

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE DE
STRASBOURG**

THÈSE présentée par :

David SIMOES

soutenue le : 17 juillet 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Etude de la fonction de TFF1 dans le cancer du sein

THÈSE dirigée par :

Dr Marie-Christine RIO

Dr, IGBMC

RAPPORTEURS :

Dr Marc Ruff

Dr, IGBMC

Pr. Stéphane Flament

Pr. , Université de Lorraine

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr Muriel Le ROMANCER

Dr, CRCL Lyon

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE SEIN	1
1. Anatomie du sein.....	2
2. Développement et physiologie de la glande mammaire.....	2
A. Durant la vie fœtale	3
B. Période pré-pubertaire	3
C. A la puberté	3
D. Durant la vie adulte.....	4
E. En période de grossesse et de lactation	4
F. A la ménopause	5
CHAPITRE II : LE CANCER DU SEIN	6
1. La biologie du cancer	6
A. Mécanisme de cancérisation.....	6
B. Les oncogènes et supresseurs de tumeurs.....	7
2. Epidémiologie des cancers du sein.....	9
3. Les facteurs de risque	10
A. Les facteurs génétiques.....	10
B. Les hormones.....	12
C. Les lésions tissulaires	13
D. Le mode de vie	13
4. Anatomopathologie des tumeurs du sein	14
A. Les carcinomes in situ	14
B. Les carcinomes invasifs.....	14
5. Les marqueurs tumoraux des cancers du sein	15
A. Les marqueurs biologiques « non-circulants »	15
B. Les marqueurs circulants	17
6. Classification des tumeurs du sein.	18
A. La classification clinique	18
B. La classification histologique	18
C. La classification moléculaire	19
7. Les stratégies thérapeutiques.....	20
CHAPITRE III : LES PEPTIDES EN TREFLE (TFFS)	21
1. Les gènes TFFs.....	22
A. Structure.....	22
B. Régulation.....	22

2.	Les peptides TFFs	25
A.	Structure peptidique.....	25
B.	Propriétés physico-chimiques des TFFs	27
3.	Expression des TFFs dans les tissus normaux	30
A.	Localisation de TFF1	30
B.	Localisation de TFF2.....	31
C.	Localisation de TFF3.....	31
4.	Fonction des TFFs.....	31
A.	Protection de l'intégrité de la muqueuse gastrique.....	31
B.	Stimulation de la migration cellulaire	32
C.	Stimulation de l'invasion cellulaire.....	32
D.	Effets des TFFs sur la différenciation.....	Erreur ! Signet non défini.
E.	Effet des TFFs sur la prolifération.....	33
F.	Effet anti-apoptotique des TFFs	34
G.	Effets angiogéniques.....	34
H.	Effets pro-inflammatoires.....	Erreur ! Signet non défini.
5.	Les TFFs dans L'inflammation	35
6.	Les TFFs dans les tissus tumoraux.....	36
A.	Les TFFs dans les cancers du sein.....	36
B.	Les TFFs dans les cancers gastriques	37
C.	Les TFFs dans les cancers du colon	37
D.	Les TFFs dans les cancers de la prostate.....	38
E.	Autres cancers.....	38

PROJET DE THESE

RESULTATS

CHAPITRE I : EXPRESSION ET PURIFICATION DE TFF1 DANS LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES MCF7.....	43
1. Production de TFF1 par les cellules MCF7	43
2. Purification de TFF1 endogène	43
A. Filtration tangentielle.....	43
B. Chromatographie échangeuse d'anions	44
C. Gel filtration	44
3. Conclusion.....	44
CHAPITRE II : EXPRESSION ET PURIFICATION DE TFF1 DANS LE SYSTEME D'EXPRESSION BACULOVIRUS / CELLULES D'INSECTE	45
1. Système d'expression baculovirus	45
2. Construction du vecteur de transfert pAcSG2-TFF1	45
3. Production de TFF1 par les cellules d'insecte SF21	46

4.	Purification de TFF1 recombinant	46
A.	Filtration tangentielle.....	46
B.	Chromatographie échangeuse d'anions	47
C.	Gel filtration	48
5.	Analyse par spectrométrie de masse (ESI-TOF).....	48
6.	Analyse des modifications post-traductionnelles de TFF1	48
7.	Analyse de la fonctionnalité du TFF1 recombinant	50
8.	Purification de TFF1 en présence de quantités faibles de DTT	50
9.	Conclusion.....	51

CHAPITRE III : EXPRESSION ET PURIFICATION DE TFF1 DANS LE SYSTEME D'EXPRESSION ESCHERICHIA COLI

1.	Système d'expression et de sécrétion bactérien E. Coli.....	52
2.	Construction du vecteur d'expression bactérien pEZZ18-TFF1	53
3.	Production de TFF1 recombinant par E. Coli	53
A.	Sélection d'un clone E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1	53
B.	Détermination des conditions optimales de production de ZZ-TFF1.....	54
4.	Purification de TFF1 à partir d'E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1	54
A.	Chromatographie d'affinité IgG	54
B.	Clivage de la protéine de fusion ZZ-TFF1 par la Facteur Xa	55
C.	Gel filtration	56
D.	Analyse de TFF1 recombinant par spectrométrie de masse	56
5.	Analyse de la fonctionnalité du TFF1 recombinant	57
6.	Production et purification de TFF1 à grande échelle	57
A.	Production de 100 L de culture HB101 pEZZ18-TFF1	57
B.	Chromatographie d'affinité IgG Sépharose.....	58
C.	Digestion de ZZ-TFF1 par le Facteur Xa	59
D.	Purification de TFF1 recombinant par chromatographie échangeuse d'anions	59
7.	Analyse par spectrométrie de masse de TFF1 et du domaine ZZ purifiés	60
8.	Analyse de la fonctionnalité du TFF1 recombinant	60
9.	Conclusion.....	60

CHAPITRE IV : ETUDE DE L'HETERODIMERE TFF1-GKN2

1.	Profil d'expression des TFFs et des GKNs chez la souris	61
2.	Formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 in vitro	63
A.	Construction du vecteur d'expression pQCXIP-GKN2	63
B.	Co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules gastriques AGS.....	63
C.	Co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules mammaires MCF7.....	65
D.	Conclusion	66
3.	Production de TFF1-GKN2 recombinant dans le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte	67
A.	Construction du vecteur de transfert pAcSG2-GKN2 et pAcSG2-GKN2C38G.....	67
B.	Co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules d'insecte SF21	67

C. Conclusion	67
4. Effets de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération et la migration cellulaire	68
A. Effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération des cellules AGS ..	68
B. Effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la migration des cellules AGS	68
C. Conclusion	68

CONCLUSION/DISCUSSION

CONCLUSION/DISCUSSION	69
------------------------------------	-----------

1. Etude de TFF1 recombinant produit dans le système baculovirus/ cellules d'insecte ..	69
A. Production et purification de TFF1 dans les cellules d'insecte	69
B. Fonctionnalité de TFF1 recombinant sur la restitution/migration	71
C. Autre fonction potentielle pour TFF1	72
D. Importance du pyroglutamate en N-terminal de TFF1	74
2. Production, purification et fonction de TFF1 produit dans E. Coli	75
3. Etude de l'hétérodimère TFF1-GKN2	76
A. Profil d'expression des TFFs et GKNs in vivo chez la souris	76
B. Formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans un système in vitro	76

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES	80
---------------------------	-----------

PROPOSITION D'ARTICLE	82
------------------------------------	-----------

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES	84
-----------------------------------	-----------

1. Construction des vecteurs	84
A. Système d'expression baculovirus/cellules d'insecte	84
B. Système d'expression cellulaire (MCF7 et AGS)	84
C. Système d'expression bactérien (HB101 pEZZ18-TFF1)	85
2. Amplification, purification et séquençage des vecteurs	86
3. Etablissement de pools de cellules par vecteurs rétroviraux	87
4. Production de TFF1 recombinant	87
A. Production de TFF1 dans les cellules d'insecte SF21	87
B. Production de TFF1 dans les cellules mammaires cancéreuses MCF7	87
C. Production de TFF1 dans E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1	88

5. Purification de TFF1 recombinant	88
A. Filtration tangentielle (FT)	88
B. Concentrations par ultrafiltration.....	88
C. Dialyses	89
D. Chromatographie échangeuse ionique.....	89
E. Chromatographie d'exclusion.....	90
F. Chromatographie d'affinité IgG Sépharose IgG Sépharose	90
G. Dessalage	90
6. Dosage des protéines	91
7. Analyse des protéines.....	91
A. Préparation des échantillons	91
B. Gels d'électrophorèse polyacrylamide (PAGE)	91
C. Western Blot	92
D. Bleu de coomassie	93
8. Blessures in vitro	93
A. Test de fonctionnalité du TFF1 recombinant	93
B. Effet de l'hétérodimère TFF1-GKN2 sur la migration cellulaire.....	94
9. Prolifération cellulaire.....	94
10. Expression des TFFs et des GKNs chez la souris	95
11. Analyses des protéines par spectrométrie de masse.....	96
12. Analyses statistiques	96

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE	98
----------------------------	----

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
ABL1	gène abelson
ADN(c)	acide désoxyribonucléique, (c), complémentaire
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AP-1	Activator-protein 1
APS	Ammonium persulfate
ARN(m)	Acide ribonucléique, (m), messenger
AspN	Endoprotéase qui clive l'aspartate en N-terminale
BC	Bleu de coomassie
BCA	BiCinchonic acid
BCEI	Breast Cancer Estrogen Induced Protein
BCR	Breakpoint cluster region
BET	Bromure d'éthidium
BV	Baculovirus
C/EBP β	Caat-enhancer-binding-protein beta
CA-15.3	Cancer antigen 15.3
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
c-erbB2	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
c-Ha-ras	Harvey ras sarcoma viral oncogene homolog
CIP	Cdk interacting protéine
cdk	Cyclin-dependent kinase
COXs	Cyclo-oxygenases
CRP-ductin	C-reactive protein
CTC	Cellules tumorales circulantes
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
CTD	Cellules tumorales Disséminées
CXCR4	C-X-C chemokine receptor
DAF	Decay Acceleration Factor
DES	Diéthylstilbestrol
DTT	Dithiothréitol
E. Coli	Escherichia Coli
E2	Estradiol
EA	Echangeuse d'anions
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
ERE	Element de réponse aux œstrogènes
ERH	Element de réponse à HIF-1
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
ESI-TOF	Electrospray ionization time-of-flight
FCS	Foetal calf serum
FT	Filtration Tangentielle
GATA	Facteur de transcription se liant aux séquences d'ADN GATA
GCSI	Goblet Cell Silencer Inhibitor
GF	Gel filtration
GKN	Gastrokine
GKN2C38G	Gastrokine mutée, remplacement de la cystéine en position 38 par une glycine
GSH	Glutathion oxydé

GSSG	Glutathion réduit
GS-X	Glutathion S-conjugate export pump
H. Pylori	Helicobacter Pylori
H+	Proton hydrogène
HAc	Acide acétique
HAS	Haute autorité de santé
HER2	Human epithelial growth factor receptor 2
HIF-1	Hypoxia induced factor 1
HIF α	Hypoxia induced factor α
HNF3	Hepatocyte nuclear factor 3
HSP	Heat choc protein
IBB	Institute for Biotechnology and Bioengineering
IF	Immunofluorescence
IgG	Immunoglobuline G
IHC	Immunohistochimie
IL-	Interleukine
InCA	Institut national du cancer
INED	Institut national d'études démographiques
INK4	Inhibitor of cdk 4
iNOs	Induced nitric oxide Synthase
InVS	Institut de veille sanitaire
IP(3,4,5)	Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate
IRM	Image par Résonance Magnétique
IRMA	Immuno Radio Metric Assay
ISH	In situ hybridization
ITF	Intestinal Trefoil Factor
JNK	C-jun N-terminal kinase
KCM	Tampon KCl / CaCl ₂ / MgCl ₂
kDa	Kilo-dalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LB	Lysogeny broth
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MNU	N-méthyl-N-nitrosourea
MSBR	Modified Scarff, Bloom et Richardson
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
MUC	Mucine
NF κ -B	Nuclear Factor kappa B
NLS	Nuclear localization factor
NMD	Nonsense mediated mRNA Decay
NO	Nitrate oxyde
OMS	Organisation mondial de la santé
p53	Protéine 53
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS 1X	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
PKC	Protein kinase C
PM	Poids moléculaire
PRE	Progesterone receptor element

PTC	Premature Stop Codon
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
Ras	Retrovirus associated sequences
RE	Récepteur aux oestrogenes
RNS	Reactive Nitrogen Species
RP	Récepteur à la progestérone
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SAPK	Stress activated protein kinase
SBR	Scarff, Bloom et Richardson
SDF1	Stromal-Derived Factor-1
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Sec	Secretion
SP	Spasmolytic Protein
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription
TFFs	Trefoil Factors
TFF1C58S	TFF1 muté, remplacement de la cystéine en position 58 par une sérine
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
KO	Knock-out
TGF α	Transforming growth factor α
THS	Traitements Hormonaux Substitutifs
TNM	Tumor, Node, Metastasis
TRH-R	Thyrotropin-releasing hormone
TST	Tris saline tween
USF	Upstream Stimulating Factor
UV	Ultra violets
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	Von Willebrand Factor
WB	Western blot
γ -GCS	γ -glutaminyll synthase

LISTE DES FIGURES

1. Liste des figures

- Figure 1 : Structure anatomique d'un sein normal
- Figure 2 : Structure histologique du tissu mammaire humain normal
- Figure 3 : Schéma résumant les principales étapes du développement de la glande mammaire chez la femme
- Figure 4 : Schéma général des principales étapes de la progression tumorale
- Figure 5 : Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du sein dans le monde
- Figure 6 : Coupes histologiques des quatre principales formes de cancers du sein
- Figure 7 : Détection des récepteurs RE (a) et RP (b) par IHC sur coupes de tissu mammaire tumoral
- Figure 8 : Détection des récepteurs RE et de TFF1 par IHC sur coupes de tissu mammaire tumoral
- Figure 9 : Détection de HER2 par IHC sur coupes de tissu mammaire tumoral
- Figure 10 : Détection par IHC des cellules cancéreuses en prolifération exprimant le Ki67
- Figure 11 : Représentation schématique du promoteur du gène TFF1
- Figure 12 : Séquence des acides aminés de TFF1, TFF2 et TFF3 humains
- Figure 13 : Structure secondaire des TFFs
- Figure 14 : Comparaison de la structure tridimensionnelle et des charges de surface des TFFs
- Figure 15 : Représentation Ribbon du dimère TFF1, de TFF2 et du dimère TFF3
- Figure 16 : Distribution des TFFs dans les tissus normaux et pathologies bénignes
- Figure 17 : Distribution des TFFs dans les tumeurs solides
- Figure 18 : Schéma résumant les différentes étapes de purification de TFF1 produit dans les cellules MCF7
- Figure 19 : Enrichissement de TFF1 par filtration tangentielle
- Figure 20 : Chromatographie échangeuse d'anions du milieu MCF7+E2 enrichi en TFF1
- Figure 21 : Analyse par WB des fractions d'élution de gel filtration des pools 1 et 3 issus de l'EA
- Figure 22 : Représentation schématique de la génération de baculovirus recombinants exprimant le gène d'intérêt
- Figure 24 : Récapitulatif de purification
- Figure 25 : Enrichissement de milieu de culture SF21-TFF1 en TFF1
- Figure 26 : Purification de TFF1 par chromatographie échangeuse d'anions
- Figure 27 : Analyse par WB de la présence des monomères et dimères TFF1
- Figure 28 : Analyse par BC des différentes fractions d'élutions de gel filtration
- Figure 29 : Digestion de TFF1 par l'AspN
- Figure 30 : Identification du résidu en C-terminal de TFF1 ayant lié une molécule inconnue

- Figure 31 : Etude de conditions favorisant la dimérisation des deux formes monomériques de TFF1
- Figure 32 : Analyse de la fonctionnalité des 3 formes de TFF1
- Figure 33 : Analyse de la fonctionnalité de TFF1 purifié en présence de quantités faibles de DTT
- Figure 34 : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire de bactéries GRAM
- Figure 35 : Figure 35: Machinerie de formation de ponts disulfure chez E. Coli
- Figure 36 : Représentation schématique du vecteur d'expression pEZZ18-TFF1
- Figure 37 : Sélection du meilleur clone HB101 pEZZ18-TFF1
- Figure 38 : Détermination du temps optimal de production ZZ-TFF1
- Figure 39 : Schéma résumant les différentes étapes de purification de TFF1 produit dans E. Coli
- Figure 40 : Purification de ZZ-TFF1 par chromatographie d'affinité IgG
- Figure 41 : Détermination du meilleur ratio de masses enzyme Facteur Xa (FXa) / substrat ZZ-TFF1
- Figure 42 : Analyse par BC et WB des protéines du mélange de digestion
- Figure 43 : Elimination du domaine ZZ et concentration de TFF1 recombinant
- Figure 44 : Analyse de la fonctionnalité de TFF1 recombinant par blessure in vitro
- Figure 45 : Figure 45 : Purification de ZZ-TFF1 par chromatographie d'affinité IgG
- Figure 46 : Dessalage des fractions d'élutions IgG
- Figure 47 : Purification de TFF1 à partir du mélange de digestion
- Figure 48 : Analyse de la fonctionnalité de TFF1 recombinant de PM 6800 Da
- Figure 49 : Criblage de l'expression des TFFs et des GKNs dans les tissus de souris TFF1 sauvage et TFF1-KO
- Figure 50 : Figure 50 : Représentation schématique de l'hétérodimère TFF1-GKN2
- Figure 51 : Représentation schématique du vecteur d'expression rétroviral pQCXIP-GKN2
- Figure 52 : Représentation schématique du vecteur d'expression pUHD172.1-TFF1
- Figure 53 : Schéma récapitulant les différentes cellules établies dans les lignées AGS
- Figure 54 : Détection de l'hétérodimère TFF1-GKN2 in vitro dans les cellules AGS
- Figure 55 : Influence du pH sur la formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 in vitro
- Figure 56 : Figure 56 : Formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 in vitro dans les cellules MCF7
- Figure 57 : Formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 in vitro dans les cellules MCF7
- Figure 58 : Représentation schématique du vecteur de transfert pAcSG2-TFF1
- Figure 59 : Co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules SF21
- Figure 60 : Effets de l'expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération des cellules AGS
- Figure 61 : Effet de la co-expression de TFF1 et de la GKN2 sur la migration des cellule AGS

2. Liste des Tableaux

Tableau 1 : Tableau de correspondances entre la classification TNM et les stades UICC

Tableau 2 : Classification moléculaire des cancers du sein

Tableau 3 : Digestion des TFFs par différentes protéases

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE SEIN

Le sein, du latin *sinu* qui signifie « courbure, sinuosité, pli » désigne la poitrine dans son ensemble, c'est-à-dire la partie antéro-supérieure du thorax de part et d'autre du sternum allant de la base du cou au creux de l'estomac. Aussi appelé « mamma », d'où le terme français « mamelle », cet organe est à l'origine du mot « mammifère » composé du confixe *mamm-* du latin *mamma* et du confixe *-ifère* dérivé du suffixe latin *-fer* (« qui porte »). Chez la femme, le sein est un organe pair et globuleux dont la morphologie évolue au cours de la vie alors que chez l'homme, la glande mammaire est atrophiée et le sein n'a aucune fonction.

La principale fonction biologique du sein est la production de lait pour allaiter les nourrissons. Le lait maternel contient tous les éléments nécessaires au développement du nourrisson : protéines, lipides, glucides, vitamines et minéraux. Parmi les protéines, on retrouve les anticorps, nécessaires pour la défense immunitaire du nouveau-né qui est incapable de mettre en place une réponse immunitaire efficace contre les organismes étrangers.

Le sein est un organe particulier. Alors qu'il n'a pas de fonction vitale pour la survie de la femme, il joue cependant un rôle important dans la sexualité, la reproduction et la psychologie humaine. Contrairement à d'autres organes, la glande mammaire évolue tout au long de la vie d'une femme. Cette évolution implique la différenciation et la prolifération des cellules mammaires et rend la glande mammaire plus sensible aux processus de cancérisation. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et constitue la première cause de mortalité chez celle-ci. Ainsi, en France, le cancer du sein tue chaque année plus de 11000 femmes. Il représente un problème majeur de santé publique non seulement en France mais aussi dans le monde. La compréhension des événements conduisant au cancer du sein, son diagnostic et ses traitements ont beaucoup évolué depuis une trentaine d'années.

Avant de nous intéresser au cancer du sein, nous allons d'abord nous intéresser à l'anatomie (1) et au développement et à la physiologie de cet organe (2).

1. Anatomie du sein

Les seins sont constitués de tissus adipeux entourant les glandes mammaires responsables de la production et sécrétion de lait. La glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes séparés entre eux par des cloisons de tissus conjonctifs (Figure 1.a). Chaque lobe est constitué d'une unité ducto-lobulaire qui représente la structure de base dans la production de lait. Ces unités ducto-lobulaires ou lobules sont constitués eux-mêmes d'acini, aussi appelées alvéoles (Figure 1.b). Les acini sont des cavités glandulaires constituées d'une couche interne de cellules épithéliales productrices de lait entourée par une couche externe de cellules myoépithéliales contractiles et de vaisseaux sanguins. Les acini se regroupent autour des canaux alvéolaires aussi appelés canaux galactophores de troisième ordre qui se réunissent à leur tour pour former le canal lobulaire (canal galactophore de deuxième ordre) qui draine le lobule. Une lame basale sépare ces unités fonctionnelles des tissus conjonctifs, constitué de cellules fibroblastiques qui participent à l'élaboration de la matrice extracellulaire, et de tissus adipeux constitués d'adipocytes (Figure 2). Finalement, les canaux lobulaires se jettent dans des canaux galactophores, ces derniers venant aboutir au mamelon par cinq à neuf orifices (Figure 1). Au sein de toutes ces structures circulent les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques drainant vers les ganglions de la chaîne mammaire interne, sous-clavière et axillaire. L'irrigation de la glande mammaire provient des artères mammaires interne et externe ainsi que des branches perforantes issues des intercostales aortiques. Le drainage veineux du sein est assuré par deux réseaux. Le réseau superficiel, riche et constant tout au long de la vie de la femme, et le réseau profond assuré par les veines profondes. Concernant le système lymphatique, deux catégories sont présentes dans le sein : les lymphatiques cutanés drainant la lymphe de la peau mammaire et de la graisse sous-cutanée et les lymphatiques de la glande mammaire. Le sein est innervé par les nerfs superficiels cutanés issus des plexus cervical, brachial et des nerfs intercostaux.

2. Développement et physiologie de la glande mammaire

Contrairement à d'autres organes, le développement de la glande mammaire humaine est très lent. Il commence dans la vie fœtale et ne s'achève qu'à la première lactation. Comme le placenta ou le corps jaune, la glande mammaire est un organe cyclique. Ces trois organes éphémères, se contrôlent mutuellement et assurent ainsi la survie de l'espèce. Le développement de la glande mammaire arrive à maturité finale à la parturition et est dépendant d'équilibres hormonaux au cours de la gestation (Figure 3). La mammogénèse peut

être subdivisée en plusieurs phases en fonction de l'âge de la femme. On retrouve ainsi des phases de développement de la glande mammaire : (i) durant la vie fœtale, (ii) au cours de la période pré-pubertaire, (iii) à la puberté, (iv) durant la vie adulte (v), en période de gestation et de lactation (vi).

A. Durant la vie fœtale

Les glandes mammaires dérivent embryologiquement de l'ectoderme. Dès la quatrième semaine, ce dernier s'invagine en d'étroits tubules formant des épaisissements longitudinaux de part et d'autre de la ligne médiane sur la face ventrale de l'embryon allant de la région axillaire à la région inguinale. Il s'agit de la crête mammaire. Le long de cette crête apparaissent cinq à sept paires de bourgeons mammaires. Ceci se produit par migration et concentration cellulaire et non par multiplication des cellules. A six semaines, la crête mammaire ainsi que les bourgeons mammaires surnuméraires se résorbent et seuls persistent les deux bourgeons pectoraux. L'aréole se forme par invagination du bourgeon mammaire. Du 3^e au 6^e mois, les bourgeons épithéliaux s'invaginent du derme vers le tissu sous-dermique. Au cours du 8^e mois, ils se creusent d'une lumière et se ramifient formant les futurs canaux galactophores. Finalement, le tissu conjonctif se densifie autour de ces ébauches et des cellules musculaires radiaires et annulaires apparaissent sous la plaque aréolaire. A ce stade, les mamelles sont identiques dans les deux sexes. Chez le garçon, les androgènes provoquent la nécrose de l'ébauche mammaire et la mamelle restera à ce stade toute la vie.

B. Période pré-pubertaire

Au cours de la période pré-pubère, la glande mammaire n'est pas en quiescence totale. Elle subit une évolution lente mais régulière au cours de laquelle les canaux galactophores se ramifient en canaux de deuxième et troisième ordres se terminant par des renflements sphériques.

C. A la puberté

La puberté correspond à la période au cours de laquelle les organes génitaux arrivent à maturation (caractères sexuels primaires) et où les particularités spécifiques au sexe apparaissent (caractères sexuels secondaires). Chez la jeune fille, le premier signe de la puberté est en général la croissance des seins qui précède en moyenne de deux ans l'apparition des premières règles. Cette croissance se produit sous l'influence des hormones sexuelles ovariennes. Les œstrogènes entraînent la prolifération et ramification canaliculaire,

la croissance des tissus conjonctifs et adipeux ainsi que leur vascularisation. Cette croissance s'accompagne, sous l'effet de la progestérone, d'un début de développement du tissu glandulaire comprenant les lobules et les alvéoles mais sans différenciation sécrétoire définitive de l'épithélium. Mise à part l'augmentation du volume du sein, on observe d'autres modifications morphologiques à savoir la saillie du mamelon ainsi que la pigmentation rosée et l'élargissement de l'aréole.

D. Durant la vie adulte

Au cours de la vie adulte de la femme et hors de période de grossesse et de lactation, le sein subit les modifications hormonales du cycle menstruel. Ainsi, en phase folliculaire, ils sont souples alors qu'en phase lutéale, on observe une légère augmentation du volume et de la température.

E. En période de grossesse et de lactation

Au cours de la grossesse, la différenciation terminale de la glande mammaire est déclenchée par les hormones stéroïdes placentaires (œstrogène durant le 1^{er} trimestre, progestérone au 2nd et 3^{ème} trimestres). Elle se caractérise par une prolifération des structures lobulaires et le développement des acini. Vers la fin de la grossesse, les cellules épithéliales alvéolaires se différencient et se polarisent pour pouvoir capter les précurseurs du lait au pôle basal et excréter le lait dans la lumière au pôle apical. Cependant, la lactation est inhibée par la progestérone jusqu'à l'accouchement. Après la délivrance, le taux des hormones stéroïdiennes placentaires chute et la glande peut sécréter du lait en réponse aux pics d'hormones peptidiques hypophysaires, la prolactine et l'ocytocine. La prolactine stimule la production et la sécrétion de lait et l'ocytocine stimule la contraction des cellules myoépithéliales permettant l'éjection du lait dans les canaux galactophores. Les pics de prolactine et d'ocytocine surviennent en réponse à la succion des mamelons au cours de la tétée.

Lors du sevrage ou en l'absence d'allaitement, la suppression des tétées entraîne l'arrêt de la production réflexe de prolactine. Ceci entraîne une distension de la glande mammaire par le lait qui s'accumule suivi d'une atrophie des structures épithéliales. Au fur et à mesure, la sécrétion lactée cesse et les cellules épithéliales productrices de lait desquament et entrent en apoptose. L'arrivée massive de macrophages termine la dégradation du tissu sécréteur. Enfin, la glande mammaire retourne à un état moins différencié proche d'avant la grossesse. Cette involution de la glande mammaire après chaque sevrage est à l'origine du rôle

protecteur de la grossesse dans le cancer du sein. En effet, c'est un processus de régulation important dans l'élimination de cellules potentiellement mutées et précancéreuses (Mathelin et al., 2007).

F. A la ménopause

Arrivée à la ménopause, la glande mammaire s'atrophie. L'arrêt des sécretions ovariennes est à l'origine de l'involution des canaux canaliculaires et des structures ducto-lobulaires qui seront remplacés progressivement par du tissu fibreux et adipeux. Ceci explique la radiotransparence du sein après la ménopause.

CHAPITRE II : LE CANCER DU SEIN

Le sein est constamment sous l'influence d'hormones stéroïdes endogènes dont les œstrogènes qui ont pour effet d'induire la prolifération cellulaire. De plus, les proliférations massives des cellules de la glande mammaire au cours de la grossesse constituent des événements propices à la cancérisation du tissu mammaire au cours de la vie d'une femme. Pour mieux comprendre la maladie du cancer du sein, nous allons dans ce chapitre tout d'abord commencer par revoir la biologie du cancer (1), l'épidémiologie du cancer du sein (2) et les facteurs de risque (3). Nous poursuivrons ensuite avec l'anatomopathologie du sein (4), les marqueurs biologiques (5) ayant permis la classification des tumeurs du sein (6) et les stratégies thérapeutiques (7). Deux cas particuliers de cancer du sein seront également traités à la fin de ce chapitre (8).

1. La biologie du cancer

Le processus de tumorigenèse est un mécanisme complexe comprenant différentes étapes faisant intervenir de nombreux acteurs.

A. Mécanisme de cancérisation

La tumorigenèse comprend trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 4) :

- **L'initiation :**

Une cellule épithéliale normale se transforme de manière irréversible en une cellule cancéreuse. Cette transformation n'est pas la conséquence d'un seul événement mais au contraire de l'accumulation de plusieurs événements conférant à la cellule des caractéristiques de cellules cancéreuses. Ces caractéristiques décrites par Hanahan et Weinberg comprennent : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité à échapper à l'apoptose, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse, la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, la capacité à échapper à une destruction par le système immunitaire, l'induction de l'inflammation, l'instabilité et les mutations du génome et la capacité à former des métastases (Fidler, 2003).

- **La promotion :**

Après transformation, la cellule cancéreuse entre en prolifération massive, cette expansion clonale sous le contrôle de l'environnement résulte en une tumeur primitive.

Durant cette phase, les cellules cancéreuses mûrissent et acquièrent la totalité des caractéristiques cancéreuses comprenant entre-autres la capacité à induire l'angiogénèse afin d'assurer l'apport en oxygène et en nutriments vers le centre de la tumeur qui grossit et les propriétés invasives et migratoires.

- La progression :

Les cellules cancéreuses ayant acquis les propriétés invasives et migratoires, se frayent un passage vers la circulation vasculaire ou lymphatique où elles vont pénétrer ces circuits par intravasation. Une fois dans le circuit systémique ou lymphatique, elles vont être véhiculées et disséminées vers d'autres régions de l'organisme où, au contact de l'endothélium cible, elles traversent à nouveau la paroi vasculaire ou lymphatique par extravasation. La cellule cancéreuse instaure un nouveau dialogue avec les composants cellulaires du tissu d'accueil afin de réunir les conditions nécessaires à sa survie et former une métastase (Fidler, 2003).

B. Les oncogènes et suppresseurs de tumeurs

La prolifération ainsi que la différenciation cellulaire sont des mécanismes finement contrôlés par le tissu environnant. Un équilibre entre facteurs activateurs et inhibiteurs définissant l'homéostasie tissulaire, contrôle la multiplication cellulaire. Chaque tissu va avoir une homéostasie qui lui est propre en conditions normales. Ainsi, certaines cellules comme les neurones qui ne nécessitent pas un renouvellement constant vont se retrouver dans un environnement empêchant leur prolifération, tandis que d'autres comme les cellules de la muqueuse gastrique qui nécessitent un renouvellement cellulaire permanent vont être sous l'influence de facteurs activant leur multiplication. Un déséquilibre de ces facteurs altère immédiatement l'homéostasie cellulaire. En effet, la cellule répond à l'information qu'elle reçoit du milieu environnant. Cette information est transmise à la cellule via des messagers moléculaires ou ligands tels que des hormones, des neuromédiateurs, des protéines ou peptides. L'information est réceptionnée grâce aux récepteurs spécifiques aux ligands présents sur la cellule cible. En se liant à leur récepteur, les ligands induisent des voies de signalisation intracellulaires qui ont pour cible principale le contrôle de l'expression des gènes induisant la modification de l'activité cellulaire. En fonction du ligand la cellule peut entre autre se suicider par apoptose ou au contraire, proliférer. Dans la plupart des formes de cancer, les molécules impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire sont altérées et entraînent à leur tour un déséquilibre entre la prolifération anarchique et la capacité à entrer en apoptose.

Les proto-oncogènes (forme sauvage) sont des facteurs activateurs de la division cellulaire. Lors de leur activation en oncogène (forme altérée) suite à une lésion génétique, la prolifération cellulaire devient anarchique. Le mode d'action des oncogènes est dominant, l'altération d'un seul allèle est suffisante pour conférer un état d'activation pathologique. Cependant, à elle seule, cette altération ne permet pas la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont généralement des facteurs inhibiteurs de la division cellulaire ou inducteurs de la mort cellulaire. Les altérations génétiques de ces facteurs résultent le plus souvent en leur inactivation. Les processus entraînant la mort des cellules anormales sont alors défectueux et empêchent l'élimination d'une tumeur naissante. Le mode d'action des gènes suppresseurs de tumeurs est récessif, l'altération des deux allèles est nécessaire (Vogelstein and Kinzler, 2004).

