *J Biol Chem* **270**:3447-3453.
- Hahn, S. A., M. Schutte, A. T. Hoque, C. A. Moskaluk, L. T. da Costa, E. Rozenblum, C. L. Weinstein, A. Fischer, C. J. Yeo, R. H. Hruban, and S. E. Kern.** 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* **271**:350-353.
- Hanisch, F. G., S. Muller, H. Hassan, H. Clausen, N. Zachara, A. A. Gooley, H. Paulsen, K. Alving, and J. Peter-Katalinic.** 1999. Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions. *J Biol Chem* **274**:9946-9954.

Hart, A. R., H. Kennedy, and I. Harvey. 2008. Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation. *Clin Gastroenterol Hepatol* **6**:275-282.

He, C., M. Hobert, L. Friend, and C. Carlin. 2002. The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J Biol Chem* **277**:38284-38293.

Hearle, N., V. Schumacher, F. H. Menko, S. Olschwang, L. A. Boardman, J. J. Gille, J. J. Keller, A. M. Westerman, R. J. Scott, W. Lim, J. D. Trimbath, F. M. Giardiello, S. B. Gruber, G. J. Offerhaus, F. W. de Rooij, J. H. Wilson, A. Hansmann, G. Moslein, B. Royer-Pokora, T. Vogel, R. K. Phillips, A. D. Spigelman, and R. S. Houlston. 2006. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res* **12**:3209-3215.

Henderson, N. C., A. C. Mackinnon, S. L. Farnworth, F. Poirier, F. P. Russo, J. P. Iredale, C. Haslett, K. J. Simpson, and T. Sethi. 2006. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5060-5065.

Hilkens, J., and F. Buijs. 1988. Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**:4215-4222.

Hirabayashi, J., T. Hashidate, Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W. E. Muller, F. Yagi, and K. Kasai. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* **1572**:232-254.

Hirabayashi, J., and K. Kasai. 1988. Complete amino acid sequence of a beta-galactoside-binding lectin from human placenta. *J Biochem* **104**:1-4.

Hittelet, A., H. Legendre, N. Nagy, Y. Bronckart, J. C. Pector, I. Salmon, P. Yeaton, H. J. Gabius, R. Kiss, and I. Camby. 2003. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int J Cancer* **103**:370-379.

Ho, S. B., G. A. Niehans, C. Lyftogt, P. S. Yan, D. L. Cherwitz, E. T. Gum, R. Dahiya, and Y. S. Kim. 1993. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* **53**:641-651.

Hollingsworth, M. A., J. M. Strawhecker, T. C. Caffrey, and D. R. Mack. 1994. Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int J Cancer* **57**:198-203.

Hong, S. M., C. M. Heaphy, C. Shi, S. H. Eo, H. Cho, A. K. Meeker, J. R. Eshleman, R. H. Hruban, and M. Goggins. 2011. Telomeres are shortened in acinar-to-ductal metaplasia lesions associated with pancreatic intraepithelial neoplasia but not in isolated acinar-to-ductal metaplasias. *Mod Pathol* **24**:256-266.

- Horn, G., A. Gaziel, D. H. Wreschner, N. I. Smorodinsky, and M. Ehrlich.** 2009. ERK and PI3K regulate different aspects of the epithelial to mesenchymal transition of mammary tumor cells induced by truncated MUC1. *Exp Cell Res* **315**:1490-1504.
- Hotta, K., T. Funahashi, Y. Matsukawa, M. Takahashi, H. Nishizawa, K. Kishida, M. Matsuda, H. Kuriyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, N. L. Bodkin, B. C. Hansen, and Y. Matsuzawa.** 2001. Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. *J Biol Chem* **276**:34089-34097.
- Hoyer, K. K., M. Pang, D. Gui, I. P. Shintaku, I. Kuwabara, F. T. Liu, J. W. Said, L. G. Baum, and M. A. Teitell.** 2004. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* **164**:893-902.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, and G. J. Offerhaus.** 2001. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* **25**:579-586.
- Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern.** 2000. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **6**:2969-2972.
- Hruban, R. H., C. Iacobuzio-Donahue, R. E. Wilentz, M. Goggins, and S. E. Kern.** 2001. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* **7**:251-258.
- Hruban, R. H., A. Maitra, S. E. Kern, and M. Goggins.** 2007. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **36**:831-849, vi.
- Hruban, R. H., R. E. Wilentz, and S. E. Kern.** 2000. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* **156**:1821-1825.
- Hsu, S. C., and M. C. Hung.** 2007. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J Biol Chem* **282**:10432-10440.
- Huang, L., D. Chen, D. Liu, L. Yin, S. Kharbanda, and D. Kufe.** 2005. MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3 β -mediated phosphorylation and degradation of β -catenin. *Cancer Res* **65**:10413-10422.
- Huang, L., J. Ren, D. Chen, Y. Li, S. Kharbanda, and D. Kufe.** 2003. MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol Ther* **2**:702-706.
- Huflejt, M. E., C. W. Turck, R. Lindstedt, S. H. Barondes, and H. Leffler.** 1993. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem* **268**:26712-26718.

Hughes, R. C. 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1473**:172-185.

Hughes, R. C. 2001. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* **83**:667-676.

Huxley, R., A. Ansary-Moghaddam, A. Berrington de Gonzalez, F. Barzi, and M. Woodward. 2005. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* **92**:2076-2083.

Iglesias Garcia, J., J. Larino Noia, and J. E. Dominguez Munoz. 2009. Endoscopic ultrasound in the diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Rev Esp Enferm Dig* **101**:631-638.

Infante, J. R., H. Matsubayashi, N. Sato, J. Tonascia, A. P. Klein, T. A. Riall, C. Yeo, C. Iacobuzio-Donahue, and M. Goggins. 2007. Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **25**:319-325.

