



HAL
open science

Rôle de MUC1 en physiopathologie rénale : cancer et inflammation

Thomas Swierczewski

► **To cite this version:**

Thomas Swierczewski. Rôle de MUC1 en physiopathologie rénale : cancer et inflammation. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS005 . tel-03467180

HAL Id: tel-03467180

<https://theses.hal.science/tel-03467180>

Submitted on 6 Dec 2021

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

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

Université de Lille

Thèse de Doctorat d'Université

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par

Thomas SWIERCZEWSKI

Rôle de MUC1 en physiopathologie rénale : cancer et inflammation

Dirigée par le Docteur Michaël PERRAIS

Soutenue le 27 janvier 2021 devant le jury composé de

Président et Rapporteur : M. le Professeur Antoine Galmiche

Rapporteur : Mme le Professeur Marie-Christine Copin

Examineur : Mme le Docteur Isabelle Fajardy

Directeur de thèse : M. le Docteur Michaël Perrais

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury de thèse d'avoir accepté de juger mes travaux.

Je remercie d'abord le Pr Antoine Galmiche d'avoir suivi mon parcours au cours de mes différents comités de suivi et d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également le Pr Marie-Christine Copin et le Dr Isabelle Fajardy d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie également le Dr Michaël Perrais de m'avoir proposé ce travail de thèse dans la continuité de mon Master 2 Recherche. Je tiens à le remercier pour tous les conseils prodigués au quotidien, ainsi que son suivi attentif de mes résultats et ses remarques toujours pertinentes.

Je remercie le Dr Isabelle Van Seuning, directrice de l'Institut Canther (UMR9020 CNRS – U1277 Inserm) et de l'équipe « Mucines, cancer et résistance aux drogues » pour m'avoir fourni un environnement de travail de qualité au sein de l'équipe.

Je remercie aussi les membres du groupe « Rein » : le Pr Sébastien Aubert, le Dr Viviane Gnemmi, le Dr Jean-Baptiste Gibier pour leur implication dans le projet et nos réunions toujours enrichissantes, ainsi que Brigitte Hémon pour son aide technique au quotidien.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'équipe (techniciens, étudiants, ingénieurs, chercheurs) qui m'ont toujours offert leur aide dans une ambiance de travail détendue et agréable.

Je tiens enfin à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné dans ce travail par leur soutien, en particulier Céline pour son optimisme indéfectible.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Résumé	1
Introduction	5
I. Généralités sur les mucines	5
A. Mucines sécrétées	6
B. Mucines membranaires	6
II. MUC1	8
A. Structure du gène et régulation	8
B. Structure et synthèse de la protéine MUC1	10
C. Expression de MUC1	12
D. Rôles physiologiques	13
E. Rôles en pathologie non tumorale	13
F. Rôles en pathologie tumorale	14
1. Interactions cellule-matrice et cellule-cellule	14
2. Prolifération – Survie – Apoptose	15
3. TEM – Invasion – Migration – Métastase – Résistance anoikis	17
4. Métabolisme	18
5. Chimiorésistance – Checkpoint immunitaire	20
G. Stratégies thérapeutiques visant MUC1	23
1. Vaccins	24
2. Anticorps	24
3. Peptides inhibiteurs	25
4. CAR-T cells	26
5. Aptamères	27
III. Le rein	29
A. Anatomie et physiologie	29
B. Insuffisance rénale	29
C. Carcinomes rénaux	31
1. Epidémiologie et cancérogenèse	31
2. Diagnostic, Pronostics et Traitements	32
IV. Le LPS et les TLR	34
A. LE LPS	34
B. Les TLR	34
V. Mucines et rein	37
A. Expression des mucines	37
1. Rein sain	37
2. Rein pathologique	37

B.	Expression de MUC1	37
VI.	Résultats acquis	39
Objectifs du projet		41
Résultats partie 1 - chimiorésistance.....		45
I.	Validation des modèles cellulaires	45
II.	Etude des propriétés de prolifération et de migration	45
III.	Sensibilité des modèles aux molécules thérapeutiques	47
IV.	Expression et activité des transporteurs membranaires d'efflux	49
V.	Importance de la transition épithélium-mésenchyme	53
Résultats partie 2 - inflammation.....		56
I.	Résultats <i>in vivo</i>	56
A.	Validation du modèle murin	56
1.	Souffrance rénale	56
2.	Expression de Tlr4 et de Muc1	57
3.	Réponse inflammatoire	59
II.	Résultats <i>in vitro</i>	62
A.	Validation du modèle cellulaire	62
B.	Rôle de MUC1 sur la signalisation du TLR4	63
C.	Détermination du domaine de MUC1 impliqué dans l'inhibition de la signalisation du TLR4	65
D.	Etude de l'interaction entre MUC1 et TLR4	66
Discussion et perspectives.....		73
I.	Partie 1 – chimiorésistance	73
A.	Discussion	73
B.	Perspectives	79
II.	Partie 2 – inflammation	82
A.	Discussion	82
B.	Perspectives	88
Appendice technique.....		93
I.	Expériences <i>in vivo</i>	93
A.	Animaux	93
B.	Dosage de l'urémie	93
C.	Extraction des ARN totaux à partir du tissu	93
D.	RT-qPCR	93
E.	Extraction protéique	95
F.	Dosage protéique	95

G.	Western Blot	95
H.	ELISA	96
I.	Immunohistochimie	96
II.	Expériences <i>in vitro</i>	97
A.	Lignées cellulaires	97
1.	Lignées cancéreuses rénales	97
2.	Lignée rénale non cancéreuse	97
B.	Transfections	98
1.	Lignées cancéreuses : transfections stables des modèles d'étude	98
2.	Lignée non cancéreuse : transfections transitoires	98
C.	Etude des propriétés de prolifération et de migration	99
D.	Test de viabilité cellulaire	99
E.	Extraction des ARN totaux à partir d'une culture cellulaire	100
F.	RT-qPCR	100
G.	Cytométrie en flux	100
H.	Etude des propriétés d'invasion	101
I.	Activité luciférase	101
J.	Extraits nucléaires et cytoplasmiques	101
K.	Western Blot	101
L.	Proximity Ligation Assay	102
III.	Analyses statistiques	102
	Références bibliographiques.....	105

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure des mucines membranaires et sécrétées	7
Figure 2 : Structure du gène MUC1	8
Figure 3 : Structure de la protéine MUC1	9
Figure 4 : Représentation de la séquence protéique de MUC1-C	11
Figure 5 : Mécanismes conduisant à la translocation nucléaire ou mitochondriale de MUC1-CT	12
Figure 6 : Mécanisme moléculaire responsable de l'apparition d'une néphropathie interstitielle	13
Figure 7 : Evolution du taux de filtration glomérulaire en fonction du temps	31
Figure 8 : Schéma des voies de signalisation associées au TLR4	35
Figure 9 : Courbe de survie des patients atteints de carcinome rénal à cellules claires	38
Figure 10 : Courbe de prolifération des modèles cellulaires de CRCC	39
Figure 11 : Expression de MUC1 dans les tubules rénaux	40
Figure 12 : Expression de MUC1 dans les modèles cellulaires	45
Figure 13 : Mesure des capacités de prolifération et de migration des modèles cellulaires	47
Figure 14 : Mesure de l'IC50 des traitements appliqués sur les cellules ACHN	48
Figure 15 : Mesure de l'IC50 des traitements appliqués sur les cellules RCC4	49
Figure 16 : Expression relative des transporteurs de la famille ABC	50
Figure 17 : Evaluation de l'activité des transporteurs d'efflux par cytométrie en flux	51
Figure 18 : Observation microscopique des cellules ACHN et RCC4	54
Figure 19 : Mesure du caractère invasif des cellules ACHN et RCC4	55
Figure 20 : Mesure de la concentration sanguine en urée	56

Figure 21 : Mesure de l'expression relative de Kim-1	57
Figure 22 : Mesure de l'expression relative de Muc1	58
Figure 23 : Expression de Muc1 dans les souris WT	58
Figure 24 : Expression du Tlr4 dans les souris WT et KO Muc1	59
Figure 25 : Expression nucléaire de p65	60
Figure 26 : Mesure de l'expression de l'Il-6 chez les souris	61
Figure 27 : Concentration en Il-6 dans le rein total mesurée par ELISA	61
Figure 28 : Validation de la fonctionnalité du modèle cellulaire HEK-TLR4	62
Figure 29 : Vérification de l'expression de MUC1 après transfection transitoire	63
Figure 30 : Mesure des activités kB- et AP-1-luciférase après transfection de MUC1	64
Figure 31 : Mesure de l'expression relative du TNF α après transfection d'un vecteur MUC1	64
Figure 32 : Mesure des activités luciférase après transfection des vecteurs MUC1, MUC1 dTR et MUC1 dCT	65
Figure 33 : Co-immunoprécipitation MUC1-TLR4HA	67
Figure 34 : Proximity Ligation Assay (PLA) réalisé entre les protéines MUC1 et TLR4HA	68
Figure 35 : Proximity Ligation Assay (PLA) réalisé entre les protéines MyD88 et TLR4HA	70
Figure 36 : Quantification du signal de PLA observé entre MyD88 et TLR4HA	70
Figure 37 : Illustration des différents états de TEM	79
Figure 38 : Représentation des propriétés des cellules cancéreuses	81
Figure 39 : Boucle de régulation de l'inflammation	88

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé	MDR	MultiDrug Resistance
ABC	ATP-Binding Cassette	miR	micro ARN
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase	MRP	Multidrug Resistance Protein
ADC	Antibody-Drug Conjugate	mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	MyD	Myeloid Differentiation
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	NF	Nuclear Factor
ADP	Adénosine DiPhosphate	NFKB	Nuclear Factor Kappa B
ADTKD	Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease	NLS	Nuclear Localisation Signal
AGR	Anterior Gradient	PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
AP	Activator Protein	pb	paires de bases
ARN	Acide RiboNucléique	PD	Programmed Death
ATP	Adénosine TriPhosphate	PDGF	Platelet Derived Growth Factor
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	PD-L	Programmed Death-Ligand
BRCA	BReast CAncer	PEM	Polymorphic Epithelial Mucin
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor - T	P-gp	P - GlycoProtein
CBNPC	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules	PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
CD	Cluster de Différenciation	PKC	Proteine Kinase C
CDA	Cytidine DéAminase	PKM	pyruvate kinase M
CDK	Cyclin Dependant Kinase	PLC	PhosphoLipase C
CK	Cystin Knot	PRR	Pattern Recognition Receptors
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PTS	Proline Thréonine Sérine
CRCC	Carcinome Rénal à Cellules Claires	PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
CT	Cytoplasmic Tail	qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein	ROS	Reactive Oxygen Species
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern	RT	Reverse Transcription
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire	RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
EGF	Epidermal Growth Factor	SEA	Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin
EMA	Epithelial Membrane Antigen	SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
EPO	ErythroPOïétine	SMA	Smooth Muscle Actin
ER	Estrogen Receptor	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
FGF	Fibroblast Growth Factor	TA	Tumor Associated
FL	Full Length	TC	Tube Collecteur
FT	Facteur de Transcription	TCD	Tubule Contourné Distal
GSK	Glycogen Synthase Kinase	TCF	T-Cell Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor	TCP	Tubule Contourné Proximal
HIF	Hypoxia Inducible Factor	TDM	TomoDensitoMétrie
HRE	HIF Response Element	TEM	Transition Epithélium-Mésenchyme
HSP	Heat Shock Protein	TGF	Tumor Growth Factor
IFN	Interferon	TIGAR	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator
IHC	ImmunoHistoChimie	TIR	Toll/IL-1R homology
IKB	Inhibitor of Kappa B	TIRAP	TIR Adaptor Protein
IKK	Inhibitor of Kappa B Kinase	TLR	Toll Like Receptor
IL	InterLeukine	TM	TransMembranaire
IRA	Insuffisance Rénale Aiguë	TME	Transition Mésenchyme-Epithélium
IRAK	IL-1R Associated Kinase	TNF	Tumor Necrosis Factor
IRC	Insuffisance Rénale Chronique	TNM	Tumor Node Metastasis

ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs	TR	Tandem Repeat
ITK	Inhibiteur de Tyrosine Kinase	TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
JAK	Janus Kinase	TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein-inducing-interferon- β
JNK	c-Jun N-terminal Kinase	UPR	Unfolded Protein Response
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
LBP	LPS Binding Protein	VHL	Von Hippel Lindau
LPS	LipoPolySaccharide	VNTR	Variable Number Tandem Repeat
LRR	Leucin-Rich Repeat	ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox
LT	Lymphocyte T		

RESUME

Résumé

La mucine MUC1, une O-glycoprotéine membranaire, joue un rôle important en physiopathologie rénale. Dans le rein sain, MUC1 est exprimée au pôle apical des cellules épithéliales des tubules contournés distaux et des tubes collecteurs. En revanche, l'apparition d'une souffrance rénale d'origine non tumorale s'accompagne d'une néo-expression de MUC1 dans les tubules contournés proximaux et de la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ou l'IL-6. En pathologie tumorale, MUC1 est connue pour être surexprimée dans les cellules épithéliales cancéreuses, sous une forme hypoglycosylée mais agissant comme une protéine-clé dans la progression tumorale. Notre équipe a déjà élucidé de manière précise le rôle de MUC1 dans le processus d'atteinte rénale aiguë induite par ischémie/reperfusion et dans le carcinome rénal à cellules claires. Ce travail vise à poursuivre ces hypothèses et à caractériser le rôle de MUC1 dans un modèle de sepsis rénal généré par exposition au LPS, ainsi que le rôle dans la chimiorésistance des cellules de carcinome rénal. Nous avons pu mettre en évidence que dans l'inflammation rénale septique, MUC1 agit comme un inhibiteur de la réaction inflammatoire en perturbant la signalisation du TLR4 et la libération des cytokines pro-inflammatoires. Cette action se produit au niveau membranaire, en amont de la cascade de signalisation, grâce à une inhibition du recrutement de MyD88 au niveau du TLR4, élément nécessaire pour la transduction du signal. De plus, nous avons pu mettre en place un nouveau modèle d'étude de l'implication de MUC1 dans le phénotype des cellules cancéreuses rénales grâce au développement d'un modèle CRISPR/Cas9 MUC1KO. Nous avons donc pu observer que les cellules surexprimant MUC1 présentent des capacités de prolifération et de migration accrues. Le point le plus important est que ces cellules surexprimant MUC1 sont aussi chimiorésistantes, et l'un des mécanismes proposés est l'augmentation de l'expression et de l'activité des transporteurs membranaires d'efflux de la famille ABC. Ce travail met donc en lumière le lien entre inflammation et cancer grâce au caractère protecteur de MUC1 : atténuation de la réaction inflammatoire d'une part et acquisition d'un phénotype cellulaire propice à la survie tumorale d'autre part.

INTRODUCTION

Introduction

I. Généralités sur les mucines

Les mucines sont une famille de volumineuses O-glycoprotéines transmembranaires, constituées d'un cœur peptidique (l'apomucine) sur lequel se greffent de nombreux résidus oligosaccharidiques. L'expression des mucines à la surface des cellules est variable dans l'espace et dans le temps : elle dépend du type cellulaire ainsi que du stade de développement du tissu. On les retrouve majoritairement à la membrane apicale des cellules épithéliales des différents tractus de l'organisme : digestif, respiratoire, urogénital. Leur rôle principal est de constituer le mucus, un gel visqueux tapissant les épithélia et ayant le rôle de première barrière physique en empêchant l'accès des pathogènes et des particules aux cellules épithéliales. Cette couche de mucus est capable de réguler le pH et l'état d'hydratation de l'espace extracellulaire afin de maintenir un environnement adapté aux cellules épithéliales. Les mucines, en tant que protéines transmembranaires, peuvent agir en tant que senseurs du microenvironnement et participer à la transduction du signal. Cette transduction peut s'avérer facilitée grâce à des interactions avec d'autres récepteurs transmembranaires. Leur structure est caractéristique : elles possèdent de nombreux résidus oligosaccharidiques représentant jusqu'à 80% de la masse des mucines liés par une O-glycosylation à des acides aminés (AA) de type proline, thréonine, sérine (PTS). Ces AA sont rassemblés dans des domaines caractérisés par des répétitions en tandem (TR : tandem repeat) de séquences riches en PTS. Le nombre et la longueur de ces domaines TR sont spécifiques de chaque mucine. Pour certaines mucines, le nombre de ces répétitions TR est également variable d'un individu à l'autre, on parle alors de VNTR (Variable Number Tandem Repeat). D'autres domaines caractéristiques peuvent également être retrouvés, comme les domaines EGF-like (présentant une homologie de séquence avec l'EGF) impliqués dans l'interaction avec les récepteurs ErbB.

Il existe actuellement 22 gènes codant pour des apomucines, nommés de *MUC1* à *MUC22* (Dhanisha et al., 2018). Ces mucines sont classées en trois grandes catégories qui diffèrent selon leur structure biochimique et leur rôle.

A. Mucines sécrétées

Les mucines sécrétées sont réparties dans 2 sous-familles, en fonction de leur capacité à participer à la formation du mucus. La première sous-famille est responsable de la formation du gel de mucus et regroupe les mucines MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19. Les gènes *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6* sont regroupés au sein d'un cluster situé sur le chromosome 11 en p15.5, suggérant une origine commune (Pigny et al., 1996). Le gène MUC19 est lui situé sur le chromosome 12q12 (Chen et al., 2004). Ces mucines sécrétées sont exprimées majoritairement par des types cellulaires épithéliaux spécialisés, au niveau du tractus intestinal, respiratoire, génital et auditif. Différents domaines caractéristiques sont retrouvés dans la séquence des apomucines sécrétées (Yonezawa et al., 2011, Figure 1). Ainsi, les domaines D et CK (Cystin-Knot) seraient impliqués dans l'oligomérisation des mucines et donc de la formation du réseau de base du mucus. Les domaines TR riches en AA PTS sont fortement O-glycosylés et sont donc responsables de la captation des molécules d'eau afin d'assurer l'hydratation du mucus (Perez-Vilar and Hill, 1999). La seconde sous-famille regroupe MUC7, 8 et 9 qui sont également des mucines sécrétées mais qui ne participent pas à la formation du mucus : MUC7 ne contient pas de domaines permettant son oligomérisation, et le rôle de MUC8 reste peu connu, bien que sa surexpression soit associée à une inflammation du système respiratoire. MUC9, enfin, est uniquement exprimée au niveau de l'oviducte et serait impliquée dans la liaison aux spermatozoïdes.

B. Mucines membranaires

Les mucines membranaires sont des protéines transmembranaires polytopiques, impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-environnement. Elles sont codées par les gènes *MUC1*, *MUC3A*, *MUC3B*, *MUC4*, *MUC12*, *MUC13*, *MUC14*, *MUC15*, *MUC16*, *MUC17*, *MUC20*, *MUC21*, *MUC22*. On notera l'existence d'un cluster rassemblant les gènes *MUC3A*, *MUC3B*, *MUC12* et *MUC17* au niveau du chromosome 7q22. Ces mucines présentent les éléments caractéristiques de la famille, à savoir la présence de domaines répétés riches en PTS. Elles sont généralement organisées en hétérodimères de deux sous-unités, liées de façon non covalente. La sous-unité extracellulaire, la plus volumineuse, contient les séquences TR fortement O-glycosylés. Elle est liée à une sous-unité transmembranaire de plus

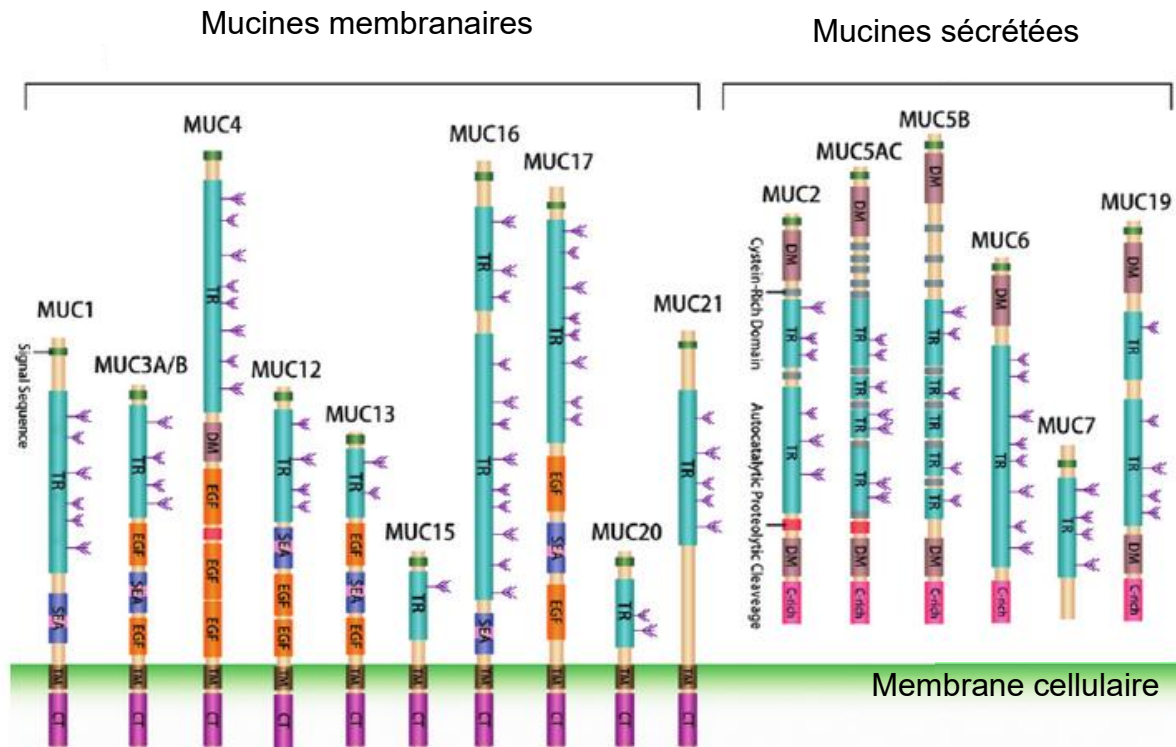


Figure 1 : Structure des mucines membranaires et sécrétées, d'après Yonezawa *et al.* 2011. TR : Tandem Repeat ; SEA : Sea-urchin sperm protein, Enterokinase and Agrin module ; TM : transmembrane ; CT : cytoplasmic tail ; EGF : EGF-like domain ; DM : von Willebrand Domain ; C-rich : Cystin-Knot domain

petite taille, et qui présente une partie intra-cytoplasmique. Ces mucines sont caractérisées par une conformation étirée (jusqu'à 2 000 nm pour MUC4) qui leur permet de dépasser le glycocalyx et de maintenir les lumières canaux ouvertes. Cependant, ces fonctions d'anti-adhérence entraînent également une déstabilisation des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Malgré leur statut transmembranaire, des phénomènes d'épissage alternatif ou de clivage protéolytique peuvent entraîner la sécrétion ou la solubilisation de ces mucines (Moniaux *et al.*, 2001). La présence d'une partie cytoplasmique C-terminale est également importante pour ces protéines afin de participer à la transduction du signal grâce à des interactions avec des protéines impliquées dans des voies de signalisation.

II. MUC1

A. Structure du gène et régulation

MUC1, également appelée EMA (Epithelial Membrane Antigen), épisialine, CD227 ou PEM (Polymorphic Epithelial Mucin), est codée par le gène *MUC1* situé sur le chromosome 1, en q21-24. Il s'agit du premier gène de mucine cloné (Gendler et al., 1987). Il est composé de 7 exons, rassemblés en 3 régions codant pour différentes parties de la protéine : (i) le premier domaine contient l'exon 1 et code pour le peptide signal en N-terminal (ii) le deuxième domaine contient l'exon 2 codant pour les séquences VNTR et présentant un nombre de répétitions compris entre 20 et 125 motifs de 60 pb selon les individus (iii) le troisième domaine rassemble les exons suivants codant en particulier la partie transmembranaire et intracytoplasmique (Nath and Mukherjee, 2014, Figure 2).