On distingue trois types de lésions génétiques induisant une altération de l'expression des gènes : les mutations, les translocations et les amplifications ou délétions géniques.

Les mutations peuvent être neutres (à l'origine du polymorphisme), néfastes et entraîner la mort de l'organisme comme c'est le cas dans le cancer, ou bénéfiques et constituer le moteur de l'évolution des êtres vivants. Les mutations sont des événements ponctuels modifiant l'une des bases de l'ADN du gène. Dans le cas d'une mutation dans la séquence codante du gène, celle-ci peut entraîner une modification de l'acide aminé codé, on parle alors de mutation faux-sens, laquelle peut avoir une répercussion sur la fonction du produit du gène. La mutation peut aussi avoir lieu par exemple dans la zone promotrice d'un gène et avoir un effet sur l'affinité pour un facteur de transcription. Prenons par exemple, le gène Ras. Sous sa forme sauvage, cette protéine stimule la prolifération cellulaire après son activation. Cependant des mutations touchant les codons 12 et 13 (Bos, 1989) rendent la protéine Ras constitutivement active. Ras stimule ainsi la prolifération cellulaire indépendamment de tout signal.

Les translocations chromosomiques sont des remaniements importants des chromosomes générant de nouveaux chromosomes. Au cours d'une translocation, un segment de taille variable d'un chromosome est transféré sur un chromosome non-homologue ou sur une nouvelle région sur le même chromosome. Ces translocations sont pour la plupart associés à des conséquences néfastes telles que l'aneuploïdie, l'infertilité ou le cancer. Dans les Leucémies Myéloïdes Chroniques, on observe dans 90 % des cas une translocation entre les chromosomes 9 et 22 fusionnant le gène *BCR* (breakpoint cluster region) situé sur le chromosome 22 avec le gène *abelson* (*ABL1*) situé sur le chromosome 9. Le gène de fusion

BCR-ABL1 code une protéine avec une activité tyrosine kinase entraînant une activation continue de la division (Quintás-Cardama and Cortes, 2009).

Les amplifications/délétions géniques correspondent à une multiplication ou à une perte du nombre de copies d'un gène. Dans 20 % des cancers mammaires, une amplification du locus contenant le gène HER2 sur le bras long du chromosome 17 est retrouvé.

2. Epidémiologie des cancers du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde avec approximativement un million de nouveaux cas par an (Dumitrescu and Cotarla, 2005). Il représente 16 % de l'ensemble des cancers féminins. En 2004, l'OMS (Organisation mondiale de la santé) a estimé le nombre de décès causés par le cancer du sein à 519000 (WHO Global Burden of Disease, 2004). En 2011 en France, le cancer du sein représente 33,4 % des cancers féminins avec 53000 nouveaux cas et 11500 décès (InVS, Institut de veille sanitaire <http://www.prevention-cancers-26-07.fr/depistage-du-cancer-du-sein>). Une étude rétrospective menée par l'INED (Institut national d'études démographiques, <http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers>) pour la période de 1980 à 2005 a montré que le taux d'incidence des cancers du sein dans le monde est passé de 56,8 à 101,5 cas pour 100000 femmes (Figure 5). Cette évolution de +2,4 % par an entre 1980 et 2005 s'est ralentie entre 2000 et 2005 (Belot et al., 2008; Curado, 2011). L'augmentation de l'incidence du cancer du sein dans le monde s'explique par l'augmentation de l'espérance de vie, l'augmentation de l'urbanisme ainsi que l'adoption des modes de vie occidentaux mais aussi par la détection du cancer du sein de plus en plus efficace. La diminution de l'incidence observée à partir de 2005 s'explique principalement par la diminution de la prescription de Traitements Hormonaux Substitutifs (THS) de la ménopause dans les pays développés. Le taux de mortalité s'est stabilisé entre 1985 et 1995 et a même diminué par la suite (Belot et al., 2008; Curado, 2011). Cette diminution de mortalité par cancer du sein est due aux dépistages organisés qui permettent des diagnostics de plus en plus précoces. En effet, de grandes différences de taux de mortalité sont observées entre les pays développés et les pays en développement. Dans ces derniers, l'absence de programmes de dépistage se traduit par une forte proportion de femmes présentant un cancer du sein à un stade avancé. De plus, l'absence d'infrastructures et de traitements adaptés ne permet pas de bonnes prises en charge des patientes. Alors que de grandes avancées ont été faites dans la compréhension des cancers du sein, leur diagnostic

ainsi que leur prise en charge, cette maladie demeure la première cause de mortalité chez la femme dans le monde (Benson and Jatoi, 2012; Youlden et al., 2012).

3. Les facteurs de risque

La connaissance des facteurs de risques tels que les facteurs génétiques, hormonaux et histologiques mais aussi le mode de vie s'avèrent très importants puisqu'ils influencent l'apparition de la maladie.

A. Les facteurs génétiques

Près de 20 à 30 % des patientes atteintes d'un cancer du sein ont des antécédents familiaux. Ceux-ci sont cumulatifs et le risque augmente avec la proximité du parent. De plus, le risque augmente davantage si une parente au premier degré a été atteinte d'un cancer bilatéral, si des membres de la famille ont été atteints par des cancers du colon ou de l'ovaire ou encore si un parent de sexe masculin a eu un cancer du sein (Bevier et al., 2012).

Il faut distinguer les cancers familiaux des cancers héréditaires. Les cancers du sein dits familiaux sont ceux qui apparaissent dans une même famille et dont on ne connaît pas de gène responsable. A la différence des cancers du sein familiaux, dans les cancers du sein héréditaires, un gène de susceptibilité a été identifié. Parmi ces gènes figurent les gènes BRCA1/2, TP53 et PTEN (Antoniou and Easton, 2006).

Les mutations des gènes *Breast Cancer 1 et 2* (BRCA1 et BRCA2) sont retrouvées dans 65 % des cancers du sein héréditaires, ce qui correspond à 2 à 5 % de l'ensemble des cancers du sein (Narod and Foulkes, 2004). Les gènes BRCA1 et BRCA2, localisés respectivement sur le chromosome 17 et 13, sont impliqués dans plusieurs processus essentiels tels que la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire ou encore la transcription (Roy et al., 2012; Zhang and Powell, 2005). La majorité des mutations constitutionnelles connues pour BRCA1 et BRCA2 mènent d'une manière générale à la diminution de l'expression de la protéine. Ainsi, dans le cas des mutations du gène BRCA1, 90 % mènent à l'introduction d'un codon stop prématuré (PTC ou Premature Stop Codon) induisant la dégradation de l'ARNm par le mécanisme de dégradation des ARNm porteurs d'un PTC, le NMD (Nonsense mediated mRNA Decay) (Perrin-Vidoz et al., 2002). D'autres types de mutations peuvent entraîner la diminution de l'expression de la protéine ou induire une forme altérée de la protéine. Ainsi, des mutations altérant le cadre de lecture, un site d'épissage, des mutations d'insertions ou de délétions de tailles variables ont été rapportées

(Trainer et al., 2010). Dans 80 % des cas, une altération du gène BRCA1 est associée à des tumeurs de haut grade et de mauvais pronostic (Foulkes et al., 2003; Turner et al., 2007).

Les cancers du sein liés à la mutation du gène BRCA2 sont souvent de haut grade (Bane et al., 2007). Chez un sujet sain porteur de la mutation du gène BRCA2, le risque de cancer est élevé et une surveillance annuelle par IRM (Image par Résonance Magnétique) mammaire, mammographie et échographie leur sont désormais proposés. Chez les patientes atteintes, le risque de cancer controlatéral est élevé et la mastectomie controlatérale peut être envisageable à titre préventif.

Les autres gènes, également identifiés dans les cancers du sein héréditaires, sont deux gènes clés impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, les gènes p53 et PTEN (de Jong et al., 2002). Les mutations du gène suppresseur de tumeurs p53 sont associées à une forme familiale de tumeurs multiples connues sous le nom de syndrome de Li-Fraumeni (Kast et al., 2012). Le gène p53 est localisé sur le chromosome 17 et code pour une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés. P53 est un facteur de transcription régulant la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose ainsi que dans la réponse aux stress (Levine et al., 1991; Yonish-Rouach et al., 1996). P53 comprend six domaines structuraux et fonctionnels, un domaine N-terminal de transactivation, un domaine de régulation riche en proline, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de localisation nucléaire (NLS), un domaine de tétramérisation et un domaine C-terminal riche en lysines impliqué dans la régulation de la liaison de p53 à l'ADN. La protéine p53 est impliquée dans d'importants mécanismes cellulaires. Dans les cellules normales et en l'absence de tout stress, p53 est faiblement exprimé. Lors de stress tels que des lésions de l'ADN ou encore des défauts au niveau de la division ou du métabolisme cellulaire, l'expression de p53 augmente et p53 va induire l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ou encore dans l'induction de l'apoptose, d'où sa dénomination de « gardienne du génome ». Généralement, les mutations du gène p53 dans les cancers affectent le repliement de la protéine ou son interaction directe avec l'ADN abolissant l'interaction ADN-protéine (Joerger and Fersht, 2007).

Les mutations germinales du gène suppresseur de tumeurs PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) sont souvent à l'origine du syndrome de Cowden. Ce syndrome se traduit par l'apparition d'hamartomes, des malformations tissulaires dans différents organes tels que le sein, la thyroïde, le tractus gastro-intestinal, l'endomètre et le cerveau. Ces malformations tissulaires favorisent l'apparition de lésions cancéreuses. Le gène PTEN, localisé sur le

chromosome 10, code pour une enzyme de 403 acides aminés impliquée dans la régulation du cycle de division cellulaire. PTEN est une phosphatase ubiquitaire impliquée dans le métabolisme des lipides. Cette enzyme inactive par déphosphorylation les phosphatidyls-inositols (3,4,5) triphosphates (PIP3), l'IP (1,3,4,5) ainsi que d'autres protéines. Elle est antagoniste de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K). Le IP (3,4,5)P3, une des principales cibles de PTEN, intervient dans le métabolisme et la croissance cellulaire. Une diminution même modérée de PTEN augmente considérablement le risque de cancer (Maehama and Dixon, 1999).

B. Les hormones

La glande mammaire est sous le contrôle des hormones ovariennes (œstradiol et progestérone) de la puberté à la ménopause. Les hormones jouent un rôle très important dans le développement physiopathologique mammaire. Le temps d'exposition aux hormones stéroïdes est directement corrélé à la survenue d'un cancer du sein. Ainsi, des règles précoces et/ou une ménopause tardive favorisent l'apparition de cancers du sein (MacMahon, 2006). A l'opposé, une maternité à un âge jeune ainsi que l'allaitement ont un effet protecteur (Dogan et al., 2011).

A côté des hormones endogènes, la glande mammaire peut également être sous le contrôle d'hormones exogènes issues d'un THS de la ménopause, de la contraception orale ou d'un traitement d'infertilité. Les THS sont administrés aux patientes dans le but de diminuer les symptômes sévères de la ménopause, tels que les bouffées de chaleur, les sueurs nocturnes, les troubles du sommeil ou de l'humeur mais aussi les risques d'ostéoporose. Toutefois, à long terme (>5 ans), ces traitements peuvent augmenter considérablement les risques de cancer du sein et pour les femmes plus âgées, augmenter également le risque de maladies cardio-vasculaires et d'accidents thromboemboliques (Afssaps, 2004). La contraception orale semble également influencer l'apparition du cancer du sein (Iatrakis et al., 2011) (Bui et al., 2013).

Les traitements d'infertilité à base de diéthylstilbestrol (DES) augmentent le risque de cancer du sein pour la descendance comme le montre l'apparition de cancers du sein agressifs chez des patientes assez jeunes dont les mères ont subis des traitements d'infertilité. Les stimulations hormonales lors d'assistance médicale à la procréation pourraient également augmenter le risque de cancer du sein (Brinton et al., 2012; Impicciatore and Tiboni, 2011; Stewart et al., 2012).

C. Les lésions tissulaires

Les lésions bénignes du sein peuvent selon les formes histologiques s'accompagner d'un risque accru de développer un cancer du sein. Les atypies épithéliales, telles que la métaplasie cylindrique, l'hyperplasie canalaire ou lobulaire peuvent représenter des lésions précancéreuses. Les lésions bénignes comme les papillomes, les lésions sclérosantes, ou les adénofibromes peuvent aussi accroître les risques de cancer du sein (MacGrogan et al., 2008).

D. Le mode de vie

Les facteurs environnementaux peuvent influencer de manière importante l'apparition du cancer du sein. Une étude a montré que dans le cas de populations migrant d'une zone géographique à faible incidence vers une zone à forte incidence, le risque de développer un cancer atteint progressivement celui de la zone d'accueil (Coyle, 2009).

Les radiations ionisantes contribuent fortement au développement des cancers du sein. L'analyse d'informations médicales concernant des femmes asiatiques exposées aux bombes atomiques d'Hiroshima et Nagasaki a montré une augmentation des cas de cancer du sein chez les femmes âgées de moins de 40 ans au moment de l'exposition (Carmichael et al., 2003). Des données épidémiologiques de patientes exposées à des radiations dans le cadre médical vont dans le même sens (Berrington de González et al., 2009; Smith-Bindman, 2012). D'autres facteurs tels que la consommation d'alcool, de tabac ou encore le surpoids et la sédentarité peuvent également influencer l'apparition du cancer du sein (Coyle, 2009). De même, la perturbation du cycle circadien ou le manque de sommeil peuvent accroître les risques de cancer du sein (Leonardi et al., 2012). La carence en vitamine D, est un facteur de risque émergent dans les cancers du sein (Engel et al., 2010; Hong et al., 2012).

En conclusion, il faut distinguer entre les facteurs de risque génétiques bien caractérisés et les facteurs de risque environnementaux ou liés au mode de vie dont l'impacte reste mal connu. Il ne faut pas perdre de vue que de nombreux cancers surviennent en l'absence de tout facteur de risque identifié.

4. Anatomopathologie des tumeurs du sein

Les tumeurs malignes du sein les plus fréquemment observées sont les adénocarcinomes d'origine canalaire et lobulaire. Ils représentent 98 % de la totalité des cancers du sein. On peut les classer en trois groupes: les carcinomes *in situ* où les cellules cancéreuses prolifèrent mais restent confinées à l'intérieur de la membrane basale, les carcinomes invasifs où les cellules cancéreuses franchissent la lame basale (Figure 6) et les formes rares constituant 1 à 2 % des carcinomes infiltrants.

A. Les carcinomes *in situ*

Les carcinomes *in situ* ou non-infiltrants se définissent comme une prolifération de cellules épithéliales à l'intérieure d'une structure délimitée du tissu conjonctivo-vasculaire par une membrane basale sous-jacente. Ils correspondent à l'évolution d'une dysplasie, une multiplication cellulaire spécifique des épithéliums, suite à des altérations génétiques. L'état dysplasique peut être diagnostiqué par le pathologiste sur des critères morphologiques : augmentation du nombre de mitoses, augmentation des rapports nucléo-cytoplasmiques, anisocytose (hétérogénéité de la taille des cellules), anisocaryose (hétérogénéité de la taille des noyaux des cellules), troubles de la polarité cellulaire, et désorganisation de l'épithélium. En fonction de l'origine des cellules cancéreuses on distingue les carcinomes canauxaires (Figure 6.a) et lobulaires (Figure 6.b).

B. Les carcinomes invasifs

Les carcinomes invasifs ou infiltrants se distinguent des carcinomes *in situ* par la rupture de la membrane basale. Les cellules tumorales envahissent le tissu environnant après avoir acquis des caractéristiques invasives et migratoires et entrent dans les circuits lymphatiques et systémiques pour aller coloniser d'autres tissus. Au niveau de la rupture de la membrane basale, le tissu conjonctif est modifié et appelé stroma tumoral. On retrouve ici aussi des carcinomes canauxaires (Figure 6.c) et lobulaires (Figure 6.d) en fonction de l'origine de la tumeur, les plus fréquents étant les carcinomes canauxaires.

5. Les marqueurs tumoraux des cancers du sein

La transformation tumorale d'une cellule s'accompagne de modifications morphologiques et moléculaires. Ainsi certains gènes sont surexprimés tandis que d'autres sont réprimés. La nature des gènes altérés aura des conséquences sur les propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces indicateurs, plus communément appelés « marqueurs biologiques », peuvent être mesurés et donner des informations sur la présence et la nature de la tumeur. Ils peuvent être « non-circulants » et visualisés histologiquement ou alors, ils peuvent être « circulants » et quantifiés dans le sérum ou dans le plasma. La nature des marqueurs biologiques est très variable, ce sont le plus souvent des protéines ou des polypeptides. D'une manière générale, un marqueur biologique est une caractéristique biologique mesurable de façon précise et reproductible. Les marqueurs peuvent être utilisés à visée diagnostique, pronostique, prédictive d'une réponse à un traitement, ou dans le cadre d'un suivi (InCA Rapport, 2009).

A. Les marqueurs biologiques « non-circulants »

Actuellement, les marqueurs les plus utilisés sont : les récepteurs hormonaux, l'HER2, et le Ki67.

a. Les récepteurs hormonaux

Les récepteurs hormonaux principalement impliqués dans les cancers du sein sont le récepteur aux œstrogènes (RE) (Figure 7.a) et le récepteur à la progestérone (RP) (Figure 7.b). Ce sont des récepteurs nucléaires qui une fois activés jouent le rôle de facteurs de transcription régulant l'expression de nombreux gènes cibles (Speirs and Walker, 2007) dont le facteur en trèfle 1 (TFF1) (Figure 8). En absence de ligand, ils sont inactifs et sont localisés dans le cytoplasme de la cellule, liés à des protéines HSP (Heat Shock Protein) (Pratt, 1997). En présence de l'hormone, le complexe ligand/récepteur est transloqué dans le noyau où il se dimérise et agit en se fixant sur des segments spécifiques de l'ADN, appelés PREs (Progesterone Response Elements) ou EREs (Estrogen Response Elements).

Les deux récepteurs hormonaux existent sous deux isoformes. Concernant les RE, il existe deux isoformes α et β codés par deux gènes différents. L'isoforme α est connue pour jouer un rôle majeur dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires alors que l'implication de l'isoforme β reste mal connue. Concernant les RP, il existe également deux isoformes : $RP\alpha$ et $RP\beta$ (Kastner et al., 1990) issus de transcrits ayant deux promoteurs

distincts situés sur le même gène. L'expression du RE α ou du RP α est évaluée dans la tumeur primitive par immunohistochimie (IHC). Lors de l'analyse, deux paramètres pour chaque récepteur sont pris en compte : le pourcentage de cellules cancéreuses présentant un marquage nucléaire (de 1 à 100 %) ainsi que l'intensité du marquage cotée de 1 à 3 du marquage le plus faible au plus fort (Hammond et al., 2010; Nofech-Mozes et al., 2012). Le calcul de scores (% x Intensité, de 1 à 300) permet de définir la positivité et de prendre la décision thérapeutique. Les patientes ER positives sont traitées par thérapie anti-hormonale.

b. *Le Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2)*

Le proto-oncogène HER2 ou c-erbB2 code pour une protéine de 185 kDa nommée HER2. Celle-ci appartient à la famille des récepteurs HER transmembranaires à activité tyrosine kinase. Cette famille comprend quatre membres, HER1 à HER4 qui sont tous impliqués dans la régulation de la croissance, de la survie et/ou de la migration cellulaire (Burstein, 2005). Contrairement à HER1, HER3 et HER4 qui sont activés par liaison à des facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor), HER2 n'a pas de ligand propre. Cependant, il est le partenaire de choix dans la formation d'hétérodimères HER (Earp et al., 2003) et peut donc être activé par des ligands spécifiques d'autres HER. HER2 est surexprimé dans 20 % des cancers du sein. Dans 95 % des cancers du sein HER2 positifs, la surexpression de HER2 est due à une amplification génique de l'amplicon HER2 situé sur le bras long du chromosome 17 (Mano et al., 2007). Dans les autres cas, la surexpression est due à des altérations transcriptionnelles, ou à des mutations du gène (Arteaga et al., 2012).

Le statut HER2 est analysé par IHC (Figure 9) dans tous les cancers du sein invasifs (Penault-Llorca et al., 2010). L'expression de HER2 est mesurée de manière semi-quantitative basée sur deux critères, l'intensité du signal et le pourcentage de cellules positives. Le score issu de ces paramètres renseigne sur l'expression de HER2, qui peut être basale, intermédiaire ou forte. Dans le cas d'une expression intermédiaire, une hybridation in situ (ISH) visant à rechercher des amplifications du gène HER2 est réalisée. Les patientes diagnostiquées positives pour HER2 sont traitées par le l'herceptin, un anticorps dirigé contre le récepteur HER2.

c. *Le Ki67*

Le Ki67 est une protéine nucléaire de 360 kDa localisée dans les noyaux des cellules prolifératives en phase G1, S, G2 et M. Il est absent dans les cellules quiescentes en phase G0. Sa fonction est inconnue mais une implication dans le pouvoir prolifératif ou dans le contrôle

du cycle cellulaire est suggérée. L'antigène Ki67 est détecté grâce à l'anticorps anti-Ki67 par IHC (Figure 10) ou par immunofluorescence (IF). Le pourcentage de noyaux positifs pour Ki67 donne l'index Ki67. Plus il est élevé, plus il y a de cellules en division. Les tumeurs présentant un Ki67 supérieur à 30 % sont traitées par chimiothérapie. Si le Ki67 est inférieur à 15 % la chimiothérapie n'est pas administrée. Entre ces deux valeurs, la décision thérapeutique est prise en fonction d'autres critères.

B. Les marqueurs circulants

L'antigène cancer 15-3 (CA-15.3) est pour le moment le seul marqueur biologique circulant dosé systématiquement. L'antigène carcino-embryonnaire ACE est souvent utilisé comme marqueur secondaire. Les cellules tumorales circulantes (CTC) constituent un marqueur biologique potentiel des cancers et ont été largement étudiées durant les dix dernières années.

a. Le CA15-3

Le CA15-3 est un antigène provenant du gène de la mucine 1 (MUC-1). Cette glycoprotéine est présente principalement au pôle ductal des cellules épithéliales normales de nombreux tissus (sein, utérus, ovaire,...). Dans les cellules mammaires cancéreuses ainsi que dans les cellules métastatiques elle est exprimée sur toute la surface cellulaire et une partie est libérée dans la circulation sanguine. Le CA15-3 est généralement dosé par Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ou Immuno Radio Metric Assay (IRMA). Une valeur supérieure à 30 U/ml suggère un stade avancé, voire une dissémination métastatique. Ce marqueur n'est pas utilisé dans le dépistage ou diagnostique du cancer du sein mais plutôt dans le suivi des patientes.

b. Les cellules tumorales circulantes (CTC) ou disséminées (CTD)

Les cellules tumorales ayant atteint la circulation générale sont appelées les CTC (Circulating Tumor Cells), et celles ayant atteint un organe cible sont appelées les DTC (Disseminated Tumor Cells) ou micrométastases. L'étude des CTC dans le sang s'est développée grâce à l'évolution des techniques (Cristofanilli and Mendelsohn, 2006; Nagrath et al., 2007; Powell et al., 2012). Il est aujourd'hui possible de détecter, après une étape d'enrichissement, les CTC circulant dans le sang par RT-PCR ou immunomarquage. La technique par RT-PCR vise à détecter les transcrits spécifiques des cellules tumorales.

Cet examen non-invasif pourrait permettre le suivi en situation adjuvante et serait un outil pronostique précieux (Lucci et al., 2012).

6. Classification des tumeurs du sein.

L'importance de la classification réside dans la création de groupes homogènes tant sur le plan pronostique que diagnostique afin de pouvoir attribuer à chaque groupe une stratégie thérapeutique adaptée. Trois types de classifications sont proposées : clinique, histologique et moléculaire.

A. La classification clinique

La classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) tient compte de la taille de la tumeur primitive (T), de l'envahissement ganglionnaire local (N) et des métastases (M). Les différentes combinaisons possibles des indices TNM sont regroupées en 5 stades (Tableau 1) (HAS & InCA, 2010). Le stade 0 est le moins avancé et correspond à la maladie *in situ*. Le stade IV est le plus avancé et correspond à la maladie métastatique.

B. La classification histologique

La classification histologique de Scarff, Bloom et Richardson (SBR) se base sur le degré de différenciation des tumeurs (Bloom and Richardson, 1957). Un grade allant de I à III est obtenu à partir des trois critères suivants :

- L'architecture de la tumeur comprend une formation de tubules :
 1. > 75 % de la surface de la pièce tumorale
 2. 10 à 75 % de la surface tumorale
 3. 0 à 10 % de la surface tumorale
- atypies cytonucléaires :
 1. noyaux réguliers monomorphes
 2. atypies modérées
 3. noyaux pléomorphes avec atypies marquées
- nombre de mitoses : le nombre de mitoses sur le champ (sur 20 champs totaux)
 1. 0 à 1 cellule en mitose
 2. 2 cellules en mitose
 3. 3 ou plus de cellules en mitose

Si la somme des cotes des trois critères est inférieure ou égal à quatre, la tumeur est qualifiée de grade I, de six à sept elle est de grade II et de huit à neuf elle est de grade III.

Un grade SBR modifié (MSBR) a été établi afin de mieux séparer les patientes de grade SBR II de bas et haut risque métastatique. Le MSBR ne prend en compte que le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses qui sont cotés de 1 à 5. Ainsi, une patiente de grade SBR II, MSBR 2 ou 3 est considérée à faible risque de rechute métastatique alors qu'une patiente de grade SBR II, MSBR 4 ou 5 est considérée à fort risque de rechute métastatique.

C. La classification moléculaire

La classification moléculaire est basée sur la présence ou l'absence des marqueurs biologiques non-circulants discutés plus haut (5.A). Cette classification utilisée actuellement en accord avec la conférence de consensus de Saint-Gallen (Goldhirsch et al., 2011) comporte 4 groupes : luminal-like, HER2+, triple-négatif et cas particuliers (Tableau 2).

a. *Luminal-like*

Ces tumeurs sont RE⁺ et/ou RP⁺ et représentent 60% des cancers du sein. On distingue trois sous-types :

- *luminal A* : RE⁺ / RP⁺ / HER2⁻, index Ki67 faible
- *luminal B/HER2⁻* : RE⁺ et/ou RP⁺, HER2⁻, index Ki67 fort
- *Luminal B/HER2⁺* : RE⁺ et/ou RP⁺, HER2⁺, index Ki67 indifférent

b. *HER2+*

Ces tumeurs constituent environ 20% des cancers du sein. Initialement de très mauvais pronostic, elles bénéficient aujourd'hui d'une thérapie ciblée par l'herceptin (Trastuzumab ®), un anticorps dirigé contre le récepteur HER2. Il existe deux sous-types :

- *Luminal B/HER2* : RE⁺ et/ou RP⁺, HER2⁺
- *HER2+ non luminal* : RE⁻ / RP⁻ / HER2⁺

c. *Triple-négatif*

Ces tumeurs n'expriment ni RE, ni RP, ni HER2. Elles expriment au moins un des marqueurs des cellules basales (ou myoépithéliales) comme les cytokératines 5 et 6 et la vimentine. Elles représentent 10% des cancers du sein. Il existe trois sous-types :

- *basal-like* : issues de progéniteurs luminaux, et non basaux (Molyneux et al., 2010). Elles représentent certainement un sous-groupe moléculaire hétérogène de tumeurs.

- *claudin-low* : issues des cellules souches mammaires. Elles ont une expression faible des claudines, et de l'E-cadhérine, caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).
- *Normal-like* : elles présentent un profil moléculaire proche du tissu mammaire normal. Aujourd'hui, ce sous-groupe est remis en question. Il serait issu d'échantillons de tumeurs contenant une grande proportion de cellules épithéliales normales (Colombo et al., 2011; Weigelt et al., 2010)

d. *Cas particuliers*

Ce groupe est constitué de tumeurs hormonosensibles (cribriformes, tubuleux et mucineux) traitées par hormonothérapie et de tumeurs non-hormonosensibles (apocrine, médullaire, adénoïde kystique et métaplasique) traitées par chimiothérapie.

7. Les stratégies thérapeutiques

La prise en charge du cancer du sein se fait grâce à des stratégies thérapeutiques complémentaires. La chirurgie avec l'ablation de la tumeur constitue la première stratégie. Après chirurgie, suivant le cancer du sein diagnostiqué chez la patiente, différents traitements seuls ou combinés peuvent être appliqués : les thérapies cytotoxiques telles que la radiothérapie et la chimiothérapie et les thérapies ciblées telles que l'hormonothérapie ou encore l'herceptin (trastuzumab) selon les critères présentés ci-dessus.

CHAPITRE III : LES PEPTIDES EN TREFLE (TFFS)

Dans les années 80, le criblage d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) provenant de cellules épithéliales de la lignée humaine mammaire cancéreuse MCF7, une lignée de type luminal possédant des récepteurs aux œstrogènes (RE+), a permis à l'équipe de Pierre Chambon de découvrir la protéine pS2 (Masiakowski et al., 1982). La protéine pS2 aussi connue sous le nom de pNR-2 ou BCEI (Breast Cancer Estrogen Induced Protein) et rebaptisée plus tard Trefoil Factor 1 (TFF1), est fortement exprimée par les cellules MCF7 en présence d'œstradiol. A la même époque, deux autres protéines, de structure similaire, ont été découvertes : TFF2 ou SP (Spasmolytic Protein) isolé à partir de pancréas de porc (Jørgensen and Larsen, 1980) et TFF3 ou ITF (Intestinal Trefoil Factor) isolé à partir d'intestin de rat (Suemori et al., 1991). TFF1, TFF2 et TFF3 constituent la famille des peptides en trèfle.

Les TFFs sont des facteurs gastro-intestinaux exprimés et sécrétés par les cellules épithéliales. La localisation d'expression des TFFs est propre à chaque membre de la famille le long du tractus gastro-intestinal. Ainsi, chez l'homme, TFF1 est principalement exprimé dans l'estomac (Madsen et al., 2007; Rio et al., 1988a), TFF2 dans l'estomac et le duodénum (Madsen et al., 2007; Tomasetto et al., 1990) et TFF3 dans l'intestin et le colon (Madsen et al., 2007; Suemori et al., 1991). Les TFFs sont aussi exprimés dans d'autres tissus normaux tels que les poumons, le tractus uro-génital, les glandes lacrymales, la vésicule biliaire, le cerveau et peuvent aussi être exprimés de manière ectopique dans certains adénocarcinomes. Les TFFs sont aujourd'hui reconnus pour leurs effets protecteurs et réparateurs des lésions des muqueuses.

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser aux trois membres de la famille des TFFs. Nous décrirons les gènes TFFs (1) et les protéines codées par ces gènes (2) avant de décrire leur localisation (3) et leur fonction (4) dans les tissus normaux, puis dans les tissus cancéreux (5).

1. Les gènes TFFs

A. Structure

Chez l'homme, les gènes codant pour les trois membres de la famille des TFFs sont localisés de manière contiguë sur le bras long du chromosome 21 en 21q22.3 formant un cluster sur une région d'environ 50 kb (May and Westley, 1997a; Tomasetto et al., 1992). Les similitudes observées entre les trois gènes suggèrent un ancêtre commun ayant subi des duplications (Gött et al., 1996). D'une manière générale, les gènes des TFFs sont organisés en 3 exons, 4 pour TFF2 (Ribieras et al., 1998). Alors que les trois membres de la famille sont exprimés dans les mêmes organes ou des organes proches en conditions physiologiques, leur transcription est sous le contrôle de promoteurs différents.

B. Régulation

L'expression des gènes TFFs est régulée par la présence d'éléments de réponse à des facteurs de transcription dans les régions promotrices et par des mécanismes épigénétiques.

a. TFF1

Le gène TFF1 humain s'étend sur une longueur d'environ 4,5 kb comprenant trois exons, codant respectivement pour la partie N-terminale, le « domaine en trèfle » ou « domaine P » et le domaine C-terminal acide (Ribieras et al., 1998). Le promoteur contient une série d'éléments de réponse à différents stimuli. Ainsi, on trouve dans le promoteur TFF1 : un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) et une région enhancer complexe de réponse à l'EGF, à l'activator protein 1 (AP-1), à la proto-oncoprotéine c-Ha-ras (Nunez et al., 1989).

La régulation du gène codant pour TFF1 a été étudiée dans les cellules gastriques et les cellules mammaires cancéreuses. Dans les cancers du sein hormono-dépendants, l'expression ectopique de TFF1 est directement sous le contrôle de l'œstradiol (Brown et al., 1984; Jakowlew et al., 1984; Rio et al., 1987) (Figure 11).

En revanche, dans l'estomac, l'expression de TFF1 est sous le contrôle de la gastrine, une hormone gastrique, qui active l'expression de TFF1 via la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) (Khan et al., 2003). D'autres facteurs régulent l'expression de TFF1 dans l'estomac. Ainsi, les facteurs de transcription GATA5 et GATA6 activent la transcription de TFF1 dans les cellules gastriques cancéreuses. De manière intéressante, GATA4 et GATA5 sont épigénétiquement inactivés dans la majorité des cancers

gastriques, tout comme TFF1 (Al-azzeah et al., 2000). D'autres études ont montré qu'au cours de l'inflammation, NF κ -B et C/EBP β activés par les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β réprimaient l'expression des trois membres TFFs pouvant mener à une atténuation de l'activité tumeur suppresseur de TFF1 dans l'estomac (Dossinger et al., 2002). Dans l'estomac, mais aussi dans le pancréas, dans le cas d'une pancréatite, le TGF α (Transforming growth factor alpha), principal ligand du récepteur à l'EGF (EGFR), active l'expression de TFF1 (Ebert et al., 1999). De même, le facteur de transcription HNF3 activé lors de lésions gastriques et pancréatiques est capable d'activer l'expression de TFF1 (Beck et al., 1999).