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

Jonckheere, N., A. Vincent, M. Perrais, M. P. Ducourouble, A. K. Male, J. P. Aubert, P. Pigny, K. L. Carraway, J. N. Freund, I. B. Renes, and I. Van Seuningen. 2007. The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells. *J Biol Chem* **282**:22638-22650.

Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S. M. Hong, B. Fu, M. T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, and K. W. Kinzler. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**:1801-1806.

Kato, K., W. Lu, H. Kai, and K. C. Kim. 2007. Phosphoinositide 3-kinase is activated by MUC1 but not responsible for MUC1-induced suppression of Toll-like receptor 5 signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**:L686-692.

Kawano, T., M. Ito, D. Raina, Z. Wu, J. Rosenblatt, D. Avigan, R. Stone, and D. Kufe. 2007. MUC1 oncoprotein regulates Bcr-Abl stability and pathogenesis in chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* **67**:11576-11584.

Keller, P., D. Toomre, E. Diaz, J. White, and K. Simons. 2001. Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* **3**:140-149.

Kelly, K. J., D. Y. Greenblatt, Y. Wan, R. J. Rettammel, E. Winslow, C. S. Cho, and S. M. Weber. 2011. Risk stratification for distal pancreatectomy utilizing ACS-NSQIP: preoperative factors predict morbidity and mortality. *J Gastrointest Surg* **15**:250-259, discussion 259-261.

Khaldoyanidi, S. K., V. V. Glinsky, L. Sikora, A. B. Glinskii, V. V. Mossine, T. P. Quinn, G. V. Glinsky, and P. Sriramarao. 2003. MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J Biol Chem* **278**:4127-4134.

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

Kim, H. R., H. M. Lin, H. Biliran, and A. Raz. 1999. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res* **59**:4148-4154.

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

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

Kinlough, C. L., P. A. Poland, S. J. Gendler, P. E. Mattila, D. Mo, O. A. Weisz, and R. P. Hughey. 2011. Core-glycosylated mucin-like repeats from MUC1 are an apical targeting signal. *J Biol Chem* **286**:39072-39081.

Kleihues, P., B. Schauble, A. zur Hausen, J. Esteve, and H. Ohgaki. 1997. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* **150**:1-13.

Klein, A. P., K. A. Brune, G. M. Petersen, M. Goggins, A. C. Tersmette, G. J. Offerhaus, C. Griffin, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. Kern, and R. H. Hruban. 2004. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res* **64**:2634-2638.

Knibbs, R. N., N. Agrwal, J. L. Wang, and I. J. Goldstein. 1993. Carbohydrate-binding protein 35. II. Analysis of the interaction of the recombinant polypeptide with saccharides. *J Biol Chem* **268**:14940-14947.

Knowles, M. R., and R. C. Boucher. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* **109**:571-577.

Koshy, M. C., J. C. Landry, S. X. Cavanaugh, C. D. Fuller, C. G. Willett, R. A. Abrams, J. P. Hoffman, and C. R. Thomas, Jr. 2005. A challenge to the therapeutic nihilism of ESPAC-1. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **61**:965-966.

- Kosugi, M., R. Ahmad, M. Alam, Y. Uchida, and D. Kufe.** 2012. MUC1-C oncoprotein regulates glycolysis and pyruvate kinase M2 activity in cancer cells. *PLoS One* **6**:e28234.
- Kovarik, A., P. J. Lu, N. Peat, J. Morris, and J. Taylor-Papadimitriou.** 1996. Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *J Biol Chem* **271**:18140-18147.
- Kovarik, A., N. Peat, D. Wilson, S. J. Gendler, and J. Taylor-Papadimitriou.** 1993. Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC1 gene. *J Biol Chem* **268**:9917-9926.
- Krugluger, W., L. G. Frigeri, T. Lucas, M. Schmer, O. Forster, F. T. Liu, and G. Boltz-Nitulescu.** 1997. Galectin-3 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cell proliferation and GM-CSF-induced gene transcription. *Immunobiology* **197**:97-109.
- Lagow, E. L., and D. D. Carson.** 2002. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem* **86**:759-772.
- Lahm, H., S. Andre, A. Hoefflich, J. R. Fischer, B. Sordat, H. Kaltner, E. Wolf, and H. J. Gabius.** 2001. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**:375-386.
- Lal, G., G. Liu, B. Schmocker, P. Kaurah, H. Ozcelik, S. A. Narod, M. Redston, and S. Gallinger.** 2000. Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germ-line p16, BRCA1, and BRCA2 mutations. *Cancer Res* **60**:409-416.
- Lan, M. S., S. K. Batra, W. N. Qi, R. S. Metzgar, and M. A. Hollingsworth.** 1990. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem* **265**:15294-15299.
- Larsson, S. C., E. Giovannucci, and A. Wolk.** 2006. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* **131**:1271-1283.
- Lavra, L., C. Rinaldo, A. Ulivieri, E. Luciani, P. Fidanza, L. Giacomelli, C. Bellotti, A. Ricci, M. Trovato, S. Soddu, A. Bartolazzi, and S. Sciacchitano.** 2011. The loss of the p53 activator HIPK2 is responsible for galectin-3 overexpression in well differentiated thyroid carcinomas. *PLoS One* **6**:e20665.
- Le Marer, N., and R. C. Hughes.** 1996. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol* **168**:51-58.
- Lee, I. J., S. W. Hyun, A. Nandi, and K. C. Kim.** 2003. Transcriptional regulation of the hamster *Muc1* gene: identification of a putative negative regulatory element. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**:L160-168.