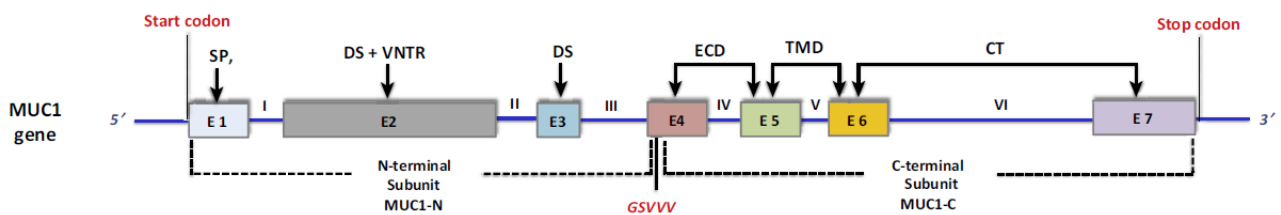


Figure 2: Structure du gène *MUC1* d'après Nath & Mukherjee, 2014. Le gène est composé de 7 exons (E1 à E7) et de 6 introns (I à VI). SP : Signal Peptide ; DS : Degenerate Sequence ; VNTR : Variable Number Tandem Repeats ; ECD : ExtraCellular Domain ; TMD : Transmembrane Domain ; CT : Cytoplasmic Tail.

Au niveau de son promoteur, le gène *MUC1* présente de nombreuses séquences riches en GC ainsi que des sites de fixation pour des facteurs de transcription : Sp1, STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), AP-1, -2 et -3 (Activating Protein), NF-1 (Nuclear Factor), ER (Estrogen Receptor) et le « milk binding protein factor » (Jonckheere et Van Seuning, 2010). Le facteur HIF1 α , impliqué dans la réponse à l'hypoxie, possède également 2 sites de fixation dans le promoteur de *MUC1*, en -1488 et -1510 (Aubert et al., 2009). La région -150/-60 présente un élément *cis* pour Sp1 (-99/-90) et une E-box (appelée E-MUC1, en -86/-64) nécessaire à l'expression tissu-spécifique de *MUC1* (Kovarik et al., 1993). Dans des lignées mammaires, des éléments *cis* pour des voies de signalisation inflammatoires (comme le TGF- β) ont également été mis en évidence dans le promoteur de *MUC1* (Zaretsky

et al., 1999), entraînant l'apparition de deux nouveaux sites d'initiation de la transcription. Dans des cellules cancéreuses, il a également été montré que, suite à la surexpression de l'interleukine-6 (IL-6) et de l'interféron- γ (IFN- γ), STAT1 et STAT3 sont capables d'interagir avec le promoteur de *MUC1* (en -503/-485) pour en augmenter l'activité transcriptionnelle (Gaemers et al., 2001). Au niveau épigénétique, l'hypométhylation et l'acétylation des lysines 9 des histones H3 positionnées en 5' du promoteur de *MUC1* sont des processus nécessaires à l'expression du gène (Yamada et al., 2008). Le gène *MUC1* peut également être régulé par les microARN (miR), des petits ARN non codants d'environ 22 pb. De nombreux miRs ont été décrits comme régulant négativement l'expression de MUC1, dans un répertoire varié de cellules cancéreuses : dans des cellules mammaires pour miR-485-5p (Wang et al., 2020), miR-140-5p (Yu et al., 2019), miR-125b (Rajabi et al., 2010) et miR-1226 (Jin et al., 2010) ; dans des cellules gastriques et œsophagiennes pour miR-136 (Huang et al., 2019), miR-206 (Deng et al., 2019) et miR-1291 (Luo et al., 2015) ; dans des cellules ovariennes et utérines pour miR-512-5p (Zhang et al., 2020) et miR-145 (Wu et al.,

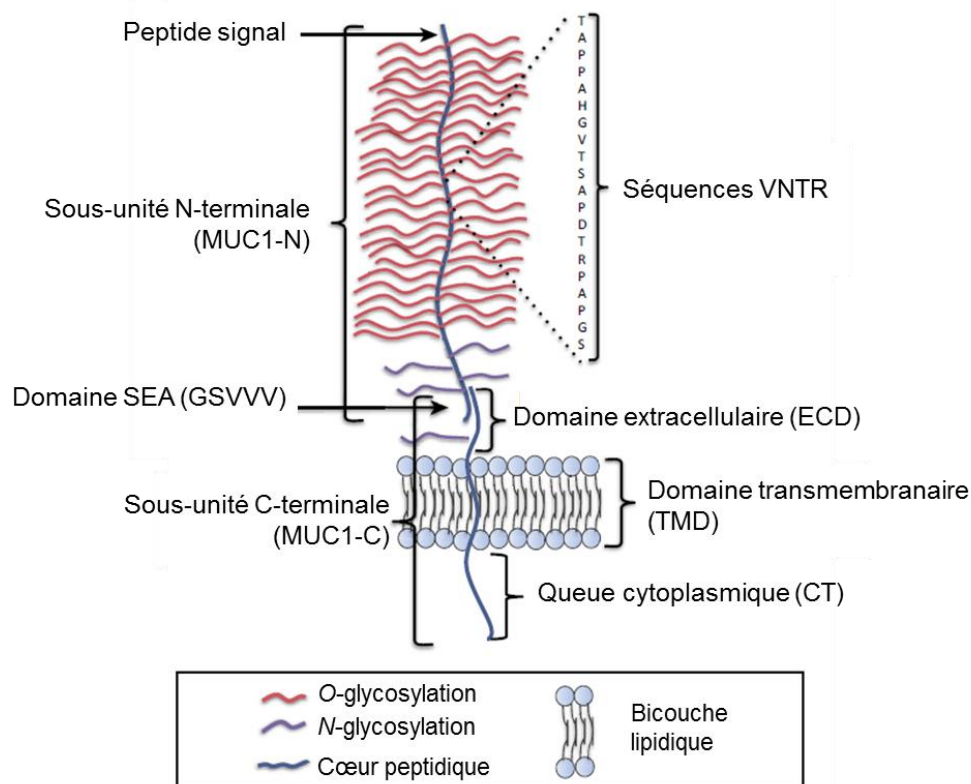


Figure 3 : Structure de la protéine MUC1, d'après Nath & Mukherjee, 2014. Les deux sous-unités MUC1-N et MUC1-C sont reliées par des liaisons non-covalentes. La région VNTR est fortement O-glycosylée. La N-glycosylation est minoritaire et se retrouve aux alentours du domaine SEA.

2013) ; dans des cellules prostatiques pour miR-326 (Liang et al., 2018) ; dans des cellules pulmonaires pour miR-128 (Koh et al., 2017) et enfin dans des cellules pancréatiques pour miR-29a et miR-330-5p (Tréhoux et al., 2015).

B. Structure et synthèse de la protéine MUC1

La traduction du gène *MUC1* entraîne la création d'un polypeptide précurseur qui sera clivé dans le réticulum endoplasmique par autoprotéolyse en deux fragments associés de manière non covalente (Ligtenberg et al., 1992; Nath and Mukherjee, 2014, Figure 3). Le clivage est opéré au niveau du motif FRPG/SVVV dans le domaine SEA (Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin) (Levitin et al., 2005). Les deux fragments ainsi libérés MUC1-N et MUC1-C demeureront liés pendant les modifications post-traductionnelles jusqu'à l'adressage à la membrane cellulaire. Parmi ces modifications, l'une des plus importantes est l'O-glycosylation.

La sous-unité MUC1-N contient le peptide d'adressage à la membrane et le domaine VNTR. Cependant, elle ne contient pas de domaine EGF-*like* contrairement aux autres mucines membranaires. Le nombre de répétitions dans le VNTR est compris entre 20 et 125 motifs de la séquence GSTAPPAHGVT SAPDTRPAP (Gendler et al., 1990). Sa taille peut atteindre 500nm. Cette sous-unité est largement O-glycosylée sur les résidus T et S. Sous l'action d'une N-acétylgalactosamine transférase (GalNAcT), un premier groupement GalNAc est greffé sur le cœur peptidique. La chaîne oligosaccharidique est ensuite synthétisée par l'ajout de galactose (Gal) et de N-Acétyleglucosamine (GlcNAc) puis terminée par un complexe dit Sialyl Lewis (fucose, GlcNAc, Gal et acide sialique).

La sous-unité MUC1-C est constituée de 158 AA, divisés en 3 parties distinctes : une région extracellulaire de 58 AA, support d'une O- et N-glycosylation, un domaine transmembranaire (TM) de 28 AA majoritairement hydrophobes et d'une partie intracytoplasmique (MUC1-CT) de 72 AA. La sous-unité MUC1-C ne représente que 14 kDa mais peut monter à 25-30 kDa après glycosylation et/ou phosphorylation. La présence du motif CQC intra-cytoplasmique mais juxta-membranaire est indispensable à l'adressage de MUC1 à la membrane (Pemberton et al., 1996) mais également à l'homo-dimérisation et la translocation nucléaire de MUC1-C (Raina et al., 2012).

La queue cytoplasmique MUC1-CT est une région importante dans la signalisation cellulaire. Elle contient en effet 9 résidus sérines, 6 thréonines et 7 tyrosines potentiellement phosphorylables (Rajabi and Kufe, 2017, Figure 4). Différentes tyrosine-kinases sont capables de phosphoryler ces résidus, en particulier les récepteurs ErbB (Schroeder, 2001), le PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) la PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase), la PLC γ (PhosphoLipase C γ), c-Src ou encore l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Les sérines et thréonines sont susceptibles d'être phosphorylées par la PKC δ (Proteine Kinase C δ) et la GSK 3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β). MUC1-CT peut également interagir avec d'autres protéines impliqués dans des voies de signalisation comme les HSP 70 et 90.

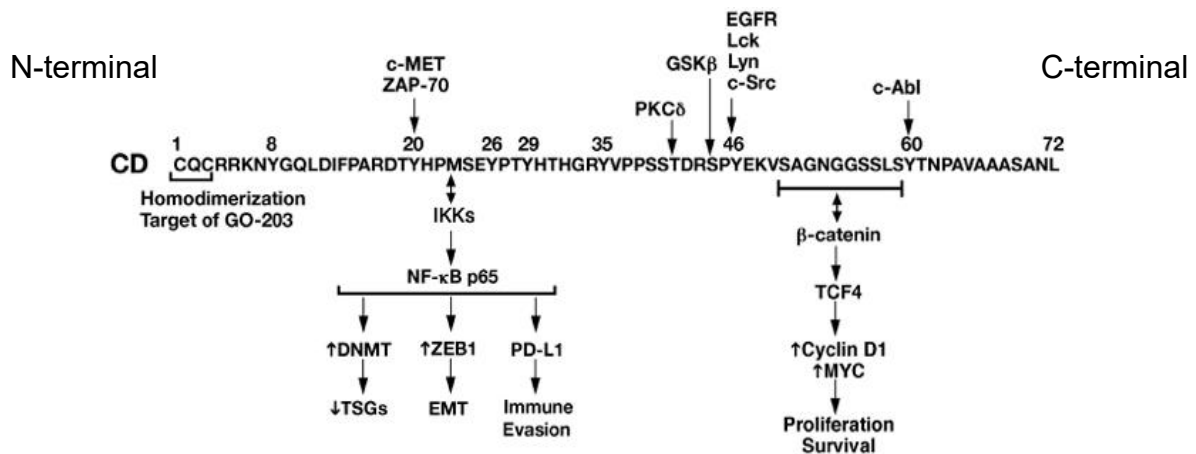


Figure 4 : Représentation de la séquence protéique de MUC1-C, d'après Rajabi et Kufe, 2017. MUC1-C possède des sites de fixation pour des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et des sites de phosphorylation.

MUC1-CT est également susceptible d'être clivée pour être transloquée au noyau afin de s'associer avec des facteurs de transcription et ainsi réguler l'expression de gènes cibles. Ce mécanisme fait intervenir 2 clivages successifs dans un ordre défini : un clivage extra-cellulaire par des sheddases de la famille des métalloprotéases (ADAM-10 et 17, MT1-MMP) puis un clivage intra-cellulaire, directement juxtamembranaire au niveau du motif CQC, par la γ -sécrétase (Julian et al., 2009; Thathiah et Carson, 2004; Thathiah et al., 2003). MUC1-CT ne présentant pas de séquence NLS (Nuclear Localization Signal), le mécanisme de sa translocation nucléaire fait d'abord intervenir une homodimérisation de deux sous-unités MUC1-CT au niveau du motif CQC

juxtamembranaire, puis une interaction avec l'importine- β et la nucléoporeine (Nup62). En effet, l'oligomérisation MUC1-CT/importine- β permet l'interaction avec Nup62, située de part et d'autre des pores nucléaires, ce qui facilite sa translocation nucléaire (Kufe, 2009a; Rajabi and Kufe, 2017, Figure 5). 78 isoformes issues de l'épissage alternatif de *MUC1* ont été décrites, les principales étant les isoformes dépourvues de TR donc faiblement glycosylées (MUC1/Y et MUC1/Z) et les isoformes solubles (MUC1/SEC).