Les TFFs présentent également des mécanismes d'inter-régulation. Dans le modèle murin TFF1-KO, TFF3 est exprimé de manière ectopique dans l'estomac (Lefebvre et al., 1996). Dans la même ligne d'idées, les souris TFF3-KO invalidées pour le gène TFF3 subissent en parallèle une diminution de l'expression de TFF1 (Taupin et al., 1999).

La transcription de TFF1 est également régulée par des facteurs environnementaux tels que le stress oxydatif, les rayons X (Balcer-Kubiczek et al., 2002), le stress osmotique (Lüdeking et al., 1998), l'hypoxie (Stoner et al., 2002) ainsi que par les lésions au niveau des muqueuses. Toutefois les voies de signalisation activées au cours de ces processus restent à élucider.

Au delà de la régulation de TFF1 par des facteurs de transcription, l'expression du gène est également sous le contrôle de mécanismes épigénétiques. Ainsi, le gène TFF1 est peu ou pas méthylé dans les tissus où il est normalement exprimé, alors qu'il est fortement méthylé dans les organes n'exprimant pas TFF1 (Ribieras et al., 2001). Dans certaines tumeurs gastriques, l'expression de TFF1 est fortement réprimée par méthylation de son promoteur (Carvalho et al., 2002). Des expériences de cancers gastriques induits chez la souris par le N-méthyl-N-nitrosourea (MNU) confirment ces observations. En effet, la perte d'expression de TFF1 est associée à la déacétylation de l'histone H3 dans la région promotrice du gène TFF1 (Tomita et al., 2011).

b. *TFF2*

TFF2, contrairement à TFF1, ne possède pas d'ERE. Dans l'estomac et le duodénum, où TFF2 est principalement exprimé, il est régulé par la gastrine (Khan et al., 2003). Le modèle murin TGF α -KO a permis de mettre en évidence une défaillance de l'expression de TFF2 au cours de la réparation de la muqueuse gastrique après ulcère (Cook et al., 1997). D'autres modèles murins utilisés dans l'étude de l'asthme ont mis en évidence une forte

induction de l'expression de TFF2 par les facteur de transcription STAT6 activé par les cytokines anti-inflammatoires interleukine-4 (Il-4) et Il-13 (Nikolaidis et al., 2003). La transcription du gène TFF2 est fortement activée par le facteur USF (Upstream Stimulating Factor) qui se fixe sur une séquence promotrice de TFF2 connue sous le nom de E box (Al-azzeh et al., 2002).

TFF2 a également la capacité d'induire sa propre expression de manière autocrine. Ainsi, des concentrations de TFF2 de l'ordre du micromolaire dans le surnageant de cellules gastriques suffisent à augmenter sa propre transcription (Bulitta et al., 2002). L'expression de TFF2 peut également être régulée par un autre membre de la famille des TFFs. En effet, les souris TFF3-KO invalidées pour le gène TFF3 subissent en parallèle une diminution de l'expression de TFF2 (Taupin et al., 1999).

c. *TFF3*

Dans les lignées cellulaires de cancer du sein RE+, TFF3 est surexprimé (May and Westley, 1997b). La régulation directe de TFF3 par les oestrogènes est controversée. Alors que certains auteurs retrouvent deux ERE dans la région promotrice de TFF3 (Baus-Loncar and Giraud, 2005; Borthwick et al., 2003), des études menées à partir de données concernant l'ensemble du génome humain ne retrouvent aucun ERE dans le promoteur du gène TFF3 (O'Lone et al., 2004; Putnik et al., 2012). Cependant le promoteur de TFF3 contient des éléments de réponse au butyrate (Tran et al., 1998) et au facteur HIF-1 (Hypoxia Induced Factor 1) (ERH) (Furuta et al., 2001). D'autres études réalisées sur les cellules calciformes de l'intestin, où TFF3 est synthétisé et sécrété, ont mis en évidence la présence de sites amplificateurs et répresseurs au niveau du promoteur TFF3 (Itoh et al., 1999). Toutefois, les facteurs de transcription reconnaissant ces sites n'ont pas encore été identifiés, à l'exception du facteur KGF (Keratinocyte Growth Factor) qui active l'expression de TFF3 via l'induction de la protéine liant l'élément GCSI (Goblet Cell Silencer Inhibitor) au cours de la différenciation des cellules calciformes (Iwakiri and Podolsky, 2001). L'expression de TFF3 est aussi sous le contrôle de facteurs locaux, tels que des régulateurs peptidiques. Ainsi, le carbachol, un agoniste cholinergique, la somatostatine et le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) induisent l'expression de TFF3 (Ogata and Podolsky, 1997).

2. Les peptides TFFs

Les TFFs sont de petits peptides sécrétés par les cellules épithéliales des muqueuses. Par définition, les TFFs contiennent au moins une copie du « domaine P » ou « domaine en trèfle » qui leur donne leur nom. Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser à la structure protéique des TFFs, à leurs propriétés physico-chimiques, leurs modifications post-traductionnelles, leurs interactions protéiques et les voies de signalisation proposées.

A. **Structure peptidique**

a. *Structure primaire*

Le nombre d'acides aminés est conservé entre les espèces. Ainsi TFF1 est toujours constitué de 60 acides aminés, TFF2 de 106 résidus et TFF3 de 59 résidus (Figure 12). Le domaine en trèfle de TFF1 comprend 42 acides aminés, le premier domaine en trèfle de TFF2, 43 et le deuxième 42, et celui de TFF3 42 résidus. Les trois TFFs ont un très fort degré d'homologie au niveau du domaine P. On remarque ainsi une conservation de l'arginine entre les cystéines 1 et 2, la séquence GXP entre les cystéines 2 et 3, la phénylalanine suivant la troisième et quatrième cystéine et la séquence VPWCFFXP autour de la sixième cystéine.

Plusieurs orthologues de TFF1, 2 et 3 ont été étudiés. Entre les orthologues TFF1, la conservation en acides aminés constitue 52 % de la protéine. Au sein du domaine P, il y a 57 % d'identité de séquence. En plus de cette conservation au niveau du domaine P, tous les orthologues TFF1 ont une région C-terminale très acide, ainsi, 4 des 6 derniers acides aminés (aa) sont des acides glutamiques. Les homologies de séquence de TFF2 chez différentes espèces est également plus élevées dans les domaines P avec respectivement 60 % et 71 % d'homologie pour le premier et le deuxième domaine P. TFF3 partage 67 % d'homologie du domaine P avec ses orthologues. On remarque aussi une très forte conservation des 8 derniers résidus de la partie C-terminale de TFF3. En effet, 5 sur 8 résidus sont conservés entre orthologues TFF3.

b. *Structure secondaire*

Des études de structure des quatre domaines P humains ont mis en évidence une identité quant aux ponts disulfures permettant la formation de la structure secondaire de ce domaine (Figure 13). Dans tous les domaines P, les ponts disulfures sont toujours formés entre les cystéines 1-5, 2-4 et 3-6. D'autres structures secondaires partagées par les domaines P des trois membres sont l'hélice alpha comprenant la première cystéine et deux feuillets beta

anti-parallèles. Le premier feuillet comprend le motif conservé CCF et le deuxième, le motif conservé WCFXP.

La protéine TFF1 présente un feuillet beta anti-parallèle supplémentaire formé par la partie N- et C-terminale des acides aminés 3-7 et 47-51

c. *Structure tertiaire*

La structure tertiaire des domaines P des trois TFF est assurée par les ponts disulfures intramoléculaires (Figure 14). Le cœur des trois boucles ainsi formées, est constitué d'un double feuillet beta irrégulier qui sépare la boucle 1 de la boucle 2 et qui est à la base de la boucle 3. L'hélice alpha de la boucle 2 rejoint le feuillet beta N-terminal de la boucle 3. Les boucles 1 et 2 sont opposées l'une à l'autre et perpendiculaires à la boucle 3. En dehors du domaine P, il n'y a pas de points communs entre les structures tertiaires des trois membres de la famille. Les extrémités N- et C-terminales de TFF2 sont peu flexibles du fait des deux domaines P. L'extrémité C-terminale se rapproche de la région charnière des deux domaines P à l'interface de ces mêmes régions. Les extrémités N- et C- terminales de TFF3 semblent aussi labiles que celles de TFF1, toutefois elles ne s'organisent pas en feuillets beta.

d. *Structure quaternaire*

TFF1 et TFF3 ont une cystéine libre à l'extrémité C-terminale. Celle-ci permet la formation d'homodimères TFF1 et TFF3. Bien que les monomères TFF1 et TFF3 se ressemblent fortement au niveau de la structure tertiaire, les homodimères TFF1 et TFF3 n'ont plus aucune similarité structurale (Figure 15).

Une analyse du dimère TFF1 par résonance magnétique nucléaire indique que les deux domaines en trèfle ont des structures très similaires dans le monomère et dans le dimère. Les deux domaines au sein du dimère sont bien séparés et maintenus opposés par les deux extrémités C-terminales de chaque molécule reliées l'une à l'autre par un pont disulfure. Les prolines en position 53 de chaque monomère et l'accumulation de charges négatives portées par les huit glutamates et deux phénylalanines autour du pont disulfure reliant les deux monomères imposent cette conformation au dimère TFF1. Toutefois, les deux domaines P n'ont pas d'orientation fixe l'un par rapport à l'autre.

TFF2 peut être considéré comme un dimère naturel compte tenu des deux domaines P en tandem dans le monomère.

L'homodimère TFF3 contrairement à l'homodimère TFF1, a une structure dimérique bien définie. De plus, la conformation des extrémités N- et C-terminales diffère du monomère

au dimère TFF3. En effet, les extrémités N-terminales des deux molécules vient renforcer l'interaction des deux domaines P. De même, la région C-terminale se replie sur elle-même en se positionnant entre l'hélice alpha et le feuillet beta pour stabiliser le dimère.

B. Propriétés physico-chimiques des TFFs

Les propriétés physico-chimiques des TFFs humains apportent des informations importantes et nécessaires pour certaines étapes de leur purification.

a. Propriétés hydrodynamiques

Des expériences de centrifugation analytiques avec TFF1 et TFF3 recombinants ont montré la présence de monomères et homodimères TFF1 et de TFF3 en solution en conditions natives (Chadwick et al., 1997; May et al., 2003). Les deux TFFs se comportent comme des solutés parfaits avec des masses moléculaires anhydres proches de la valeur théorique. Par la suite, des expériences de gel filtration sur Sephadex 75 ont permis de calculer le rayon hydrodynamique (rayon de Stokes) pour TFF1 et TFF3 monomères et homodimères. Lors de ces expériences, les auteurs ont observé que TFF1 et TFF3 étaient élués plus tôt que prévu indiquant que ces deux protéines ne sont pas globulaires. Les rayons hydrodynamiques de 15,5 Å et 13,7 Å pour les monomères TFF1 et TFF3, respectivement, indiquent une globularité plus faible pour le monomère TFF1. Il en est de même pour les formes dimériques de TFF1 et TFF3 avec des rayons hydrodynamiques respectifs de 20,8 Å et 17,8 Å. Les coefficients de frictionnement calculés à l'aide des rayons hydrodynamiques et des masses moléculaires permettent de déterminer la symétrie d'une protéine. Les résultats obtenus pour les monomères TFF1 et TFF3 respectivement de 1,25 et 1,12, indiquent une asymétrie moléculaire plus importante pour TFF1 que pour TFF3. Cette différence est accentuée pour les homodimères TFF1 et TFF3, avec des coefficients de frictionnement respectifs de 1,34 et 1,14 (Chadwick et al., 1997; May et al., 2003).

TFF2, contrairement à TFF1 et TFF3, est une protéine extrêmement compacte. En effet, des expériences de gel filtration réalisées sur Sephadex G50 montrent un profil d'éluion de TFF2 apparent de 8500 Da, alors que la masse molaire théorique de TFF2 s'élève à 11801 Da. Ces résultats confirment la structure de TFF2 qui est essentiellement constitué de deux domaines P très globulaires et d'extrémités N- et C-terminales très courtes (Jørgensen et al., 1982).

b. *Charges électriques*

Les points isoélectriques (pHi) théoriques de TFF1, TFF2 et TFF3 sont respectivement 3,94, 4,91 et 4,75. Ces valeurs ont été confirmées par chromatographie échangeuse d'ions. Les expériences ont montré une interaction avec la résine anionique plus forte pour TFF1 que pour TFF3 et TFF2, tant pour les formes monomériques que dimériques. Ceci confirme le caractère plus acide de TFF1 comparé à TFF3. Les charges négatives globales à pH neutre doublent pour les dimères TFF1 et TFF3, ceci est reflété par une plus grande avidité de liaison des dimères aux résines échangeuses d'anions que leurs correspondants monomériques (May et al., 2003). Si on s'intéresse à la distribution des charges, on constate de grandes différences entre les monomères TFF1 et TFF3. Les résidus chargés dans les différents domaines de la protéine TFF1 lui confère une polarité très prononcée. TFF2 comporte des résidus basiques et acides distribués de manière uniforme sur les différents domaines, ne lui conférant pas de polarité.

c. *Résistances aux protéases*

Les TFFs sont des facteurs gastro-intestinaux sécrétés dans des milieux riches en protéases. Leur résistance à différentes protéases a été étudiée. En conditions natives, ils résistent à la dégradation par les protéases. Après dénaturation, tous les TFFs sont digérés par les différentes protéases. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3. (Jørgensen et al., 1982; Poulsen et al., 1999; Thim and May, 2005).

d. *Modifications post-traductionnelles*

La modification post-traductionnelle commune aux trois TFFs est le clivage du peptide signal par protéolyse au cours de la maturation dans le réticulum endoplasmique. D'autres modifications post-traductionnelles plus spécifiques à chaque membre ont été mises en évidence. L'analyse des résidus N-terminaux par réaction d'Edman et de fragments tryptiques de TFF1 purifié à partir de suc gastrique humain a mis en évidence la modification du glutamate, premier résidu en N-terminal en pyroglutamate (Rio et al., 1988b). Cette modification n'est cependant pas observée dans la protéine TFF1 issue du milieu conditionné de cellules cancéreuses MCF7 (Rio et al., 1988b). TFF2, tout comme TFF1, possède une glutamine ou un glutamate en N-terminal suivant l'espèce d'origine. La cyclisation N-terminale du glutamate a également été observée dans la protéine TFF2 isolée à partir de pancréas de porc (Thim et al., 1985).

Les orthologues TFF3 ne présentent pas tous une glutamine ou un glutamate en N-terminal. TFF3 humain, qui présente une glutamine en N-terminal, n'a jamais été purifié à partir d'une source naturelle. Il n'est donc pas connu, s'il présente un pyroglutamate en N-terminal. Cependant, la protéine TFF3 humaine recombinante produite dans la levure présente une cyclisation N-terminale de la glutamine en pyroglutamate.

La glycosylation est une modification post-traductionnelle fréquemment observée. Seul TFF2 isolé à partir de tissus et suc gastrique humain présente une glycosylation au niveau du site consensus de glycosylation en position 15-17 (Tomasetto et al., 1990). Cependant, tout le TFF2 n'est pas glycosylé (Semple et al., 2001). TFF1 et TFF3 ne possèdent pas de sites consensus de glycosylation et n'ont jamais été observés sous forme glycosylée.

e. Interactions protéiques

Les TFFs ont été étudiés de manière intensive notamment leur rôle physiologique ainsi que les voies de signalisation potentielles ont été recherchées. Plusieurs études utilisant des TFFs radiomarqués à l'iode 125 suggèrent que les TFFs possèdent un ou plusieurs récepteurs (Chinery and Cox, 1995; Frandsen et al., 1986; Poulsen et al., 2003). Toutefois, les récepteurs par lesquels les différents TFFs induisent leur effet restent inconnus à ce jour.

Cependant des interactions protéine-protéine ont été découvertes. Ainsi, un criblage réalisé par la technique du double hybride d'une banque d'ADNc issus d'extraits d'estomac et de duodénum murins ont mis en évidence une interaction par formation d'un pont disulfure entre TFF1 et les domaines vWF C1 et C2 (von Willebrand Factor C) localisés en C-terminal des mucines MUC2 et MUC5AC (Tomasetto et al., 2000). L'association entre TFF1 et MUC5AC a également été observée chez l'homme (Ruchaud-Sparagano et al., 2004). Quelques années plus tard, un hétérodimère TFF1-Gastrokine2 (GKN2) a été isolé à partir d'épithélium d'estomac humain. La GKN2, une petite protéine de 18 kDa, spécifiquement exprimée et sécrétée dans l'estomac, se lie de manière covalente à TFF1 via un pont disulfure avec la septième cystéine libre du monomère TFF1 (Westley et al., 2005). De manière intéressante, l'homologue de GKN2 chez la souris, appelé blottin, forme un hétérodimère avec un autre TFF, le TFF2 (Otto et al., 2006). L'hétérodimère TFF2-blottin se forme probablement via interactions ioniques et hydrophobes étant donné que TFF2 ne possède pas de cystéines libres.

Dans l'estomac, *Helicobacter Pylori*, une bactérie carcinogène gastrique, lie fortement et spécifiquement les dimères TFF1. Cette interaction est nécessaire à la liaison de *H. pylori* sur la muqueuse gastrique de porc (Clyne et al., 2004).

Par la technique de spectrométrie de masse, Thim et ses collaborateurs ont identifié deux protéines issues de la muqueuse gastrique de porc pouvant se lier à TFF2 de porc immobilisée sur une colonne d'affinité et éluées par addition d'un excès de TFF2. Les deux protéines isolées correspondaient à la sous-unité β du récepteur à la fibronectine et à un récepteur membranaire CRP-Ductin (Thim and Mørtz, 2000). Cependant, le rôle de la protéine CRP-ductin n'est pas connu. Récemment, des expériences d'immunoprécipitation ont permis de découvrir l'interaction de TFF2 avec le récepteur CXCR4 menant à l'activation de la voie des MAPKs dans des lignées cancéreuses épithéliales et lymphocytaires (Dubeykovskaya et al., 2009a).

3. Expression des TFFs dans les tissus normaux

Les TFFs sont principalement, mais pas exclusivement, exprimés par les cellules épithéliales le long du tractus gastro-intestinal de manière région et cellule spécifique. On les retrouve aussi dans d'autres tissus (Figure 16).

A. Localisation de TFF1

L'expression de TFF1 a été observée dans les cellules à mucus de l'estomac et plus précisément dans la région fundique et antropylorique (Madsen et al., 2007; Rio et al., 1988a). Une très faible expression de TFF1 a également été mise en évidence dans le duodénum. Mise à part le tractus gastro-intestinal, l'expression de TFF1 a également été observée dans les glandes salivaires sublinguales et sous mandibulaires ainsi que dans la vésicule biliaire (Devine et al., 2000; Madsen et al., 2007; Srivatsa et al., 2002). L'expression de TFF1 est aussi retrouvée dans le système respiratoire au niveau de la muqueuse nasale et de l'arbre trachéobronchique (dos Santos Silva et al., 2000), tout comme dans les glandes lacrymales, le canal nasalo-lacrymal et la conjonctive (Buron et al., 2008; Langer et al., 2001; Paulsen et al., 2002). Au niveau des organes sexuels, TFF1 est exprimé en faibles quantités dans la glande mammaire et l'utérus (Poulsom et al., 1997; Wiede et al., 2001).

B. Localisation de TFF2

TFF2 est exprimé dans la muqueuse fundique et antropylorique de l'estomac (Madsen et al., 2007; Tomasetto et al., 1990). Dans le duodénum, TFF2 est exprimé dans les glandes de Brunner (Elia et al., 1994). On retrouve aussi son expression dans la vésicule biliaire, dans le canal lacrymal (Paulsen et al., 2002), et en moindre quantité dans l'œsophage. Dans les organes sexuels, TFF2 est exprimé dans l'utérus (Paulsen et al., 2002) mais pas dans la glande mammaire (Poulsom et al., 1997).

C. Localisation de TFF3

TFF3 est principalement exprimé dans l'intestin grêle et le colon par les cellules calciformes (Madsen et al., 2007; Suemori et al., 1991). TFF3 est également exprimé dans les glandes salivaires, les glandes lacrymales, la muqueuse nasale et dans l'arbre trachéobronchique.

4. Fonction des TFFs

A. Protection de l'intégrité de la muqueuse gastrique

Les études menées sur des modèles de souris invalidées pour les différents gènes TFFs ont permis de leur attribuer un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique. En effet, les souris déficientes pour TFF1 développent toutes des adénomes antropyloriques et présentent des anomalies de production de mucus (Lefebvre et al., 1996). Les souris déficientes pour TFF2 présentent quant à elles, une muqueuse gastrique érodée et une augmentation de la sécrétion acide par les cellules pariétales (Farrell et al., 2002). Les souris invalidées pour TFF3 présentent une incapacité dans la réparation de la muqueuse et meurent suite au gavage avec du sulfate de sodium dextran, un agent causant des blessures épithéliales légères chez les souris sauvages (Mashimo et al., 1996).

Les TFFs sont des peptides sécrétés dans le tractus gastro-intestinal et co-localisés avec les mucines. Ainsi, TFF1 co-localise et interagit avec MUC5AC et MUC2, TFF2 co-localise MUC6 et TFF3 co-localise avec MUC2 (Longman et al., 2000). Ces interactions favorisent la polymérisation et la stabilisation du mucus (Thim et al., 2002) protégeant ainsi la muqueuse gastro-intestinale des agressions endogènes (protéases, diffusion rétrograde des ions H⁺) et exogènes (agents pathogènes, allergènes)(Rodrigues et al., 2004).

La protection de l'intégrité de la muqueuse par les TFFs est confirmée par des modèles de souris transgéniques sur-exprimant TFF1 et TFF3 dans les villosités du jéjunum qui développent une résistance à l'érosion induite par l'indométacine. De plus, ayant été gavés avec de la protéine recombinante TFF3, les souris montrent des facilités de cicatrisation de la muqueuse gastrique induites par l'indométacine, l'aspirine ou l'éthanol induites (Babyatsky et al., 1996; Cook et al., 1998).

B. Stimulation de la migration cellulaire

La migration cellulaire vers la zone lésée est un processus indispensable à la réparation d'une blessure, appelée restitution. Ainsi, après avoir observé les phénotypes dans les modèles invalidés et transgéniques pour les différents TFFs, plusieurs équipes ont étudié l'effet des TFFs sur la migration cellulaire in vitro.

La sur-expression ou expression ectopique de TFF1 stimule la migration des cellules mammaires humaines cancéreuses (MDA-MB-231, T47D et MCF7) et normales (MCF10A) (Amiry et al., 2009; Buache et al., 2011). De même, le peptide recombinant TFF1 stimule la migration des cellules MCF7 et MDA-MB-231 (Prest et al., 2002). L'expression ectopique de TFF3 stimule la migration d'une lignée métastatique colorectale de rat (Yio et al., 2005). D'autres études menées sur d'autres modèles cellulaires vont toutes dans le même sens (Chan et al., 2005; Graness et al., 2002; Rivat et al., 2005; Storesund et al., 2008).

Les TFFs induisent la migration cellulaire au cours de la régénération et de la réparation des muqueuses. Les voies de signalisation activées par les TFFs au cours de ce processus n'ont pas encore été totalement élucidées. Cependant, des études montrent l'implication des voies MAPK-ERK1/2, PKC et des tyrosines kinases de la famille src (Graness et al., 2002; Kinoshita et al., 2000; Rodrigues et al., 2004). L'EGFR a également été décrit comme potentialisateur potentiel des effets des TFFs (Kato et al., 1999; Kinoshita et al., 2000; Kosriwong et al., 2011; Rodrigues et al., 2004; Wilson and Gibson, 1999).

C. Stimulation de l'invasion cellulaire

Lors de l'étude de l'effet des TFFs sur la migration cellulaire, les auteurs ont également étudié les capacités de TFF1 à induire l'invasion cellulaire. L'invasion cellulaire, est un processus indispensable à la réparation des muqueuses. En effet, lors des blessures, les cellules épithéliales avoisinantes doivent être en mesure de se détacher de la matrice extracellulaire afin de migrer rapidement vers les zones lésées. La capacité des TFFs à induire

la dissémination cellulaire se traduit par l'augmentation de l'invasion cellulaire (Amiry et al., 2009; Buache et al., 2011; Prest et al., 2002; Yio et al., 2005). Ainsi, dans les cellules colorectales HT29, les voies de signalisation induites par TFF3 mènent à la phosphorylation des β -caténines, à une diminution des E-cadhérines et de l'adhésion intercellulaire permettant la motilité cellulaire (Efstathiou et al., 1998; Liu et al., 1997).

Les voies de signalisation activées par les TFFs au cours de l'invasion restent inconnues à ce jour (Rodrigues et al., 2004).

L'invasion cellulaire est aussi un processus indispensable au cours du développement des tissus pour permettre aux cellules de migrer à travers le tissu vers leur zone prédestinée. En effet, des travaux réalisés sur la souris ont permis d'établir un lien entre différentes cellules gastriques et l'expression temporelle par ces dernières au cours du développement de la muqueuse (Karam et al., 2004).

D. Effet des TFFs sur la prolifération

L'effet des TFFs sur la prolifération cellulaire fait débat. En effet, certains auteurs ont observé un effet prolifératif de TFF1 et TFF3 sur les cellules mammaires cancéreuses MCF7 et T47-D (Amiry et al., 2009; Kannan et al., 2010). Cependant, des études menées dans notre laboratoire sur ces mêmes lignées cellulaires ne montrent aucun effet de TFF1 sur leur prolifération (Buache et al., 2011). Ces différences pourraient être dues à des approches expérimentales différentes, tel que l'utilisation de protéine recombinante ou surexpression. Concernant les cellules gastriques cancéreuses, l'effet des TFFs varie en fonction des auteurs. Ainsi, la surexpression de TFF1 inhibe la prolifération dans les lignées BGC823, SGC7901, GES-1 (Ge et al., 2012) et AGS (Mao et al., 2012). Cet effet antiprolifératif de TFF1 serait induit par les cyclines kinases dépendantes (cdk) INK4 et CIP retardant la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Le même effet antiprolifératif sur les AGS est observé avec de la protéine recombinante TFF1 (Mao et al., 2012; Rodrigues et al., 2004).

TFF2 a été décrit comme induisant la prolifération des cellules cancéreuses coliques, HT29 et SW480 (Playford et al., 1995) mais pas des cellules cancéreuses mammaires MCF7 et T47D (Lalani et al., 1999).

E. Effet anti-apoptotique des TFFs

Lors de la réparation d'une blessure, les cellules doivent, avant de migrer vers la zone lésée, se détacher de la matrice extracellulaire. En générale, les cellules épithéliales isolées entrent en apoptose, c'est ce qu'on appelle l'anoïkis. Les TFFs jouent ici un rôle important dans la protection des cellules épithéliales contre l'anoïkis. Des études menées au laboratoire ont montré des effets anti-apoptotiques de TFF1 sur la lignée normale d'intestin grêle de rat (IEC18), la lignée cancéreuse de colon HCT116 et sur la lignée cancéreuse gastrique AGS (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Les mêmes effets ont été observés pour TFF2 sur les cellules MCF7 (Lalani et al., 1999). TFF3, comme TFF1, est capable d'inhiber l'apoptose des lignées HCT116 et IEC18 (Taupin et al., 2000).

D'autres études ont montré un effet protecteurs contre l'apoptose induite par le butyrate, les céramides, l'étoposide et la staurosporine et même contre la sur-expression de Bad, un agent pro-apoptotique (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002; Kinoshita et al., 2000; Lalani et al., 1999).

Les effets anti-apoptotiques des TFFs empruntent les voies de signalisation de la PI3K et sont EGFR dépendants (Rodrigues et al., 2004).

F. Effets angiogéniques

La guérison d'une blessure s'accompagne de la revascularisation du tissu afin d'assurer l'oxygénation des cellules ainsi que l'apport des nutriments. Les effets pro-angiogéniques des TFFs ont été démontrés sur la membrane chorio-allantoïde d'embryons de poulet (Rodrigues et al., 2003a). L'hypoxie active le facteur de transcription HIF α qui va induire la transcription de gènes impliqués dans l'angiogénèse comme le VEGF, dans la survie cellulaire ou encore dans la migration. Parmi ces facteurs on retrouve TFF3. En effet, ce dernier possède un élément de réponse à l'HIF α (Furuta et al., 2001).

L'activité pro-angiogénique des TFFs implique le récepteur à l'EGF et la voie des COXs (cyclo-oxygénases) (Rodrigues et al., 2004).

5. Les TFFs dans L'inflammation

Les TFFs sont surexprimés et/ou exprimés de manière ectopique dans les maladies inflammatoires. Ils sont impliqués dans les processus inflammatoires. Ainsi, lors de colites intestinales induites par l'acide acétique, l'expression de TFF1 est augmentée au cours de la phase aïgue. TFF3, quant à lui, n'est augmenté qu'au cours de la phase de régénération (Itoh et al., 1996). De plus, TFF2 et TFF3 stimulent directement les monocytes qui vont coloniser le tissu inflammé pour mettre en place une réponse immunitaire (Cook et al., 1999). Il a également été montré que l'expression ectopique de DAF entraînant d'une part le blocage de l'activation du complément dirigé contre les cellules épithéliales intestinales (Andoh et al., 2001) et d'autres part l'augmentation de l'activité de NFκ-B. Ce dernier induit la transcription de la cyclo-oxygénase 2 (COX2) qui est impliquée dans les processus inflammatoires (Rodrigues et al., 2001). En parallèle à l'induction de COX2, les TFFs induisent également la production de NO via la NO synthétase NOS2. Le NO est un médiateur de l'inflammation et de l'angiogenèse mais il a aussi des propriétés génotoxiques et mutagènes (Li et al., 2002). Cette situation reflète bien la dualité fonctionnelle des TFFs.

6. Les TFFs dans les tissus tumoraux

Le rôle des TFFs dans la régénération des muqueuses gastro-intestinales est reflété par leur capacité à stimuler la migration et invasion des cellules épithéliales, à les protéger de l'apoptose et à induire l'angiogenèse. Or, ces caractéristiques pourraient être favorables à la progression des cancers et à la dissémination des cellules cancéreuses. De plus, le premier membre de la famille des TFFs, TFF1, a été isolé à partir d'une lignée cellulaire cancéreuse humaine MCF7 dans les années 80 (Jakowlew et al., 1984). Depuis, l'expression des TFFs a été étudiée dans plusieurs tissus cancéreux (Figure 17). L'ensemble des études menées a montré une expression aberrante des TFFs dans plusieurs tumeurs solides humaines, notamment dans les cancers du sein, de l'estomac, de la prostate, du colon et des poumons.

A. Les TFFs dans les cancers du sein

TFF1 a été initialement découvert en tant que gène surexprimé par les cellules cancéreuses MCF7 mammaires hormono-dépendantes en réponse à l'œstradiol. Dans la glande mammaire saine, TFF1 n'est pas ou que très peu exprimé. Depuis les années 80, de multiples études ont permis d'établir une corrélation entre l'expression de TFF1 et la présence des RE dans les cancers du sein (Rio et al., 1987). TFF1 est exprimé dans environ 50 % des tumeurs mammaires primaires dont la plupart sont ER+ constituant un sous-groupe de meilleur pronostic (Dunnwald et al., 2007; Rio et al., 1987). TFF1 est aujourd'hui considéré comme un marqueur des cancers du sein hormono-dépendants et de bonne réponse à l'hormono-thérapie (Predine et al., 1992; Ribieras et al., 1998) et de bon pronostic. TFF1 a également été décrit comme associé à la formation de métastases osseuses d'origine mammaire (Smid et al., 2006). Cependant, l'expression de TFF1 par les métastases d'origine mammaires facilite leur détection (Mikhitarian et al., 2005).

TFF3 est également surexprimé dans certains cancers du sein. Deux études ont établies une corrélation entre l'expression de TFF3 avec le RE (Ahmed et al., 2012; Chen et al., 2011; May and Westley, 1997b; Tozlu et al., 2006) et le RP (Ahmed et al., 2012; Chen et al., 2011). A l'inverse, une autre étude considère TFF3 comme un marqueur de cancers ER⁻ et PR⁻ (Doane et al., 2006). Contrairement à TFF1, TFF3 est associé à une mauvaise réponse à l'hormonothérapie (Ahmed et al., 2012; Kannan et al., 2010). Au même titre que TFF1, TFF3 est un marqueur prédictif d'apparition de métastases osseuses d'origine mammaires (Foekens et al., 1994; Smid et al., 2006).

B. Les TFFs dans les cancers gastriques

Les TFFs sont exprimés et sécrétés de manière prédominante dans le tractus gastro-intestinal chez le sujet sain (Regalo et al., 2005). En revanche, dans les cancers gastriques, l'expression des TFFs est altérée (Kirikoshi and Katoh, 2002; Leung et al., 2002).