- Lee, Y. J., Y. K. Song, J. J. Song, R. R. Siervo-Sassi, H. R. Kim, L. Li, D. R. Spitz, A. Lokshin, and J. H. Kim.** 2003. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Exp Cell Res* **288**:21-34.
- Leng, Y., C. Cao, J. Ren, L. Huang, D. Chen, M. Ito, and D. Kufe.** 2007. Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62. *J Biol Chem* **282**:19321-19330.
- Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y. R. Hadari, S. Eshhar, D. Ronen, E. Elhanany, B. Geiger, and Y. Zick.** 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem* **276**:31285-31295.
- Li, Y., A. Bharti, D. Chen, J. Gong, and D. Kufe.** 1998. Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol* **18**:7216-7224.
- Li, Y., H. Kuwahara, J. Ren, G. Wen, and D. Kufe.** 2001. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin. *J Biol Chem* **276**:6061-6064.
- Li, Y., J. Ren, W. Yu, Q. Li, H. Kuwahara, L. Yin, K. L. Carraway, 3rd, and D. Kufe.** 2001. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J Biol Chem* **276**:35239-35242.
- Li, Y., H. Yi, Y. Yao, X. Liao, Y. Xie, J. Yang, Z. Yan, L. Wang, S. Lu, Y. Kuang, M. Gu, J. Fei, Z. Wang, and L. Huang.** 2011. The cytoplasmic domain of MUC1 induces hyperplasia in the mammary gland and correlates with nuclear accumulation of beta-catenin. *PLoS One* **6**:e19102.
- Li, Y., W. H. Yu, J. Ren, W. Chen, L. Huang, S. Kharbanda, M. Loda, and D. Kufe.** 2003. Heregulin targets gamma-catenin to the nucleolus by a mechanism dependent on the DF3/MUC1 oncoprotein. *Mol Cancer Res* **1**:765-775.
- Lidell, M. E., M. E. Johansson, M. Morgelin, N. Asker, J. R. Gum, Jr., Y. S. Kim, and G. C. Hansson.** 2003. The recombinant C-terminus of the human MUC2 mucin forms dimers in Chinese-hamster ovary cells and heterodimers with full-length MUC2 in LS 174T cells. *Biochem J* **372**:335-345.
- Ligtenberg, M. J., L. Kruijshaar, F. Buijs, M. van Meijer, S. V. Litvinov, and J. Hilkens.** 1992. Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem* **267**:6171-6177.
- Lin, H. M., B. K. Moon, F. Yu, and H. R. Kim.** 2000. Galectin-3 mediates genistein-induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis. *Carcinogenesis* **21**:1941-1945.

- Lin, S. Y., K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon, and M. C. Hung.** 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* **3**:802-808.
- Lindkvist, B., N. Wierup, F. Sundler, and A. Borgstrom.** 2008. Long-term nicotine exposure causes increased concentrations of trypsinogens and amylase in pancreatic extracts in the rat. *Pancreas* **37**:288-294.
- Litvinov, S. V., and J. Hilkens.** 1993. The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem* **268**:21364-21371.
- Liu, F. T., D. K. Hsu, R. I. Zuberi, I. Kuwabara, E. Y. Chi, and W. R. Henderson, Jr.** 1995. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* **147**:1016-1028.
- Liu, L., T. Sakai, N. Sano, and K. Fukui.** 2004. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. *Biochem J* **380**:31-41.
- Liu, P., H. Cheng, T. M. Roberts, and J. J. Zhao.** 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**:627-644.
- Lloyd, K. O., J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. Yin, and J. Taylor-Papadimitriou.** 1996. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem* **271**:33325-33334.
- Lo, H. W., M. Ali-Seyed, Y. Wu, G. Bartholomeusz, S. C. Hsu, and M. C. Hung.** 2006. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J Cell Biochem* **98**:1570-1583.
- Lock, J. G., and J. L. Stow.** 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* **16**:1744-1755.
- Longnecker, D. S., H. Shinozuka, and A. Dekker.** 1980. Focal acinar cell dysplasia in human pancreas. *Cancer* **45**:534-540.
- Longnecker, D. S., and J. N. Webb.** 1980. Dysplastic acinar cell foci in human pancreas. *Hum Pathol* **11**:86-87.
- Lotan, R., P. N. Belloni, R. J. Tressler, D. Lotan, X. C. Xu, and G. L. Nicolson.** 1994. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. *Glycoconj J* **11**:462-468.
- Lotz, M. M., C. W. Andrews, Jr., C. A. Korzelius, E. C. Lee, G. D. Steele, Jr., A. Clarke, and A. M. Mercurio.** 1993. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35)

and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:3466-3470.

Loukopoulos, P., K. Kanetaka, M. Takamura, T. Shibata, M. Sakamoto, and S. Hirohashi. 2004. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* **29**:193-203.

Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg, and L. Domellof. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* **328**:1433-1437.

Lueangarun, S., P. Sittinamsuwan, B. Mahakkanukrauh, P. Pattanaprichakul, and S. Pongprasobchai. 2011. Pancreatic panniculitis: a cutaneous presentation as an initial clue to the diagnosis of pancreatic cancer. *J Med Assoc Thai* **94 Suppl 1**:S253-257.

Lyon, J. L., M. L. Slattery, A. W. Mahoney, and L. M. Robison. 1993. Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2**:513-518.

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

MacDonald, B. T., K. Tamai, and X. He. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**:9-26.

Mack, T. M., M. C. Yu, R. Hanisch, and B. E. Henderson. 1986. Pancreas cancer and smoking, beverage consumption, and past medical history. *J Natl Cancer Inst* **76**:49-60.

Madsen, P., H. H. Rasmussen, T. Flint, P. Gromov, T. A. Kruse, B. Honore, H. Vorum, and J. E. Celis. 1995. Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *J Biol Chem* **270**:5823-5829.

Maitra, A., N. V. Adsay, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, A. De Marzo, J. L. Cameron, C. J. Yeo, and R. H. Hruban. 2003. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* **16**:902-912.