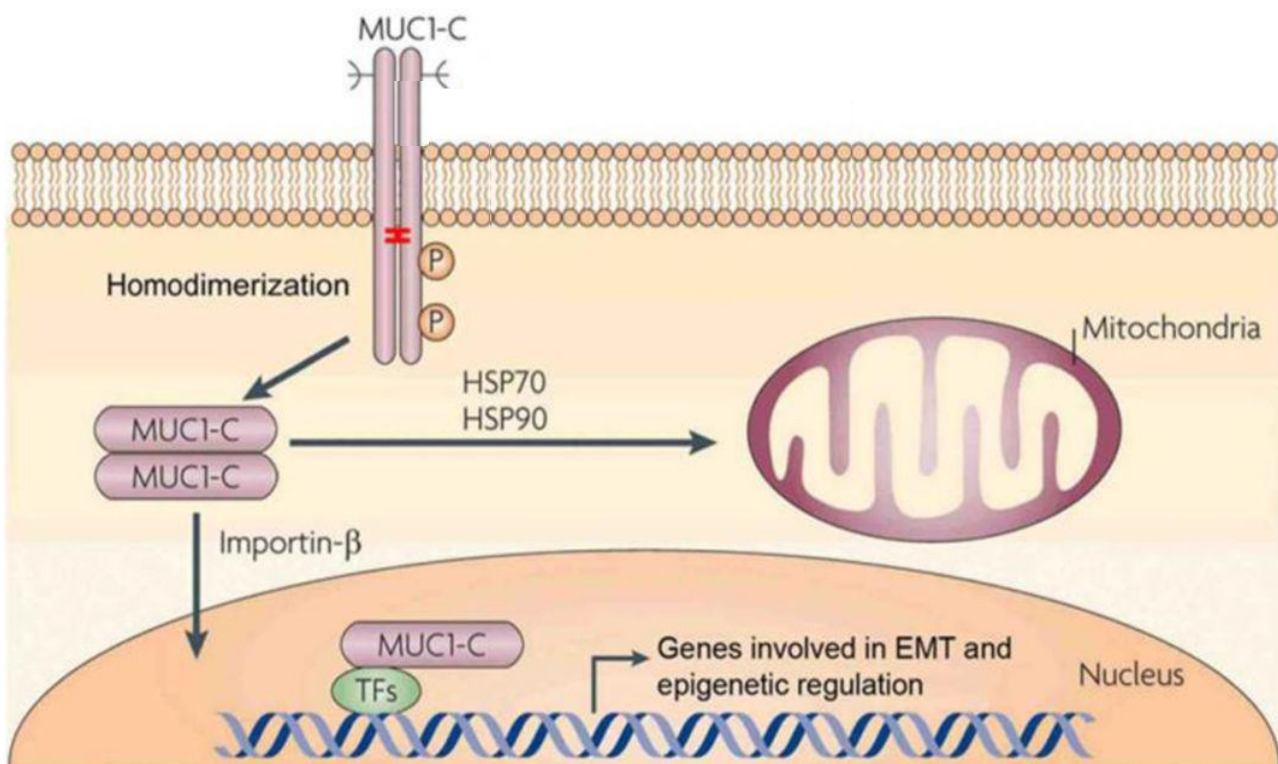


Figure 5 : Mécanismes conduisant à la translocation nucléaire ou mitochondriale de MUC1-CT, d'après Rajabi et Kufe, 2017. La translocation nucléaire de MUC1-CT nécessite une homodimérisation et une interaction avec l'importine- β .

C. Expression de MUC1

MUC1 est exprimée de manière ubiquitaire dans la plupart des épithélia glandulaires et canaux : poumon, estomac, sein, pancréas, tractus digestif et génito-urinaire. Elle peut également être exprimée à la surface de certaines cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes T (Agrawal et al., 1998), les cellules dendritiques (Wykes et al., 2002) et les macrophages (Xu et al., 2014). En pathologie, l'expression de MUC1 est augmentée dans les cellules inflammatoires et cancéreuses. En effet, une

surexpression de MUC1 a été observée dans 2/3 des cancers, tous organes confondus (Kufe, 2009b). De plus, l'augmentation de l'expression serait corrélée à une augmentation de la gravité et donc à un pronostic plus défavorable.

D. Rôles physiologiques

De la même manière que les autres mucines, MUC1 est impliquée dans le maintien de l'hydratation des épithélia grâce à son importante glycosylation extracellulaire. Son encombrement à la surface cellulaire joue le rôle de barrière physique en empêchant l'accès des micro-organismes et des particules, mais peut également maintenir les lumières canales ouvertes grâce à des forces répulsives (Ligtenberg et al., 1992). Enfin, MUC1-CT intervient dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires.

E. Rôles en pathologie non tumorale

Indépendamment de son rôle physiologique, MUC1 peut avoir une importance en pathologie suite à des mutations dans la séquence de son gène. En effet, de manière très rare, une cytosine peut être dupliquée dans la région VNTR, entraînant un changement dans le cadre de lecture. Au niveau protéique, on observe ainsi une nouvelle séquence répétée de 20 AA différente de la séquence d'origine GSTAPPAHGVT SAPDTRPAP, mais surtout l'apparition d'un codon stop prématuré peu après ces répétitions, entraînant la perte de tous les domaines caractéristiques en C-terminal : domaine SEA, domaine transmembranaire, queue cytoplasmique. La protéine ainsi modifiée perd toutes les informations nécessaires à sa fonctionnalité : pas de modifications post-traductionnelles, pas de recyclage de la protéine mal

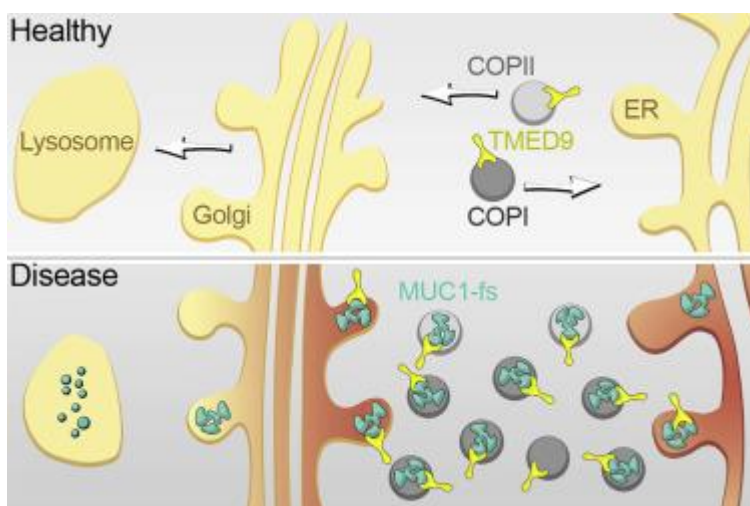


Figure 6 : Mécanisme moléculaire responsable de l'apparition d'une néphropathie interstitielle induite par une mutation de *MUC1*, d'après Dvela-Levitt et al. 2019. L'accumulation d'une forme anormale de MUC1 dans le cytoplasme déclenche l'UPR.

conformée, pas d'ancrage à la membrane et donc pas de signalisation intracellulaire (Devuyst et al., 2019). On observe donc une accumulation de la protéine mutante mal conformée au niveau cytoplasmique, déclenchant la réponse aux protéines mal conformées (UPR : Unfolded Protein Response) (Dvela-Levitt et al., 2019, Figure 6). La pathologie résultante, une néphropathie tubulointerstitielle (ADTKD : Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease) se caractérise par des atteintes tubulaires et une fibrose interstitielle. Le symptôme principal est le développement lent et inexorable d'une insuffisance rénale chronique, nécessitant *in fine* une transplantation rénale (Bleyer et al., 2017).

MUC1 est exprimée à la surface des cellules épithéliales et immunitaires. Son rôle principal physiologique est la protection face aux agressions. En pathologie non tumorale, MUC1 est donc impliquée dans des phénomènes immunitaires et inflammatoires. Cependant, son rôle précis reste encore à élucider. En effet, des études réalisées sur des pathologies pulmonaires montrent un rôle plutôt anti-inflammatoire de MUC1. L'équipe du Dr. Kato a pu montrer que MUC1 interagit avec divers membres de la famille des récepteurs de type Toll (Toll-like Receptors, TLR). Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des pathogènes et sont responsables du déclenchement de l'inflammation. En inhibant cette signalisation, MUC1 inhibe la réponse inflammatoire consécutive à l'activation du récepteur. Les exemples d'inflammation pulmonaire étudiés par l'équipe sont bien entendus d'abord de type infectieux (Kato et al., 2012, 2014, 2016) mais également de type toxique, en particulier avec la fumée de cigarette (Xu et al., 2014).

F. Rôles en pathologie tumorale

1. Interactions cellule-matrice et cellule-cellule

En situation physiologique, MUC1 est exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales. Cependant, les cellules cancéreuses peuvent présenter une perte de polarité et ainsi permettre aux protéines initialement apicales de se distribuer sur tout le pourtour de la cellule. Du fait de son encombrement stérique important, MUC1 participerait donc à la perte d'adhérence de la cellule à la matrice extracellulaire et aux autres cellules. Elle peut également masquer des récepteurs et empêcher la liaison avec leur ligand (Hollingsworth and Swanson, 2004).

2. Prolifération – Survie – Apoptose

En situation tumorale, suite à la perte de polarité cellulaire, MUC1 peut interagir avec de nombreux récepteurs impliqués dans des voies de signalisation. C'est le cas notamment des récepteurs aux facteurs de croissance. MUC1 peut ainsi interagir avec le récepteur au FGF (Fibroblast Growth Factor), à l'HGF (Hepatocyte Growth Factor ou c-Met), au PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ainsi qu'aux récepteurs de la famille ErbB (Pochampalli et al., 2007). D'autres études ont également montré que la galectine-3 peut se lier à la partie extracellulaire de MUC1-C et également à l'EGFR. Ce complexe membranaire empêche la dégradation du récepteur et augmente son activation ainsi que celle de ses gènes cibles (Kharbanda et al., 2014; Merlin et al., 2011). MUC1-CT est également capable d'influer sur la voie Wnt/ β -caténine et favoriser la régulation transcriptionnelle de gènes cibles de cette voie. MUC1-CT ne possède pas de sites de fixation à l'ADN et ne peut donc pas agir directement en tant que facteur de transcription. Cependant, elle possède un domaine riche en sérines (SAGNGGSSLS) capable de lier la β -caténine (Yamamoto et al., 1997). Ce complexe est ensuite capable de réguler l'activité transcriptionnelle de gènes cibles. On notera particulièrement l'induction du FT TCF7L2 (T-cell Factor 7L2), entraînant une régulation positive du gène de la cycline D1 (Rajabi et al., 2012). Enfin, l'activation du proto-oncogène c-Myc entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle de gènes cibles tels que *CCND2* et *CDKN1B*, codant respectivement pour la cycline D2 et le Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor 1B (Tagde et al., 2016).