Le modèle murin TFF1-KO a permis d'attribuer le rôle de tumeur suppresseur gastrique à TFF1 (Lefebvre et al., 1996). Ceci a été confirmé chez l'homme où l'expression de TFF1 est perdue dans environ 50 % des cancers gastriques (Kirikoshi and Katoh, 2002; Leung et al., 2002; Machado et al., 2000; Shi et al., 2006; Taupin et al., 2001). La perte d'expression de TFF1 dans les cancers gastriques peut avoir deux causes : une répression du gène TFF1 par des mécanismes épigénétiques (Beckler et al., 2003; Carvalho et al., 2002) ou des altérations géniques telles que des mutations somatiques non-sens affectant la conformation spatiale de TFF1 (Park et al., 2000; Yio et al., 2006).

TFF2 a été décrit comme protégeant la muqueuse gastrique contre l'infection d'*H. pylori* (Kubota et al., 2011), un agent pathogène à l'origine de certains cancers gastriques (Sepulveda, 2013). L'expression de TFF2 est réprimée dans certains cancers gastriques (Kirikoshi and Katoh, 2002; Machado et al., 2000; Shi et al., 2006) et augmentée dans d'autres (Dhar et al., 2005). La surexpression de TFF2 dans le cancer gastrique a été corrélée avec une augmentation de l'angiogénèse et est considérée de mauvais pronostic (Dhar et al., 2005).

TFF3 est exprimé dans l'intestin chez le sujet sain. Dans 50 % des cancers gastriques, TFF3 est sur-exprimé et sécrété de manière ectopique dans l'estomac (Dhar et al., 2005; Emami et al., 2004; Kirikoshi and Katoh, 2002; Leung et al., 2002). L'expression de TFF3 dans les cancers gastriques est corrélée avec l'apparition de métastases, particulièrement chez les femmes et est de mauvais pronostic (Dhar et al., 2005; Emami et al., 2004).

C. Les TFFs dans les cancers du colon

L'expression ectopique de TFF1 a été observée dans près de 90 % des cancers colorectaux (Tuna et al., 2006; Welter et al., 1994). L'expression de TFF1 dans les cancers colorectaux corrèle avec la protéine HSP70 (Heat Shock Protein 70).

L'expression de TFF2 n'a pas été observée dans les cancers colo-rectaux.

TFF3 est exprimé dans l'intestin sain et est souvent sous-exprimé dans les lésions précancéreuses du colon (John et al., 2007). Une étude a mis en évidence une corrélation

inversement proportionnelle entre l'expression de TFF3 dans les cancers colo-rectaux et la progression tumorale (Taupin and Podolsky, 2003).

D. Les TFFs dans les cancers de la prostate

TFF1 est exprimé de manière ectopique dans près de 92 % des cancers de la prostate (Emami et al., 2004; Regalo et al., 2005). Le taux plasmatique de TFF1 chez les patients atteints de cancers de la prostate à un stade avancé est élevé (Vestergaard et al., 2006).

Le taux plasmatique de TFF2 est également élevé chez les patients atteints de cancer de la prostate avancé (Vestergaard et al., 2006).

TFF3 est sur-exprimé dans la majorité des cancers de la prostate (Dhanasekaran et al., 2001; Luo et al., 2001; Welsh et al., 2001). Le taux plasmatique de TFF3 varie en fonction du grade de la tumeur (Vestergaard et al., 2006). TFF3 est un marqueurs prédictifs des métastases osseuses d'origine prostatique (Vestergaard et al., 2006).

E. Autres cancers

Les TFFs sont aussi exprimés de manière aberrante dans d'autres cancers. Ainsi, l'expression des trois TFFs a été associée avec les cancers pancréatiques (Collier et al., 1995; Emami et al., 2004; Prasad et al., 2005; Regalo et al., 2005).

TFF1 est aussi sur-exprimé dans les cancers rénaux (Kraus et al., 2002), les cancers du poumon (Higashiyama et al., 1994, 1996), les cancers de l'ovaire (Luqmani et al., 1992; Regalo et al., 2005; Speiser et al., 1997; Wysocki et al., 1990) ainsi que dans les cancers de l'endomètre (Koshiyama et al., 1997). TFF1 et TFF3 sont également sur-exprimés dans les cancers biliaires et hépatiques (Khoury et al., 2005; Okada et al., 2005).

TFF2 est pour sa part sur-exprimé dans les cancers de l'œsophage (Labouvie et al., 1999).

PROJET DE THESE

TFF1 est un peptide sécrété appartenant à la famille des peptides en trèfle, les Trefoil Factors (TFFs). Cette famille comprenant trois membres, TFF1, TFF2 et TFF3, est caractérisée par la présence d'une structure dite « en trèfle » aussi appelée « domaine P ». TFF1 fut identifié pour la première fois dans la lignée cellulaire mammaire cancéreuse MCF7 cultivée en présence d'œstradiol (Masiakowski et al, 1982). En effet, chez l'Homme, le promoteur de TFF1 comprend un élément de réponse aux œstrogènes (ERE). Le rôle physiologique de TFF1 a été mis en évidence grâce au modèle murin délété pour TFF1, les souris TFF1-KO (Lefebvre et al, 1996). Des analyses histologiques réalisées sur différents organes n'ont montré d'anomalies que dans l'estomac. En effet, toutes les souris TFF1-KO présentent des adénomes antropyloriques. Dans 30 % des cas, ces adénomes évoluent en carcinomes. Des études cliniques confirment ces observations chez l'homme où l'expression de TFF1 est perdue dans environ 50 % des tumeurs gastriques. Ces études montrent que l'absence de TFF1 dans l'estomac est suivie de l'apparition de tumeurs gastriques et que par conséquent, TFF1 est un gène suppresseur de tumeurs gastriques.

Afin d'étudier un potentiel rôle de TFF1 dans le développement de tumeurs mammaires, des souris transgéniques surexprimant TFF1 spécifiquement dans la glande mammaire au cours de la lactation ont été établies au laboratoire. L'analyse histologique de la glande mammaire des souris transgéniques n'a pas retrouvé d'hyperplasie chez ces souris (Tomasetto et al, 1989). La surexpression de TFF1 et sa sécrétion dans le lait n'a pas eu d'effet sur le développement ni la physiologie des souriceaux. En accord avec les critères de Weinberg (Weinberg et al, 1988), TFF1 ne peut donc être considéré comme un oncogène dans la glande mammaire comme proposé par certains auteurs. Des expériences in vitro de gain- et de perte de fonction réalisées au laboratoire sur des cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses ont confirmé l'absence de pouvoir oncogénique de TFF1 (Buache et al, 2011). Malgré toutes ces données, le rôle de TFF1 dans le cancer du sein reste controversé. En effet, contrairement à la glande mammaire saine où TFF1 n'est que peu ou pas exprimé, TFF1 est surexprimé dans approximativement 50 % des cancers du sein et une forte corrélation a été observée entre son expression et le statut ER+ des tumeurs. TFF1 est également exprimé par les métastases issues de carcinomes mammaires retrouvées dans le cerveau, les os, les viscères et les ganglions lymphatiques. De nombreuses études cliniques montrent que TFF1 est un excellent biomarqueur circulant et un facteur de prédiction à une bonne réponse au traitement antihormonal (Predine et al, 1992).

C'est dans ce cadre que s'est inscrit mon projet de thèse.

Compte tenu des controverses de la fonction de TFF1 dans le cancer du sein et de la proposition de certains auteurs d'un traitement anti-TFF1 en tant qu'approche thérapeutique, il est important de comprendre les mécanismes moléculaires de TFF1 dans cette maladie. Des études utilisant la protéine TFF1 recombinante produite dans *E. Coli* ont été menées dans le passé et ont mis en évidence une fonction motogène de TFF1 sur des cellules mammaires cancéreuses. Toutefois, la protéine recombinante produite et purifiée par ces auteurs présentait des PM de 6645 Da pour le monomère TFF1 et 13378 Da pour le dimère au lieu des masses théoriques respectives de 6667 Da et 13333 Da (Mark et al, 1997). Cependant, il est primordial, dans le cadre de l'utilisation de TFF1 recombinant, de réaliser les expériences avec de la protéine recombinante le plus proche possible de TFF1 humain physiologique. En effet, TFF1 recombinant est nécessaire à l'étude des interactions protéines-protéines pour mettre en évidence un possible récepteur de TFF1 et/ou d'étudier les voies de signalisation. D'autre part, un hétérodimère TFF1-GKN2 (gastrokine 2) extrait de mucus gastrique humain a été mis en évidence (Westley et al, 2005). A ce jour, peu d'études ont été menées sur cet hétérodimère, et sa fonction reste toujours inconnue. La production et la purification de l'hétérodimère TFF1-GKN2 en vue d'étudier sa fonction constituait une étude très intéressante à mener.

RESULTATS

CHAPITRE I : EXPRESSION ET PURIFICATION DE TFF1 DANS LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES MCF7

Afin d'étudier les caractéristiques de TFF1, j'ai entrepris de purifier TFF1 à partir des cellules épithéliales mammaires cancéreuses MCF7. C'est dans cette lignée cellulaire cultivée en présence d'œstradiol que le peptide TFF1 a été caractérisé pour la première fois (Jakowlew et al., 1984). En effet, TFF1 possède dans sa région promotrice un ERE. L'avantage de ce système d'expression, est qu'en présence d'œstradiol, les cellules MCF7 expriment et sécrètent TFF1 endogène dans le milieu de culture. Ce modèle cellulaire constitue donc une source naturelle du peptide.

1. Production de TFF1 par les cellules MCF7

Pour produire TFF1 par les cellules MCF7, j'ai dans un premier temps amplifié les cellules dans du milieu complet contenant de l'œstradiol. Cependant, la présence de 10 % de sérum de veau (FCS, Fœtal Calf Serum) rend la purification impossible. J'ai donc ensuite cultivé les cellules dans du milieu de culture contenant seulement 1 % de sérum pendant 4 jours.

2. Purification de TFF1 endogène

La purification de TFF1 endogène a été réalisée en trois étapes : une filtration tangentielle (FT), une chromatographie échangeuse d'anions (EA) et une gel filtration (GF) (Figure 18). Toutes ces étapes ont été suivies par analyse des protéines totales au bleu de coomassie (BC) et de TFF1 au moyen de western blot (WB) réalisés avec l'anticorps monoclonal spécifique p28O2.

A. Filtration tangentielle

Pour enrichir le milieu de culture MCF7 en TFF1, j'ai réalisé deux filtrations tangentielles successives (Figure 19.a). Les fractions issues des filtrations tangentielles ont été analysées sur gel SDS-PAGE par bleu de coomassie pour la présence des protéines totales et par WB pour la présence de TFF1 (Figure 19.b). La première filtration tangentielle avec le filtre 30 K a permis d'éliminer une grande majorité de protéines contaminantes supérieures à 30 kDa et la deuxième filtration tangentielle avec un filtre 5K a permis de concentrer les protéines dans le rétentat R5K (Figure 19.b). La fraction R5K a ensuite été dialysée dans du

tampon à faible concentration en sel (10 mM NaCl) avant d'être chargée sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions.

B. Chromatographie échangeuse d'anions

Afin de séparer TFF1 des protéines contaminantes, une chromatographie échangeuse d'anions a été réalisée. Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leurs charges à un pH donné. J'ai observé 3 formes de TFF1 à partir du milieu de culture des cellules MCF7 : les pool 1 (fractions 54 à 57), pool 2 (fractions 60 à 63) et pool 3 (fractions 70 à 73) (Figure 20). Malheureusement, les quantités de protéines obtenues sont très faibles comme on peut le constater sur BC sur lequel on ne voit aucunes bandes correspondant à TFF1.

C. Gel filtration

Vu la faible quantité de TFF1 dans le pool 2 de l'EA estimée par WB, j'ai continué uniquement la purification des pools 1 et 3. Dans le but d'éliminer les protéines contaminantes, j'ai passé ses fractions sur colonne de gel filtration (Sephadex G200). Concernant le pool 1, j'ai d'abord mélangé les fractions 53 à 57, puis je les ai concentrées par ultrafiltration 3K. Les fractions d'élution de la GF ont été analysées par WB uniquement (Figure 21). Le pool 3 constitué de la fraction 71, a été directement injecté dans la colonne de gel filtration. Les fractions d'élutions ont été analysées par WB (Figure 21). Après gel filtration, la quantité de peptide TFF1 obtenue était trop faible pour permettre de l'analyser.

3. Conclusion

Les différentes formes de TFF1 purifiées à partir du milieu de culture MCF7 n'ont pas pu être analysées par spectrométrie de masse faute de quantité suffisante.

Cependant le profil obtenu par WB après échangeuse d'anions suggère la présence de trois formes différentes. En raison des faibles quantités de TFF1 produites, je n'ai pas continué avec le modèle MCF7.

CHAPITRE II : EXPRESSION ET PURIFICATION DE TFF1 DANS LE SYSTEME D'EXPRESSION BACULOVIRUS / CELLULES D'INSECTE

Afin de synthétiser le peptide TFF1 recombinant le plus identique possible à celui retrouvé chez l'homme nous avons choisi au laboratoire de produire TFF1 dans un modèle eucaryote supérieur. Ce modèle, contrairement au système bactérien, est équipé de toute la machinerie nécessaire aux modifications post-traductionnelles telles qu'on les retrouve chez l'homme. Nous avons choisi pour ce faire le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte.

1. Système d'expression baculovirus

Le modèle baculovirus consiste à exprimer un gène d'intérêt, délivré par un baculovirus recombinant, dans les cellules d'insecte. Pour générer le virus recombinant, (Figure 22) le gène d'intérêt est cloné dans un vecteur de transfert qui comprend en 5' de la cassette de clonage la région promotrice d'une protéine baculovirale non-essentielle, la polyhédrine. En 3' de la cassette de clonage est placée la région terminatrice de la polyhédrine. Suite à la co-transfection du vecteur de transfert chargé et de l'ADN viral linéarisé non-infectieux dans les cellules d'insecte, il y a recombinaison homologue entre les deux molécules d'ADN. Ceci induit la formation d'un ADN baculovirus recombinant circulaire et infectieux permettant l'expression du gène d'intérêt dans les cellules infectées. Ce dernier est récupéré dans le surnageant de culture des cellules transfectées.

2. Construction du vecteur de transfert pAcSG2-TFF1

Pour produire TFF1 recombinant dans les cellules d'insectes, l'ADNc codant le peptide TFF1 humain a été intégré dans le vecteur de transfert pAcSG2, sous le contrôle du promoteur viral de la polyhédrine (Figure 23). Après transformation et amplification dans E. Coli sous sélection à l'ampicilline, le vecteur de transfert chargé (pAcSG2-TFF1) a été purifié et séquencé.

3. Production de TFF1 par les cellules d'insecte SF21

La co-transfection ainsi que la production de TFF1 par les cellules d'insecte SF21 a été réalisée en collaboration avec le service baculovirus de l'IGBMC. Dans un premier temps, les cellules d'insecte SF21 ont été co-transfectées en plaque six-puits avec la molécule d'ADN virale du baculovirus linéarisée et pAcSG2-TFF1. Après recombinaison homologue entre l'ADN viral linéaire et le vecteur pAcSG2-TFF1, le virus recombinant BV-TFF1 ainsi formé est produit par les cellules SF21-pAcSG2-TFF1. Dans un deuxième temps, le surnageant de culture contenant le BV-TFF1 a été récolté pour infecter d'autres cellules SF21. Des cellules SF21-TFF1 ont alors été amplifiées jusqu'au volume final de 4 L et cultivées en suspension pendant 72 heures. Après production, le milieu de culture des cellules SF21 contenant la protéine recombinante TFF1 a été récupéré.

4. Purification de TFF1 recombinant

La purification de TFF1 a été réalisée en trois étapes : par filtration tangentielle, par chromatographie échangeuse d'anions et par gel filtration (Figure 24). Toutes ces étapes ont été suivies par analyse des protéines totales au bleu de coomassie (BC) et de TFF1 au moyen de western blot (WB) réalisés avec l'anticorps monoclonal spécifique p28O2.

A. Filtration tangentielle

Afin de réduire le volume de milieu et de l'enrichir en TFF1, j'ai réalisé deux filtrations tangentielles (FT) successives (Figure 25.a et 25.b).

La première FT réalisée avec le filtre de 30 kDa a permis d'éliminer une quantité importante de protéines non spécifiques présentes dans le milieu de culture (Figure 25.c, partie supérieure). Sur BC on voit que le filtrat 30K (F30), qui contient la grande majorité du peptide TFF1, présente peu de protéines contaminantes. L'analyse par WB permet de mettre en évidence la présence de TFF1 dans les deux fractions R30 et F30 (Figure 25.c, partie inférieure). Ceci s'explique par le dispositif expérimental (Figure 25.a) qui est constitué d'un circuit fermé pour la fraction retenue (rétentat). L'analyse par WB du filtrat de la deuxième FT, réalisée avec un filtre 5 K, a permis de diminuer le volume contenant TFF1 d'environ 9 fois (Figure 25.d) et donc de concentrer les protéines dont TFF1 dans cette fraction (Figure 25.c). Après enrichissement du milieu de culture en TFF1 (R5), une dialyse dans un tampon à

faible concentration en sel (10 mM NaCl) était nécessaire (Figure 4.c, fraction R5^{dial}) avant de charger les protéines sur une colonne échangeuse d'anions.

B. Chromatographie échangeuse d'anions

La réalisation d'une chromatographie échangeuse d'anions a permis de purifier TFF1 présent dans la fraction R5^{dial} (Figure 26). Le profil d'élution obtenu présente de nombreux pics d'élutions tout au long du gradient NaCl (10 mM à 500 mM) (Figure 26.a). Pour traquer le peptide TFF1 recombinant, toutes les trois fractions d'élutions ont été analysées par WB (Figure 26.b, partie inférieure). Une analyse de ces mêmes fractions par BC a permis également de visualiser la totalité des protéines contaminantes présentes dans ces fractions (Figure 26.b, partie supérieure). La séparation des protéines en fonction de leur charge a ainsi permis de séparer TFF1 présent dans trois fractions distinctes : pool 1 (fractions 53 à 55), pool 2 (fractions 58 à 61) et pool 3 (fractions 76 à 79) (Figure 26.b). Afin de vérifier la présence de TFF1 sous forme monomérique et dimérique dans ces trois pools, ces fractions ont été analysées sur gel d'acrylamide dans des conditions natives avant révélation par WB (Figure 26.b, partie inférieure).

Les résultats du WB ont confirmé la présence de deux formes de TFF1 (Figure 27). Les fractions du pool 1 et 2 montrent un profil de migration identique caractéristique de la forme monomérique de TFF1, alors que les fractions du pool 3 présentent un profil de migration correspondant au dimère TFF1. La purification de chaque pool a été poursuivie de manière indépendante.

C. Gel filtration

Les trois pools TFF1 présentaient encore de nombreux contaminants. Afin de purifier TFF1, les fractions de chaque pool ont été assemblées puis concentrées par ultrafiltration 3K avant d'être injectées dans une colonne de gel filtration. L'analyse par BC des fractions éluées montre l'obtention de trois formes TFF1 quasiment pures et en quantités importantes (Figure 28.a).

5. Analyse par spectrométrie de masse (ESI-TOF)

Dans le but de déterminer le poids moléculaire de chaque forme purifiée, trois fractions d'élutions de chaque pool ont été analysées par spectrométrie de masse en conditions natives (ESI-TOF, Electrospray Ionization-Time of Flight) (Figure 28.c). Le PM obtenu pour TFF1 issu du pool 1 était de 6787 Da, soit 120 Da de plus que la valeur théorique. Le pool 2 avait un PM de 305 Da supérieur à la valeur théorique. TFF1 issu du pool 3 avait le PM exacte du dimère TFF1, 13333 Da.

6. Analyse des modifications post-traductionnelles de TFF1

Les masses en excès mesurées à partir des pools 1 et 2 ne correspondaient pas à des modifications post-traductionnelles connues telles que les glycosylations, les méthylations, les ubiquitination ou autres. L'absence de dimérisation spontanée des deux formes monomériques (6787 Da et 6972 Da) de TFF1 purifié laissait suggérer une modification affectant la septième cystéine libre de TFF1.

Afin de déterminer si ces modifications impliquaient la septième cystéine libre de TFF1, le produit de digestion de TFF1 par l'AspN (Protéase aspartate N-terminale) a été analysé par spectrométrie de masse. L'AspN est une endoprotéase qui coupe les protéines du côté N-terminal des résidus aspartates. TFF1 contient 3 résidus aspartates, deux aspartates successifs (D35 et D36) compris dans le domaine P et un aspartate individuel dans la partie C-terminale (D51). En théorie, la digestion de TFF1 natif (donc avec maintien des ponts disulfures) digéré par l'AspN génère 3 fragments. Un grand fragment de 5359 Da comprenant le domaine P, un fragment C-terminal de 1313 Da et un « troisième fragment », le résidu aspartate de 133 Da. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse montrent la présence d'un grand fragment de 5492 Da et d'un petit fragment de 1313 Da (Figure 29.a). Ces résultats montrent qu'il n'y a pas eu de libération de résidu aspartate au cours de la digestion,

puisque le grand fragment fait 5492 Da, soit $5359 + 133$ Da du résidu glutamate qui n'a pas été perdu au cours de la digestion. Donc, soit il y a eut une seule coupure au niveau des aspartates D35 et D36 et les deux fragments générés sont restés maintenus via les ponts disulfures, soit il n'y a pas eut de coupure du tout, pour des raisons de gênes stériques. Toutefois, les résultats montrent que, comparé à la valeur théorique, l'excès de masse pour les deux formes de TFF1 6787 Da et 6972 Da, est liée au fragment C-terminal (Figure 29.b).

Afin de déterminer de manière plus précise à quel acide aminé étaient liées les molécules conférant les surcharges aux deux formes de TFF1, nous avons réalisé des expériences de spectrométrie de masse en tandem. Cette technique consiste à sélectionner un ion par une première spectrométrie de masse, à le fragmenter, puis, par une deuxième spectrométrie de masse, les fragments ainsi générés sont séparés et analysés (Figure 30.a). Ceci avait pour but de défragmenter les deux formes de TFF1 de PM 6787 Da et 6972 Da. Les résultats obtenus indiquaient qu'une molécule X de 120 Da était liée sur la septième cystéine de TFF1 de PM 6787 Da et qu'une molécule Y de 305 Da était liée sur la septième cystéine de TFF1 de PM 6972 Da (Figure 30.b). En se basant sur les masses, la molécule de 120 Da pourrait correspondre à un résidu de cystéine (120 Da) et la molécule de 305 Da à un glutathion (305 Da). Ces modifications ne correspondent pas à des modifications post-traductionnelles fonctionnelles connues. Il s'agirait plutôt d'artefacts de production et/ou de purification.

Dans le but de favoriser la formation du dimère TFF1, j'ai essayé d'éliminer ces molécules par addition de doses faibles de DTT (Dithiothréitol) (Figure 31). L'incubation de TFF1 (6787 Da) dans des concentrations croissantes de DTT suivie de dialyses a permis la formation de dimères. Cependant, les quantités de dimères formées restaient trop faibles pour envisager d'en étudier la fonction.

7. Analyse de la fonctionnalité du TFF1 recombinant

La fonctionnalité du peptide TFF1 est habituellement reflétée par sa capacité à augmenter la migration des cellules épithéliales (Buache et al., 2011; Prest et al., 2002) (cf introduction chapitre III 4.B). Au laboratoire, nous avons précédemment montré que les cellules MCF10A sur-exprimant de manière ectopique TFF1 voyaient leur capacité migratoire augmenter. Pour vérifier la fonctionnalité des trois formes de TFF1 obtenues dans les cellules SF21-TFF1 (6787 Da, 6972 Da et 13333 Da), j'ai réalisé des expériences de blessure in vitro sur des cellules épithéliales mammaires normales MCF10A (Figure 32). Ces expériences ont été menées avec les formes monomériques et dimérique à plusieurs reprises de manière indépendantes et à différents temps d'incubation et de concentrations (0,1 µg/ml, 1 µg/ml et 10 µg/ml). Les résultats obtenus témoignent d'une absence d'activité des trois formes de TFF1 (Figure 32). La faible concentration de TFF1 dimérique purifiée (100 µg/ml) n'a pas permis de vérifier sa fonctionnalité à des concentrations appropriées.

8. Purification de TFF1 en présence de quantités faibles de DTT

Afin d'obtenir une quantité plus importante de dimère TFF1 et au vu des dimères obtenus après incubation des deux formes TFF1 monomériques (6787 Da et 6972 Da) avec du DTT (Figure 10.a), j'ai entrepris de mener toute la purification du peptide TFF1 en présence d'une concentration faible en DTT (10 mM). L'idée était d'empêcher la liaison des molécules de 120 Da et 305 Da sur la septième cystéine libre de TFF1. Cependant, le risque de dénaturer les ponts disulfure intra-peptidiques assurant la structure en trèfle subsistait. TFF1 purifié en présence de DTT s'est présenté sous une seule forme de PM 6667 Da, une valeur très proche du PM théorique (6667 Da) du peptide (Figure 33.c). Après purification, j'ai dialysé TFF1 recombinant dans du PBS 1X afin d'éliminer l'agent réducteur. L'analyse par BC en conditions natives de TFF1 avant et après dialyse montrait une dimérisation spontanée complète du peptide en absence de DTT (Figure 33.b).

Afin de vérifier la fonctionnalité du dimère TFF1 ainsi obtenu, j'ai réalisé des expériences de blessures in vitro comme précédemment décrit (Figure 33.d). Ayant obtenu des quantités importantes de dimère, j'ai augmenté la concentration de TFF1 jusqu'à 100 µg/ml de milieu de culture ce qui correspond à la concentration physiologique retrouvée dans le suc gastrique humain. Les résultats présentés correspondent à une migration des cellules pendant 72 heures.

La migration des cellules 24 et 48 heures après blessure était identique dans les trois conditions. Comparé au contrôle négatif, c'est-à-dire à la migration des cellules incubées en présence de PBS 1X, les deux concentrations de TFF1 n'augmentaient pas la capacité migratoire des cellules MCF10A au cours des trois jours suivant la blessure (Figure 33.d).

9. Conclusion

La purification de TFF1 en absence de DTT à partir de milieu de culture de cellules d'insecte SF21-TFF1 a permis d'obtenir trois formes de TFF1 : deux formes monomériques 6787 Da et 6972 Da, et la forme dimérique de PM 13333 Da. Les expériences visant à vérifier la fonctionnalité de TFF1 recombinant ont montré une absence d'activité pour les trois formes purifiées. La faible concentration du dimère TFF1 n'a pas permis de vérifier son activité à des concentrations plus élevées. La purification de TFF1 en présence de DTT a mené à l'obtention d'une seule forme de TFF1 de 6667 Da, le PM attendu, qui s'est dimérisé spontanément après l'élimination de l'agent réducteur. Cependant, ce dernier n'avait aucune activité sur la migration des cellules épithéliales MCF10A.

Le système baculovirus/cellules d'insecte n'est finalement pas approprié pour la production de TFF1 fonctionnel. Cela peut provenir d'une altération de son repliement, TFF1 renfermant 3 ponts disulfures. Nous nous sommes donc tourné vers un autre système d'expression pour obtenir du TFF1 recombinant actif.

CHAPITRE III : EXPRESSION ET PURIFICATION DE TFF1 DANS LE SYSTEME D'EXPRESSION ESCHERICHIA COLI

La présence de ponts disulfures et d'une cystéine libre en C-terminal du peptide TFF1 sécrété dans le milieu extracellulaire rend sa purification difficile. En effet, le milieu de culture constitue un environnement oxydatif favorisant la formation de ponts disulfures. Ceci entraîne la liaison de molécules présentes dans le milieu de culture, telles que des cystéines libres ou du glutathion, sur la cystéine C-terminale de TFF1. Par conséquent, TFF1 purifié dans ces conditions se présente avec un excès de masse (cf Système d'expression baculovirus et MCF7 + E2). De plus, cette liaison aspécifique sur la cystéine impliquée dans l'homodimérisation du peptide explique l'absence de dimères TFF1. Enfin, les monomères TFF1 ayant ces excès de masse ne présentaient aucune activité pro-migratoire sur les cellules épithéliales mammaires au cours des expériences de blessure in vitro.

Pour contrecarrer ces problèmes, il fallait trouver un système permettant la production et la sécrétion de TFF1 dans un milieu oxydant mais dépourvu de molécules pouvant interagir de manière aspécifique avec la cystéine libre de TFF1. L'absence de modifications post-traductionnelles de TFF1 dans le système d'expression eucaryote baculovirus/cellules d'insecte permettait un libre choix concernant le système d'expression à adopter. J'ai donc choisi de produire et de purifier TFF1 recombinant dans le système d'expression bactérien *E. Coli*, bien qu'il soit dépourvu de la capacité à réaliser un certain nombre de modifications post-traductionnelles classiques.

1. Système d'expression et de sécrétion bactérien *E. Coli*

E. Coli est un bacille à GRAM⁻. Les bactéries GRAM⁻ ont la particularité de présenter une structure bi-membranaire délimitant un espace appelé périplasma (Figure 34). C'est dans cet espace que sont sécrétées des protéines et enzymes impliquées dans l'assemblage du peptidoglycane, le constituant majeur de la paroi bactérienne. Le périplasma contient de nombreuses protéines à ponts disulfures dont la réaction d'oxydoréduction est assurée par des complexes enzymatiques (Figure 35). Les protéines périplasmiques possèdent un peptide signal permettant leur exportation du cytoplasme vers le périplasma. L'exportation est un phénomène actif assurée par des complexes protéiques impliqués dans les voies de sécrétion des protéines. On retrouve chez la bactérie *E. Coli* plusieurs types de voies de sécrétion. La voie de sécrétion la plus classique est celle de type II. Cette voie de sécrétion des protéines globulaires solubles du cytoplasme vers le périplasma est assurée par le système Sec, un

complexe sécrétoire constituée de plusieurs protéines. Dès lors que les protéines sont dans le périplasme, elles sont prises en charge par des complexes enzymatiques et des protéines chaperonnes qui vont assurer leur bonne conformation. Les protéines empruntant la voie de sécrétion Sec restent généralement dans le périplasme.

2. Construction du vecteur d'expression bactérien pEZZ18-TFF1

Pour produire TFF1 dans le modèle d'expression bactérien, j'ai cloné l'ADN codant TFF1 sécrété, donc dépourvu du peptide signal de sécrétion de TFF1, dans le vecteur d'expression pEZZ18 (Figure 36). Le vecteur d'expression pEZZ18, permet l'expression de protéines recombinantes et leur sécrétion vers le périplasme grâce au peptide signal de la protéine A de *S. aureus* situé entre le promoteur et la cassette de clonage. De plus, le vecteur est doté de deux domaines à forte affinité pour les immunoglobulines G (IgG) humaines, les domaines Z, issus de la protéine A de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Le vecteur pEZZ18-TFF1 permet donc l'expression de la protéine de fusion ZZ-TFF1 et sa sécrétion dans le périplasme. L'insertion d'une séquence codant le site de clivage spécifique de la protéase Facteur Xa entre les domaines ZZ et TFF1, permet le clivage de la protéine de fusion ZZ-TFF1 et ainsi l'obtention de TFF1 recombinant.

3. Production de TFF1 recombinant par E. Coli

A. Sélection d'un clone E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1

La souche bactérienne E. Coli HB101 a été décrite comme étant la plus adaptée pour la production de protéines sécrétées. La souche bactérienne HB101 compétente a été transformée avec le vecteur d'expression pEZZ18-TFF1 et sélectionnée sous ampicilline. 51 clones ont été repiqués et cultivés en suspension dans du milieu Lysogeny broth 2 fois concentré (LB 2X) pendant 48 heures sous agitation. On constate sur le BC que la fraction périplasmique, obtenue après choc osmotique, présente peu de protéines totales (Figure 37, partie supérieure). L'analyse par WB permet de visualiser les quantités de ZZ-TFF1 (~25k Da) produites par les différents clones. Le clone n°1 présentant la plus forte expression de ZZ-TFF1 a été retenu (Figure 37, partie inférieure).

B. Détermination des conditions optimales de production de ZZ-TFF1

Pour favoriser la synthèse de TFF1, les bactéries HB101 pEZZ18-TFF1 ont été cultivées dans du milieu LB 2X) en suspension à 37°C sous agitation. Afin de déterminer le temps de culture optimal permettant une accumulation importante de ZZ-TFF1 dans le périplasma, j'ai analysé par WB la présence de ZZ-TFF1 dans le milieu de culture, le cytosol et le périplasma après 24, 48 et 72 heures de culture (Figure 38). L'analyse de la fraction cytoplasmique montre une synthèse maximale de ZZ-TFF1 après 48 heures de culture. On voit également une apparition de TFF1 dans le milieu de culture LB2X après 48 heures de production. L'analyse de la fraction périplasmique nous indique un pic d'accumulation maximal de ZZ-TFF1 dans le périplasma à 48 heures de culture qui décroît à 72 heures.

Après avoir sélectionné le meilleur clone bactérien et le temps de production optimal de ZZ-TFF1, j'ai lancé une production de 4 L de bactéries HB101 pEZZ18-TFF1 pendant 48 heures à 37°C.

4. Purification de TFF1 à partir d'E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1

La purification de TFF1 à partir des bactéries HB101 pEZZ18-TFF1 a été réalisée en plusieurs étapes : par chromatographie d'affinité IgG, clivage par le Facteur Xa et gel filtration (Figure 39).