Maitra, A., N. Fukushima, K. Takaori, and R. H. Hruban. 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* **12**:81-91.

Malumbres, M., and M. Barbacid. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**:459-465.

Marzolo, M. P., M. I. Yuseff, C. Retamal, M. Donoso, F. Ezquer, P. Farfan, Y. Li, and G. Bu. 2003. Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and

megalyn in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic* **4**:273-288.

Masia, R., M. Mino-Kenudson, A. L. Warshaw, M. B. Pitman, and J. Misdraji. 2011. Pancreatic mucinous cystic neoplasm of the main pancreatic duct. *Arch Pathol Lab Med* **135**:264-267.

Massague, J., S. W. Blain, and R. S. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**:295-309.

Matarrese, P., N. Tinari, M. L. Semeraro, C. Natoli, S. Iacobelli, and W. Malorni. 2000. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett* **473**:311-315.

Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman. 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**:741-753.

Mattila, P. E., C. L. Kinlough, J. R. Bruns, O. A. Weisz, and R. P. Hughey. 2009. MUC1 traverses apical recycling endosomes along the biosynthetic pathway in polarized MDCK cells. *Biol Chem* **390**:551-556.

Mayor, S., and H. Riezman. 2004. Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:110-120.

Mazurek, N., J. Conklin, J. C. Byrd, A. Raz, and R. S. Bresalier. 2000. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem* **275**:36311-36315.

McDonald, N. Q., and W. A. Hendrickson. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**:421-424.

McPhee, J. T., J. S. Hill, G. F. Whalen, M. Zayaruzny, D. E. Litwin, M. E. Sullivan, F. A. Anderson, and J. F. Tseng. 2007. Perioperative mortality for pancreatectomy: a national perspective. *Ann Surg* **246**:246-253.

Meerzaman, D., P. S. Shapiro, and K. C. Kim. 2001. Involvement of the MAP kinase ERK2 in MUC1 mucin signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**:L86-91.

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

Moiseeva, E. P., Q. Javed, E. L. Spring, and D. P. de Bono. 2000. Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* **45**:493-502.

Monges, G. M., M. P. Mathoulin-Portier, R. B. Acres, G. F. Houvenaeghel, M. F. Giovannini, J. F. Seitz, V. J. Bardou, M. J. Payan, and D. Olive. 1999. Differential MUC 1 expression in normal and neoplastic human pancreatic tissue. An immunohistochemical study of 60 samples. *Am J Clin Pathol* **112**:635-640.

Mostov, K. E. 1994. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* **12**:63-84.

Moutsatsos, I. K., M. Wade, M. Schindler, and J. L. Wang. 1987. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:6452-6456.

Muller, M. F., C. Meyenberger, P. Bertschinger, R. Schaer, and B. Marincek. 1994. Pancreatic tumors: evaluation with endoscopic US, CT, and MR imaging. *Radiology* **190**:745-751.

Murphy, K. M., K. A. Brune, C. Griffin, J. E. Sollenberger, G. M. Petersen, R. Bansal, R. H. Hruban, and S. E. Kern. 2002. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res* **62**:3789-3793.

Nagy, N., Y. Bronckart, I. Camby, H. Legendre, H. Lahm, H. Kaltner, Y. Hadari, P. Van Ham, P. Yeaton, J. C. Pector, Y. Zick, I. Salmon, A. Danguy, R. Kiss, and H. J. Gabius. 2002. Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* **50**:392-401.

Nakahara, S., V. Hogan, H. Inohara, and A. Raz. 2006. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *J Biol Chem* **281**:39649-39659.

Nakahara, S., N. Oka, and A. Raz. 2005. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* **10**:267-275.

Nangia-Makker, P., Y. Honjo, R. Sarvis, S. Akahani, V. Hogan, K. J. Pienta, and A. Raz. 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* **156**:899-909.

Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, C. Bassi, P. Ghaneh, D. Cunningham, D. Goldstein, R. Padbury, M. J. Moore, S. Gallinger, C. Mariette, M. N. Wentz, J. R. Izbicki, H. Friess, M. M. Lerch, C. Dervenis, A. Olah, G. Butturini, R. Doi, P. A. Lind, D. Smith, J. W. Valle, D. H. Palmer, J. A. Buckels, J. Thompson, C. J. McKay, C. L. Rawcliffe, and M. W. Buchler. 2010. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA* **304**:1073-1081.

- Niida, S., N. Amizuka, F. Hara, H. Ozawa, and H. Kodama.** 1994. Expression of Mac-2 antigen in the preosteoclast and osteoclast identified in the op/op mouse injected with macrophage colony-stimulating factor. *J Bone Miner Res* **9**:873-881.
- Nothlings, U., L. R. Wilkens, S. P. Murphy, J. H. Hankin, B. E. Henderson, and L. N. Kolonel.** 2005. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. *J Natl Cancer Inst* **97**:1458-1465.
- Oaks, B. M., K. W. Dodd, C. L. Meinhold, L. Jiao, T. R. Church, and R. Z. Stolzenberg-Solomon.** 2010. Folate intake, post-folic acid grain fortification, and pancreatic cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr* **91**:449-455.
- Ochieng, J., V. Furtak, and P. Lukyanov.** 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* **19**:527-535.
- Ochieng, J., B. Green, S. Evans, O. James, and P. Warfield.** 1998. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta* **1379**:97-106.
- Ochieng, J., D. Platt, L. Tait, V. Hogan, T. Raz, P. Carmi, and A. Raz.** 1993. Structure-function relationship of a recombinant human galactoside-binding protein. *Biochemistry* **32**:4455-4460.
- O'Driscoll, L., R. Linehan, Y. H. Liang, H. Joyce, I. Oglesby, and M. Clynes.** 2002. Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro. *Anticancer Res* **22**:3117-3125.
- Oka, N., S. Nakahara, Y. Takenaka, T. Fukumori, V. Hogan, H. O. Kanayama, T. Yanagawa, and A. Raz.** 2005. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* **65**:7546-7553.
- Pacis, R. A., M. J. Pilat, K. J. Pienta, K. Wojno, A. Raz, V. Hogan, and C. R. Cooper.** 2000. Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. *Prostate* **44**:118-123.
- Pahwa, G. S., L. J. Maher, 3rd, and M. A. Hollingsworth.** 1996. A potential H-DNA element in the MUC1 promoter does not influence transcription. *J Biol Chem* **271**:26543-26546.
- Pandey, P., S. Kharbanda, and D. Kufe.** 1995. Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res* **55**:4000-4003.
- Pannala, R., J. B. Leirness, W. R. Bamlet, A. Basu, G. M. Petersen, and S. T. Chari.** 2008. Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology* **134**:981-987.