Concernant la survie, des études ont démontré le rôle de MUC1 sur différentes voies de signalisation, comme NF- κ B ou p53. MUC1-CT possède en effet un site de fixation pour NF- κ B. A l'état basal non activé, I κ B α séquestre les sous-unités du complexe NF- κ B au niveau cytoplasmique. L'activation de cette voie passe par la phosphorylation d'I κ B α par IKK α et β (Inhibitor of Kappa B Kinase alpha et beta). I κ B α phosphorylée libère les sous-unités p50 et p65 puis est adressée au protéasome pour dégradation. Les 2 sous-unités ainsi libérées peuvent être transloquées au noyau pour y agir en tant que facteurs de transcription. Dans cette activation, MUC1 est capable d'agir à différents niveaux : MUC1-CT peut interagir en amont de la voie avec IKK pour favoriser la phosphorylation d'I κ B α et la libération des sous-unités (Ahmad et al., 2007). Elle peut également agir en aval de cette voie en stabilisant directement p50 et p65 au niveau des promoteurs de gènes cibles (Ahmad et al., 2009). En termes de

survie, MUC1 joue un rôle dans la protection contre l'apoptose. Différentes voies de signalisation peuvent être activées par MUC1 pour faire pencher la balance apoptotique du côté survie. Tout d'abord, l'activation de la voie PI3K/Akt entraîne une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL et donc une inhibition du processus apoptotique (Raina et al., 2004). Dans des cellules cancéreuses coliques, la même équipe a montré une diminution du stress oxydatif grâce à la phosphorylation de FOXO3a, conséquence également d'une interaction de MUC1 avec la voie PI3K/Akt (Yin et al., 2004). La voie p53 peut également être activée par MUC1 afin de favoriser la transcription de gènes pro-survie (Wei et al., 2005). Une boucle de régulation entre MUC1 et HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 alpha) a également pu être décrite. En effet, en situation normoxique, HIF1 α est poly-ubiquitinyllée suite à l'interaction avec la protéine VHL (Von Hippel Lindau) et est donc rapidement dégradée par le protéasome. En situation hypoxique, HIF1 α n'interagit plus avec VHL et peut donc s'accumuler au niveau nucléaire et se fixer sur des séquences HRE (Hypoxia Response Element) pour activer la transcription de gènes cibles liés à la protection face à l'hypoxie (angiogénèse et homéostasie rédox). Des études ont pu montrer que parmi les gènes cibles de HIF1 α , on retrouve MUC1 (Aubert et al., 2009) mais que MUC1 pouvait également stabiliser HIF1 α (Chaika et al., 2012). Cette boucle suggère donc que MUC1 joue un rôle protecteur sur les cellules tumorales en empêchant les dommages liés à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) induite par l'hypoxie. Enfin, l'apoptose étant un processus en partie mitochondrial, plusieurs études rapportent un rôle de MUC1 au niveau de la mitochondrie. MUC1-C a pu être identifiée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, suite à son interaction avec les protéines chaperonnes HSP70 et 90 (Ren et al., 2006). La formation de ce complexe a montré comme résultat une diminution de la voie apoptotique intrinsèque. De plus, dans une lignée cancéreuse colique humaine, l'expression de MUC1 a engendré une baisse du relargage mitochondrial de cytochrome c et de l'activation de la caspase 3 (Ren et al., 2004). La même équipe a pu montrer que MUC1 induisait également une diminution de l'activation de la caspase 8, une voie de l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de mort (par des ligands tels que FasL, TRAIL ou le TNF alpha) (Agata et al., 2008). Plus récemment, l'inhibition de MUC1 entraîne une augmentation de l'apoptose grâce à une inhibition du facteur Slug et de ce fait une augmentation de l'expression de PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) (Zhao et al., 2017).

3. TEM – Invasion – Migration – Métastase – Résistance anoïkis

Le processus de dissémination métastatique est un processus complexe. Une cellule épithéliale cancéreuse métastatique doit ainsi, après avoir proliféré localement, être capable de digérer la membrane basale pour pouvoir disséminer dans la circulation sanguine. De nombreuses voies de signalisation peuvent être suractivées par MUC1 pour concourir à augmenter le caractère invasif et migratoire des cellules cancéreuses. Tout d'abord, l'un des prérequis nécessaires pour la dissémination métastatique est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Il s'agit d'un phénomène réversible de plasticité lors duquel la cellule perd ses caractéristiques de cellule épithéliale (jonction avec les autres cellules, polarité) pour acquérir des caractéristiques de cellule mésenchymateuse (en particulier la mobilité). En termes de marqueurs cellulaires, de nombreuses protéines ont été décrites comme étant des marqueurs de l'un ou l'autre des états. Parmi les marqueurs épithéliaux, on retrouve ainsi l'E-cadhérine, la claudine, l'occludine, la desmoplakine ou les cytokératines 8 et 18. A l'inverse, la fibronectine, la vitronectine, la vimentine, l'alpha-SMA (Smooth Muscle Actin) sont plutôt décrites comme des marqueurs mésenchymateux. Ce processus n'est pas complètement binaire, en effet de nombreux types cellulaires présentent plutôt un phénotype de TEM partiel, avec une coexpression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, il s'agirait donc plus précisément d'un processus de balance, plus ou moins orienté vers un état plutôt que l'autre. L'un des événements fondamentaux entraînant la TEM est la diminution ou la perte d'expression de l'E-cadhérine. Ce processus est régi par une régulation transcriptionnelle fine des gènes des différents marqueurs précédemment cités, grâce à des FT dédiés : on notera en particulier les FT Snail, Slug, ZEB1 et 2 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1 et 2), et TWIST.

Le rôle de MUC1 dans la TEM a été étudié de manière précise par notre équipe. En effet, nous avons pu montrer, dans des cellules cancéreuses rénales, que MUC1-CT permet de stabiliser l'interaction entre la β -caténine et le promoteur du gène *SNAI1* codant pour le FT Snail impliqué dans la TEM. De plus, Snail est également capable d'augmenter l'expression de MUC1, créant ainsi une boucle de régulation positive pouvant favoriser la transition vers le phénotype mésenchymateux plus agressif (Gnemmi et al., 2014). D'autres FT de la TEM peuvent également interagir avec MUC1-C. L'équipe du Dr Kufe a pu mettre en évidence que MUC1-C lie la sous-unité p65 de NF κ B au niveau du promoteur de *ZEB1*, activant sa transcription. Le facteur

ZEB1 ainsi transcrit et traduit peut ensuite interagir directement avec MUC1-C pour cette fois-ci inhiber l'expression de miR-200c, impliqué dans la différenciation épithéliale et la transition mésenchymato-épithéliale (TME). L'effet conjoint de l'augmentation de ZEB1 et l'inhibition de miR-200c est donc l'initiation de la TEM dans les cellules épithéliales cancéreuses (Rajabi et al., 2014). Plus récemment, la même équipe a mis en lumière l'existence d'une autre boucle de régulation positive entre MUC1-C et TWIST1, *via* STAT3. Le complexe MUC1-C/STAT3 induit l'expression de TWIST1, et le complexe MUC1-C/TWIST1 permet l'auto-activation de l'expression de MUC1 (Hata et al., 2019).

4. Métabolisme

Afin d'assurer leur prolifération, les cellules cancéreuses doivent pouvoir opérer des changements dans leur métabolisme. En effet, le métabolisme basal de la cellule normale n'est pas suffisant pour subvenir aux besoins de la cellule cancéreuse. De plus, l'environnement tumoral est généralement à tendance hypoxique. De ce fait, la captation de glucose et la glycolyse productrice de pyruvate sont grandement augmentées. Cependant, là où les cellules normales se contentent d'oxyder le pyruvate au niveau mitochondrial (réaction à haut rendement énergétique, uniquement possible en milieu aérobie), les cellules cancéreuses sont capables de mettre en œuvre une fermentation anaérobie du pyruvate, productrice de lactates. On parle alors d'effet Warburg. Le rendement énergétique, bien qu'inférieur à celui de la glycolyse aérobie, permet à la cellule un approvisionnement rapide en énergie dans un milieu pauvre en oxygène. Comme évoqué précédemment, la part de l'hypoxie dans ce phénomène laisse présager l'implication des facteurs HIF, et en particulier HIF1 α . Notre équipe s'est déjà intéressée à l'existence de la boucle de régulation MUC1/HIF1 α dans le carcinome rénal (Aubert et al., 2009). Ces observations ont été confirmées dans d'autres types de cancer : dans un modèle de xénogreffe orthotopique de cancer pancréatique, la stabilisation de HIF1 α par MUC1 permet la transcription de gènes cibles impliqués dans l'assimilation du glucose et la glycolyse aérobie (Chaika et al., 2012). La même équipe a également mis en lumière ce phénomène dans un modèle de cancer pancréatique, et a lié le dérèglement du métabolisme glucidique à la résistance à la gemcitabine (Shukla et al., 2017). Plus récemment, l'implication de MUC1 et HIF1 α dans un modèle de cancer utérin a permis de montrer une modification dans le métabolisme du glucose par l'intermédiaire de la

protéine AGR2 (Anterior Gradient 2) (Gong et al., 2020). MUC1 peut également modifier le métabolisme glucidique de manière HIF1 α -indépendante. Par exemple, MUC1-C est capable d'interagir directement avec l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2), exprimée préférentiellement par les cellules cancéreuses par rapport à l'isoforme M1 (Kosugi et al., 2011). Cette enzyme catalyse la dernière étape de la glycolyse : la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP et la production d'une molécule de pyruvate. Une récente étude a également confirmé le rôle de MUC1 dans la glycolyse, dans un modèle de cellules cancéreuses pancréatiques. Dans cette étude, les auteurs ont pu démontrer l'inhibition de BRCA1 (BRCA1) par MUC1, entraînant une augmentation de la glycolyse (Fu et al., 2020). Une équipe chinoise a également pu montrer un lien entre MUC1, la voie PI3K/Akt et les niveaux de TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator). De hauts niveaux de TIGAR sont associés avec un métabolisme mitochondrial accru. Les auteurs ont mis en lumière que l'utilisation du GO-203, un peptide inhibiteur de la translocation nucléaire de MUC1, s'accompagne d'une inhibition de la voie PI3K/Akt et une diminution de l'expression de TIGAR (GongSun et al., 2019). D'autres branches du métabolisme cellulaire sont également modifiées par MUC1, comme le métabolisme lipidique. Bien que fortement liée au métabolisme glucidique, la synthèse des acides gras est elle aussi impactée par l'expression de MUC1. Pitroda *et al.* ont montré la corrélation entre la surexpression de MUC1 dans des cellules cancéreuses mammaires et des altérations dans un panel de 38 gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, comme les gènes *SREBP1* ou *HMGCS1* (Pitroda et al., 2009). Toujours dans le cancer du sein, une autre équipe s'est intéressée à la glutamine (Gln), un élément essentiel à de nombreuses voies métaboliques. De manière similaire aux observations précédentes, la surexpression de MUC1 a été reliée à des altérations dans des gènes responsables du métabolisme de la glutamine (Goode et al., 2017). Enfin, une étude plus récente a investigué le rôle de MUC1 dans la biosynthèse des bases pyrimidiques. Les auteurs ont pu montrer une diminution de la toxicité du stress réticulaire liée à l'augmentation de l'activité de la cytidine désaminase (CDA) consécutive à la présence de MUC1 au niveau du promoteur du gène (Olou et al., 2020). Les cellules exprimant MUC1 présentent ainsi une survie plus importante.

5. Chimiorésistance – Checkpoint immunitaire

L'une des implications de MUC1 les plus importantes dans le cancer est sa capacité à induire une chimio- et une radiorésistance des cellules cancéreuses. Concernant la radiorésistance, une équipe a pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de MUC1 après irradiation de cellules d'hépatocarcinome. La résistance qui en découle fait intervenir des voies déjà connues, comme la voie JAK2/STAT3 qui entraîne dans ce cas présent une diminution de l'apoptose radio-induite et donc une résistance des cellules (Yi and Lu, 2017). De la même manière, une augmentation de l'expression de MUC1 a également été retrouvée dans des cellules cancéreuses cervicales, couplée à une inhibition du miR-512-5p, entraînant ainsi une diminution de l'apoptose (Zhang et al., 2020). Dans une autre étude récente, c'est la réparation des dommages à l'ADN qui est au cœur du mécanisme de radiorésistance conférée par MUC1 (Huang et al., 2020). En effet, l'irradiation des cellules cancéreuses (ici, d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou) entraîne des cassures de l'ADN pouvant être simple ou double brin. Ces dernières sont les plus délétères pour la cellule, bien que certains mécanismes existent pour tenter de réparer les dommages à l'ADN. Dans les stades précoces de réparation, la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) est un élément clé, permettant de quantifier les cassures double brin et de favoriser leur réparation. L'équipe a pu montrer que dans les cellules surexprimant MUC1, après irradiation, présentent une augmentation du recrutement de γ H2AX au niveau de l'ADN. Cette augmentation s'accompagne de modifications dans l'expression des protéines de la balance apoptotique : inhibition des caspases 3, 8 et 9 (pro-apoptotiques), augmentation de Bcl-2 (anti-apoptotique). La cellule irradiée présente donc un phénotype anti-apoptotique donc radiorésistant. Ces études mettent en lumière une action protectrice de MUC1 vis-à-vis de l'induction de l'apoptose consécutive à des traitements ionisants. Cependant, la littérature est encore plus riche d'exemples de chimiorésistance liée à MUC1. En effet, le recours à des chimiothérapies anti-cancéreuses reste majoritaire par rapport aux rayonnements ionisants. Les premières observations d'une corrélation entre l'expression de MUC1 et la résistance aux traitements ont presque 30 ans. Une équipe avait mis en évidence que des cellules d'adénocarcinome colique résistantes au méthotrexate présentaient des niveaux élevés de MUC1 (Dahiya et al., 1992). Depuis, de nombreuses équipes se sont intéressées à expliquer les mécanismes par lesquels MUC1 confère une