A. Chromatographie d'affinité IgG

Après production de 4 L de culture, les bactéries ont été culotées et la fraction périplasmique extraite par choc osmotique. Pour purifier la protéine de fusion ZZ-TFF1, j'ai réalisé une chromatographie d'affinité IgG (Billes IgG Sépharose). La présence de TFF1 dans les différentes fractions obtenues au cours de cette étape a été analysée par WB et par BC (Figure 40.a). Le BC permet d'apprécier les protéines totales dans le périplasma bactérien. La fraction « effluent IgG » représente la totalité des protéines contaminantes non retenues sur la colonne d'affinité et donc éliminées (Figure 40.a, partie supérieure). On constate également que tout le ZZ-TFF1 présent dans la fraction périplasmique n'a pu être récupéré au cours de cette étape. En effet, la présence de ZZ-TFF1 dans l'effluent IgG ainsi que dans les fractions de lavages TST L1 et L2 (Tris Saline Tween) indiquent une saturation de la colonne IgG en ZZ-TFF1 (Figure 40.a). L'élution à l'acide acétique 500 mM pH 3.4 a permis d'éluer la quasi-totalité de ZZ-TFF1 retenu sur les billes IgG en une seule fraction d'élution (Elution HAc n°1, Figure 40.a). La chromatographie d'affinité IgG m'a permis d'obtenir de la protéine de

fusion ZZ-TFF1 très pure et en quantités importantes. Les volumes et concentrations protéiques obtenues au cours de cette étape sont résumés sur la Figure 40.b.

B. Clivage de la protéine de fusion ZZ-TFF1 par la Facteur Xa

Avant de digérer la protéine de fusion par le Facteur Xa, la fraction d'élution IgG contenant la protéine ZZ-TFF1 a été dialysée dans du tampon de digestion Facteur Xa. Une première digestion sur un petit aliquot de ZZ-TFF1 a été réalisée pour déterminer le meilleur ratio enzyme/substrat. Les digestions réalisées avec les différents ratios ont été analysées par BC et WB (Figure 41). Le ratio 1/8 (1 ng de Facteur Xa pour 8 ng de ZZ-TFF1) permet le meilleur rendement de digestion. La totalité de la protéine de fusion ZZ-TFF1 a ensuite été digérée et l'efficacité de digestion a été analysée par BC et par WB (Figure 25). Comme on peut le voir par BC, la digestion de la protéine de fusion ZZ-TFF1 par le Facteur Xa a été efficace (Figure 41, partie supérieure). Les observations sont confirmées par WB. Comparé à la fraction d'élution IgG (E1^{dial}) avant digestion, la fraction digérée par la Facteur Xa (E1^{FXa}) montre une diminution de la bande correspondant à ZZ-TFF1 (~25 kDa) avec l'apparition des deux bandes correspondant aux monomères (~11 kDa) et dimères TFF1 (~17 kDa) (Figure 41.a, partie inférieure).

C. Gel filtration

Après digestion, le mélange de digestion contenant la protéase Facteur Xa, la protéine ZZ-TFF1 non digérée, le domaine ZZ et le TFF1 recombinant a été séparé par colonne de gel filtration afin de récupérer le peptide TFF1. Le mélange de digestion a d'abord été concentré à l'aide d'un filtre d'ultrafiltration 3K. Le profil d'élution de la gel filtration indiquait deux pics d'élution (fractions 56 à 58 et fractions 64 à 66). J'ai analysé trois fractions correspondant aux pics d'élution par BC et par WB pour la présence de TFF1 (Figure 42). Le BC montre la présence des domaines ZZ et de TFF1 respectivement dans le premier et deuxième pic d'élution. Les bandes à la hauteur du domaine ZZ dans les fractions 64 à 66 correspondent au dimère TFF1 (Figure 42, partie supérieure). Les résultats obtenus par WB montrent la présence de quantités faibles de monomères et de dimères TFF1 ainsi que de protéine de fusion ZZ-TFF1 non digéré dans le premier pic d'élution. Les fractions d'élution 64 à 66 présentent trois bandes distinctes caractéristiques du profil de migration de TFF1 (Figure 42, partie inférieure). Les quantités de TFF1 et de domaine ZZ purifiées sont indiquées dans le tableau (Figure 42.b)

L'analyse des fractions 57 et 65 par spectrométrie de masse a révélé la présence de monomères et de dimères TFF1 mais malheureusement aussi la présence de domaine ZZ contaminant. Le passage du mélange des fractions 56 à 58 sur colonne IgG a permis d'éliminer le domaine ZZ de manière efficace et d'obtenir du TFF1 pure (Figure 43, partie supérieure). J'ai concentré TFF1 par EA. Les résultats obtenus par WB (Figure 43.a, partie inférieure), indiquent qu'il n'y a pas eu de perte de TFF1 au cours du passage à travers la colonne IgG. Cependant, on peut voir une bande comprise entre 11 et 17 kDa qui correspond à une masse inattendue pour TFF1. L'analyse par WB des fractions d'élution d'EA m'a permis de déceler différentes formes de TFF1 dans les fractions 24 à 29 qui ne sont pas visibles sur BC (Figure 43, partie supérieure). Compte tenu de ces différentes formes de TFF1, je n'ai retenu que les fractions 30 à 33. Les quantités de TFF1 et de domaine ZZ obtenues au cours de cette étape sont présentées dans le tableau (Figure 43.b)

D. Analyse de TFF1 recombinant par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse a révélé la présence de TFF1 sous deux formes : TFF1 monomérique présentant un PM correcte de 6667 Da, et TFF1 dimérique présentant un PM correcte de 13333 Da. Le Pic de 5714 Da est du à un artefact de logiciel lors de la déconvolution des charges électriques en masse (Figure 43.c)

5. Analyse de la fonctionnalité du TFF1 recombinant

Afin de vérifier la fonctionnalité du TFF1 recombinant obtenu à partir du système d'expression bactérien, j'ai réalisé des expériences de blessure *in vitro* sur les cellules épithéliales mammaires normales MCF10A. Les résultats de la blessure montrent une augmentation de 70 % de migration des cellules après 24 heures d'incubation en présence de 10 µg/ml de TFF1 recombinant (Figure 44).

6. Production et purification de TFF1 à grande échelle

A. Production de 100 L de culture HB101 pEZZ18-TFF1

Le protocole de production et de purification de TFF1 recombinant dans le système bactérien ayant été validé par la fonctionnalité de TFF1 produit et purifié, j'ai réalisé une production d'E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1 de 100 L dans un fermenteur. La production a été réalisée pendant 48 heures à 37°C sous agitation. Après production, les bactéries ont été culotées par centrifugation à flux continu et stockées à -20°C par lots de 50 gr, correspondant à 10 L de culture.

B. Chromatographie d'affinité IgG Sépharose

Dans un premier temps, j'ai extrait la fraction périplasmique d'un culot de 50 gr de bactéries HB101 pEZZ18-TFF1 que j'ai préparée et chargée sur colonne d'affinité IgG Sépharose. Après les différents lavages de la colonne, j'ai élué la protéine de fusion ZZ-TFF1 dans l'acide acétique. J'ai ensuite analysé les différentes fractions obtenues au cours de cette étape par BC et WB (Figure 45). Le profil d'élution, comprenant les étapes de lavage de la colonne après chargement, indiquait deux pics : un pic très important au cours du lavage de la colonne avec du tampon TST, et un pic au cours de l'élution à l'acide acétique (Figure 45.a). L'analyse par BC montre une grande quantité de protéines de PM variés éluées dans le premier pic et une grande quantité de protéines de PM d'environ 25 kDa correspondant à ZZ-TFF1 éluées dans le deuxième (Figure 45.b). Les quantités de protéines de fusion ZZ-TFF1 sont indiquées dans le tableau (Figure 45.c.).

C. Digestion de ZZ-TFF1 par le Facteur Xa

Les fractions contenant la protéine de fusion ZZ-TFF1 ont été dessalées, via une colonne de dessalage, dans du tampon de digestion du Facteur Xa (Figure 46). La digestion a ensuite été réalisée avec un ratio de masse Facteur Xa/ZZ-TFF1 de 1/8 et analysée par BC et WB.

D. Purification de TFF1 recombinant par chromatographie échangeuse d'anions

Lors de la première purification de TFF1 à partir de la souche HB101 pEZZ18-TFF1, j'ai séparé les différentes protéines présentes dans le mélange de digestion (TFF1, domaine ZZ, Protéase Xa) par gel filtration (cf Figure 47). Du fait d'une mauvaise séparation des différentes protéines ainsi que de la dilution des fractions au cours de la gel filtration, j'ai décidé de procéder à la séparation des différents éléments par chromatographie échangeuse d'ions. J'ai ajusté le pH du mélange de digestion à 4,5 puis j'ai passé le mélange à travers deux échangeuses ioniques successives. Du fait du bas pHi de TFF1, ce dernier est protoné et peut se lier à une échangeuse anionique. Les autres protéines chargées négativement doivent être retenues par la colonne échangeuse de cations branchée directement à la sortie de l'échangeuse anionique (Figure 47.a). Après passage du produit de digestion par le Facteur Xa sur les deux colonnes, ces dernières ont été découplées et j'ai réalisé des éluions indépendantes dans du tampon contenant 500 mM NaCl afin de tout éluer en une fraction pour obtenir de bonnes concentrations protéiques. J'ai ensuite analysé par BC et WB les différentes fractions obtenues (Figure 47.b). Comme on peut le constater sur BC, d'importantes quantités de TFF1 pures ont été éluées dans les fractions d'éluion 7 à 10 de l'échangeuse anionique. De même, d'importantes quantités de protéines Z ont été éluées dans les fractions d'éluion 5 à 9 de l'échangeuse cationique (Figure 47.b, partie supérieure). L'analyse par WB de ces mêmes fractions indique la présence de TFF1 uniquement dans les fractions d'éluion de l'échangeuse anionique (figure 47.b, partie inférieure). Les quantités de protéines purifiées sont résumées dans le tableau (Figure 47.c).

7. Analyse par spectrométrie de masse de TFF1 et du domaine ZZ purifiés

Les fractions d'élutions 7 à 10 de l'échangeuse anionique contenant TFF1 purifié ainsi que la fraction 5 de l'échangeuse cationique contenant le domaine ZZ ont été analysées par spectrométrie de masse. Dans toutes les fractions analysées, TFF1 se présente uniquement sous une forme monomérique de PM de 6800 Da, soit ayant un excès de masse de 133 Da (Figure 48.a, partie supérieure). Le domaine Z quant à lui avait le PM exacte de 14856 Da (Figure 48.a, partie inférieure).

8. Analyse de la fonctionnalité du TFF1 recombinant

Pour tester l'activité du peptide TFF1 recombinant purifié, j'ai réalisé comme précédemment, des expériences de blessures in vitro sur des cellules épithéliales mammaires MCF10A incubées avec des doses croissantes de TFF1 (0,1 à 30 µg/ml). Les résultats obtenus montrent une absence d'activité pro-migratoire de TFF1 sur les MCF10A (Figure 48.b).

9. Conclusion

La première purification de TFF1 dans le système bactérien a permis d'obtenir du TFF1 monomérique et dimérique avec les PM exactes. De plus, TFF1 ainsi produit et purifié présentait une activité pro-migratoire sur les cellules MCF10A lors des expériences de blessures in vitro.

La deuxième production et purification à plus grande échelle n'a pas permis d'obtenir du TFF1 monomérique et dimérique de PM exacte. Une nouvelle forme de TFF1 de PM 6800 Da a été mise en évidence. Cette forme présentant un excès de masse de 133 Da était inactive et ceci même à des concentrations élevées (30 µg/ml). Cet excès de masse pourrait correspondre à un résidu méthionine, à un sucre pentose ou à un atome de césium.

Après lavage de la colonne d'affinité IgG et le remplacement des colonnes échangeuses ioniques, j'ai réalisé une nouvelle purification de TFF1 à partir d'un autre culot de 50 gr de HB101 pEZZ18-TFF1 issu de la même production. Les résultats de spectrométrie de masse obtenus montraient une deuxième fois la présence de TFF1 à 6800 Da soit un excès de masse de 133 Da. Il semblerait donc, que cet excès de masse soit déjà présent sur la protéine de fusion accumulée dans le périplasme de la bactérie.

CHAPITRE IV : ETUDE DE L'HETERODIMERE TFF1-GKN2

En 2005, Westley et al. isolent une forme de TFF1 d'un PM d'environ 25 kDa à partir de mucus gastrique humain. Il s'agit de l'hétérodimère TFF1-GKN2 (Gastrokine 2). La GKN2 est un peptide sécrété dans le suc gastrique dont l'expression est, comme TFF1, diminuée voire absente dans plus de 50% des cancers gastriques humains. Peu d'études ont été menées sur l'hétérodimère TFF1-GKN2. Cependant, une étude menée sur des lignées gastriques suggère un effet inhibiteur TFF1-dépendant de la GKN2 sur la prolifération tumorale gastrique.

J'ai entrepris d'étudier la formation et la fonction de l'hétérodimère *in vitro* dans deux systèmes cellulaires : les cellules épithéliales gastriques cancéreuses AGS et les cellules épithéliales mammaires cancéreuses MCF7. J'ai ensuite co-exprimé les deux protéines dans les cellules d'insecte SF21 en vue d'obtenir de l'hétérodimère TFF1-GKN2 recombinant. L'effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération et la migration des cellules gastriques AGS a été étudié.

1. Profil d'expression des TFFs et des GKNs chez la souris

Les GKNs et les TFFs ont beaucoup de points communs. Les deux familles sont composées de trois membres, TFF1, TFF2 et TFF3 et GKN1, GKN2 et GKN3. Les gènes codant les TFFs et ceux codant les GKNs sont localisés de manière contiguë respectivement sur le bras long du chromosome 21 et sur le bras court du chromosome 2. Les membres des deux familles sont des peptides gastro-intestinaux sécrétés et leur expression est perdue dans plus de 50 % des cancers gastriques (Moss et al., 2008; Yoon et al., 2011). TFF1 et GKN2 contiennent tous les deux dans leur promoteur, des sites de liaison C/EBP- β , GATA6 et HNF3 β . De plus, TFF1 et les gastrokines sont sous le contrôle de la gastrine (Khan et al., 2003). L'expression de TFF1 et de GKN2 est réprimée par les cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β et IL-6 (Baus-Loncar et al., 2007; Dossinger et al., 2002). De plus, des interactions entre les membres des deux familles ont été mises en évidence. Ainsi, chez l'homme, TFF1 interagit directement avec GKN2 via un pont disulfure (Westley et al., 2005) alors que chez la souris, l'homologue de la GKN2, la « blottin » interagit avec TFF2 (Otto et al., 2006). Enfin, un effet inhibiteur TFF1-dépendant de la GKN2 sur la prolifération tumorale gastrique a été suggéré par une étude *in vitro* (Chu et al., 2012)

Malgré toutes ces données, l'interaction TFF1-GKN2 et la fonction de l'hétérodimère ont été très peu étudiées et les mécanismes moléculaires impliqués restent méconnus.

Dans un premier temps, nous avons entrepris d'étudier l'expression des TFFs et des GKNs dans les souris TFF1 KO et sauvages. Le but de cette étude était de vérifier si les deux protéines étaient exprimées par les mêmes tissus et si la délétion de TFF1 avait une répercussion sur l'expression des GKNs, et plus particulier sur la GKN2. Pour cela, des extraits d'ADNc issus de différents tissus murins (2 femelles et 1 mâle par génotype) ont été analysés par PCR pour la présence des TFFs et des GKNs (Figure 49).

Les résultats obtenus avec les souris sauvages confirment une expression des TFFs et des GKNs spécifiquement dans le tractus gastro-intestinal. Les souris TFF1-KO, comme attendu, n'expriment pas TFF1 et le profil d'expression de TFF2 et TFF3 chez ces souris change par rapport à celui observé chez les souris sauvages. En effet, chez les souris TFF1-KO, TFF2 n'est plus exprimé dans les glandes salivaires ni dans le fundus, cependant, il est faiblement exprimé dans le duodénum. Concernant TFF3, celui-ci est exprimé dans le pylore et de manière plus faible dans l'antre chez la souris TFF1-KO alors que son expression dans la souris sauvage est exclusivement intestinale. En ce qui concerne les GKNs leur profil d'expression dans la souris TFF1-KO reste identique à celui retrouvé dans la souris TFF1 sauvage. Que ce soit dans la souris TFF1 sauvage ou KO, l'expression des GKN1 et GKN2 sont exclusivement gastriques, et l'expression de GKN3 est localisée dans l'antre et le pylore.

D'après le profil d'expression des GKNs et des TFFs et plus particulièrement de la GKN2, encore appelée blottin chez la souris, et de TFF1 et TFF2, il ya des possibilités de former des hétérodimères TFF1-GKN2 et TFF2-GKN2.

2. Formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 in vitro

A. Construction du vecteur d'expression pQCXIP-GKN2

Pour étudier l'hétérodimère TFF1-GKN2 humain (Figure 50), j'ai d'abord cloné l'ADNc codant la GKN2 humaine dans le vecteur d'expression rétroviral pQCXIP (Figure 51). D'autre part, afin d'étudier une possible formation d'hétérodimère TFF1-GKN1, j'ai isolé par PCR le gène codant la GKN1, un autre membre de la famille des gastrokines, que j'ai également cloné dans le vecteur d'expression pQCXIP. Les deux vecteurs pQCXIP-GKN1 et pQCXIP-GKN2 ont été amplifiés dans E.Coli, purifiés et validés par séquençage.

B. Co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules gastriques AGS

Les GKNs, tout comme les TFFs, sont des peptides gastriques. J'ai donc choisi d'étudier tout d'abord l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans les cellules AGS, des cellules épithéliales gastriques cancéreuses, n'exprimant pas GKN1, GKN2 et TFF1. Dans le laboratoire, j'avais à disposition deux lignées gastriques AGS stables exprimant TFF1 sauvage ou TFF1 muté (TFF1C58S) de manière doxycycline-dépendante établies avec le vecteur d'expression pUHD172.1 (Figure 52). J'ai donc utilisé ces lignées ainsi que la lignée contrôle AGS/pUHD172.1-*vide* pour établir par transgénèse rétrovirale de nouvelles lignées co-exprimant TFF1 de manière doxycycline-inductible et GKN1 ou GKN2 de manière constitutive. Des lignées ont également été obtenues avec la GKN2 mutée sur la cystéine en position 38 impliquée dans la formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2.

Les différentes lignées obtenues (Figure 53) ont été cultivées pendant 3 jours en présence ou en absence de doxycycline. Le surnageant de culture a ensuite été analysé sur SDS-PAGE Tris-Tricine semi-dénaturant par WB pour la présence de TFF1 sauvage ou muté (TFF1C58S) et de l'hétérodimère TFF1-GKN2 avec l'anticorps p28O2 anti-TFF1 (Figure 54, partie supérieure). Ces mêmes surnageants ont également été analysés pour la présence de la GKN2 sauvage ou mutée et de l'hétérodimère TFF1-GKN2 avec l'anticorps polyclonal anti-GKN2 (ab 70480, abcam) (Figure 54, partie inférieure). Les résultats montrent que l'expression et la sécrétion de TFF1 dans les cellules AGS/pUHD172.1-TFF1 et AGS/pUHD172.1-TFF1C58S ont lieu uniquement en présence de doxycycline (Figure 54, partie supérieure). De même, l'expression de la GKN2 a été mise en évidence uniquement dans les lignées AGS/pQCXIP-GKN2 et AGS/pQCXIP-GKN2C38G (Figure 54, partie inférieure). Ces observations confirment l'absence d'expression de TFF1 et de GKN2 endogènes dans les cellules gastriques AGS. Cependant, aucun hétérodimère TFF1-GKN2 n'a été mis en évidence dans la lignée AGS/pUHD172.1-TFF1/pQCXIP-GKN2, ni avec l'anticorps anti-TFF1, ni avec l'anticorps anti-GKN2 (Figure 54). Des expériences similaires ont été faites pour GKN1. L'expression de GKN1 a été vérifiée par PCR faute d'anticorps (figure non présentée). Aucun hétérodimère TFF1-GKN2 n'a été mis en évidence avec l'anticorps anti-TFF1.

Etant donné que l'hétérodimère TFF1-GKN2 avait été mis en évidence dans le mucus gastrique humain (référence), il était possible que le pH acide soit essentiel à sa formation. En effet, dans l'estomac, le pH varie de 1,5 à 4, un pH inférieur au pHi de TFF1 (4,18) et de la GKN2 (3,94). Ceci pourrait expliquer l'absence d'hétérodimères dans le système cellulaire in vitro qui est utilisé à pH 8.0. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai cultivé les cellules gastriques AGS dans du milieu de culture à pH 3,5 (ajusté avec de l'HCl) pendant 3 jours en présence ou en absence de doxycycline. J'ai ensuite analysé sur SDS-PAGE Tris-Tricine (10-20 %) par WB la présence de TFF1, de GKN2 et de l'hétérodimère TFF1-GKN2 avec les anticorps anti-TFF1 et anti-GKN2 (Figure 55).

Les résultats obtenus à pH 3.5 sont identiques aux résultats obtenus à pH 8.0. L'hétérodimère n'est présent dans aucune des conditions testées. Le pH n'est donc probablement pas la cause de l'absence de formation d'hétérodimère dans le modèle cellulaire gastrique in vitro (Figure 55).

C. Co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules mammaires MCF7

Pour analyser la formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans le contexte du cancer du sein, j'ai établi à l'aide du vecteur pQCXIP-GKN2 (Figure 51) la lignée MCF7/pQCXIP-GKN2 exprimant la GKN2 de manière constitutive. La lignée épithéliale mammaire cancéreuse MCF7 exprime TFF1 endogène en présence d'E2. J'ai cultivé les cellules MCF7/pQCXIP-GKN2 en présence ou en absence d'E2 pendant 3 jours. J'ai ensuite analysé le surnageant de culture sur gel SDS-PAGE Tris-Tricine semi-dénaturant (10 – 20 %) par WB avec les anticorps anti-TFF1 et anti-GKN2 (Figure 56). Les résultats obtenus avec l'anticorps anti-TFF1 indiquent une expression importante de TFF1 en présence d'E2. Cependant, aucune bande correspondant à l'hétérodimère TFF1-GKN2 n'est mise en évidence (Figure 56, partie supérieure). Les résultats obtenus avec l'anticorps anti-GKN2 indiquent une expression forte de GKN2 sauvage et mutée en présence ou en absence d'E2 respectivement dans les lignées MCF7/pQCXIP-GKN2 et MCF7/pQCXIP-GKN2C38G (Figure 56, partie inférieure). On observe une bande pouvant correspondre au dimère GKN2 (36 kDa) dans le milieu de culture de la lignée MCF7/pQCXIP-GKN2 en absence d'E2 et donc de TFF1. De manière plus intéressante, on peut observer la présence d'une bande de faible intensité pouvant correspondre à l'hétérodimère TFF1-GKN2 en présence d'E2 (Figure 56, partie inférieure). Ces deux bandes à 36 kDa et à 25 kDa sont absentes dans les surnageants de culture des

MCF7/pQCXIP-GKN2C38G cultivées en présence ou en absence d'E2 (Figure 56, partie inférieure).

Afin d'augmenter la résolution de la révélation, j'ai cultivé ces mêmes lignées dans du milieu appauvri en sérum (3 %). En effet, dans l'expérience précédente, la présence de beaucoup de sérum (10 %) piège une grande partie des anticorps (Visible sur la figure 55 par exemple). Après 5 jours de culture en présence ou en absence d'E2, j'ai analysé le surnageant de culture des différentes lignées sur gel SDS PAGE Tris-Tricine (10-20 %) par WB avec l'anticorps anti-TFF1 (Figure 57). On constate une expression importante de TFF1 en présence d'E2 mais pas de bande correspondant à l'hétérodimère TFF1-GKN2 (Figure 57, partie supérieure). Cependant, après avoir augmenté le contraste, on voit les bandes correspondant au dimère TFF1, ce qui est rarement visible dans le milieu de culture des MCF7 traitées à l'E2. On voit également une bande de très faible intensité correspondant à TFF1-GKN2 uniquement dans le surnageant des cellules MCF7/pQCXIP-GKN2 cultivées en présence d'E2 (Figure 57, partie inférieure). Il faut néanmoins tenir compte du fait que l'interaction entre TFF1 et GKN2 pourrait être très forte et résister, du moins en partie, à la réduction par le β -mercaptoéthanol dans les conditions décrites. Ceci aurait pour conséquence d'empêcher l'accès des anticorps (p2802 ou anticorps anti-GKN2) à leurs épitopes.

D. Conclusion

Il a été très difficile de mettre en évidence la présence de l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans les systèmes cellulaires AGS et MCF7. Les très faibles quantités d'hétérodimères TFF1-GKN2 observées mettent en doute la spécificité de formation de cet hétérodimère. Cependant, les quantités de protéines produites dans les systèmes cellulaires *in vitro* sont faibles par rapport aux quantités physiologiques présentes dans l'estomac. Il serait donc intéressant de pouvoir avoir de plus grandes quantités de TFF1 et de GKN2 produites par une même cellule afin de vérifier si l'augmentation de la probabilité de rencontre entre les deux molécules pourrait favoriser la formation de l'hétérodimère.

3. Production de TFF1-GKN2 recombinant dans le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte

A. Construction du vecteur de transfert pAcSG2-GKN2 et pAcSG2-GKN2C38G

Pour produire TFF1 et GKN2 en quantités plus importantes par un même système d'expression, j'ai entrepris de produire GKN2 dans le système d'expression baculovirus / cellule d'insectes. Pour cela, j'ai cloné le gène codant la GKN2 dans le vecteur de transfert pAcSG2 sous le contrôle du promoteur viral de la polyhédrine. Après transformation et amplification dans E.Coli sous sélection à l'ampicilline, le vecteur de transfert chargé (pAcSG2-TFF1) a été purifié et séquencé (Figure 58). En parallèle, j'ai aussi cloné la GKN2C38G dans le vecteur de transfert pAcSG2.

B. Co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules d'insecte SF21

Les cellules d'insecte SF21 ont été transfectées avec les différents vecteurs de transferts nécessaires à l'étude de la formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 : pAcSG2-GKN2 sauvage, pAcSG2-GKN2C38G, pAcSG2-TFF1 sauvage, pAc-SG2-TFF1C58S et simultanément avec les deux vecteurs, pAcSG2-TFF1 sauvage et pAcSG2-GKN2 sauvage. Après 72 heures de production dans un volume final de 100 ml / construction, j'ai analysé le milieu de culture pour la présence des différentes protéines produites sur gel SDS-PAGE Tris-Tricine (10-20%) par WB (Figure 59).

Les résultats montrent une expression forte de TFF1 et de GKN2, tant pour les formes sauvages que pour les formes mutées. Il est intéressant de noter que la forme TFF1 C58S ne forme plus de dimères. Dans le système baculovirus, la production GKN2 est supérieure à celle obtenue précédemment dans les cellules AGS (Figure 59). Cependant, la co-expression de TFF1 et GKN2 sauvages par les cellules SF21 ne permet pas l'obtention de l'hétérodimère TFF1-GKN2 (Figure 59).

C. Conclusion

La formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans des systèmes d'expression in vitro s'est avérée peu efficace. Le pH du milieu de culture ne semble pas être la cause de l'absence de formation d'hétérodimères in vitro. Toutefois, le microenvironnement gastrique pourrait intervenir dans la formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 in vivo, ce qui expliquerait l'absence de formation de l'hétérodimère in vitro.

4. Effets de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération et la migration cellulaire

Bien qu'il m'ait été impossible de mettre en évidence la présence de l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans le milieu de culture des lignées gastriques exprimant les deux protéines TFF1 et GKN2, j'ai tout de même étudié l'effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération ainsi que sur la migration des cellules gastriques cancéreuses AGS.

A. Effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération des cellules AGS

J'ai réalisé des expériences de prolifération colorimétriques au MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium]. Les résultats indiquent une prolifération cellulaire identique des cellules AGS en présence de l'expression de TFF1 et GKN2 seules ou combinées (Figure 60). Je n'ai donc pas pu confirmer l'effet inhibiteur TFF1-dépendant de la GKN2 sur la prolifération tumorale gastrique (Chu et al., 2012).

B. Effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la migration des cellules AGS

L'effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la migration des cellules gastriques a été testé sur un modèle de blessure in vitro (Figure 61). Les résultats obtenus montrent une migration identique des cellules AGS exprimant TFF1 et/ou GKN2 seules ou combinés.

C. Conclusion

La co-expression de TFF1 et GKN2 ne semble pas avoir d'effets prolifératifs et/ou migratoires in vitro sur les cellules gastriques. En effet, les deux protéines sont absentes dans environ 50 % des cancers gastriques humains. Elles ont toutes les deux un rôle suppresseur de tumeurs dans l'estomac. In vivo, TFF1 et GKN2 ont été décrites comme ayant des effets anti-prolifératifs sur les cellules gastriques cancéreuses et pro-migratoires sur les cellules gastriques lors d'ulcérations. L'absence d'effet pro-migratoire sur les cellules AGS pourrait s'expliquer par le fait que les cellules AGS sont des cellules gastriques cancéreuses et ne seraient donc pas sensibles au TFF1 et GKN2 du fait de la perte d'expressions de protéines impliquées dans les voies de signalisation de TFF1 et GKN2. Cependant, j'aurais dû observer une diminution de la prolifération des cellules AGS en présence de TFF1 seul. En effet, il a été montré que l'expression de TFF1 inhibait la prolifération des cellules gastriques cancéreuses en retardant le passage de la phase G1 à S (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002).

CONCLUSION/DISCUSSION

Le projet de ma thèse consistait à produire et à purifier du TFF1 humain recombinant dans le but d'étudier sa fonction dans le cancer du sein et dans le cancer gastrique. De manière plus précise, il s'agissait d'étudier les voies de signalisation activées par TFF1 extracellulaire dans l'espoir de mettre en évidence un ou des récepteur(s) spécifique(s) à la surface cellulaire. En effet, plusieurs voies de signalisation ont été proposées au fil du temps, mais le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans la signalisation de TFF1 demeurent inconnus. De plus, les mises en évidence de ces voies de signalisation sont basées pour la plupart, sur des expériences de surexpression de TFF1 et non pas sur l'utilisation de TFF1 exogène. De ce fait, il est impossible de dire avec assurance que les voies de signalisation activées par TFF1 passent par des récepteurs membranaires.

1. Etude de TFF1 recombinant produit dans le système baculovirus/cellules d'insecte

A. Production et purification de TFF1 dans les cellules d'insecte

Mises à part les voies de signalisation et les interactions protéines-protéines de TFF1, nous avons l'intention d'utiliser TFF1 en thérapie en tant que drogue. En effet, le modèle murin déficients pour le gène TFF1 a permis de montrer un rôle de tumeur suppresseur dans l'estomac (Lefebvre et al., 1996). Nous voulions étudier les effets bénéfiques de TFF1 dans l'estomac par traitement des souris TFF1-KO avec du TFF1 purifié, dans le but de diminuer l'apparition des adénomes antro-pyloriques chez ces dernières comparées à des souris TFF1-KO non traitées. Pour ces expériences, il était indispensable de disposer de grandes quantités de TFF1. Nous avons opté au tout début, pour le système le plus fiable, c'est-à-dire celui qui allait nous permettre d'obtenir du TFF1 endogène produit par les cellules MCF7 en présence d'œstradiol. Ce système de production de TFF1 endogène par les cellules mammaires humaines nous affranchissait de tous les problèmes potentiels de clonage ou de modifications post-traductionnelles tout en obtenant du TFF1 tel qu'il est produit et sécrété dans les tumeurs mammaires. Très vite nous nous sommes rendu compte que la purification de TFF1 à partir de milieu complet contenant 10% de FCS rendait la purification impossible et que la diminution du taux de sérum entraînait une diminution de la production de TFF1. De plus, les cellules MCF7 étant des cellules épithéliales, leur culture en flasques était très fastidieuse et encombrante. Nous n'avons pas été en mesure de produire suffisamment de TFF1 endogène

pour l'analyser en spectrométrie de masse. Toutefois, le profil d'éluion de la chromatographie échangeuse d'anions nous a indiqué la présence de trois formes distinctes de TFF1 endogène produit par les cellules MCF7. Nous pouvions à priori expliquer deux de ces formes qui étaient la forme monomérique et dimérique de TFF1 alors que la nature de la troisième forme nous échappait!