Paron, I., A. Scalon, A. Pines, A. Bachi, F. T. Liu, C. Puppini, M. Pandolfi, L. Ledda, C. Di Loreto, G. Damante, and G. Tell. 2003. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **302**:545-553.

Paz, A., R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan, and Y. Kloog. 2001. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* **20**:7486-7493.

Peng, B., J. B. Fleming, T. Breslin, A. M. Grau, S. Fojioka, J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, D. Ayers, K. Wathen, T. Wu, K. D. Robertson, and P. J. Chiao. 2002. Suppression of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **8**:3628-3638.

Peng, W., H. Y. Wang, Y. Miyahara, G. Peng, and R. F. Wang. 2008. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res* **68**:7228-7236.

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

Pochampalli, M. R., R. M. el Bejjani, and J. A. Schroeder. 2007. MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene* **26**:1693-1701.

Pokutta, S., and W. I. Weis. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**:237-261.

Raimondi, S., P. Maisonneuve, J. M. Lohr, and A. B. Lowenfels. 2007. Early onset pancreatic cancer: evidence of a major role for smoking and genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**:1894-1897.

Rajabi, H., R. Ahmad, C. Jin, M. Kosugi, M. Alam, M. D. Joshi, and D. Kufe. 2012. MUC1-C oncoprotein induces TCF7L2 transcription factor activation and promotes cyclin D1 expression in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **287**:10703-10713.

Rajabi, H., C. Jin, R. Ahmad, C. McClary, M. D. Joshi, and D. Kufe. 2010. MUCIN 1 ONCOPROTEIN EXPRESSION IS SUPPRESSED BY THE miR-125b ONCOMIR. *Genes Cancer* **1**:62-68.

Ramasamy, S., S. Duraisamy, S. Barbashov, T. Kawano, S. Kharbanda, and D. Kufe. 2007. The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop. *Mol Cell* **27**:992-1004.

Regimbald, L. H., L. M. Pilarski, B. M. Longenecker, M. A. Reddish, G. Zimmermann, and J. C. Hugh. 1996. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res* **56**:4244-4249.

- Reichert, F., A. Saada, and S. Rotshenker.** 1994. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci* **14**:3231-3245.
- Ren, J., Y. Li, and D. Kufe.** 2002. Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **277**:17616-17622.
- Ren, J., D. Raina, W. Chen, G. Li, L. Huang, and D. Kufe.** 2006. MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling. *Mol Cancer Res* **4**:873-883.
- Resat, H., J. A. Ewald, D. A. Dixon, and H. S. Wiley.** 2003. An integrated model of epidermal growth factor receptor trafficking and signal transduction. *Biophys J* **85**:730-743.
- Rousseau, K., C. Byrne, Y. S. Kim, J. R. Gum, D. M. Swallow, and N. W. Toribara.** 2004. The complete genomic organization of the human MUC6 and MUC2 mucin genes. *Genomics* **83**:936-939.
- Rozenblum, E., M. Schutte, M. Goggins, S. A. Hahn, S. Panzer, M. Zahurak, S. N. Goodman, T. A. Sohn, R. H. Hruban, C. J. Yeo, and S. E. Kern.** 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* **57**:1731-1734.
- Saada, A., F. Reichert, and S. Rotshenker.** 1996. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J Cell Biol* **133**:159-167.
- Sachdeva, M., and Y. Y. Mo.** 2010. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res* **70**:378-387.
- Sano, H., D. K. Hsu, L. Yu, J. R. Apgar, I. Kuwabara, T. Yamanaka, M. Hirashima, and F. T. Liu.** 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* **165**:2156-2164.
- Sarnataro, D., S. Paladino, V. Campana, J. Grassi, L. Nitsch, and C. Zurzolo.** 2002. PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* **3**:810-821.
- Sasaki, S., Q. Bao, and R. C. Hughes.** 1999. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *J Pathol* **187**:481-489.
- Scheiffele, P., M. G. Roth, and K. Simons.** 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J* **16**:5501-5508.