résistance aux cellules cancéreuses. Comme dans le cadre de la radio-résistance, l'un des mécanismes principaux est la modulation de la réponse apoptotique. L'équipe du Dr Kufe a ainsi montré que le traitement de cellules cancéreuses au cisplatine induisait la libération mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques, conduisant à la mort de la cellule (Ren et al., 2004). Cependant, les cellules surexprimant MUC1 présentent une diminution de l'apoptose chimio-induite, signant donc une chimiorésistance plus importante. Les mêmes résultats ont été confirmés par une équipe italienne dans les carcinomes thyroïdiens (Siragusa et al., 2007). Pour les cancers hormono-dépendants, en particulier le cancer du sein chez la femme, MUC1 peut se complexer avec le récepteur aux oestrogènes (ER) et faciliter sa fixation sur les éléments de réponse correspondants, au niveau de promoteurs de gènes cibles. Le tamoxifène, agent inhibant en temps normal l'interaction entre le récepteur et ses éléments de réponse, se retrouve ainsi en compétition avec MUC1, ce qui entraîne une diminution de son efficacité (Kharbanda et al., 2013). L'altération du métabolisme lipidique par MUC1, déjà évoquée précédemment, est également un facteur de résistance au tamoxifène dans le cancer du sein (Pitroda et al., 2009). Enfin, le trastuzumab, anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur HER2 et utilisé dans le cancer du sein, fait aussi l'objet d'une résistance conférée par MUC1. En effet, la surexpression de MUC1 est liée à une augmentation de l'activation de ce récepteur, impliqué dans la carcinogenèse mammaire, conduisant ainsi à une diminution de l'efficacité du trastuzumab (Raina et al., 2014). La cellule cancéreuse est généralement pourvue d'un autre type de mécanisme de résistance aux traitements : les pompes d'efflux membranaires de type ABC (ATP-Binding Cassette). Ces protéines transmembranaires sont activées, en conditions physiologiques, pour permettre l'efflux hors de la cellule de divers composés endogènes ou de xénobiotiques. Leur distribution est relativement ubiquitaire, et de nombreux types de composés sont susceptibles d'être pris en charge par ces transporteurs, les plus communs étant les leucotriènes ou les dérivés conjugués de la bilirubine. Les transporteurs ABC sont répartis en 7 familles (ABCA à ABCG) selon leurs similarités de structure, les plus connus et importants étant ABCB1 (codant pour la glycoprotéine P ou P-gp), ABCC1 (codant pour la protéine MRP1 ou Multidrug Resistance Protein 1) et ABCG2 (codant pour la protéine BCRP ou Breast Cancer Resistance Protein) (Sodani et al., 2012). En conditions pathologiques, la surexpression ou l'augmentation de l'activité de ces transporteurs d'efflux entraîne une diminution des concentrations intracellulaires des

différents produits de chimiothérapie, conduisant de manière caractéristique à un phénotype plutôt chimiorésistant. Plusieurs équipes se sont intéressées au rôle de MUC1 sur l'expression de ces pompes d'efflux. Dès 2013, le rôle de MUC1 sur l'expression de différents membres des ABC exprimés par des cellules pancréatiques a été en partie dévoilé (Nath et al., 2013a). L'étude a mis en évidence 2 voies préférentielles par lesquelles MUC1 induit l'expression d'ABCC1 : tout d'abord, une voie Akt-dépendante (cohérente avec les différentes études précédentes sur l'inhibition de l'apoptose chimio-induite) mais également une voie Akt-indépendante, dans laquelle MUC1-C nucléaire stabilise directement des facteurs de transcriptions sur le promoteur du gène *ABCC1*, stimulant ainsi son expression. En conséquence, les cellules surexprimant MUC1 présente une sensibilité plus faible aux traitements utilisés. Dans un modèle mammaire, des observations similaires ont été rapportées : la surexpression de MUC1 est corrélée à la surexpression de BCRP dans les échantillons de patients non ou peu répondeurs à la chimiothérapie (Chen et al., 2015). De manière intéressante, la chimiothérapie a eu pour effet d'activer l'expression de ces protéines, augmentant encore la résistance acquise. Plus récemment, une équipe chinoise a utilisé 2 lignées cellulaires de cancers traités par paclitaxel : le cancer cervical et le carcinome mucoépidermoïde pulmonaire. Dans ces deux modèles, l'expression de MUC1 et d'ABCB1 a augmenté avec le traitement au paclitaxel. Les auteurs proposent une intervention de l'EGFR comme dénominateur commun entre ces 2 protéines, en effet MUC1 est connue pour interagir avec l'EGFR et faciliter sa localisation nucléaire. Le complexe ainsi formé se retrouve au niveau du promoteur d'*ABCB1* et stimule sa transcription, résultant *in fine* en une augmentation de la résistance au paclitaxel. (Jin et al., 2017).

Dans la compréhension des mécanismes développés par les cellules cancéreuses, la découverte des régulateurs immunitaires de type PD-1 (Programmed cell Death 1) a constitué une avancée significative. Cette protéine (et ses ligands PD-L1 et PD-L2) est impliquée, de manière physiologique, dans la régulation des lymphocytes T pour garantir une protection face à l'autoimmunité : l'inflammation est réduite par induction de l'apoptose des lymphocytes T auto-immuns. Cependant, en pathologie cancéreuse, ces protéines sont surexprimées et détournées de leur usage principal par les cellules tumorales afin d'échapper à l'action des lymphocytes T cytotoxiques (LTc), recrutés initialement pour détruire les cellules cancéreuses. L'importance de ce mécanisme est

telle que des thérapies inhibitrices de ces protéines sont déjà utilisées avec une certaine efficacité dans certains types de cancers. Comme pour de nombreux autres mécanismes cellulaires déjà évoqués, MUC1 est également impliquée dans la signalisation de PD-1/PD-L1. L'équipe du Dr Kufe a longuement investigué ce rôle, dans divers modèles de cancer et *via* divers mécanismes. En 2017, les auteurs ont proposé un premier élément de réponse, dans un modèle de carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC) : MUC1 active la fixation de la sous-unité p65 de NFκB au niveau du promoteur de *PD-L1*, induisant son expression (Bouillez et al., 2017a). Pour compléter ces observations, ils ont également étudié la réponse immunitaire après xénogreffe de cellules murines surexprimant MUC1 dans un modèle de souris immunocompétentes. Le traitement au GO-203, inhibiteur de MUC1-C, a permis une diminution de l'expression de PD-L1 et un regain de fonction des LTc aux alentours de la tumeur (Bouillez et al., 2017b). Les mêmes conclusions ont été tirées dans un modèle murin de cancer du sein triple négatif : le ciblage de MUC1 a permis de restaurer l'efficacité des LTc et de diminuer l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales (Maeda et al., 2018). Enfin, un autre mécanisme a été proposé par cette équipe pour justifier le rôle de MUC1 sur la signalisation de PD-L1 : dans des cellules de leucémie aiguë myéloïde (LAM), la régulation de l'expression de PD-L1 par MUC1 se fait au niveau post-transcriptionnel, grâce à un mécanisme dépendant des miR (Pyzer et al., 2017). En effet, MUC1 inhibe l'enzyme DICER nécessaire à l'épissage des miR-200c et 34a. Ces microARN, dont l'un des rôles est l'inhibition de l'expression de *PD-L1* par fixation dans le 3'-UTR de l'ARNm, ne sont donc pas fonctionnels. *In fine*, l'expression de MUC1 entraîne une augmentation de l'expression de PD-L1 dans ce modèle, et comme pour les précédentes études de cette équipe, le ciblage de MUC1-C par GO-203 permet de retrouver une fonctionnalité des LTc par inhibition de PD-L1.

G. Stratégies thérapeutiques visant MUC1

Au vu de l'importance que revêt MUC1 dans tous les aspects du cancer, de la tumorigenèse à la résistance aux traitements, mais également de sa surexpression dans plus de 60% des cancers, cette protéine possède donc un attrait particulier en tant que cible thérapeutique. Le National Cancer Institute a pu, grâce à un système de pondération basé sur des caractéristiques telles que l'immunogénicité, la spécificité, l'oncogénicité ou l'expression, classer MUC1 comme 2^{ème} antigène prioritaire lié au

cancer (Cheever et al., 2009). De nombreuses équipes se sont donc intéressées à faire de MUC1 une cible thérapeutique, grâce à différentes stratégies.

1. Vaccins

MUC1 étant exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales, elle est ainsi facilement accessible par les cellules responsables de la réponse mise en jeu lors d'une stratégie vaccinale. Du fait de son expression relativement ubiquitaire, les vaccins sont mis au point à partir des formes de MUC1 associées au cancer (Tumor-Associated MUC1 : TA-MUC1). Ces formes sont caractérisées par une hypoglycosylation aberrante de MUC1-N. Actuellement, plus d'une cinquantaine d'essais cliniques en cours ou terminés ont étudié la réponse thérapeutique à des vaccins dérivés de formes de MUC1. Différentes stratégies sont employées pour ce type de vaccin : différences entre les glycopeptides immunogènes dérivés de MUC1, entre les bases protéiques. Ces essais ont rapporté que ces vaccins étaient capables de déclencher une réponse immunitaire humorale, grâce à la production d'anticorps dirigés contre TA-MUC1, puis la mise en œuvre d'une réponse immunitaire cellulaire (déclenchement de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC ; Antibody-dependent cellular cytotoxicity) (Hossain and Wall, 2016). L'un des candidats les plus récents en date est le vaccin viral TG4010, un vaccin exprimant MUC1-FL (Full Length, pleine longueur) contenant 5 domaines TR et l'IL-2. La phase IIb avait pu montrer une augmentation de la survie sans progression (SSP) des patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules traités par ce vaccin par rapport à ceux traités avec une chimiothérapie classique (Quoix et al., 2016). Un essai clinique de phase II est actuellement actif pour mesurer son efficacité en association avec le nivolumab. Cependant, la plupart des autres vaccins n'ont pas montré d'efficacité significative dans les différents cancers traités (Taylor-Papadimitriou et al., 2018).

2. Anticorps

La glycosylation aberrante de MUC1-N dans les cellules cancéreuses entraîne une plus forte immunogénicité et donc une production d'anticorps dirigés contre ces motifs glycaniques altérés. Le fait que TA-MUC1 soit hypoglycosylée génère également le démasquage d'épitopes cryptiques, dans le cœur peptidique de MUC1-N. L'une des stratégies envisagées est donc de développer des anticorps monoclonaux dirigés contre MUC1 afin de générer une cytotoxicité contre les cellules reconnues par ces

anticorps (immunothérapie passive). Cependant, le problème majeur est la présence dans le sérum des patients de formes solubles de MUC1-N. Ces formes présentent des motifs glycaniques altérés et ont déjà fait l'objet d'études, notamment en tant que marqueurs pronostiques. Ce fut notamment le cas pour le CA15.3 dans le cancer du sein. Ce pool de MUC1-N libéré et soluble entre donc en compétition avec les formes ancrées lors de la reconnaissance par les anticorps monoclonaux injectés. Ceux-ci, saturés, ne peuvent pas entraîner une réponse immunitaire suffisante (Albrecht and Carraway, 2011). Parmi les candidats malheureux, le PankoMab® (ou gatipotuzumab) a été l'un des plus prometteurs, montrant un profil de sécurité rassurant (Fiedler et al., 2016) mais dont la phase II n'a semble-t-il pas été concluante (essai clinique NCT01899599 ; clinicaltrials.gov). Une stratégie de complexes drogue/anticorps (ADC : Antibody-Drug Conjugates) a également émergé grâce au développement d'anticorps anti-TA-MUC1. Elle se base sur la synthèse de conjugués comprenant un anticorps spécifique de la cellule cancéreuse (dans ce cas, ciblant TA-MUC1), une petite molécule de liaison et la molécule active. Cette approche permet la délivrance ciblée de molécules de chimiothérapie aux cellules reconnues par un anticorps spécifique. Une efficacité a pu être mise en évidence dans un modèle murin, grâce à l'association d'un anticorps avec un antimétabolite, la monométhyl auristatine E (Panchamoorthy et al., 2018). Plus récemment, un anticorps ciblant un motif glycanique particulier de MUC1 a également été développé et couplé à un autre antimétabolite dérivé de la maytansine (Nicolazzi et al., 2020). Les résultats dans des modèles de xénogreffes dérivées de tumeurs pancréatiques, utérines, vésicales et ovariennes sont encourageants et laissent envisager l'utilisation de cet ADC en clinique.