Afin d'étudier sa fonction, de plus grandes quantités de TFF1 étaient indispensables. Il fallait donc envisager d'utiliser du TFF1 recombinant. Du TFF1 recombinant produit dans *E. Coli* était disponible dans le commerce. Cependant son prix élevé et son poids moléculaire incorrect (analyse par spectrométrie de masse : 6787 Da au lieu de 6667 Da), l'absence de dimères TFF1 ainsi que l'absence de pyroglutamate en N-terminal nous ont poussé à le produire et purifier nous même. Du TFF1 recombinant avait déjà été obtenu au laboratoire dans *Pichia. pastoris* (*P. pastoris*) (Kannan et al., 2001). Cependant cette forme contient deux acides aminés supplémentaires en N-terminal nécessaires pour sa sécrétion dans ce système. De façon à obtenir un TFF1 recombinant de séquence correcte, nous nous sommes tournés vers le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte. Bien qu'onéreux, ce système de production est équipé d'une machinerie de modifications post-traductionnelles proche de celle retrouvée chez l'homme. Ce système ayant été développé pour la production de protéines recombinantes, il nous a été possible de produire aisément de bonnes quantités de TFF1 recombinant. De manière intéressante, les cellules d'insecte SF-21 produisaient également trois formes distinctes de TFF1. Les résultats obtenus par spectrométrie de masse ont montré du TFF1 à 6787 Da, 6972 Da et 13333Da. Le PM théorique de TFF1 incluant les ponts disulfures dans le domaine P et la formation du pyroglutamate à partir du glutamate en N-terminal est de 6650 Da. Le séquençage de TFF1 recombinant par réaction d'Edman a confirmé la séquence initiale de TFF1 sécrété (E-A-Q) et par conséquent, l'absence de la formation du pyroglutamate en N-terminal. En effet, la présence d'un pyroglutamate en N-terminal bloque la réaction d'Edman. Le PM théorique de TFF1 présentant un glutamate en N-terminal est de 6667 Da. Parmi les trois formes analysées, la forme 13333 Da correspondait donc au dimère et les formes 6787 Da et 6972 Da correspondaient à du TFF1 présentant respectivement des excès de masse de 119 Da et 305 Da. Des analyses par digestion à l'AspN et de spectrométrie de masse en tandem ont permis de montrer une liaison de molécules inconnues de PM 119 et 305 Da sur la septième cystéine libre de TFF1 en C-terminal. Ces résultats expliquaient le faible taux de dimères TFF1. En effet, cette cystéine est impliquée dans la dimérisation de TFF1. D'après les PM, ces deux molécules de 119 Da et 305 Da

pourraient correspondre respectivement à une cystéine et à un glutathion (GSH). On retrouve la cystéine et le GSH respectivement dans le milieu de culture et dans les cellules. La liaison de ces molécules sur la cystéine libre se fait par réaction d'oxydoréduction résultant en la formation d'un pont disulfure entre TFF1 et une cystéine libre ou un GSH. La liaison de cystéine ou de GSH ne sont pas classiquement considérés comme des modifications post-traductionnelles. A priori, compte tenu de la cystéine libre de TFF1 et du milieu oxydatif dans lequel il est sécrété au cours de la production, ces réactions semblent être aspécifiques. Cependant, le GSH a été rapporté comme régulateur de l'activité de certaines protéines (Reuter et al., 2010).

B. Fonctionnalité de TFF1 recombinant sur la restitution/migration.

Pour tester la fonctionnalité de TFF1 recombinant, nous avons opté pour le système de blessure *in vitro* (wound healing). L'effet de TFF1 le plus étudié et le mieux connu est sa capacité à induire la restitution/migration cellulaire après blessure (Amiry et al., 2009; Buache et al., 2011; Prest et al., 2002). De plus, le test de blessure *in vitro* en plaques 24 puits nécessitait peu de peptide recombinant comparé à des expériences de chambres de Boyden. Nous avons choisi de réaliser les tests fonctionnels sur des cellules épithéliales mammaires normales MCF10A suite à des expériences menées au laboratoire. En effet, nous avons précédemment montré que les cellules MCF10A sur-exprimant TFF1 voyaient leur capacité migratoire augmenter (Buache et al., 2011). Lorsque nous avons testé la fonctionnalité des trois formes de TFF1 recombinant produites dans baculovirus nous n'avons détecté aucun effet pro-migratoire. La forme dimérique de TFF1 avait été décrite comme ayant des effets pro-migratoires plus élevés que la forme monomérique (Marchbank et al., 1998; Prest et al., 2002). Pourtant, nous n'avons vu aucun effet pro-migratoire de TFF1 dimère sur les cellules. Ceci pouvait être dû aux faibles concentrations testées. En effet, la majorité de TFF1 recombinant obtenu étant les deux formes monomériques, nous n'avons pas obtenu suffisamment de TFF1 dimérique nous permettant de le tester à de plus fortes concentrations. L'absence d'activité des deux formes monomériques de 6787 Da et 6972 Da était probablement due à la liaison du GSH et de la cystéine sur la septième cystéine libre de TFF1. Ces liaisons empêchaient d'un côté la dimérisation du peptide et d'un autre côté, elles pourraient empêcher la liaison de TFF1 à son récepteur potentiel. De plus, un rôle intracellulaire de TFF1, notamment au niveau de la machinerie du réticulum endoplasmique avait été proposé précédemment (Torres et al., 2002). La fixation du GSH et de la cystéine sur TFF1 pourrait impliquer TFF1 dans l'équilibre du potentiel redox intra-cellulaire.

C. Autre fonction potentielle pour TFF1

Le GSH est un tripeptide intracellulaire composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il existe sous forme réduite (GSH) et sous forme oxydée (GSSG) et il est considéré comme l'antioxydant majeur dans les cellules de mammifères (1 à 10 mM). En effet, en servant de substrat aux enzymes antioxydantes GSH peroxydases et phospholipides hydroperoxydases qui convertissent les peroxydes en acides gras moins toxiques, le GSH protège les cellules contre le stress oxydatif (Takebe et al., 2002). Le GSH peut également assurer la protection de la cellule contre le stress oxydatif de manière enzyme-indépendante par fixation directe des radicaux libres sur son groupement sulfhydryle. Un lien entre stress oxydatif, inflammation et cancer existe (Reuter et al., 2010). De manière très intéressante, le glutathion peut aussi se lier aux protéines par formation de ponts disulfures (Modig, 1968). Près de 30 ans plus tard, Thomas et al introduisent pour la première fois le concept de régulation des protéines par S-glutathionylation en réponse au stress oxydatif (Thomas et al., 1995). Ainsi, la S-glutathionylation du facteur de transcription c-Jun sur la cystéine en position 269 et non sur la cystéine en position 320 abolit son interaction avec l'ADN (Klatt et al., 1999). Cette glutathionylation est dépendante du ratio GSH/GSSG. Ce ratio est important pour le maintien du potentiel redox intracellulaire (Schafer and Buettner, 2001) et est impliqué dans l'activation de plusieurs protéines telles que le protéines activatrices AP-1 et AP-2, c-jun N-terminal kinase (JNK), la protéine kinase activée par le stress (SAPK), la protéine kinase C (PKC) et la tyrosine kinase (Hayes and McLellan, 1999; Janssen et al., 1993).

Suite à ces observations ainsi qu'à la capacité de TFF1 à fixer le glutathion intracellulaire, on peut s'interroger sur une éventuelle régulation de l'activité de TFF1 par le glutathion ou à l'inverse une éventuelle régulation du taux de glutathion intracellulaire par TFF1! Une étude récente a montré l'activation de l'inflammation gastrique NF κ -B-dépendante associée à la perte d'expression de TFF1 chez l'homme et chez la souris (Soutto et al., 2011). Les auteurs ont montré que l'expression ectopique de TFF1 inhibait l'activation TNF- α -dépendante et la translocation de NF κ -B dans le noyau de clones AGS. De manière intéressante, une étude plus ancienne avait démontré que la déplétion en glutathion intracellulaire inhibait l'activation et la translocation de NF κ -B dans le noyau des cellules T (Mihm et al., 1995). L'effet de TFF1 sur l'activation de NF κ -B rapportée par Soutto et al n'est-il pas dû à la diminution du taux de GSH piégé par TFF1 ? De plus, le promoteur de TFF1 possède un élément de réponse à AP-1, composée de l'hétérodimère jun et fos. Or, la

glutathionylation de c-jun empêche son interaction avec l'ADN (Klatt et al., 1999). Ainsi, le glutathion est capable d'inhiber la transcription du gène TFF1. On pourrait donc imaginer un système de régulation du GSH par TFF1 et/ou vice versa.

La perturbation de l'équilibre du couple redox GSH/GSSG peut entraîner un stress oxydatif. Le stress oxydatif est souvent à l'origine de l'inflammation. L'inflammation médiée par le stress oxydatif s'accompagne de l'expression aberrante de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'Il-6, ainsi que de chemokines comme l'IL-8 et le récepteur 4 aux chemokines CXC (CXCR4). L'Il-1 β ainsi que l'Il6 inhibent l'expression de TFF1 (Dossinger et al., 2002). Si TFF1 joue un rôle dans l'équilibre du couple GSH/GSSG dans l'estomac, la diminution de l'expression de TFF1 entraîne davantage une perturbation du couple redox qui ne permettra plus au GSH de contrecarrer le stress oxydatif. Une succession d'évènements liés au déséquilibre du couple GSH/GSSG mènent à l'induction de radicaux libres tels que les oxydes de nitrate qui peuvent entraîner des mutations et être à l'origine de la cancérisation des cellules épithéliales gastriques. En effet, la diminution voire la perte d'expression de TFF1 dans l'estomac s'accompagne de l'expression ectopique de TFF2 et de TFF3. Or, TFF2 et TFF3 stimulent la migration des monocytes (Cook et al., 1999). Des études ont montré que des cellules myéloïdes sont recrutées dans les zones inflammatoires de l'estomac et sécrètent d'avantage de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'IL-1 β (IL-6, TNF α et SDF-1) menant au recrutement de plus de cellules immunitaires amplifiant ainsi l'inflammation (Gonda et al., 2009). De plus, l'activation du récepteur CXCR4 par TFF2 (Dubeykovskaya et al., 2009b) mène à l'expression de gènes impliqués dans le chimiotactisme, recrutant également plus de cellules immunitaires, dans la survie cellulaire et dans la prolifération cellulaire (Teicher and Fricker, 2010). TFF3 de son côté induit l'expression de DAF via l'activation de NF κ -B (Decay acceleration factor) une glycoprotéine plasmatique inhibant l'activation du complément (Andoh et al., 2001). L'activation de NF κ -B par TFF3 induit en parallèle l'expression de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) impliquée dans les processus inflammatoires et la cancérogenèse (Rodrigues et al., 2001, 2003b) et aussi la production de nitrates oxydes (NO) via la NO synthétase NOS2 un médiateur de l'inflammation et de l'angiogenèse. Le iNOs (induced Nitric Oxyde species) peuvent dans le cas d'hypoxie générer des RNS (Reactive Nitrogen Species) qui à forte dose entraînent des mutations génétiques à l'origine de la cancérisation des cellules épithéliales (Poyton et al., 2009).

Le taux de GSH ainsi que de la γ -glutamyl synthase (γ -GCS), une enzyme impliquée dans la synthèse de novo du GSH, sont élevés dans les cancers du sein, du colon, des poumons et du pancréas. Cette augmentation est associée à la résistance des cellules tumorales aux chimio- et radiothérapies via la conjugaison et la détoxification par le glutathion impliquant la glutathion s-transférase (GST) et la pompe GS-X (Glutathion S-conjugate export pump) (Ishikawa, 1992; Midander et al., 1982; Suzuki et al., 2001). L'expression ectopique de TFF1 dans ces cancers pourrait jouer un rôle dans la sensibilisation des cellules aux traitements par chimio- et radiothérapie.

Concernant la cystéine, il n'y a pas d'études mettant en évidence de régulation de l'activité des protéines par liaison de cystéine libre. Cependant, il a été montré que le couple redox cystéine/cystine était également impliqué dans la protection de la cellule contre le stress oxydatif et ceci de manière GSH indépendant (Banjac et al., 2008). La liaison de la cystéine par TFF1 pourrait néanmoins jouer un rôle dans la régulation du GSH puisque la disponibilité de la cystéine est le facteur limitant dans la synthèse du glutathion (Bannai and Tateishi, 1986). D'ailleurs, le couple cystine/cystéine, comme le GSH/GSSG, joue un rôle antioxydant dans les cancers (Venè et al., 2011).

D. Importance du pyroglutamate en N-terminal de TFF1

La réaction d'Edman a permis de vérifier les trois premiers acides aminés de TFF1 recombinant produit dans le système baculovirus/cellules d'insecte, montrant aussi l'absence de cyclisation en N-terminal de TFF1. Or, le pyroglutamate en N-terminal pourrait jouer un rôle important dans la fonctionnalité de TFF1. TFF1 purifié à partir du suc gastrique humain contrairement à TFF1 exprimé par les cellules mammaires MCF7, présentait un pyroglutamate en N-terminal (Rio et al., 1988b). Il a été montré que l'affinité de certaines protéines pour leur récepteur était dépendante de la présence de pyroglutamate en N-terminal. Tel est le cas pour la TRH (Tyrotropin releasing hormone) ainsi que pour la chemokine MCP-2 (Monocyte chemotactic protein 2) qui nécessitent la présence d'un pyroglutamate en N terminal afin de lier leur récepteur respectifs, TRH-R et CCR5 (Blaszczyk et al., 2000; Perlman et al., 1994). La formation du pyroglutamate à partir de glutamate N-terminal est une modification post-traductionnelle assurée par la glutamyl cyclase (Schilling et al., 2004). L'absence de pyroglutamate en N-terminal de TFF1 recombinant produit dans baculovirus pourrait être à l'origine de l'absence d'activité sur le modèle de blessure in vitro.

2. Production, purification et fonction de TFF1 produit dans E. Coli

Le système baculovirus/cellules d'insecte a permis de montrer que TFF1 ne subissait pas de modifications post-traductionnelles classiques dans un système de production eucaryote. Cependant, ce système n'ayant pas permis de produire du TFF1 recombinant fonctionnel, j'ai décidé de produire du TFF1 dans le système d'expression bactérien E. Coli.

TFF1 recombinant produit et purifié dans E. Coli se présentait sous les formes monomériques et dimériques avec des PMs exactes de respectivement 6667 Da et 13333 Da. La modification post-traductionnelle du glutamate N-terminal en pyroglutamate était absente. Cependant, le peptide présentait une activité pro-migratoire dans le modèle de blessure in vitro. La migration des cellules MCF10A était augmentée d'environ 40% en présence de TFF1 recombinant (mélange de monomères et de dimères). Ces résultats montrent que l'activité pro-migratoire du peptide n'était pas abolie par l'absence de formation de pyroglutamate en N-terminal. Toutefois, cette dernière pourrait être plus élevée en présence de pyroglutamate.

Lors de la production de TFF1 à grande échelle (100 L de bactéries HB101 pEZZ18-TFF1), TFF1 obtenu avait de nouveau un PM incorrecte (6800 Da). Cet excès de 133 Da par rapport au PM théorique de 6667 Da pourrait correspondre à plusieurs molécules : un césium, une méthionine ou un pentose. La probabilité qu'une de ces trois molécules ait été liée à TFF1 est très faible. Le césium n'est présent dans aucune étape de production ou de purification de TFF1. Bien qu'il soit utilisé dans la maintenance du spectromètre de masse, il était peu probable qu'il se fixe sur TFF1 au cours de son analyse. La méthionine est un acide aminé présent dans le milieu de culture et dans les bactéries. Cependant, nous n'expliquons pas de quelle manière elle pourrait se lier à TFF1. Il en est de même pour le pentose, bien que présent dans les nucléotides, il n'y a pas d'explications pour une éventuelle liaison à TFF1 au cours de sa production. Il reste une autre explication qui est probablement plus plausible c'est-à-dire, la fixation d'un groupe de molécules qui ensemble ont un PM de 133 Da. Vu l'absence de dimères TFF1, ces molécules pourraient être liées à la cystéine libre en C-terminal de TFF1 empêchant ainsi sa dimérisation. Pour une raison que nous ignorons, il ne nous a pas été possible de produire TFF1 fonctionnel à grande échelle.

3. Etude de l'hétérodimère TFF1-GKN2

La découverte de l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans le mucus gastrique par Westley et al en 2005 a suscité beaucoup d'intérêt. Cependant, très peu d'études ont été menées sur la fonction de cet hétérodimère. Beaucoup de similitudes existent entre les TFFs et les GKNs (cf chapitre profil d'expression des TFFs et des GKNs chez la souris). Une étude fonctionnelle a suggéré un effet inhibiteur TFF1-dépendant de la GKN2 sur la prolifération tumorale gastrique (Chu et al., 2012). Cela nous a conduit à analyser le profil d'expression des TFFs et des GKNs dans le modèle murin TFF1-KO et dans la souris sauvage.

A. Profil d'expression des TFFs et GKNs in vivo chez la souris

Il est important de noter que chez la souris, l'homologue de la GKN2, la blottin forme un hétérodimère avec TFF2 (Otto et al., 2006). Les résultats obtenus chez la souris sauvage montrent que l'expression des trois membres de la famille des GKNs est presque exclusivement gastrique et coïncide avec l'expression de TFF1 et de TFF2. Cependant, ces résultats ne donnent pas d'indications sur la nature des cellules exprimant TFF1 ou GKN2. L'expression des GKN2 chez la souris TFF1-KO n'est pas altérée. Enfin, les gastrokines sont exprimées dans l'estomac, alors que TFF3 est exprimé de manière ectopique dans l'estomac des souris TFF1-KO. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas à priori d'inter-régulation entre les TFFs et les GKNs.

B. Formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 dans un système in vitro

Afin d'étudier la formation de l'hétérodimère in vitro, des cellules gastriques AGS exprimant TFF1 de manière doxycycline-dépendante et GKN2 de manière constitutive ont été établies. L'hétérodimère TFF1-GKN2 se formant par liaison disulfure entre la cystéine 58 de TFF1 et la cystéine 38 de GKN2, des cellules exprimant les mutants TFF1C58S et GKN2C38G ont été établies en parallèle. Une éventuelle interaction entre GKN1 et TFF1 a été également étudiée. L'analyse du milieu de culture des cellules exprimant à la fois TFF1 sauvage et GKN2 sauvage sur gel semi-dénaturant à l'aide d'anticorps anti-TFF1 et anti GKN2 n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'hétérodimères. L'étude de la formation d'hétérodimères sur les cellules mammaires MCF7 exprimant la GKN2 de manière ectopique en présence d'œstradiol a permis de révéler très difficilement à l'aide de l'anticorps anti-TFF1 la présence de l'hétérodimère TFF1-GKN2. De manière intéressante, il a été possible de détecter des homodimères TFF1 et GKN2 dans le surnageant des cellules

MCF7/GKN2 cultivées respectivement en présence et en absence d'œstradiol. L'interaction entre ces deux peptides nous a donc semblé peu spécifique étant donné la faible quantité d'hétérodimère TFF1-GKN2 obtenue comparé aux quantités d'homodimères TFF1 obtenus. L'hétérodimère TFF1-GKN2 a été mis en évidence in vivo dans le mucus gastrique (Westley et al., 2005). Or dans l'estomac, le pH est inférieur au pHi de TFF1 et de la GKN2. Afin de favoriser la formation de l'hétérodimère, les cellules AGS exprimant TFF1 et GKN2 ont alors été cultivées à pH 3.5. Cependant la diminution du pH en dessous des pHi de TFF1 et de la GKN2 n'a pas favorisé la formation du dimère par les cellules AGS.

Afin d'augmenter les quantités de TFF1 et de GKN2, nous avons co-exprimé TFF1 et GKN2 dans les cellules d'insecte SF21 dans le système baculovirus. De manière très surprenante, nous avons constaté que l'expression de TFF1 était très faible dans les cellules SF21 co-exprimant les deux peptides comparées à celles n'exprimant que TFF1. L'expression de la GKN2 co-exprimée avec TFF1 était semblable à celle exprimée seule. L'analyse du surnageant des cellules SF21 co-exprimant TFF1 et GKN2 sur SDS-PAGE semi-dénaturant n'a pas permis de mettre en évidence la présence de l'hétérodimère.

La formation de l'hétérodimère in vivo est probablement facilitée par la présence de facteurs absents dans un système in vitro. En effet, TFF1 est co-sécrété dans la lumière gastrique avec des mucines. Une grande partie de TFF1 ainsi sécrété va interagir avec les mucines et rester piégé dans le mucus gastrique alors qu'une autre partie de TFF1 est sécrétée dans le suc gastrique. La GKN2 est également sécrétée dans la lumière gastrique et passe par le mucus où se trouve TFF1 lié aux mucines. La formation de l'hétérodimère TFF1-GKN2 pourrait ainsi se faire au niveau du mucus gastrique par rapprochement des deux peptides à un pH favorable à leur interaction.

Afin de vérifier l'effet inhibiteur TFF1-dépendant de la GKN2 sur la prolifération tumorale gastrique suggérée par Chu et al, nous avons entrepris d'étudier la prolifération et la migration des cellules gastriques cancéreuses AGS co-exprimant TFF1 et GKN2, ou exprimant TFF1 et/ou GKN2 seul. Les résultats indiquaient une courbe de prolifération semblable entre des cellules exprimant TFF1 ou GKN2 seul ou combinés. De même, aucune différence dans la migration des cellules AGS exprimant TFF1 et/ou GKN2 seuls ou combinés n'a été observé. L'absence d'un quelconque effet de la co-expression de TFF1 et GKN2 sur la prolifération ou la migration pourrait être dû au modèle cellulaire utilisé. En effet, Chu et al ont montré un effet inhibiteur TFF1-dépendant de la GKN2 sur la prolifération cellulaire des cellules gastriques SGC-7901. Or ces cellules expriment TFF1 endogène. Il est

donc probable que les AGS aient perdu l'expression de protéines impliquées dans la ou les voie(s) de signalisation activée(s) par l'hétérodimère.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

La production de TFF1 recombinant natif s'est avérée beaucoup plus difficile que prévue. Seul le système bactérien a permis d'obtenir du TFF1 recombinant fonctionnel. Cependant, la production à grande échelle en vue d'avoir de grandes quantités de TFF1 pour étudier les voies de signalisation ou pour l'utiliser comme drogue thérapeutique dans le modèle murin TFF1-KO a échoué. Pour avoir assez de TFF1 recombinant, il est nécessaire de le produire en une succession de petites productions jusqu'à obtention de quantités suffisantes.

Il serait très intéressant de pouvoir obtenir du TFF1 possédant un pyroglutamate en N-terminal. En effet, pour certaines protéines la présence du pyroglutamate en N-terminal augmente considérablement l'affinité pour leur récepteur. Pour favoriser la formation du pyroglutamate N-terminal de TFF1 au cours de la production, il serait utile de co-transfecter un vecteur exprimant la glutaminyl cyclase et le vecteur pEZZ-18-TFF1 dans E. Coli. Une analyse par réaction d'Edman et par spectrométrie de masse permettrait par la suite de vérifier la présence du pyroglutamate. Il serait intéressant d'étudier alors l'activité de TFF1 sur la migration cellulaire avec ou sans le pyroglutamate en N-terminal et de déterminer si cette modification accroît les effets pro-migratoires de TFF1 dans les cellules épithéliales gastriques et mammaires.

Concernant l'étude d'une éventuelle implication de TFF1 dans le potentiel redox intracellulaire, il serait intéressant de doser les taux de GSH dans des cellules exprimant de manière ectopique TFF1 sauvage pouvant lier le GSH ou TFF1C58S incapable de lier le GSH. Si une diminution du GSH est observée, ceci signifierait que le couple redox GSH/GSSG assurant le potentiel redox intracellulaire serait perturbé. Cette perturbation pourrait être à l'origine de l'activation de plusieurs voies de signalisations menant à la prolifération, à la migration, à la différenciation ou à la morphogenèse cellulaire. Dans la même ligne d'idées, il serait intéressant de vérifier la sensibilité de lignées cellulaires cancéreuses résistantes aux chimiothérapies ou radiothérapies exprimant ou pas TFF1 sauvage et/ou TFF1C58S de manière ectopique. Une sensibilisation des cellules cancéreuses aux chimiothérapies ou radiothérapies pourrait contribuer à la compréhension de l'expression ectopique de TFF1 dans certains cancers et métastases. Il serait également intéressant de réaliser les mêmes expériences avec TFF3 puisque lors de la production de TFF3 dans *Saccharomyces cerevisiae*, la cystéine libre de TFF3 en position 57 est elle aussi liée à une

cystéine ou à un glutathion (Thim et al., 1995). TFF3 pourrait donc également jouer un rôle intracellulaire dans le contrôle du potentiel redox.

L'étude de la fonction de l'hétérodimère TFF1-GKN2 est limitée par sa faible formation dans un système cellulaire *in vitro*. La présence de mucines est peut-être nécessaire à la formation de l'hétérodimère. Il faudrait essayer de produire les deux peptides dans des cellules gastriques représentant au mieux la muqueuse gastrique telles que les cellules gastriques humaines HGE-17 et HGE-20 (Human gastric epithelial cells) (Chailier and Ménard, 2005). Ces cellules présentent des caractéristiques épithéliales le plus proches de l'épithélium gastrique humain et s'avèrent un bon modèle pour étudier la restitution cellulaire.

Proposition d'article

Les résultats de cette thèse ne sont pas encore publiés mais un article est en cours de préparation :

Baculovirus-produced recombinant human TFF1: nature and function

David Simoes, Adrien Rousseau, Fabrice Klein, Franck Ruffenach, Fabien Alpy, Catherine Tomasetto and Marie-Christine Rio*

* :corresponding author

Soumission prévue dans la revue « peptides »

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Construction des vecteurs

A. Système d'expression baculovirus/cellules d'insecte

Les vecteurs de transferts pAcSG2-TFF1 et pAcSG2-TFF1C58S avaient été précédemment construits au laboratoire. Les vecteurs d'expression pAcSG2-GKN2 et pAcSG2-GKN2C38G ont été construits à partir de produits de PCR. Les ADNc codant la GKN2 sauvage et la GKN2C38G humaines nous ont été gracieusement fournis par le Dr Treve Menheniott, qui travaille au « Murdoch Childrens Research Institute » en Australie sur les GKNs et leur fonction dans les cancers gastriques. Les ADNc GKN2 sauvage et muté ont été amplifiés par PCR comme avec les primers sens comprenant le site de restriction Sall (en gras et souligné) ainsi que la séquence consensus kozak (en rouge) précédant l'ATG codant la première méthionine du peptide signal de GKN2 sauvage et/ou mutée et antisens comprenant le site de restriction NotI (en gras et souligné).

Primers GKN2 sauvage et mutée (C38G) :

sens 5' -GAGA **GTCGACGCCACC**ATGAAAATACTTGTGGCATTCTG- 3'

antisens 5' -GAGA **GCGGCCGC**TTACTAAACATGAATGTCTGCACAGATTGA-3'

Réaction PCR :

98°C 15''		1 X
60°C 10''		
72°C 15''		
98°C 10''		24 X
60°C 10''		
72°C 30''		

Les ADNc GKN2 sauvage et muté digérés par Sall en 5' et NotI en 3' ont été clonés dans le vecteur de transfert pAcSG2 préalablement digéré par les enzymes de restriction XhoI et NotI. Après ligation (1 heure à 16°C), le mélange de ligation a été digéré par l'enzyme de restriction XhoI (sabotage). Après sabotage, les vecteurs de transferts pAcSG2-GKN2 et pAcSG2-GKN2C38G ont été amplifiés dans E. Coli DH5 α .

B. Système d'expression cellulaire (MCF7 et AGS)

Pour cloner l'ADNc GKN1 humain dans le vecteur d'expression rétroviral pQCXIP, une RT-PCR sur un extrait d'ARN messagers d'estomac humain sain a été réalisée grâce au kit de retro-transcription SuperScript® Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Les vecteurs d'expression rétroviraux pQCXIP-GKN2 et pQCXIP-GKN2C38G ont été construits à partir de l'ADNc de la GKN2 sauvage et/ou mutée (C38G) amplifié par PCR. Les ADNc GKN1 sauvage et GKN2 sauvage ou muté ont été amplifiés par PCR avec les primers sens comprenant le site de restriction NotI (en gras et souligné) ainsi que la séquence consensus kozak (en rouge) précédant l'ATG codant la première méthionine et le primer antisens comprenant le site de restriction BglII (en gras et souligné) dans du tampon PCR.

Primers GKN1 sauvage :

sens : 5' -GAGAGCGGCCGC**GCCACC**ATGCTTGCCTACTCCTCTGTCCAC-3'

anti-sens : 5' - GAGAAGATCTTTACTAGTTCTCCACCGTGTCTCCACAGAA-3'

Primers GKN2 sauvage ou mutée (C38G)

sens : 5'-GAGAGCGGCCGC**GCCACC**ATGAAAATACTTGTGGCATTCTCTG-3'

antisens : 5' -GAGAAGATCTTTACTAAACATGAATGTCTGCACAGATTGA-3'

Réaction PCR :

98°C 15''	1 X
60°C 10''	
72°C 15''	
98°C 10''	24 X
60°C 10''	
72°C 30''	

Après amplification PCR, les ADNc GKN2 sauvage et muté digérés par NotI en 5' et BglII en 3' ont été clonés dans le vecteur d'expression rétroviral pQCXIP préalablement digéré par les enzymes de restriction NotI et BamHI. Après ligation (1 heure à 16°C), le mélange a été digéré par l'enzyme de restriction BamHI (sabotage). Après sabotage, les vecteurs de transfert pQCXIP-GKN1, pQCXIP-GKN2 et pQCXIP-GKN2C38G ont été amplifiés dans les bactéries thermo-compétentes E. Coli DH5α.

C. Système d'expression bactérien (HB101 pEZZ18-TFF1)

Le vecteur d'expression bactérien nous a été gracieusement fourni par le Dr Gabriel Monteiro de l'IBB (Institute for Biotechnology and Bioengineering, Lisbonne). L'ADNc codant TFF1 sauvage et muté (C58S) sécrété a été obtenu par PCR réalisée sur le vecteur d'expression pQCXIP avec les primers sens comprenant le site de restriction EcoRI (en gras et souligné) suivi de la séquence codant le site de clivage de la protéase Facteur X1 (en bleu) avant le premier triplet codant l'acide glutamique N-terminal de TFF1 sécrété et les primers antisens comprenant deux codons stop (en rouge) ocre (TAA) et opale (TGA) suivi du site de restriction XbaI (en gras et souligné).

Primers TFF1 sauvage

sens : 5' -GCGAATTCGATCGAAGGGCGTGAGGCCCCAGACAGAGACG-3'

antisens : 5' -GCTCTAGATCATTAAATTCACACTCCTCTTCTGC-3'

Primers TFF1C58S

sens : 5' -GCGAATTCGATCGAAGGGCGTGAGGCCCCAGACAGAGACG-3'

antisens : 5' -GCTCTAGATCATTAAATTCACACTCCTCTTCTGC-3'

Après amplification PCR, les ADNc codant TFF1 sécrété sauvage et muté, digérés par EcoRI en 5' et XbaI en 3', ont été clonés dans le vecteur d'expression bactérien pEZZ18 préalablement digéré par les enzymes de restriction EcoRI et XbaI. Après ligation (1 heure à 16°C), le mélange a été amplifié dans E. Coli DH5 α .

2. Amplification, purification et séquençage des vecteurs

Tous les vecteurs construits (pAcSG2, pQCXIP et pEZZ18) ont été amplifiés dans E.Coli DH5 α . Pour cela, les bactéries E. Coli DH5 α thermo-compétentes ont été transformées par choc thermique à dans un tampon KCM (KCl 0.5 M/CaCl₂ 0.15 M/MgCl₂ 0.25 M) : 30 μ l de produit de ligation, 20 μ l de KCM 5X, 50 μ l d'H₂Omq et 100 μ l de bactéries compétentes. Incubation 20' dans la glace puis 10' à température ambiante. Après transformation, les bactéries ont été régénérées 40' dans du milieu LB sans antibiotique à 37°C avant d'être étalées sur boîte de Pétri dans de l'agar contenant de l'ampicilline. Après 16 heures de sélection 10 à 20 clones ont été prélevés et resuspendus dans 5ml de LB 1X contenant de l'ampicilline avant d'être incubés pendant 16 heures à 37°C sous agitation. Une extraction de vecteur à partir de 2 ml de culture de chaque clone a été réalisée dans le but de l'analyser après digestion sur gel d'agarose.

Les clones ayant présenté un profil de digestion correcte ont alors été amplifiés dans 100 ml de milieu LB pendant 16 heures à 37°C sous agitation. Après amplification, l'ADN plasmidique a été extrait et purifié à l'aide du kit d'extraction NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel).

Tous les vecteurs construits ont été séquencés par la société GATC Biotech et analysés à l'aide du logiciel «Gentle» avant utilisation.

3. Etablissement de pools de cellules par vecteurs rétroviraux

Les lignées cellulaires gastriques AGS/pUHD172.1-TFF1, et AGS/pUHD172.1-TFF1C58S étaient disponibles au laboratoire (Bossenmeyer-Pourié et al., 2002). Les cellules AGS/pUHD172.1-TFF1/pQCXIP-Ø (contrôle, vecteur vide), AGS/pUHD172.1-TFF1/pQCXIP-GKN1, AGS/pUHD172.1-TFF1/pQCXIP-GKN2 et AGS/pUHD172.1-TFF1/pQCXIP-GKN2C38G ainsi que les cellules mammaires MCF7/pQCXIP-GKN2 et MCF7/pQCXIP-GKN2C38G ont été établies par infection rétrovirale. Les rétrovirus ont été générés dans les cellules 293T par co-transfection des vecteurs pQCXIP-GKN1, pQCXIP-GKN2 sauvage ou pQCXIP-GKN2C38G avec le vecteur pCL-Ampho (Imaginex, San Diego, CA, USA) à l'aide du réactif de transfection Fugene 6 (Fugene 6 Reagent, Roche, Mannheim, Germany). Les particules virales produites et sécrétées par les cellules 293T ont été récupérées après 48 heures. Après infection avec les particules virales (10 µg/ml polybrène, 20 mM acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-yl]éthane sulfonique), les cellules ont été sélectionnées dans leur milieu adéquat (American type culture collection) contenant l'antibiotique de sélection (puromycine 0,5 µg/ml, ou blasticidine 4 µg/ml).