- Schroeder, J. A., M. C. Thompson, M. M. Gardner, and S. J. Gendler.** 2001. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* **276**:13057-13064.
- Schrumpf, E., and K. M. Boberg.** 2003. Hepatic and extrahepatic malignancies and primary sclerosing cholangitis. *Gut* **52**:165.
- Sheehan, J. K., M. Kesimer, and R. Pickles.** 2006. Innate immunity and mucus structure and function. *Novartis Found Symp* **279**:155-166; discussion 167-159, 216-159.
- Sherr, C. J.** 2001. Parsing Ink4a/Arf: "pure" p16-null mice. *Cell* **106**:531-534.
- Shimura, T., Y. Takenaka, S. Tsutsumi, V. Hogan, A. Kikuchi, and A. Raz.** 2004. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res* **64**:6363-6367.
- Shiraga, T., D. Smith, H. N. Nuthall, M. A. Hollingsworth, and A. Harris.** 2002. Identification of two novel elements involved in human MUC1 gene expression in vivo. *Mol Med* **8**:33-41.
- Simmen, T., S. Honing, A. Icking, R. Tikkanen, and W. Hunziker.** 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**:154-159.
- Singh, P. K., M. E. Behrens, J. P. Eggers, R. L. Cerny, J. M. Bailey, K. Shanmugam, S. J. Gendler, E. P. Bennett, and M. A. Hollingsworth.** 2008. Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *J Biol Chem* **283**:26985-26995.
- Singh, P. K., Y. Wen, B. J. Swanson, K. Shanmugam, A. Kazlauskas, R. L. Cerny, S. J. Gendler, and M. A. Hollingsworth.** 2007. Platelet-derived growth factor receptor beta-mediated phosphorylation of MUC1 enhances invasiveness in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res* **67**:5201-5210.
- Song, S., N. Mazurek, C. Liu, Y. Sun, Q. Q. Ding, K. Liu, M. C. Hung, and R. S. Bresalier.** 2009. Galectin-3 mediates nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3beta activity. *Cancer Res* **69**:1343-1349.
- Staubach, S., H. Razawi, and F. G. Hanisch.** 2009. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics* **9**:2820-2835.
- Stechly, L., W. Morelle, A. F. Desein, S. Andre, G. Grard, D. Trinel, M. J. Dejonghe, E. Leteurtre, H. Drobecq, G. Trugnan, H. J. Gabius, and G. Huet.** 2009. Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic* **10**:438-450.

Stock, M., H. Schafer, S. Stricker, G. Gross, S. Mundlos, and F. Otto. 2003. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *J Biol Chem* **278**:17360-17367.

Stocks, T., K. Rapp, T. Bjorge, J. Manjer, H. Ulmer, R. Selmer, A. Lukanova, D. Johansen, H. Concin, S. Tretli, G. Hallmans, H. Jonsson, and P. Stattin. 2009. Blood glucose and risk of incident and fatal cancer in the metabolic syndrome and cancer project (me-can): analysis of six prospective cohorts. *PLoS Med* **6**:e1000201.

Stolzenberg-Solomon, R. Z., B. I. Graubard, S. Chari, P. Limburg, P. R. Taylor, J. Virtamo, and D. Albanes. 2005. Insulin, glucose, insulin resistance, and pancreatic cancer in male smokers. *JAMA* **294**:2872-2878.

Storniolo, A. M., N. H. Enas, C. A. Brown, M. Voi, M. L. Rothenberg, and R. Schilsky. 1999. An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* **85**:1261-1268.

Suehara, N., K. Mizumoto, T. Muta, Y. Tominaga, H. Shimura, S. Kitajima, N. Hamasaki, M. Tsuneyoshi, and M. Tanaka. 1997. Telomerase elevation in pancreatic ductal carcinoma compared to nonmalignant pathological states. *Clin Cancer Res* **3**:993-998.

Takenaka, Y., T. Fukumori, and A. Raz. 2004. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* **19**:543-549.

Tanaka, H. 2006. [Descriptive epidemiology of pancreatic cancer]. *Nihon Rinsho* **64 Suppl 1**:5-9.

Tanaka, M., H. Sawai, Y. Okada, M. Yamamoto, H. Funahashi, H. Takeyama, and T. Manabe. 2006. Clinicopathologic study of intraductal papillary-mucinous tumors and mucinous cystic tumors of the pancreas. *Hepatogastroenterology* **53**:783-787.

Tanaka, T., H. Mori, and G. M. Williams. 1988. Atypical and neoplastic acinar cell lesions of the pancreas in an autopsy study of Japanese patients. *Cancer* **61**:2278-2285.

Tanos, B., and E. Rodriguez-Boulan. 2008. The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* **27**:6939-6957.

Tascilar, M., H. G. Skinner, C. Rosty, T. Sohn, R. E. Wilentz, G. J. Offerhaus, V. Adsay, R. A. Abrams, J. L. Cameron, S. E. Kern, C. J. Yeo, R. H. Hruban, and M. Goggins. 2001. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **7**:4115-4121.

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

Thiebaut, A. C., L. Jiao, D. T. Silverman, A. J. Cross, F. E. Thompson, A. F. Subar, A. R. Hollenbeck, A. Schatzkin, and R. Z. Stolzenberg-Solomon. 2009. Dietary fatty acids and pancreatic cancer in the NIH-AARP diet and health study. *J Natl Cancer Inst* **101**:1001-1011.

Thijssen, V. L., B. Barkan, H. Shoji, I. M. Aries, V. Mathieu, L. Deltour, T. M. Hackeng, R. Kiss, Y. Kloog, F. Poirier, and A. W. Griffioen. 2010. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res* **70**:6216-6224.

Tomioka, T., A. Andren-Sandberg, H. Fujii, H. Egami, Y. Takiyama, and P. M. Pour. 1990. Comparative histopathological findings in the pancreas of cigarette smokers and non-smokers. *Cancer Lett* **55**:121-128.

Toribara, N. W., A. M. Robertson, S. B. Ho, W. L. Kuo, E. Gum, J. W. Hicks, J. R. Gum, Jr., J. C. Byrd, B. Siddiki, and Y. S. Kim. 1993. Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem* **268**:5879-5885.

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

Truong, M. J., V. Gruart, J. P. Kusnierz, J. P. Papin, S. Loiseau, A. Capron, and M. Capron. 1993. Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *J Exp Med* **177**:243-248.

Tsay, Y. G., N. Y. Lin, P. G. Voss, R. J. Patterson, and J. L. Wang. 1999. Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* **252**:250-261.