3. Peptides inhibiteurs

Les fonctions oncogéniques de MUC1 sont majoritairement dues au rôle de MUC1-CT dans l'activation de voies de signalisation intracellulaire. MUC1-CT nécessite un clivage, une homodimérisation et une translocation nucléaire pour agir sur les différents FT déjà évoqués : NFκB, c-Myc, ... L'utilisation de peptides inhibiteurs de l'homodimérisation de MUC1-CT est donc une alternative thérapeutique prometteuse. Ces peptides sont caractérisés par la présence d'un motif CQC capable de former des ponts di-sulfure avec le motif CQC de MUC1-CT. L'hétérodimère ainsi formé (peptide inhibiteur/MUC1-CT) est incapable de transloquer au niveau nucléaire et cela entraîne

donc la séquestration du complexe et le blocage des fonctions nucléaires de MUC1-CT. Le chef de file de cette famille, le GO-201, a montré *in vitro* l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules traitées. Différentes voies de signalisation ont été impactées par le blocage de la dimérisation de MUC1-CT. En premier lieu, la voie Wnt/ β -caténine a vu son activation diminuer grâce au blocage de l'interaction MUC1-CT/TCF7L2, ainsi que la voie STAT3 (Ahmad et al., 2011). La voie NF κ B a également été impactée suite à l'action du GO-201 (Ahmad et al., 2009). Enfin, le GO-201 a inhibé la voie PI3K \rightarrow Akt \rightarrow mTOR dans des cellules de cancer bronchique (Raina et al., 2011). Cependant, ce premier peptide a montré une stabilité limitée *in vivo*, avec une dégradation par les protéases plasmatiques. Un peptide plus court et présentant une conformation différente (AA sous forme lévogyre, non naturelle), le GO-203, représente à l'heure actuelle un candidat plus intéressant. En plus de présenter une efficacité *in vitro* sur divers processus cellulaires oncogéniques (GongSun et al., 2019; Uchida et al., 2013; Yin and Kufe, 2011) son utilisation *in vivo* est actuellement étudiée dans un essai clinique de phase I/II dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë (LAM) réfractaire ou en rechute (essai clinique NCT02204085 ; clinicaltrials.gov). Une autre équipe s'est également intéressée au blocage de MUC1-CT par un peptide inhibiteur. A l'inverse de l'équipe du Dr. Kufe, ils ont choisi de se focaliser sur une voie particulière en aval du clivage de MUC1. En effet, le peptide synthétisé, appelé MIP pour MUC1 Inhibitory Peptide, vise à empêcher l'interaction entre MUC1 et la β -caténine. Des résultats encourageants ont été obtenus *in vitro* et dans un modèle murin (Bitler et al., 2009).

4. CAR-T cells

Les progrès en immunothérapie fondamentale ont permis la mise au point de nouveaux protocoles. L'un des plus marquants est l'utilisation des cellules CAR-T (Chimeric Antigenic Receptor – T). Il s'agit d'un protocole basé sur le système immunitaire du patient : le but est de rediriger l'action des lymphocytes T cytotoxiques vers les cellules cancéreuses et ce de manière la plus spécifique possible. Ce protocole repose sur le prélèvement, la modification et la réinjection de lymphocytes T au patient. Le prélèvement est appelé leucaphérèse et permet la récupération des cellules d'intérêt. Après collecte des lymphocytes T, ceux-ci sont envoyés en laboratoire spécialisé où ils pourront être modifiés génétiquement afin d'exprimer à leur surface un récepteur synthétique capable de reconnaître spécifiquement les

cellules cancéreuses, indépendamment du système physiologique de présentation d'antigène par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Différentes techniques sont utilisées pour l'introduction du matériel génétique codant pour le CAR. La plus utilisée reste les virus, du fait de leur haut potentiel de transfert de matériel et leur rapidité à infecter les cellules. Cependant, d'autres méthodes non-virales existent, comme les transfections par liposomes, caractérisées par une meilleure efficacité et une meilleure spécificité et surtout par l'absence du caractère infectieux inhérent aux virus (Zhang et al., 2017). En terme de structure, les CAR sont des récepteurs, ils possèdent donc : un domaine extracellulaire, responsable de la reconnaissance du TA-Ag (Tumor-Associated Antigen, antigène associé à la tumeur) ; un domaine transmembranaire pour l'ancrage à la membrane ; un domaine intracellulaire, responsable de la transduction du signal et généralement composé de motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) associés à des molécules de co-stimulation comme le CD28 ou le CD3 ζ . Enfin, après modification, les lymphocytes T sont réinjectés au patient, après que celui-ci ait subi une chimiothérapie lymphodépétante afin de faciliter l'expansion clonale des lymphocytes T transférés. Ces CAR-T ont rencontré un vif succès dans les hémopathies malignes, avec la mise sur le marché de deux spécialités (Yescarta® et Kymriah®) dans le traitement des lymphomes. Le nouveau défi est maintenant l'utilisation de ces cellules dans les cancers solides. L'expression d'isoformes spécifiques de MUC1 à la surface des cellules cancéreuses rend donc ce protocole particulièrement attrayant. Depuis quelques années, des essais cliniques ont été conduits avec des cellules CAR-T anti-MUC1. L'un des premiers, en 2016, avait déjà pu montrer l'efficacité de ces CAR-T anti-MUC1 après injection intratumorale dans des métastases d'un cancer des vésicules séminales (You et al., 2016). Depuis, de nombreux autres essais ont vu le jour dans des cancers solides variés, comme le cancer du sein ou du pancréas et forment ainsi une alternative thérapeutique prometteuse.

5. Aptamères

Les aptamères regroupent un panel de composés capables de lier des cibles moléculaires. Ils sont aussi appelés « anticorps chimiques ou synthétiques ». Ces composés peuvent être des fragments d'ADN simple brin, d'ARN, plus rarement des peptides. Leur mise au point dépend d'un processus cyclique appelé SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) : d'abord, des

oligonucléotides ou des peptides (obtenus aléatoirement) sont incubés avec la cible moléculaire d'intérêt afin d'établir une liaison ; ensuite, les séquences qui ont permis une liaison sont isolées ; enfin ces séquences sont réamplifiées. Les séquences ainsi obtenues retournent dans le pool initial, puis un nouveau cycle commence. On estime à 8-15 cycles pour obtenir un aptamère avec une spécificité et une fixation suffisante (Wu et al., 2015). De nombreux avantages sont associés aux aptamères, découlant principalement de leur nature et de leur mode de production. En effet, ils diffèrent des anticorps « classiques » dans le sens où il n'est pas nécessaire d'avoir une cible immunogène pour obtenir un aptamère. De plus, une fois un candidat sélectionné pour une cible donnée, il est très simple de modifier la séquence ou d'ajouter des groupements afin d'améliorer encore la spécificité et l'affinité pour la cible. Leur production est reproductible et génère des produits de haute pureté. Enfin, leur nature le plus souvent oligonucléotidique permet une résistance au stress thermique (température anormalement élevée ou cycles de décongélation/recongélation), là où les anticorps de nature protéique seraient dénaturés. Ces composés possèdent un potentiel important dans le diagnostic (aptasenseurs) mais surtout dans le traitement des cancers. Concernant MUC1, les premiers aptamères sont apparus en 2006 (Ferreira et al., 2006). De la même manière que pour les anticorps monoclonaux, les recherches se sont orientées vers la création d'aptamères dirigés contre les épitopes particuliers de TA-MUC1. Le dernier en date et le plus utilisé actuellement est l'aptamère MA3, composé d'une séquence ADN de 86 pb et dirigée contre une séquence d'AA du VNTR de MUC1-N (Hu et al., 2012). De cette base, de nombreux dérivés ont été mis au point afin d'expérimenter de nouvelles techniques de traitement : conjugaison simple avec la doxorubicine ou complexation de plusieurs molécules d'ADN pour créer des nanoparticules afin de délivrer la molécule directement au niveau des cellules cancéreuses, association avec des polymères pour faciliter l'excrétion des produits toxiques de radiothérapie ou au contraire association avec des molécules radioactives pour une radiothérapie ciblée,...(Nabavinia et al., 2017). Les possibilités sont nombreuses et variées et font de cette approche une alternative thérapeutique intéressante, pour l'instant seulement limitée aux études *in vitro*.

III. Le rein

A. Anatomie et physiologie

Les reins sont des organes situés dans l'espace rétropéritonéal, au niveau des vertèbres lombaires. Ils mesurent en moyenne 12 cm et sont surmontés des glandes surrénales. Ils ont une forme dite « de haricot », avec une partie concave où sont retrouvés les vaisseaux sanguins et les voies excrétrices. Le rein est composé de plusieurs parties aux rôles distincts :

- la capsule rénale, un tissu de protection entourant l'organe,
- le parenchyme rénal, comprenant le cortex et la médulla, qui représente la partie fonctionnelle du rein,
- les voies excrétrices, avec les calices aboutissant au bassinet puis à l'uretère.

Les fonctions principales du rein sont la filtration sanguine et l'homéostasie hydrique et minérale. Ces fonctions sont assurées par des unités fonctionnelles appelées néphrons, prenant place dans le parenchyme. Celui-ci est formé d'un glomérule (jouant le rôle d'interface entre le système sanguin et le système excréteur) et de tubules collecteurs où s'opèrent des mécanismes d'absorption d'eau et de d'ions. Le rein joue également un rôle important dans d'autres processus : production d'érythropoïétine (EPO) nécessaire à la maturation des hématies, hydroxylation et activation de la Vitamine D, régulation de la pression artérielle par sécrétion de rénine. En cas de dysfonctionnement soudain de la fonction épuratrice, une insuffisance rénale aiguë (IRA) peut se développer, ce qui entraîne une diminution de l'excrétion urinaire et une augmentation de la créatininémie et de l'urémie.

B. Insuffisance rénale

De nombreuses causes peuvent conduire à l'apparition d'une IRA, elles sont communément divisées en trois catégories : les causes pré-rénales, intrinsèques ou post-rénales. Les causes pré-rénales sont de nature fonctionnelle : l'hypovolémie ou l'hypoperfusion entraînent une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) sans atteinte de l'organe. Dans la majorité des cas, la restauration de la perfusion entraîne la résolution de l'IRA. Les causes intrinsèques sont souvent des pathologies rénales propres, comme la nécrose tubulaire aiguë ou la glomérulonéphrite. Enfin, les causes post-rénales sont de nature obstructive : un obstacle empêche la bonne

excrétion urinaire, il s'agit le plus souvent d'une lithiase. Il s'agit d'un réel problème de santé publique car environ 20% des adultes hospitalisés développeront une IRA (Susantitaphong et al., 2013). Il existe des facteurs de risque, bien que non spécifiques : l'âge de plus de 65 ans, le diabète, les affections cardiovasculaires et l'hospitalisation. Dans la moitié des cas retrouvés à l'hôpital, la cause principale est le sepsis. L'acte chirurgical compte également pour près de 40%. En fonction des causes, l'IRA peut être spontanément résolutive mais peut également mener au décès dans environ 1 cas sur 10, ce taux étant positivement corrélé à la gravité de l'atteinte. Le diagnostic repose sur un faisceau de paramètres biologiques, en particulier la diurèse, la créatininémie sanguine et le calcul du débit de filtration glomérulaire. Celui-ci peut être estimé grâce à différents calculs, l'équation CKD-EPI étant actuellement recommandée par l'HAS pour la majorité des patients. Ces paramètres biologiques permettent de catégoriser les IRA selon différentes classifications : historiquement, la première était la classification RIFLE en 2004 (Risk, Injury, Failure, Loss of Kidney Function, End-Stage Kidney Disease) puis la classification AKIN (Acute Kidney Injury Network) en 2007. Depuis 2012, c'est la classification KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) qui est utilisée (Gameiro et al., 2018). L'évolution de l'IRA se déroule en 4 étapes. La première étape est une phase d'initiation, dans laquelle l'atteinte structurelle et fonctionnelle des cellules rénales se caractérise et lors de laquelle la fonction rénale s'altère. La phase d'extension voit la perte de fonction rénale s'amplifier suite à l'apparition d'un environnement plutôt inflammatoire et hypoxique. Dans la phase suivante, dite de maintenance, les cellules endommagées vont engager des mécanismes réparateurs afin de stabiliser la perte de fonction. Enfin, la phase de restauration se caractérise par la régénération épithéliale et la reprise d'une fonction rénale normale. Deux phénomènes sont évoqués pour la réparation tissulaire : l'hyperprolifération des cellules épithéliales restantes, ou l'afflux et la différenciation de cellules progénitrices (Sutton et al., 2002, Figure 7). Cependant, la restauration de l'épithélium tubulaire n'est pas totale. Chawla *et al.* ont pu noter la présence de cellules présentant des caractéristiques fibrotiques (Chawla and Kimmel, 2012). La perte de souplesse du tissu peut ensuite entraîner une diminution de la perfusion du rein, résultant en une boucle négative qui favorise l'apparition d'une insuffisance rénale chronique (IRC), d'autant plus lorsque l'atteinte aiguë initiale est sévère. De plus, une IRC équilibrée et bien prise en charge peut parfois se compliquer à cause d'épisodes ponctuels d'IRA.