4. Production de TFF1 recombinant

A. Production de TFF1 dans les cellules d'insecte SF21

La production de TFF1 par les cellules d'insecte SF21 a été réalisée en collaboration avec le service Baculovirus de l'IGBMC. La production des particules baculo-virales recombinantes ainsi que la production des protéines recombinantes par les cellules d'insecte SF21 ont été réalisés en suivant le protocole BD BaculoGold™ Baculovirus Expression System (BD, Biosciences).

B. Production de TFF1 dans les cellules mammaires cancéreuses MCF7

Les cellules MCF7 ont été amplifiées dans leur milieu adéquat (American Type Culture Collection) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS) contenant de l'oestradiol à 10 mM. La production de TFF1 par les cellules MCF7 confluentes à 80% a été réalisée dans leur milieu adéquat contenant 0,5 % de FCS et 10 mM d'oestradiol pendant 72 heures à 37°C, 5% CO₂. Le milieu de culture contenant TFF1 endogène sécrété a été centrifugé 2 fois à 2000 rpm puis filtré par unité de filtration Stericup 0,22 µm (Stericup® Filter Units, Merck Millipore) avant utilisation.

C. Production de TFF1 dans E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1

La souche E. Coli HB101 thermo-compétente a été transformée avec le vecteur d'expression constitutive bactérien pEZZ18-TFF1 (comme décrit plus haut). Après transformation, les cellules ont été cultivées dans du milieu LB 2 fois concentré pendant 48 heures à 37°C sous agitation. Après production, les cellules ont été culotées par centrifugation (4000 rpm, 20') puis lavées 2 fois dans du tampon NaCl 150 mM (4000 rpm, 20'). Le culot bactérien a ensuite été congelé à -20°C avant utilisation.

La fraction périplasmique contenant TFF1 recombinant produit par E. Coli HB101 pEZZ18-TFF1 a été obtenue par choc osmotique. Les bactéries ont été resuspendues dans du tampon de choc osmotique (0,1 mM MgCl₂, 60ml de tampon / 500 ml de culture bactérienne) et incubées sous agitation pendant 20' à température ambiante. Les débris bactérien ont été éliminés par centrifugation (8000 rpm, 30'). La fraction périplasmique a ensuite été filtrée par unité de filtration Stéricup 0,45 µm (Stericup® Filter Units, Merck Millipore) avant utilisation.

5. Purification de TFF1 recombinant

A. Filtration tangentielle (FT)

La FT a été réalisée par passage du milieu contenant TFF1 à l'aide d'une pompe péristaltique à travers une unité de filtration tangentielle (Prep/Scale™-TFF ft1, Millipore). Deux FT ont été réalisées successivement. Une première FT par une unité de filtration 30 kDa résultant en deux fractions, le filtrat 30K et le rétentat 30K), et une deuxième filtration tangentielle du filtrat 30 K par une unité de filtration 5K. Le rétentat 5K obtenu a ensuite été dialysé dans du tampon sodium potassium à faible concentration en sel (10 mM K₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM NaCl, pH8.0).

B. Concentrations par ultrafiltration

La concentration des protéines a été réalisée à l'aide d'unités d'ultrafiltration Amicon 3 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Merck-Millipore). Avant concentration, les unités de filtrations ont été préalablement lavées au PBS 1X à 3000 rpm pendant 15 min. Les protéines ont ensuite été ultra-filtrées par cycles de 5' à 3000 rpm avec resuspension du rétentat par pipetage up and down. Ceci a été répété jusqu'à obtention du volume voulu.

C. Dialyses

Toutes les dialyses ont été réalisées dans un tube de dialyse (Spectra/Por® Dialysis Membrane, MWCO :1,000, SpectrumLabs) de manière à diluer les sels 10^9 fois. Toutes les fractions ont été dialysées à 4°C sous agitation pendant au moins 4 heures. Une fois dialysées, les fractions ont été centrifugées (8000 rpm, 30') pour éliminer les protéines pouvant avoir précipitées.

D. Chromatographie échangeuse ionique

a. Séparation des protéines en fonction de leur charge

Les protéines destinées à être séparées en fonction de leur charge par chromatographie échangeuse d'anions (HiTrap® monoQ, Sigma-Aldrich) ont été préalablement dialysées dans du tampon à faible concentration en sel (10 mM K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, pH8.0). Les protéines ont été chargées sur colonne échangeuse d'anions à un débit de 1ml/min à 4°C. Après chargement des protéines, la colonne a été lavée avec 5 volumes colonne de tampon à faible concentration en sel à 1ml/min. L'éluion des protéines a été réalisée grâce à l'application d'un gradient croissant en sel (10 mM à 500 mM) par mélange des tampons à faible concentration en sel et à forte concentration en sel (10 mM K_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 1 M NaCl, pH 8.0) sur 10 volumes colonne à 1 ml/min. Une application de 2,5 volumes colonnes de tampon à forte concentration en sel a ensuite permis de décrocher les protéines non éluées au cours du gradient. La colonne a été ré-équilibrée dans du tampon à faible concentration en sel après chaque purification. Les fractions d'éluions (1ml) récoltées après échangeuse anionique ont ensuite été analysées sur gel d'électrophorèse par bleu de coomassie et par western blot.

b. Séparation du produit de digestion par le Factor Xa et concentration de TFF1

Après digestion de la protéine de fusion ZZ-TFF1 produite dans E. Coli, TFF1 compris dans le mélange de digestion a été purifié et concentré par chromatographie échangeuse d'anions. Le mélange de digestion a été dilué 10x dans du tampon acide acétique sans sel (10 mM, pH 3,5) avant d'être chargé sur un dispositif comprenant une colonne échangeuse anionique Q15 (Sartobind® Q15, Sigma-Aldrich) couplée sur une colonne échangeuse cationique S15 (Sartobind® S15, Sigma-Aldrich) à 5 ml/min à 4°C. Après chargement, les colonnes ont été lavées et éluées indépendamment avec respectivement 20 ml de tampon acide acétique sans sel (10 mM, pH 3,5) et 50 ml de tampon acide acétique 10 mM, NaCl 500 mM, pH 3,5 à un débit de 5ml/min. Les fractions (0,5 ml) éluées par

échangeuse anionique et cationique ont ensuite été analysées sur gel d'électrophorèse par bleu de coomassie et par western blot.

E. Chromatographie d'exclusion

Les protéines ont été purifiées en fonction de leur taille sur chromatographie d'exclusion (Sephades G200, GE Healthcare). Le volume maximal injecté sur colonne de gel filtration était de 4 ml et la séparation des protéines a été réalisée à 1ml/min à 4°C dans du tampon PBS 1X. Un aliquot des fractions d'élutions de 1 ml issu de la chromatographie d'exclusion a été analysé par bleu de coomassie et par western blot.

F. Chromatographie d'affinité IgG Sépharose IgG Sépharose

Avant chaque utilisation, la colonne d'affinité IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE healthcare) a été équilibrée avec deux passages successifs de tampon 0,5 M acide acétique, pH 3,4 suivi de tampon TST (Tris-saline-tween : 50 mM Tris-Hcl à pH 7,6, 150 mM NaCl).

Après chargement de la colonne d'affinité avec la fraction protéique à purifier, la colonne était lavée avec 10 volumes colonnes de tampon TST pour éliminer les protéines non liées ou liées de manière aspécifique. Un lavage par la suite avec deux volumes colonnes de tampon 5 mM acétate d'ammonium à pH5.0 permettait de diminuer le pH et d'éliminer le NaCl. L'élution de la protéine d'intérêt (ZZ-TFF1) a été réalisée avec le passage de tampon 0,5 M acide acétique à pH 3,4 dans la colonne.

Toutes les étapes (équilibrage, chargement, lavage et élution) de chromatographie d'affinité ont été réalisées à 4°C à un débit de 1ml/min. Les fractions d'élutions étaient de 1ml.

G. Dessalage

Le dessalage des échantillons a été réalisé à 4°C dans une colonne de dessalage (HIPREP 26/10 DESALTING).à un débit de 5 ml/min. Les fractions d'élutions de 1ml ont suite été analysés par WB et BC.

6. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode BCA (BiCinchonic acid Assay, Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermofischer Scientific). Il s'agit d'une méthode de dosage colorimétrique des protéines ayant réduit l'ion Cu^{2+} en Cu^{1+} qui réagit avec l'acide biCinchonique formant un complexe pourpre absorbant à 562nm. L'absorbance a été dosée au nanodrop.

7. Analyse des protéines

A. Préparation des échantillons

Les échantillons issus des différentes étapes de purification ont été analysés purs ou dilués dans du PBS 1X. Avant dépôt sur gel SDS-PAGE dénaturant, les échantillons ont été additionnés de tampon de charge Bleu/SDS (0,05M Tris-HCl pH 6,8 ; 10 % glycérol, bleu de bromophénol, 2 % de SDS, 1,4M de β -mercaptoéthanol) et bouillis pendant 4'. Les échantillons destinés à être analysés sur SDS-PAGE semi-dénaturant ont été additionnés de tampon de charge sans β -mercaptoéthanol et n'ont pas été chauffés. Les échantillons destinés à être analysés sur PAGE natif ont été additionnés de tampon de charge (50 % glycérol, 0,1M Tris-HCl pH 6,8, bleu de bromophénol) et n'ont pas été chauffés.

B. Gels d'électrophorèse polyacrylamide (PAGE)

a. SDS-PAGE dénaturant et semi-dénaturant

Les gels SDS-PAGE dénaturants et semi-dénaturants sont de même composition mais diffèrent de par la préparation des échantillons déposés et du traitement après migration.

Les gels SDS-PAGE dénaturants sont chargés avec les fractions protéiques préalablement préparées dans du tampon de charge contenant du β -mercaptoéthanol et chauffées. Après migration, les protéines sont directement transférées sur membrane nitrocellulose.

Les gels SDS-PAGE semi-dénaturants sont chargés avec les fractions protéiques préalablement préparées dans du tampon de charge sans β -mercaptoéthanol et non-chauffées. Après migration, le gel SDS-PAGE est incubé dans une solution contenant du β -mercaptoéthanol (10% glycérol, 2 % SDS, 2 % β -mercaptoéthanol) afin de réduire les ponts disulfures des homodimères TFF1 ou hétérodimères TFF1-GKN2 et de libérer l'épitope de

l'anticorps monoclonal anti-TFF1 p28O2. Après réduction des ponts disulfures, les protéines sont électro-transférées classiquement sur membrane de nitrocellulose.

- SDS-PAGE 10 %

Gel de concentration : 4,8 % acrylamide/bisacrylamide 40/1 ; 0,375M Tris-HCl pH 6,8 ; 0,1 % SDS ; 0,005% APS (Ammonium persulfate); 0,2 % (v/v) TEMED (Tétraméthyléthylènediamine).

Gel de séparation : 10 % acrylamide/ bisacrylamide 40/1 ; 0,375M Tris-HCl pH 8,8 ; 0,1 % SDS ; 0,005 % APS ; 0,2 % (v/v) TEMED.

Tampon de migration : 20 mM Tris-base ; 0,2 M Glycine ; 0,1 % SDS , pH 8,3

- SDS-PAGE Tris-Tricine (10-20 %)

Gel de concentration : 4,8 % acrylamide/bisacrylamide 40/1 ; 0,375M Tris-HCl pH 8,45 ; 0,1 % SDS ; 0,01 % APS ; 0,2% (v/v) TEMED.

Gel de séparation : gradient 10-20 % acrylamide/ bisacrylamide 40/1 ; 0,1 M Tris-HCl pH 8,45; 0,1 % SDS ; 10 % glycérol ; 0,005 % APS ; 0,2 % (v/v) TEMED.

Tampon de migration :

Cathode : 0,1 M Tris-base ; 0,1 M Tricine ; 0,1 % SDS

Anode : 0,2 M Tris-Hcl, pH 8,9

b. PAGE natif 20%

Gel de concentration : 10 % acrylamide/bisacrylamide 40/1 ; 0,125 M Tris-Hcl, pH 6,8 ; 10 % glycérol ; 0,04 % APS ; 0,004 % TEMED.

Gel de séparation : 20 % acrylamide/bisacrylamide 40/1 ; 0,375 M Tris-Hcl, pH 8,9 ; 10 % glycérol ; 0,04 % APS ; 0,008 % TEMED.

Tampon de migration : 0,05 M Tris-base ; 0,28 M Glycine, pH 8,9.

C. Western Blot

Après électrophorèse, les protéines ont été transférées pendant une heure à 100 Volts sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell) dans du tampon de transfert (0,02 M Tris-base ; 0,1 M glycine ; 20% éthanol. L'efficacité de transfert a été vérifiée au rouge ponceau (0,1 % de Ponceau S dans 5% acide acétique).

La saturation des sites aspécifiques a été réalisé par incubation de la membrane de nitrocellulose dans du PBS 1X contenant 5 % de lait écrémé pendant une heure à température ambiante.

L'incubation des anticorps primaires (anticorps p28O2 anti-TFF1, anticorps ab70480 anti-GKN2) a été réalisée dans une solution PBS 1X, 1 % lait écrémé sous agitation pendant une heure à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C.

Après 3 lavages de 10' dans du PBS-tween (PBS 1X, 0,1 % tween 20), les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dirigé contre l'anticorps primaire pendant 1 heure dans une solution PBS 1X, 1 % lait écrémé sous agitation pendant une heure à température ambiante.

Après 3 lavages successifs de 10' dans du PBS-tween (PBS 1X, 0,1 % tween 20), les protéines d'intérêt ont été révélées par un système de chimio-luminescence par ECL® (Amersham Pharmacia Biotech) et détectées à 428 nm par l'ImageQuant LAS-4000.

D. Bleu de coomassie

Après migration des protéines sur gel PAGE, les gels ont été incubés au minimum pendant 2 heures dans une solution de bleu de coomassie (0,25 % de bleu de Coomassie, 50 % éthanol absolu, 10 % acide acétique glacial) sous agitation à température ambiante. Les protéines ont ensuite été révélées par incubation du gel PAGE dans une solution de décoloration (70 % éthanol absolu, 7 % acide acétique) sous agitation à température ambiante.

8. Blessures in vitro

A. Test de fonctionnalité du TFF1 recombinant

Les cellules épithéliales mammaires MCF10A ont été cultivées dans leur milieu adéquat (American Type Culture Collection) dans des plaques 24 puits jusqu'à atteindre une confluence d'environ 80%. Elles ont ensuite été sevrées de sérum 24 heures avant induction de la blessure. La blessure a été réalisée à l'aide d'un cône de pipette P200. Après blessure, les cellules ont été lavées dans du PBS 1X et les blessures à T0 ont été prises en photo à la lumière blanche à l'aide d'un microscope inversé (3 photos par puits ; 3 puits par condition), avant d'être incubées en présence ou en absence de protéine recombinante TFF1 pendant 24, 48 ou 72 heures à 37°C, 5 % CO₂.

Deux manières différentes pour marquer les cellules avant acquisition des photos :

a. *Marquage des cellules à la calcéine-AM (Calcéine Acétoxy-méthyle)*

Après restitution, les cellules ont été incubées 30 min dans du milieu de culture contenant 10 μ M de calcéine-AM. Les cellules sont ensuite excitées à 490nm et des photos des cellules sont prises à 520 nm l'aide d'un microscope inversé.

b. *Marquage des noyau au Hoechst :*

Les cellules ont alors été fixées au PFA 4% pendant 10 minutes à température ambiante puis lavées dans du PBS 1X et imperméabilisées dans du PBS 1X-triton 0,01 % pendant 10 min. Enfin, les cellules ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution contenant du Hoechst afin de marquer leur noyau et finalement lavées au PBS 1X.

Les cellules ont ensuite été excitées aux UV et quatre photos par puits (3 puits par condition) ont été acquises à l'aide d'un microscope inversé. Le nombre de cellules ayant migré dans la zone de blessure a ensuite été quantifié à l'aide du logiciel ImageJ.

B. Effet de l'hétérodimère TFF1-GKN2 sur la migration cellulaire.

Les expériences de restitution ont été réalisées comme expliqué ci-dessus. Les cellules gastriques ont poussées jusqu'à confluence dans leur milieu adéquat appauvri en FCS (1 % de FCS). Avant induction de la blessure, le milieu de culture conditionné a été gardé et les cellules ont été incubées avec ce même milieu pendant le temps de restitution.

9. Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire des cellules gastriques a été étudiée dans des plaques 96 puits. 1000 cellules par puits (6 puits par condition) ont été cultivées en présence ou en absence de doxycycline pendant 24, 48 et 72 heures. La viabilité des cellules, reflétant le nombre de cellules, a été mesurée toutes les 24 heures par dosage colorimétrique au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). La DO a été mesurée à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

10. Expression des TFFs et des GKNs chez la souris

Après dissection et récupération des tissus, ceux-ci ont été broyés et l'ARNm en a été extrait en suivant le protocole du kit d'extraction d'ARN NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel). Une RT-PCR sur chaque extrait d'ARN messagers a été réalisée grâce au kit de retro-transcription SuperScript® Reverse Transcriptase (Invitrogen).

L'expression des TFFs et des GKNs dans les différents tissus a été analysée par PCR avec les primers suivants :

TFF1

sens : 5' - GTCCTCATGCTGGCCTTC - 3'
anti-sens : 5' - TCTCTCCGTGCACTGCTG - 3'

TFF2

sens : 5' - TAGAGGGCGAGAAACCTTCC - 3'
anti-sens : 5' - TGACACACTGCTCCGATTCT - 3'

TFF3

sens : 5' - CATCGGAGCAGTGTAACAACC - 3'
anti-sens : 5' - GATCGGGGATGCTTGCTAC - 3'

GKN1

sens : 5' - GCCTGATCCTCTGCTCCAC - 3'
anti-sens : 5' - TCTCGTGGCAGCGAAACT - 3'

GKN2

sens : 5' - GCAAAATGAAACCCCTCGT - 3'
anti-sens : 5' - TGATGACGTAACAGGCTCTCC - 3'

GKN3

sens : 5' - TGGAGAGAGACAACATGAGACG - 3'
anti-sens : 5' - TAGCTGCCAGGAGGTCGT - 3'

Réaction PCR :	98°C 15''		1 X
	60°C 10''		
	72°C 15''		
	98°C 10''		24 X
	60°C 10''		
	72°C 30''		

Les produits de PCR ont été analysés sur gel agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (BET) et révélés aux UV.

11. Analyses des protéines par spectrométrie de masse

L'analyse des protéines recombinantes par spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec le service de spectrométrie de masse de l'IGBMC. Avant analyse, les échantillons étaient préalablement dialysés dans un tampon 150 mM acétate d'ammonium. La technique de spectrométrie de masse utilisée était l'ESI-TOF natif (ElectroSpray Ionization – Time Of Flight) qui permettait une analyse du peptide TFF1 en conditions natives.

12. Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante. Les différences statistiques ont été évaluées par le test de student (t -test) ou par le test du Chi-2 (χ^2 -test). Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Afssaps (2004). [Up-to-date clarification on the menopause hormonal substitutive treatment (HRT) December 2003]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 32, 571–575; discussion 569–570.

Ahmed, A.R.H., Griffiths, A.B., Tilby, M.T., Westley, B.R., and May, F.E.B. (2012). TFF3 is a normal breast epithelial protein and is associated with differentiated phenotype in early breast cancer but predisposes to invasion and metastasis in advanced disease. *Am. J. Pathol.* 180, 904–916.

Al-azze E, Dittrich, O., Vervoorts, J., Blin, N., Gött, P., and Lüscher, B. (2002). Gastroprotective peptide trefoil factor family 2 gene is activated by upstream stimulating factor but not by c-Myc in gastrointestinal cancer cells. *Gut* 51, 685–690.

Al-azze E D, Fegert, P., Blin, N., and Gött, P. (2000). Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim. Biophys. Acta* 1490, 324–332.

Amiry, N., Kong, X., Muniraj, N., Kannan, N., Grandison, P.M., Lin, J., Yang, Y., Vouyovitch, C.M., Borges, S., Perry, J.K., et al. (2009). Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology* 150, 4473–4483.

Andoh, A., Kinoshita, K., Rosenberg, I., and Podolsky, D.K. (2001). Intestinal trefoil factor induces decay-accelerating factor expression and enhances the protective activities against complement activation in intestinal epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 3887–3893.

Antoniou, A.C., and Easton, D.F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25, 5898–5905.

Arteaga, C.L., Sliwkowski, M.X., Osborne, C.K., Perez, E.A., Puglisi, F., and Gianni, L. (2012). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 16–32.

Babyatsky, M.W., deBeaumont, M., Thim, L., and Podolsky, D.K. (1996). Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 110, 489–497.

Balcer-Kubiczek, E.K., Harrison, G.H., Xu, J.-F., and Gutierrez, P.L. (2002). Coordinate late expression of trefoil peptide genes (pS2/TFF1 and ITF/TFF3) in human breast, colon, and gastric tumor cells exposed to X-rays. *Mol. Cancer Ther.* 1, 405–415.

Bane, A.L., Beck, J.C., Bleiweiss, I., Buys, S.S., Catalano, E., Daly, M.B., Giles, G., Godwin, A.K., Hibshoosh, H., Hopper, J.L., et al. (2007). BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 121–128.

Banjac, A., Perisic, T., Sato, H., Seiler, A., Bannai, S., Weiss, N., Kölle, P., Tschöep, K., Issels, R.D., Daniel, P.T., et al. (2008). The cystine/cysteine cycle: a redox cycle regulating susceptibility versus resistance to cell death. *Oncogene* 27, 1618–1628.

- Bannai, S., and Tateishi, N. (1986). Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J. Membr. Biol.* 89, 1–8.
- Baus-Loncar, M., and Giraud, A.S. (2005). Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* 62, 2921–2931.
- Baus-Loncar, M., Lubka, M., Pusch, C.M., Otto, W.R., Poulosom, R., and Blin, N. (2007). Cytokine regulation of the trefoil factor family binding protein GKN2 (GDDR/TFIZ1/blottin) in human gastrointestinal epithelial cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 20, 193–204.
- Beck, S., Sommer, P., dos Santos Silva, E., Blin, N., and Gött, P. (1999). Hepatocyte nuclear factor 3 (winged helix domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATAA box. *Dna Cell Biol.* 18, 157–164.
- Beckler, A.D., Roche, J.K., Harper, J.C., Petroni, G., Frierson, H.F., Jr, Moskaluk, C.A., El-Rifai, W., and Powell, S.M. (2003). Decreased abundance of trefoil factor 1 transcript in the majority of gastric carcinomas. *Cancer* 98, 2184–2191.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Dépidémiologie Santé Publique* 56, 159–175.
- Benson, J.R., and Jatoi, I. (2012). The global breast cancer burden. *Future Oncol. Lond. Engl.* 8, 697–702.
- Berrington de González, A., Mahesh, M., Kim, K.-P., Bhargavan, M., Lewis, R., Mettler, F., and Land, C. (2009). Projected cancer risks from computed tomographic scans performed in the United States in 2007. *Arch. Intern. Med.* 169, 2071–2077.
- Bevier, M., Sundquist, K., and Hemminki, K. (2012). Risk of breast cancer in families of multiple affected women and men. *Breast Cancer Res. Treat.* 132, 723–728.
- Blaszczyk, J., Coillie, E.V., Proost, P., Damme, J.V., Opdenakker, G., Bujacz, G.D., Wang, J.M., and Ji, X. (2000). Complete crystal structure of monocyte chemotactic protein-2, a CC chemokine that interacts with multiple receptors. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 14075–14081.
- BLOOM, H.J., and RICHARDSON, W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer* 11, 359–377.
- Borthwick, J.M., Charnock-Jones, D.S., Tom, B.D., Hull, M.L., Teirney, R., Phillips, S.C., and Smith, S.K. (2003). Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 19–33.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689.
- Bossenmeyer-Pourrié, C., Kannan, R., Ribieras, S., Wendling, C., Stoll, I., Thim, L., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2002). The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J. Cell Biol.* 157, 761–770.

- Brinton, L.A., Sahasrabudhe, V.V., and Scoccia, B. (2012). Fertility drugs and the risk of breast and gynecologic cancers. *Semin. Reprod. Med.* 30, 131–145.
- Brown, A.M., Jeltsch, J.M., Roberts, M., and Chambon, P. (1984). Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 6344–6348.
- Buache, E., Etique, N., Alpy, F., Stoll, I., Muckensturm, M., Reina-San-Martin, B., Chenard, M.P., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2011). Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene* 30, 3261–3273.
- Bui, K.T., Wakefield, C.E., Kasparian, N.A., Tyler, J., Abbott, J., and Tucker, K. (2013). Oral contraceptive use in women at increased risk of breast/ovarian cancer: knowledge and attitudes. *Psychooncology*. 22, 228–232.
- Bulitta, C.J., Fleming, J.V., Raychowdhury, R., Taupin, D., Rosenberg, I., and Wang, T.C. (2002). Autoinduction of the trefoil factor 2 (TFF2) promoter requires an upstream cis-acting element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 366–374.
- Buron, N., Guery, L., Creuzot-Garcher, C., Lafontaine, P.-O., Bron, A., Rio, M.-C., and Solary, E. (2008). Trefoil factor TFF1-induced protection of conjunctival cells from apoptosis at premitochondrial and postmitochondrial levels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3790–3798.
- Burstein, H.J. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N. Engl. J. Med.* 353, 1652–1654.
- Carmichael, A., Sami, A.S., and Dixon, J.M. (2003). Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* 29, 475–479.
- Carvalho, R., Kayademir, T., Soares, P., Canedo, P., Sousa, S., Oliveira, C., Leistenschneider, P., Seruca, R., Gött, P., Blin, N., et al. (2002). Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 82, 1319–1326.
- Chadwick, M.P., Westley, B.R., and May, F.E. (1997). Homodimerization and hetero-oligomerization of the single-domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine 58. *Biochem. J.* 327 (Pt 1), 117–123.
- Chailer, P., and Ménard, D. (2005). Establishment of human gastric epithelial (HGE) cell lines exhibiting barrier function, progenitor, and prezymogenic characteristics. *J. Cell. Physiol.* 202, 263–274.
- Chen, Y., Chen, C., Yang, B., Xu, Q., Wu, F., Liu, F., Ye, X., Meng, X., Mougin, B., Liu, G., et al. (2011). Estrogen receptor-related genes as an important panel of predictors for breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Lett.* 302, 63–68.
- Chinery, R., and Cox, H.M. (1995). Immunoprecipitation and characterization of a binding protein specific for the peptide, intestinal trefoil factor. *Peptides* 16, 749–755.

- Chu, G., Qi, S., Yang, G., Dou, K., Du, J., and Lu, Z. (2012). Gastrointestinal tract specific gene GDDR inhibits the progression of gastric cancer in a TFF1 dependent manner. *Mol. Cell. Biochem.* *359*, 369–374.
- Clyne, M., Dillon, P., Daly, S., O’Kennedy, R., May, F.E.B., Westley, B.R., and Drumm, B. (2004). *Helicobacter pylori* interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7409–7414.
- Collier, J.D., Bennett, M.K., Bassendine, M.F., and Lendrum, R. (1995). Immunolocalization of pS2, a putative growth factor, in pancreatic carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 396–400.
- Colombo, P.-E., Milanezi, F., Weigelt, B., and Reis-Filho, J.S. (2011). Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast Cancer Res. Bcr* *13*, 212.
- Cook, G.A., Yeomans, N.D., and Giraud, A.S. (1997). Temporal expression of trefoil peptides in the TGF- α knockout mouse after gastric ulceration. *Am. J. Physiol.* *272*, G1540–1549.
- Cook, G.A., Thim, L., Yeomans, N.D., and Giraud, A.S. (1998). Oral human spasmolytic polypeptide protects against aspirin-induced gastric injury in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 363–370.
- Cook, G.A., Familiar, M., Thim, L., and Giraud, A.S. (1999). The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *Febs Lett.* *456*, 155–159.
- Coyle, Y.M. (2009). Lifestyle, genes, and cancer. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* *472*, 25–56.
- Cristofanilli, M., and Mendelsohn, J. (2006). Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for “tailored” therapy? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17073–17074.
- Curado, M.P. (2011). Breast cancer in the world: incidence and mortality. *Salud Pública México* *53*, 372–384.
- Devine, D.A., High, A.S., Owen, P.J., Poulsom, R., and Bonass, W.A. (2000). Trefoil factor expression in normal and diseased human salivary glands. *Hum. Pathol.* *31*, 509–515.
- Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* *412*, 822–826.
- Dhar, D.K., Wang, T.C., Tabara, H., Tonomoto, Y., Maruyama, R., Tachibana, M., Kubota, H., and Nagasue, N. (2005). Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 6472–6478.
- Doane, A.S., Danso, M., Lal, P., Donaton, M., Zhang, L., Hudis, C., and Gerald, W.L. (2006). An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* *25*, 3994–4008.

- Dogan, L., Kalaylioglu, Z., Karaman, N., Ozaslan, C., Atalay, C., and Altinok, M. (2011). Relationships between epidemiological features and tumor characteristics of breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. Apjcp* 12, 3375–3380.
- Dossinger, V., Kayademir, T., Blin, N., and Gött, P. (2002). Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 12, 197–206.
- Dubeykovskaya, Z., Dubeykovskiy, A., Solal-Cohen, J., and Wang, T.C. (2009a). Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 284, 3650–3662.
- Dubeykovskaya, Z., Dubeykovskiy, A., Solal-Cohen, J., and Wang, T.C. (2009b). Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 284, 3650–3662.
- Dumitrescu, R.G., and Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med.* 9, 208–221.
- Dunnwald, L.K., Rossing, M.A., and Li, C.I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Bcr* 9, R6.
- Earp, H.S., 3rd, Calvo, B.F., and Sartor, C.I. (2003). The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 114, 315–333; discussion 333–334.
- Ebert, M.P., Hoffmann, J., Haeckel, C., Rutkowski, K., Schmid, R.M., Wagner, M., Adler, G., Schulz, H.U., Roessner, A., Hoffmann, W., et al. (1999). Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* 45, 105–111.
- Efstathiou, J.A., Noda, M., Rowan, A., Dixon, C., Chinery, R., Jawhari, A., Hattori, T., Wright, N.A., Bodmer, W.F., and Pignatelli, M. (1998). Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3122–3127.
- Elia, G., Chinery, R., Hanby, A.M., Poulson, R., and Wright, N.A. (1994). The production and characterization of a new monoclonal antibody to the trefoil peptide human spasmolytic polypeptide. *Histochem. J.* 26, 644–647.
- Emami, S., Rodrigues, S., Rodrigue, C.M., Le Floch, N., Rivat, C., Attoub, S., Bruyneel, E., and Gespach, C. (2004). Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 25, 885–898.
- Engel, P., Fagherazzi, G., Boutten, A., Dupré, T., Mesrine, S., Boutron-Ruault, M.-C., and Clavel-Chapelon, F. (2010). Serum 25(OH) vitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 19, 2341–2350.
- Farrell, J.J., Taupin, D., Koh, T.J., Chen, D., Zhao, C.-M., Podolsky, D.K., and Wang, T.C. (2002). TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J. Clin. Invest.* 109, 193–204.

- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.
- Foekens, J.A., Portengen, H., Look, M.P., van Putten, W.L., Thirion, B., Bontenbal, M., and Klijn, J.G. (1994). Relationship of PS2 with response to tamoxifen therapy in patients with recurrent breast cancer. *Br. J. Cancer* 70, 1217–1223.
- Foulkes, W.D., Stefansson, I.M., Chappuis, P.O., Bégin, L.R., Goffin, J.R., Wong, N., Trudel, M., and Akslen, L.A. (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1482–1485.
- Frandsen, E.K., Jørgensen, K.H., and Thim, L. (1986). Receptor binding of pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP) in rat intestinal mucosal cell membranes inhibits the adenylate cyclase activity. *Regul. Pept.* 16, 291–297.
- Furuta, G.T., Turner, J.R., Taylor, C.T., Hershberg, R.M., Comerford, K., Narravula, S., Podolsky, D.K., and Colgan, S.P. (2001). Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J. Exp. Med.* 193, 1027–1034.
- Ge, Y., Zhang, J., Cao, J., Wu, Q., Sun, L., Guo, L., and Wang, Z. (2012). TFF1 inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells in vitro. *Bosn. J. Basic Med. Sci. Udruženje Basičnih Med. Znan. Assoc. Basic Med. Sci.* 12, 74–81.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. Esmo* 22, 1736–1747.
- Gonda, T.A., Tu, S., and Wang, T.C. (2009). Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2005–2013.
- Gött, P., Beck, S., Machado, J.C., Carneiro, F., Schmitt, H., and Blin, N. (1996). Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur. J. Hum. Genet. Ejhg* 4, 308–315.
- Graness, A., Chwieralski, C.E., Reinhold, D., Thim, L., and Hoffmann, W. (2002). Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J. Biol. Chem.* 277, 18440–18446.
- Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Wolff, A.C., Mangu, P.B., and Temin, S. (2010). American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Oncol. Pr. Am. Soc. Clin. Oncol.* 6, 195–197.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hayes, J.D., and McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300.

- Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H., Inaji, H., Nakamori, S., and Tateishi, R. (1994). Prognostic significance of pS2 protein expression in pulmonary adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 30A, 792–797.
- Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokuchi, H., Inaji, H., and Tateishi, R. (1996). Estimation of serum level of pS2 protein in patients with lung adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 16, 2351–2355.
- Hong, Z., Tian, C., and Zhang, X. (2012). Dietary calcium intake, vitamin D levels, and breast cancer risk: a dose-response analysis of observational studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 136, 309–312.
- Iatrakis, G., Iavazzo, C., Zervoudis, S., Koumousidis, A., Sofoudis, C., Kalampokas, T., and Salakos, N. (2011). The role of oral contraception use in the occurrence of breast cancer. A retrospective study of 405 patients. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 38, 225–227.
- Impicciatore, G.G., and Tiboni, G.M. (2011). Ovulation inducing agents and cancer risk: review of literature. *Curr. Drug Saf.* 6, 250–258.
- Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17, 463–468.
- Itoh, H., Tomita, M., Uchino, H., Kobayashi, T., Kataoka, H., Sekiya, R., and Nawa, Y. (1996). cDNA cloning of rat pS2 peptide and expression of trefoil peptides in acetic acid-induced colitis. *Biochem. J.* 318 (Pt 3), 939–944.
- Itoh, H., Inoue, N., and Podolsky, D.K. (1999). Goblet-cell-specific transcription of mouse intestinal trefoil factor gene results from collaboration of complex series of positive and negative regulatory elements. *Biochem. J.* 341 (Pt 2), 461–472.
- Iwakiri, D., and Podolsky, D.K. (2001). Keratinocyte growth factor promotes goblet cell differentiation through regulation of goblet cell silencer inhibitor. *Gastroenterology* 120, 1372–1380.
- Jakowlew, S.B., Breathnach, R., Jeltsch, J.M., Masiakowski, P., and Chambon, P. (1984). Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res.* 12, 2861–2878.
- Janssen, Y.M., Van Houten, B., Borm, P.J., and Mossman, B.T. (1993). Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 69, 261–274.
- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2007). Structural biology of the tumor suppressor p53 and cancer-associated mutants. *Adv. Cancer Res.* 97, 1–23.
- John, R., El-Rouby, N.M., Tomasetto, C., Rio, M.-C., and Karam, S.M. (2007). Expression of TFF3 during multistep colon carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* 22, 743–751.
- De Jong, M.M., Nolte, I.M., te Meerman, G.J., van der Graaf, W.T.A., Oosterwijk, J.C., Kleibeuker, J.H., Schaapveld, M., and de Vries, E.G.E. (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J. Med. Genet.* 39, 225–242.

- Jørgensen, K.H., and Larsen, U.D. (1980). Homogeneous mono-(125)i-insulins. Preparation and characterization of mono-(125)i-(tyr a14)-and mono-(125)i-(tyr a19)-insulin. *Diabetologia* 19, 546–554.
- Jørgensen, K.H., Thim, L., and Jacobsen, H.E. (1982). Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul. Pept.* 3, 207–219.
- Kannan, N., Kang, J., Kong, X., Tang, J., Perry, J.K., Mohankumar, K.M., Miller, L.D., Liu, E.T., Mertani, H.C., Zhu, T., et al. (2010). Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. *Neoplasia New York N* 12, 1041–1053.
- Kannan, R., Tomasetto, C., Staub, A., Bossenmeyer-Pourrié, C., Thim, L., Nielsen, P.F., and Rio, M. (2001). Human pS2/trefoil factor 1: production and characterization in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 21, 92–98.
- Karam, S.M., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2004). Trefoil factor 1 is required for the commitment programme of mouse oxyntic epithelial progenitors. *Gut* 53, 1408–1415.
- Kast, K., Krause, M., Schuler, M., Friedrich, K., Thamm, B., Bier, A., Distler, W., and Krüger, S. (2012). Late onset Li-Fraumeni Syndrome with bilateral breast cancer and other malignancies: case report and review of the literature. *Bmc Cancer* 12, 217.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J.* 9, 1603–1614.
- Kato, K., Chen, M.C., Nguyen, M., Lehmann, F.S., Podolsky, D.K., and Soll, A.H. (1999). Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures. *Am. J. Physiol.* 276, G1105–1116.
- Khan, Z.E., Wang, T.C., Cui, G., Chi, A.L., and Dimaline, R. (2003). Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin. *Gastroenterology* 125, 510–521.
- Khoury, T., Chadha, K., Javle, M., Donohue, K., Levea, C., Iyer, R., Okada, H., Nagase, H., and Tan, D. (2005). Expression of intestinal trefoil factor (TFF-3) in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Gastrointest. Cancer* 35, 171–177.
- Kinoshita, K., Taupin, D.R., Itoh, H., and Podolsky, D.K. (2000). Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4680–4690.
- Kirikoshi, H., and Katoh, M. (2002). Expression of TFF1, TFF2 and TFF3 in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* 21, 655–659.
- Klatt, P., Molina, E.P., De Lacoba, M.G., Padilla, C.A., Martinez-Galesteo, E., Barcena, J.A., and Lamas, S. (1999). Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13, 1481–1490.
- Koshiyama, M., Yoshida, M., Konishi, M., Takemura, M., Yura, Y., Matsushita, K., Hayashi, M., and Tauchi, K. (1997). Expression of pS2 protein in endometrial carcinomas: correlation

with clinicopathologic features and sex steroid receptor status. *Int. J. Cancer* *J. Int. Cancer* *74*, 237–244.

Kosriwong, K., Menheniott, T.R., Giraud, A.S., Jearanaikoon, P., Sripa, B., and Limpai boon, T. (2011). Trefoil factors: tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma. *World J. Gastroenterol. Wjg* *17*, 1631–1641.

Kraus, S., Abel, P.D., Nachtmann, C., Linsenmann, H.-J., Weidner, W., Stamp, G.W.H., Chaudhary, K.S., Mitchell, S.E., Franke, F.E., and Lalani, E.-N. (2002). MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Hum. Pathol.* *33*, 60–67.

Kubota, S., Yamauchi, K., Sugano, M., Kawasaki, K., Sugiyama, A., Matsuzawa, K., Akamatsu, T., Ohmoto, Y., and Ota, H. (2011). Pathophysiological investigation of the gastric surface mucous gel layer of patients with *Helicobacter pylori* infection by using immunoassays for trefoil factor family 2 and gastric gland mucous cell-type mucin in gastric juice. *Dig. Dis. Sci.* *56*, 3498–3506.

Labouvie, C., Machado, J.C., Carneiro, F., Sarbia, M., Vieth, M., Porschen, R., Seitz, G., and Blin, N. (1999). Differential expression of mucins and trefoil peptides in native epithelium, Barrett's metaplasia and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *125*, 71–76.

Lalani, E.N., Williams, R., Jayaram, Y., Gilbert, C., Chaudhary, K.S., Siu, L.S., Koumari anou, A., Playford, R., and Stamp, G.W. (1999). Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *79*, 537–546.

Langer, G., Walter, S., Behrens-Baumann, W., and Hoffmann, W. (2001). [TFF peptides. New mucus-associated secretory products of the conjunctiva]. *Ophthalmol. Z. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* *98*, 976–979.

Lefebvre, O., Chenard, M.P., Masson, R., Linares, J., Dierich, A., LeMeur, M., Wendling, C., Tomasetto, C., Chambon, P., and Rio, M.C. (1996). Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* *274*, 259–262.

Lemercinier, X., Muskett, F.W., Cheeseman, B., McIntosh, P.B., Thim, L., and Carr, M.D. (2001). High-resolution solution structure of human intestinal trefoil factor and functional insights from detailed structural comparisons with the other members of the trefoil family of mammalian cell motility factors. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 9552–9559.

Leonardi, G.C., Rapisarda, V., Marconi, A., Scalisi, A., Catalano, F., Proietti, L., Travali, S., Libra, M., and Fenga, C. (2012). Correlation of the risk of breast cancer and disruption of the circadian rhythm (Review). *Oncol. Rep.* *28*, 418–428.

Leung, W.K., Yu, J., Chan, F.K.L., To, K.F., Chan, M.W.Y., Ebert, M.P.A., Ng, E.K.W., Chung, S.C.S., Malfertheiner, P., and Sung, J.J.Y. (2002). Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J. Pathol.* *197*, 582–588.

Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* *351*, 453–456.

- Li, C.-Q., Trudel, L.J., and Wogan, G.N. (2002). Nitric oxide-induced genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells expressing wild-type and mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 10364–10369.
- Liu, D., el-Hariry, I., Karayiannakis, A.J., Wilding, J., Chinery, R., Kmiot, W., McCrea, P.D., Gullick, W.J., and Pignatelli, M. (1997). Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *77*, 557–563.
- Longman, R.J., Douthwaite, J., Sylvester, P.A., Poulsom, R., Corfield, A.P., Thomas, M.G., and Wright, N.A. (2000). Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* *47*, 792–800.
- Lucci, A., Hall, C.S., Lodhi, A.K., Bhattacharyya, A., Anderson, A.E., Xiao, L., Bedrosian, I., Kuerer, H.M., and Krishnamurthy, S. (2012). Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol.* *13*, 688–695.
- Lüdeking, A., Fegert, P., Blin, N., and Gött, P. (1998). Osmotic changes and ethanol modify TFF gene expression in gastrointestinal cell lines. *Febs Lett.* *439*, 180–184.
- Luo, J., Duggan, D.J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C.M., Bittner, M.L., Trent, J.M., and Isaacs, W.B. (2001). Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res.* *61*, 4683–4688.
- Luqmani, Y.A., Ryall, G., Shousha, S., and Coombes, R.C. (1992). An immunohistochemical survey of pS2 expression in human epithelial cancers. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *50*, 302–304.
- MacGrogan, G., Arnould, L., de Mascarel, I., Vincent-Salomon, A., Penault-Llorca, F., Lacroix-Triki, M., Bibeau, F., Baranzelli, M.C., Fridman, V., Antoine, M., et al. (2008). Impact of immunohistochemical markers, CK5/6 and E-cadherin on diagnostic agreement in non-invasive proliferative breast lesions. *Histopathology* *52*, 689–697.
- Machado, J.C., Nogueira, A.M., Carneiro, F., Reis, C.A., and Sobrinho-Simões, M. (2000). Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J. Pathol.* *190*, 437–443.
- MacMahon, B. (2006). Epidemiology and the causes of breast cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *118*, 2373–2378.
- Madsen, J., Nielsen, O., Tornøe, I., Thim, L., and Holmskov, U. (2007). Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *55*, 505–513.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* *9*, 125–128.
- Mahooti, S., Porter, K., Alpaugh, M.L., Ye, Y., Xiao, Y., Jones, S., Tellez, J.D., and Barsky, S.H. (2010). Breast carcinomatous tumoral emboli can result from encircling lymphovasculogenesis rather than lymphovascular invasion. *Oncotarget* *1*, 131–147.

- Man, Y.-G., and Sang, Q.-X.A. (2004). The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the “protease-centered” hypothesis. *Exp. Cell Res.* 301, 103–118.
- Mano, M.S., Rosa, D.D., De Azambuja, E., Ismael, G.F.V., and Durbecq, V. (2007). The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat. Rev.* 33, 64–77.
- Mao, W., Chen, J., Peng, T.-L., Yin, X.-F., Chen, L.-Z., and Chen, M.-H. (2012). Role of trefoil factor 1 in gastric cancer and relationship between trefoil factor 1 and gastrokine 1. *Oncol. Rep.* 28, 1257–1262.
- Marchbank, T., Westley, B.R., May, F.E., Calnan, D.P., and Playford, R.J. (1998). Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J. Pathol.* 185, 153–158.
- Mashimo, H., Wu, D.C., Podolsky, D.K., and Fishman, M.C. (1996). Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 274, 262–265.
- Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A., and Chambon, P. (1982). Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* 10, 7895–7903.
- Mathelin, C., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2005). [Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions]. *Bull. Cancer (Paris)* 92, 773–781.
- Mathelin, C., Youssef, C., Brettes, J.-P., and Rio, M.-C. (2007). [Paradoxical interactions between pregnancy and breast cancer]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 35, 449–456.
- May, F.E., and Westley, B.R. (1997a). Close physical linkage of the genes encoding the pNR-2/pS2 protein and human spasmolytic protein (hSP). *Hum. Genet.* 99, 303–307.
- May, F.E., and Westley, B.R. (1997b). Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J. Pathol.* 182, 404–413.
- May, F.E.B., Church, S.T., Major, S., and Westley, B.R. (2003). The closely related estrogen-regulated trefoil proteins TFF1 and TFF3 have markedly different hydrodynamic properties, overall charge, and distribution of surface charge. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 8250–8259.
- Midander, J., Deschavanne, P.J., Malaise, E.P., and Revesz, L. (1982). Survival curves of irradiated glutathione-deficient human fibroblasts: indication of a reduced enhancement of radiosensitivity by oxygen and misonidazole. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 443–446.
- Mihm, S., Galter, D., and Dröge, W. (1995). Modulation of transcription factor NF kappa B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 246–252.
- Mikhitarian, K., Gillanders, W.E., Almeida, J.S., Hebert Martin, R., Varela, J.C., Metcalf, J.S., Cole, D.J., and Mitas, M. (2005). An innovative microarray strategy identifies informative molecular markers for the detection of micrometastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 3697–3704.

- Modig, H. (1968). Cellular mixed disulphides between thiols and proteins, and their possible implication for radiation protection. *Biochem. Pharmacol.* *17*, 177–186.
- Molyneux, G., Geyer, F.C., Magnay, F.-A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., Mackay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., et al. (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* *7*, 403–417.
- Moss, S.F., Lee, J.-W., Sabo, E., Rubin, A.K., Rommel, J., Westley, B.R., May, F.E.B., Gao, J., Meitner, P.A., Tavares, R., et al. (2008). Decreased expression of gastrokine 1 and the trefoil factor interacting protein TFIZ1/GKN2 in gastric cancer: influence of tumor histology and relationship to prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 4161–4167.
- Nagrath, S., Sequist, L.V., Maheswaran, S., Bell, D.W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M.R., Kwak, E.L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., et al. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* *450*, 1235–1239.
- Narod, S.A., and Foulkes, W.D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 665–676.
- Nikolaidis, N.M., Zimmermann, N., King, N.E., Mishra, A., Pope, S.M., Finkelman, F.D., and Rothenberg, M.E. (2003). Trefoil factor-2 is an allergen-induced gene regulated by Th2 cytokines and STAT6 in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *29*, 458–464.
- Nofech-Mozes, S., Vella, E.T., Dhesy-Thind, S., Hagerty, K.L., Mangu, P.B., Temin, S., and Hanna, W.M. (2012). Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. Aimm Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* *20*, 214–263.
- Nunez, A.M., Berry, M., Imler, J.L., and Chambon, P. (1989). The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *Embo J.* *8*, 823–829.
- O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *18*, 1859–1875.
- Ogata, H., and Podolsky, D.K. (1997). Trefoil peptide expression and secretion is regulated by neuropeptides and acetylcholine. *Am. J. Physiol.* *273*, G348–354.
- Okada, H., Kimura, M.T., Tan, D., Fujiwara, K., Igarashi, J., Makuuchi, M., Hui, A.-M., Tsurumaru, M., and Nagase, H. (2005). Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int. J. Oncol.* *26*, 369–377.
- Otto, W.R., Patel, K., McKinnell, I., Evans, M.D., Lee, C.-Y., Frith, D., Hanrahan, S., Blight, K., Blin, N., Kayademir, T., et al. (2006). Identification of blottin: a novel gastric trefoil factor family-2 binding protein. *Proteomics* *6*, 4235–4245.

- Park, W.S., Oh, R.R., Park, J.Y., Lee, J.H., Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, H.K., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Lee, S.H., et al. (2000). Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology* *119*, 691–698.
- Paulsen, F.P., Hinz, M., Schaudig, U., Thale, A.B., and Hoffmann, W. (2002). TFF peptides in the human efferent tear ducts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 3359–3364.
- Penault-Llorca, F., Vincent-Salomon, A., Bellocq, J.-P., Matthieu, M.-C., Grogan, G.-M., Treilleux, I., Ettore, F., Laberge-Le Couteulx, S., Sigal, B., Couturier, J., et al. (2010). [Update of the GEFPICS' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. *Ann. Pathol.* *30*, 357–373.
- Perlman, J.H., Laakkonen, L., Osman, R., and Gershengorn, M.C. (1994). A model of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor binding pocket. Evidence for a second direct interaction between transmembrane helix 3 and TRH. *J. Biol. Chem.* *269*, 23383–23386.
- Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M., and Mazoyer, S. (2002). The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2805–2814.
- Peterson, A.J., Menheniott, T.R., O'Connor, L., Walduck, A.K., Fox, J.G., Kawakami, K., Minamoto, T., Ong, E.K., Wang, T.C., Judd, L.M., et al. (2010). *Helicobacter pylori* infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. *Gastroenterology* *139*, 2005–2017.
- Playford, R.J., Marchbank, T., Chinery, R., Evison, R., Pignatelli, M., Boulton, R.A., Thim, L., and Hanby, A.M. (1995). Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology* *108*, 108–116.
- Poulsen, S.S., Thulesen, J., Christensen, L., Nexø, E., and Thim, L. (1999). Metabolism of oral trefoil factor 2 (TFF2) and the effect of oral and parenteral TFF2 on gastric and duodenal ulcer healing in the rat. *Gut* *45*, 516–522.
- Poulsen, S.S., Thulesen, J., Hartmann, B., Kissow, H.L., Nexø, E., and Thim, L. (2003). Injected TFF1 and TFF3 bind to TFF2-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract in rats. *Regul. Pept.* *115*, 91–99.
- Poulsom, R., Hanby, A.M., Lalani, E.N., Hauser, F., Hoffmann, W., and Stamp, G.W. (1997). Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J. Pathol.* *183*, 30–38.
- Powell, A.A., Talasaz, A.H., Zhang, H., Coram, M.A., Reddy, A., Deng, G., Telli, M.L., Advani, R.H., Carlson, R.W., Mollick, J.A., et al. (2012). Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *Plos One* *7*, e33788.
- Poyton, R.O., Ball, K.A., and Castello, P.R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 332–340.
- Prasad, N.B., Biankin, A.V., Fukushima, N., Maitra, A., Dhara, S., Elkahloun, A.G., Hruban, R.H., Goggins, M., and Leach, S.D. (2005). Gene expression profiles in pancreatic

intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res.* 65, 1619–1626.

Pratt, W.B. (1997). The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 297–326.

Predine, J., Spyrtatos, F., Prud'homme, J.F., Andrieu, C., Hacene, K., Brunet, M., Pallud, C., and Milgrom, E. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assay of pS2 in breast cancers, benign tumors, and normal breast tissues. Correlation with prognosis and adjuvant hormone therapy. *Cancer* 69, 2116–2123.

Prest, S.J., May, F.E.B., and Westley, B.R. (2002). The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 592–594.

Putnik, M., Zhao, C., Gustafsson, J.-Å., and Dahlman-Wright, K. (2012). Global identification of genes regulated by estrogen signaling and demethylation in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 26–32.

Quintás-Cardama, A., and Cortes, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 1619–1630.

Regalo, G., Wright, N.A., and Machado, J.C. (2005). Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* 62, 2910–2915.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616.

Ribieras, S., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (1998). The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta* 1378, F61–77.

Ribieras, S., Lefèbvre, O., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2001). Mouse Trefoil factor genes: genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene* 266, 67–75.

Rio, M.C., Bellocq, J.P., Gairard, B., Rasmussen, U.B., Krust, A., Koehl, C., Calderoli, H., Schiff, V., Renaud, R., and Chambon, P. (1987). Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9243–9247.

Rio, M.C., Bellocq, J.P., Daniel, J.Y., Tomasetto, C., Lathe, R., Chenard, M.P., Batzenschlager, A., and Chambon, P. (1988a). Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* 241, 705–708.

Rio, M.C., Lepage, P., Diemunsch, P., Roitsch, C., and Chambon, P. (1988b). [Primary structure of human protein pS2]. *Comptes Rendus Académie Sci. Série Iii Sci. Vie* 307, 825–831.

Rio, M.C., Chenard, M.P., Wolf, C., Marcellin, L., Tomasetto, C., Lathe, R., Bellocq, J.P., and Chambon, P. (1991). Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology* 100, 375–379.

- Rodrigues, S., Nguyen, Q.D., Faivre, S., Bruyneel, E., Thim, L., Westley, B., May, F., Flatau, G., Mareel, M., Gespach, C., et al. (2001). Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 1517–1528.
- Rodrigues, S., Van Aken, E., Van Bocxlaer, S., Attoub, S., Nguyen, Q.-D., Bruyneel, E., Westley, B.R., May, F.E.B., Thim, L., Mareel, M., et al. (2003a). Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 7–16.
- Rodrigues, S., Attoub, S., Nguyen, Q.-D., Bruyneel, E., Rodrigue, C.M., Westley, B.R., May, F.E.B., Thim, L., Mareel, M., Emami, S., et al. (2003b). Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* *22*, 4488–4497.
- Rodrigues, S., Emami, S., and Gespach, C. (2004). Rôle des peptides en trèfle dans l'inflammation et le cancer. *Hépatogastro* *11*, 49–62.
- Roy, R., Chun, J., and Powell, S.N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 68–78.
- Ruchaud-Sparagano, M.-H., Westley, B.R., and May, F.E.B. (2004). The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* *61*, 1946–1954.
- Dos Santos Silva, E., Ulrich, M., Döring, G., Botzenhart, K., and Gött, P. (2000). Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *J. Pathol.* *190*, 133–142.
- Sartelet, H., Lagonotte, E., Lorenzato, M., Duval, I., Lechki, C., Rigaud, C., Cucherousset, J., Durlach, A., Graesslin, O., Abboud, P., et al. (2005). Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* *58*, 864–871.
- Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* *30*, 1191–1212.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., and Demuth, H.-U. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *Febs Lett.* *563*, 191–196.
- Semple, J.I., Newton, J.L., Westley, B.R., and May, F.E. (2001). Dramatic diurnal variation in the concentration of the human trefoil peptide TFF2 in gastric juice. *Gut* *48*, 648–655.
- Sepulveda, A.R. (2013). Helicobacter, Inflammation, and Gastric Cancer. *Curr. Pathobiol. Reports* *1*, 9–18.
- Shi, S.-Q., Cai, J.-T., and Yang, J.-M. (2006). Expression of trefoil factors 1 and 2 in precancerous condition and gastric cancer. *World J. Gastroenterol. Wjg* *12*, 3119–3122.

Smid, M., Wang, Y., Klijn, J.G.M., Sieuwerts, A.M., Zhang, Y., Atkins, D., Martens, J.W.M., and Foekens, J.A. (2006). Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *24*, 2261–2267.

Smith-Bindman, R. (2012). Environmental causes of breast cancer and radiation from medical imaging: findings from the Institute of Medicine report. *Arch. Intern. Med.* *172*, 1023–1027.

Soutto, M., Belkhiri, A., Piazuelo, M.B., Schneider, B.G., Peng, D., Jiang, A., Washington, M.K., Kokoye, Y., Crowe, S.E., Zaika, A., et al. (2011). Loss of TFF1 is associated with activation of NF- κ B-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans. *J. Clin. Invest.* *121*, 1753–1767.

Speiser, P., Mayerhofer, K., Kucera, E., Roch, G., Mittelböck, M., Gitsch, G., and Zeillinger, R. (1997). pS2 and PAI-1 in ovarian cancer: correlation to pathohistological parameters. *Anticancer Res.* *17*, 679–683.

Srivatsa, G., Giraud, A.S., Ulaganathan, M., Yeomans, N.D., Dow, C., and Nicoll, A.J. (2002). Biliary epithelial trefoil peptide expression is increased in biliary diseases. *Histopathology* *40*, 261–268.

Stewart, L.M., Holman, C.D.J., Hart, R., Bulsara, M.K., Preen, D.B., and Finn, J.C. (2012). In vitro fertilization and breast cancer: is there cause for concern? *Fertil. Steril.* *98*, 334–340.

Stoner, M., Saville, B., Wormke, M., Dean, D., Burghardt, R., and Safe, S. (2002). Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *16*, 2231–2242.

Suemori, S., Lynch-Devaney, K., and Podolsky, D.K. (1991). Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 11017–11021.

Suzuki, T., Nishio, K., and Tanabe, S. (2001). The MRP family and anticancer drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* *2*, 367–377.

Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Nagasawa, S., and Takahashi, K. (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* *277*, 41254–41258.

Taupin, D., and Podolsky, D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 721–732.

Taupin, D., Wu, D.C., Jeon, W.K., Devaney, K., Wang, T.C., and Podolsky, D.K. (1999). The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J. Clin. Invest.* *103*, R31–38.

Taupin, D., Pedersen, J., Familiari, M., Cook, G., Yeomans, N., and Giraud, A.S. (2001). Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *81*, 397–408.

Taupin, D.R., Kinoshita, K., and Podolsky, D.K. (2000). Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 799–804.

- Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 2927–2931.
- Thim, L., and May, F.E.B. (2005). Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* *62*, 2956–2973.
- Thim, L., and Mørtz, E. (2000). Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul. Pept.* *90*, 61–68.
- Thim, L., Thomsen, J., Christensen, M., and Jørgensen, K.H. (1985). The amino acid sequence of pancreatic spasmolytic polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta* *827*, 410–418.
- Thim, L., Wöldike, H.F., Nielsen, P.F., Christensen, M., Lynch-Devaney, K., and Podolsky, D.K. (1995). Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 4757–4764.
- Thim, L., Madsen, F., and Poulsen, S.S. (2002). Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.* *32*, 519–527.
- Thomas, J.A., Poland, B., and Honzatko, R. (1995). Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* *319*, 1–9.
- Tomasetto, C., Rio, M.C., Gautier, C., Wolf, C., Hareuveni, M., Chambon, P., and Lathe, R. (1990). hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *Embo J.* *9*, 407–414.
- Tomasetto, C., Rockel, N., Mattei, M.G., Fujita, R., and Rio, M.C. (1992). The gene encoding the human spasmolytic protein (SML1/hSP) is in 21q 22.3, physically linked to the homologous breast cancer marker gene BCE1/pS2. *Genomics* *13*, 1328–1330.
- Tomasetto, C., Masson, R., Linares, J.L., Wendling, C., Lefebvre, O., Chenard, M.P., and Rio, M.C. (2000). pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* *118*, 70–80.
- Tomita, H., Takaishi, S., Menheniott, T.R., Yang, X., Shibata, W., Jin, G., Betz, K.S., Kawakami, K., Minamoto, T., Tomasetto, C., et al. (2011). Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone gastrin is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. *Gastroenterology* *140*, 879–891.
- Torres, L.-F., Karam, S.M., Wendling, C., Chenard, M.-P., Kershenobich, D., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2002). Trefoil factor 1 (TFF1/pS2) deficiency activates the unfolded protein response. *Mol. Med. Camb. Mass* *8*, 273–282.
- Tozlu, S., Girault, I., Vacher, S., Vendrell, J., Andrieu, C., Spyrtos, F., Cohen, P., Lidereau, R., and Bieche, I. (2006). Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. *Endocr. Relat. Cancer* *13*, 1109–1120.
- Trainer, A.H., Lewis, C.R., Tucker, K., Meiser, B., Friedlander, M., and Ward, R.L. (2010). The role of BRCA mutation testing in determining breast cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *7*, 708–717.

- Tran, C.P., Familiari, M., Parker, L.M., Whitehead, R.H., and Giraud, A.S. (1998). Short-chain fatty acids inhibit intestinal trefoil factor gene expression in colon cancer cells. *Am. J. Physiol.* *275*, G85–94.
- Tuna, B., Sökmen, S., Sarioğlu, S., Füzün, M., Küpelioglu, A., and Ellidokuz, H. (2006). PS2 and HSP70 expression in rectal adenocarcinomas: an immunohistochemical investigation of 45 cases. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. Aimm Off. Publ. Soc. Appl. Immunohistochem.* *14*, 31–36.
- Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C.E., Schmitt, F.C., Ashworth, A., et al. (2007). BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* *26*, 2126–2132.
- Venè, R., Castellani, P., Delfino, L., Lucibello, M., Ciriolo, M.R., and Rubartelli, A. (2011). The cystine/cysteine cycle and GSH are independent and crucial antioxidant systems in malignant melanoma cells and represent druggable targets. *Antioxidants Redox Signal.* *15*, 2439–2453.
- Vestergaard, E.M., Borre, M., Poulsen, S.S., Nexø, E., and Tørring, N. (2006). Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 807–812.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* *10*, 789–799.
- Weigelt, B., Mackay, A., A’hern, R., Natrajan, R., Tan, D.S.P., Dowsett, M., Ashworth, A., and Reis-Filho, J.S. (2010). Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* *11*, 339–349.
- Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Kern, S.G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr, and Hampton, G.M. (2001). Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.* *61*, 5974–5978.
- Welter, C., Theisinger, B., Rio, M.C., Seitz, G., Schüder, G., and Blin, N. (1994). Expression pattern of breast-cancer-associated protein pS2/BCEI in colorectal tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *56*, 52–55.
- Westley, B.R., Griffin, S.M., and May, F.E.B. (2005). Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 7967–7975.
- Wiede, A., Hinz, M., Canzler, E., Franke, K., Quednow, C., and Hoffmann, W. (2001). Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res.* *303*, 109–115.
- Wills-Karp, M., Rani, R., Dienger, K., Lewkowich, I., Fox, J.G., Perkins, C., Lewis, L., Finkelman, F.D., Smith, D.E., Bryce, P.J., et al. (2012). Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. *J. Exp. Med.* *209*, 607–622.

- Wilson, A.J., and Gibson, P.R. (1999). Role of epidermal growth factor receptor in basal and stimulated colonic epithelial cell migration in vitro. *Exp. Cell Res.* 250, 187–196.
- Wright, N.A., Poulson, R., Stamp, G., Van Noorden, S., Sarraf, C., Elia, G., Ahnen, D., Jeffery, R., Longcroft, J., and Pike, C. (1993). Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104, 12–20.
- Wysocki, S.J., Hahnel, E., Masters, A., Smith, V., McCartney, A.J., and Hahnel, R. (1990). Detection of pS2 messenger RNA in gynecological cancers. *Cancer Res.* 50, 1800–1802.
- Yio, X., Zhang, J., Babyatsky, M., Chen, A., Lin, J., Fan, Q.-X., Werther, J.L., and Itzkowitz, S. (2005). Trefoil factor family-3 is associated with aggressive behavior of colon cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 22, 157–165.
- Yio, X., Diamond, M., Zhang, J.-Y., Weinstein, H., Wang, L.-H., Werther, L., and Itzkowitz, S. (2006). Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways. *Gastroenterology* 130, 1696–1706.
- Yonish-Rouach, E., Choisy, C., Deguin, V., Breugnot, C., and May, E. (1996). The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis. *Behring Inst. Mitt.* 60–71.
- Yoon, J.H., Song, J.H., Zhang, C., Jin, M., Kang, Y.H., Nam, S.W., Lee, J.Y., and Park, W.S. (2011). Inactivation of the Gastrokine 1 gene in gastric adenomas and carcinomas. *J. Pathol.* 223, 618–625.
- Youlden, D.R., Cramb, S.M., Dunn, N.A.M., Muller, J.M., Pyke, C.M., and Baade, P.D. (2012). The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 36, 237–248.
- Zhang, J., and Powell, S.N. (2005). The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Res. Mcr* 3, 531–539.

Etude de la fonction de TFF1 dans le cancer du sein

Résumé

Afin d'étudier la fonction de TFF1 (Trefoil Factor 1) dans les cancers du sein, de grandes quantités de TFF1 recombinant semblable au TFF1 humain physiologique sont indispensables.

Parmi différents systèmes de production étudiés, seul TFF1 recombinant produit dans E.Coli s'est avéré avoir le bon poids moléculaire et être fonctionnel. En effet, la présence de TFF1 produit dans E.Coli a permis d'augmenter la capacité migratoire des cellules épithéliales mammaires MCF10A de 70 % au cours d'un test de reconstitution in vitro.

L'étude de l'hétérodimère TFF1-GKN2 (GKN: Gastrokine2) , précédemment mis en évidence dans l'estomac humain sain, suggère que sa formation est peu spécifique. De plus, la co-expression de TFF1 et GKN2 dans les cellules gastriques n'a pas d'impact, ni sur la prolifération, ni sur la migration cellulaire.

En conclusion, seul le système d'expression bactérien permet l'obtention de TFF1 recombinant fonctionnel. Une formation et une éventuelle fonction de l'hétérodimère TFF1-GKN2 semblent peu probables.

, Cancer du sein, TFF1, GKN2, Migration, Reconstitution in vitro, Hormone-dépendant, Oestradiol

Résumé en anglais

In order to study the function of TFF1 (Trefoil Factor 1) in breast cancer, important quantities of recombinant physiologic-like TFF1 peptide is required.

Among several production system studied, only E. coli produced TFF1 has a molecular weight identical to the physiological one and is active. Indeed, when compared to the negative control, recombinant TFF1 peptide produced in E. coli can increase the migratory capabilities of MCF10A (mammary epithelial cells) cells by 70% in a wound healing assay.

The study of the heterodimer TFF1-GKN2 (GKN: Gastrokine2) , previously shown to form in healthy human stomach, suggest that its formation is not specific. Furthermore the co-expression of TFF1 and GKN2 in gastric cell lines did not impact migration nor proliferation of these cells.

In conclusion, only the bacterial expression system (E. coli) has allowed us to obtain functional recombinant TFF1. The specific formation of TFF1-GKN2 heterodimer in vitro seems to be very weak.

Breast cancer, TFF1, GKN2, Migration, Wound healing, Hormone dependent, Oestradiol,