Tureci, O., H. Schmitt, N. Fadle, M. Pfreundschuh, and U. Sahin. 1997. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem* **272**:6416-6422.

van den Brule, F. A., C. Buicu, M. Baldet, M. E. Sobel, D. N. Cooper, P. Marschal, and V. Castronovo. 1995. Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem Biophys Res Commun* **209**:760-767.

van den Brule, F. A., C. Buicu, A. Berchuck, R. C. Bast, M. Deprez, F. T. Liu, D. N. Cooper, C. Pieters, M. E. Sobel, and V. Castronovo. 1996. Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum Pathol* **27**:1185-1191.

Van den Brule, F. A., P. L. Fernandez, C. Buicu, F. T. Liu, P. Jackers, R. Lambotte, and V. Castronovo. 1997. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. *Dev Dyn* **209**:399-405.

Van Heek, N. T., A. Maitra, J. Koopmann, N. Fedarko, A. Jain, A. Rahman, C. A. Iacobuzio-Donahue, V. Adsay, R. Ashfaq, C. J. Yeo, J. L. Cameron, J. A. Offerhaus, R. H. Hruban, K. D. Berg, and M. Goggins. 2004. Gene expression profiling identifies markers of ampullary adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* **3**:651-656.

van Heek, T., A. E. Rader, G. J. Offerhaus, D. M. McCarthy, M. Goggins, R. H. Hruban, and R. E. Wilentz. 2002. K-ras, p53, and DPC4 (MAD4) alterations in fine-needle aspirates of the pancreas: a molecular panel correlates with and supplements cytologic diagnosis. *Am J Clin Pathol* **117**:755-765.

van Klinken, B. J., A. W. Einerhand, H. A. Buller, and J. Dekker. 1998. The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins. *Glycobiology* **8**:67-75.

van Meer, G., and K. Simons. 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* **36**:51-58.

Vasen, H. F., N. A. Gruis, R. R. Frants, P. A. van Der Velden, E. T. Hille, and W. Bergman. 2000. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer* **87**:809-811.

Venkitaraman, A. R. 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**:171-182.

Verkade, P., and K. Simons. 1997. Robert Feulgen Lecture 1997. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem Cell Biol* **108**:211-220.

Villa-Verde, D. M., E. Silva-Monteiro, M. G. Jasiulionis, D. A. Farias-De-Oliveira, R. R. Brentani, W. Savino, and R. Chammas. 2002. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* **32**:1434-1444.

Vinall, L. E., A. S. Hill, P. Pigny, W. S. Pratt, N. Toribara, J. R. Gum, Y. S. Kim, N. Porchet, J. P. Aubert, and D. M. Swallow. 1998. Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum Genet* **102**:357-366.

Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban, and M. Goggins. 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* **378**:607-620.

Vincent, A., M. Perrais, J. L. Desseyn, J. P. Aubert, P. Pigny, and I. Van Seuning. 2007. Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. *Oncogene* **26**:6566-6576.

Wahi, M. M., N. Shah, C. E. Schrock, A. S. Rosemurgy, 2nd, and S. B. Goldin. 2009. Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature. *Ann Epidemiol* **19**:103-111.

- Wang, J. L., J. G. Laing, and R. L. Anderson.** 1991. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology* **1**:243-252.
- Wang, L., H. Friess, Z. Zhu, L. Frigeri, A. Zimmermann, M. Korc, P. O. Berberat, and M. W. Buchler.** 2000. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Lab Invest* **80**:1233-1241.
- Wang, Y. N., H. Yamaguchi, J. M. Hsu, and M. C. Hung.** 2010. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* **29**:3997-4006.
- Wei, X., H. Xu, and D. Kufe.** 2006. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol Cell* **21**:295-305.
- Weisz, O. A., and E. Rodriguez-Boulan.** 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* **122**:4253-4266.
- Wen, Y., T. C. Caffrey, M. J. Wheelock, K. R. Johnson, and M. A. Hollingsworth.** 2003. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *J Biol Chem* **278**:38029-38039.
- Wesseling, J., S. W. van der Valk, and J. Hilkens.** 1996. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell* **7**:565-577.
- Whelan, A. J., D. Bartsch, and P. J. Goodfellow.** 1995. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* **333**:975-977.
- Wolpin, B. M., A. T. Chan, P. Hartge, S. J. Chanock, P. Kraft, D. J. Hunter, E. L. Giovannucci, and C. S. Fuchs.** 2009. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**:424-431.
- Woo, J. K., Y. Choi, S. H. Oh, J. H. Jeong, D. H. Choi, H. S. Seo, and C. W. Kim.** 2012. Mucin 1 enhances the tumor angiogenic response by activation of the AKT signaling pathway. *Oncogene* **31**:2187-2198.
- Wreschner, D. H., M. Hareuveni, I. Tsarfaty, N. Smorodinsky, J. Horev, J. Zaretsky, P. Kotkes, M. Weiss, R. Lathe, A. Dion, and et al.** 1990. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. *Eur J Biochem* **189**:463-473.
- Yamamoto, M., A. Bharti, Y. Li, and D. Kufe.** 1997. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* **272**:12492-12494.
- Yamano, M., H. Fujii, T. Takagaki, N. Kadowaki, H. Watanabe, and T. Shirai.** 2000. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* **156**:2123-2133.

- Yang, R. Y., P. N. Hill, D. K. Hsu, and F. T. Liu.** 1998. Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry* **37**:4086-4092.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, and F. T. Liu.** 1996. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6737-6742.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, L. Yu, J. Ni, and F. T. Liu.** 2001. Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *J Biol Chem* **276**:20252-20260.
- Yao, M., W. Zhang, Q. Zhang, L. Xing, A. Xu, Q. Liu, and B. Cui.** 2011. Overexpression of MUC1 enhances proangiogenic activity of non-small-cell lung cancer cells through activation of Akt and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Lung* **189**:453-460.
- Yeaman, C., A. H. Le Gall, A. N. Baldwin, L. Monlauzeur, A. Le Bivic, and E. Rodriguez-Boulan.** 1997. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **139**:929-940.
- Yeo, C. J., J. L. Cameron, T. A. Sohn, K. D. Lillemo, H. A. Pitt, M. A. Talamini, R. H. Hruban, S. E. Ord, P. K. Sauter, J. Coleman, M. L. Zahurak, L. B. Grochow, and R. A. Abrams.** 1997. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg* **226**:248-257; discussion 257-260.
- Yu, F., R. L. Finley, Jr., A. Raz, and H. R. Kim.** 2002. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* **277**:15819-15827.
- Yu, L. G., N. Andrews, Q. Zhao, D. McKean, J. F. Williams, L. J. Connor, O. V. Gerasimenko, J. Hilken, J. Hirabayashi, K. Kasai, and J. M. Rhodes.** 2007. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J Biol Chem* **282**:773-781.
- Zaretsky, J. Z., R. Sarid, Y. Aylon, L. A. Mittelman, D. H. Wreschner, and I. Keydar.** 1999. Analysis of the promoter of the MUC1 gene overexpressed in breast cancer. *FEBS Lett* **461**:189-195.
- Zhang, J., Z. Zhao, and H. J. Berkel.** 2005. Animal fat consumption and pancreatic cancer incidence: evidence of interaction with cigarette smoking. *Ann Epidemiol* **15**:500-508.
- Zhao, Q., M. Barclay, J. Hilken, X. Guo, H. Barrow, J. M. Rhodes, and L. G. Yu.** 2010. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol Cancer* **9**:154.
- Zhou, Q., and R. D. Cummings.** 1993. L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* **300**:6-17.

Zhou, W., R. Lv, X. Wang, Y. Mou, X. Cai, and I. Herr. 2010. Stapler vs suture closure of pancreatic remnant after distal pancreatectomy: a meta-analysis. *Am J Surg* **200**:529-536.

Zhu, J., A. Rashid, K. Cleary, J. L. Abbruzzese, H. Friess, S. Takahashi, T. Shirai, and D. Li. 2006. Detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]-pyridine (PhIP)-DNA adducts in human pancreatic tissues. *Biomarkers* **11**:319-328.

Zurzolo, C., M. P. Lisanti, I. W. Caras, L. Nitsch, and E. Rodriguez-Boulan. 1993. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are preferentially targeted to the basolateral surface in Fischer rat thyroid epithelial cells. *J Cell Biol* **121**:1031-1039.

RESUME

L'adénocarcinome pancréatique canalaire est un cancer de mauvais pronostic avec une survie à 5 ans d'environ 5 % et une médiane de survie d'environ 6 mois. Dès les stades précoces de la carcinogenèse pancréatique, la mucine membranaire MUC1, glycoprotéine de haute masse moléculaire, est surexprimée et présente des anomalies de localisation cellulaire : une perte de polarité de distribution cellulaire avec expression au niveau de l'ensemble de la membrane plasmique et une rétention à l'intérieur de la cellule qui est utilisée par les pathologistes comme indicateur de malignité après ponction à l'aiguille fine sur des lésions pancréatiques. Sachant que MUC1 est capable d'interagir avec l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) et de jouer un rôle sur la transduction des signaux, nous avons émis l'hypothèse que ces anomalies de distribution cellulaire pouvaient être à l'origine de signaux oncogéniques. Cependant, les mécanismes permettant cette rétention cytoplasmique ne sont pas connus. Des études antérieures du laboratoire au sein de cellules épithéliales exprimant un phénotype entérocytaire ont montré que le trafic de certaines glycoprotéines vers la membrane apicale était régulé par une lectine endogène : la Galectine-4. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à un autre membre de la famille des galectines : la Galectine-3, exprimée au niveau des cellules pancréatiques. La Galectine-3 interagit avec des motifs glycosylés contenant un motif N-acétyl-lactosamine. Ce type de motif est présent au niveau de nombreuses structures glycaniques, qu'elles soient de type *N*- ou *O*-glycaniques. Les mucines et les récepteurs membranaires sont substitués par ces deux types de chaînes oligosaccharidiques. La Galectine-3 est surexprimée dans le cancer pancréatique et son expression est corrélée à une forte agressivité tumorale dans d'autres cancers.

Le but de ce travail a été dans un premier temps d'établir des lignées cellulaires pancréatiques humaines polarisées CAPAN-1 invalidées pour la Galectine-3 et dans un second temps d'étudier l'implication de la Galectine-3 (i) au niveau du trafic intracellulaire de MUC1 et l'EGFR, (ii) de l'interaction entre MUC1 et l'EGFR et (iii) des voies de signalisation en aval de l'EGFR.

Les résultats montrent que la lignée tumorale pancréatique CAPAN-1 présente les anomalies de distribution cellulaire de MUC1 similaires à celles observées dans les tumeurs pancréatiques humaines, notamment la rétention de MUC1 à l'intérieur des cellules. Le *silencing* de la Galectine-3 entraîne la disparition de cette anomalie de distribution cellulaire, MUC1 retrouvant une localisation membranaire. Nous montrons que l'inhibition de l'expression de la Galectine-3 est associée à une augmentation de la translocation nucléaire de l'EGFR et à une inhibition de l'endocytose de MUC1 et de l'EGFR. Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation de l'interaction entre MUC1 et l'EGFR et d'une activation accrue de ce récepteur tyrosine kinase lorsqu'il est soumis à l'EGF : augmentation de la phosphorylation de l'EGFR et de la phosphorylation des MAPK Erk1 et 2.

Mots clés : Galectine, Mucine, EGFR, cancer, endocytose, translocation nucléaire