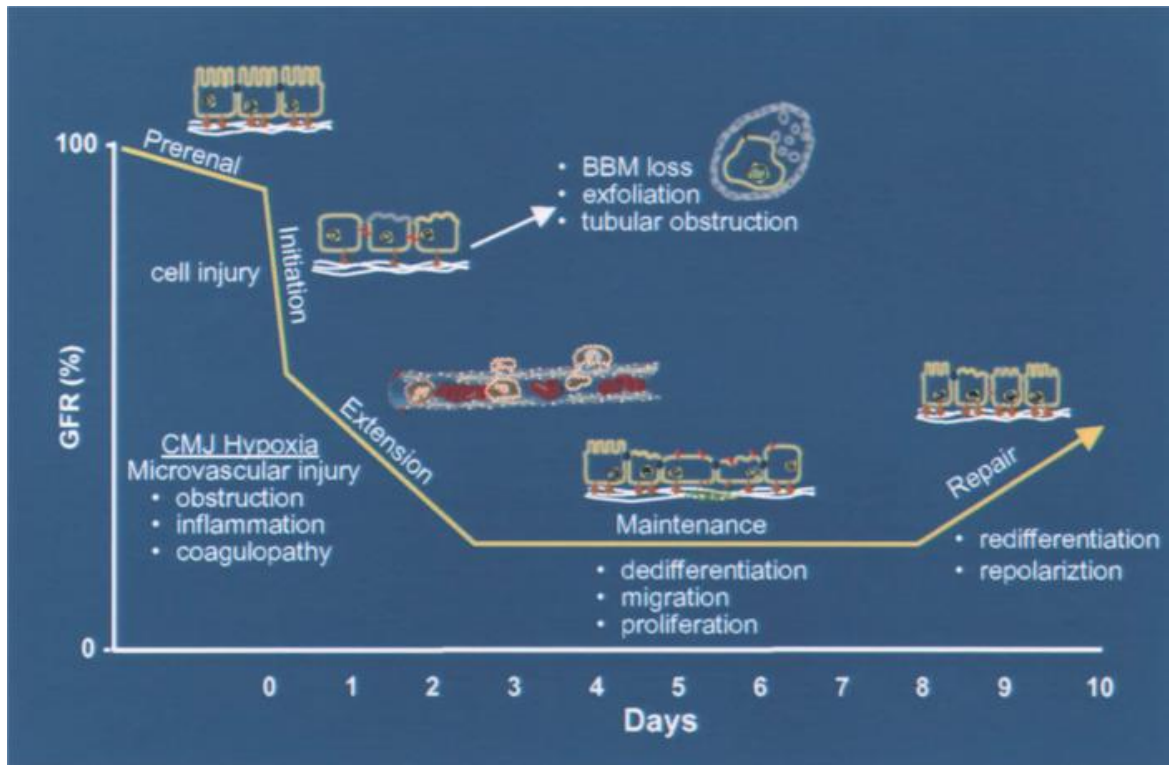


Figure 7 : Evolution du taux de filtration glomérulaire en fonction du temps. Les différentes phases caractéristiques sont indiquées sur la courbe. D'après Sutton *et al.*, 2002

Peu de traitements spécifiques existent pour l'IRA : dans la majeure partie des cas, il suffira de traiter la cause pour observer une restauration de la fonction rénale. On pourra éventuellement envisager une recharge volémique afin de maintenir un état d'hydratation correct. Dans 5% des cas, le recours à une épuration extra-rénale (dialyse) sera nécessaire.

C. Carcinomes rénaux

1. Epidémiologie et cancérogénèse

Les cancers du rein regroupent un ensemble de tumeurs, qui diffèrent selon le type cellulaire et la localisation de la lésion. Dans 10% des cas, il s'agit d'une tumeur bénigne affectant le tissu adipeux. Dans les 90% restants, on retrouve une majorité de carcinomes rénaux à cellules claires (CRCC) pour 70% des cas, le reste comprenant les carcinomes à cellules chromophobes (5%), les carcinomes tubulopapillaires (15%) ainsi que d'autres formes plus rares. Le sex ratio est d'environ 2 hommes atteints pour 1 femme. L'ensemble de ces cancers du rein ne représente que 5% des cancers chez les hommes et 3% chez les femmes (Escudier *et al.*, 2019). La présence de certains

facteurs de risque peut favoriser l'apparition de la pathologie, les plus communément admis étant le tabagisme, l'obésité, la consommation d'alcool et l'hypertension (Scelo and Larose, 2018). Le diagnostic est fortuit dans plus de 50% des cas, lors d'un bilan d'imagerie pour des symptômes peu spécifiques. La majorité de ces cancers sont dus à des mutations sporadiques, cependant, dans 2-3% des cas, une mutation autosomique dominante peut entraîner des cancers héréditaires, le plus répandu étant la maladie de Von Hippel Lindau (VHL). La perte d'expression de la protéine pVHL entraîne la stabilisation des facteurs de l'hypoxie (dont HIF1 α) et la transcription de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse, la prolifération et la migration. D'autres mutations ont également été décrites, dans des gènes tels que PBRM1, BAP1 ou encore SETD2 (Jonasch et al., 2014).

2. Diagnostic, Pronostics et Traitements

Bien que le diagnostic soit souvent fortuit lors d'une imagerie, un bilan complet est nécessaire pour affirmer le diagnostic. En premier lieu, un bilan d'imagerie est indispensable, avec la tomodensitométrie (TDM) comme examen de référence. L'évaluation de la fonction rénale par CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration 2009) est également recommandée. Enfin, une ponction de biopsie percutanée peut être demandée afin de préciser le sous-type histologique et d'adapter le traitement (Bensalah et al., 2018). Le pronostic dépend de différents facteurs, principalement anatomiques et histologiques :

- La classification TNM 2017 (Tumor Node Metastasis) : elle se base sur 3 paramètres que sont la taille de la tumeur, l'envahissement ganglionnaire régional et l'atteinte à distance.
- Le grade nucléaire de Fuhrman ou le grade nucléolaire de l'ISUP : ces classifications se basent sur les différences morphologiques entre les noyaux des cellules saines et cancéreuses.
- Le sous-type histologique déterminé suite à la biopsie : le CRCC est en général de moins bon pronostic que le carcinome rénal chromophile ou papillaire.

Les traitements vont principalement dépendre du statut métastatique du carcinome. En cas de cancer localisé et de petite taille, l'intervention de référence est la néphrectomie partielle (ablation de la partie du rein atteinte). En cas de carcinome localement avancé, en fonction de l'état du patient, on pourra envisager une

néphrectomie totale (ablation totale du rein atteint). Dans ces deux cas, aucune thérapie néoadjuvante n'est recommandée. En cas de métastases, le traitement chirurgical n'est plus suffisant (mais peut être envisagé, on parle de chirurgie cytoréductrice). Il faut alors utiliser des traitements médicamenteux. Les carcinomes rénaux ont pour caractéristique d'être naturellement résistants aux thérapies conventionnelles. L'arsenal disponible actuellement repose donc sur les thérapies ciblées et l'immunothérapie, et le choix de la thérapie adaptée sera fait en fonction du pronostic. Concernant les thérapies ciblées, 2 cibles préférentielles ont été décrites : un récepteur à tyrosine kinase (RTK), le VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) et la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), les deux étant impliqués dans des processus oncogéniques. L'arsenal thérapeutique comprend donc des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), la plupart du temps multi-cibles (sunitinib, pazopanib, cabozantinib) et des inhibiteurs de mTOR (temsirolimus, everolimus). L'immunothérapie a constitué une avancée importante en 2015 avec 2 molécules immunomodulatrices : le nivolumab, un anticorps anti-PD-1 et l'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Ces anticorps, utilisés en association, ont montré une efficacité non négligeable par rapport aux ITK. D'autres anticorps ont depuis intégré l'arsenal thérapeutique : l'avelumab (anti PD-L1) et le pembrolizumab (anti PD-1). En cas de CRCC de bon pronostic, le traitement de première ligne est un ITK (en général le sunitinib). En cas d'échec, le changement d'ITK ou l'utilisation du nivolumab sont envisagés. Pour un pronostic intermédiaire ou mauvais, l'association nivolumab-ipilimumab est maintenant recommandée en première ligne, par rapport au sunitinib seul. Un ITK peut cependant être prescrit en option. En cas d'échec, les traitements possibles (changement d'ITK, utilisation d'inhibiteurs de mTOR) sont discutés en fonction du patient. Récemment, des études pré-cliniques ont montré l'efficacité d'une association ITK-anticorps anti-PD-L1 en première ligne. Cependant, certains patients restent non-répondeurs aux immunothérapies (Xu et al., 2020).

IV. Le LPS et les TLR

A. Le LPS

Le sepsis étant la cause majeure d'IRA à l'hôpital, nous avons mis en place un modèle d'atteinte rénale par lipopolysaccharide (LPS). Il s'agit d'un composé retrouvé dans la paroi des bactéries Gram-négatives. La partie lipidique (lipide A) consiste en un phospholipide qui permet sa fixation à la paroi bactérienne. La partie polysaccharidique rassemble un cœur oligosaccharidique, souvent un heptose et un Kdo (acide 3-déoxy-D-manno-oct-2-ulosonique) avec un polysaccharide de structure très variée appelé antigène O (Raetz and Whitfield, 2002). La forte immunogénicité de ce composé lui est conférée par le lipide A, lors de la fixation sur son récepteur, le TLR4 (Toll-Like Receptor 4).

B. Les TLR

La famille des TLR regroupe des récepteurs transmembranaires de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR : Pattern Recognition Receptors). Ces motifs peuvent être associés aux pathogènes (on parle de PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou associés aux dommages (on parle alors de DAMPs : Damage-Associated Molecular Pattern). Les TLR sont des éléments du système immunitaire inné, et leur expression est capable d'être modulée en fonction de certains stimuli comme la reconnaissance d'un pathogène, l'action de cytokines ou des stress exogènes. Ces récepteurs partagent des caractéristiques avec le récepteur Toll, découvert en 1996 chez la drosophile et impliqué dans la résistance antifongique. Les TLR partagent une structure commune : il s'agit de glycoprotéines de type 1, présentant une partie extracellulaire riche en leucine (motif LRR, Leucin-Rich-Repeat) et une partie intracellulaire responsable de la transduction du signal. Au niveau cytoplasmique, la glycoprotéine se caractérise par la présence d'un motif d'homologie avec le récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R) nommé TIR (Toll/IL-1R homology). Deux familles de TLR ont été identifiées en fonction de leur localisation : les TLR extracellulaires (comprenant les TLR1, 2, 4, 5 et 6) et les TLR endosomaux (comprenant les TLR3, 7, 8 et 9). Les TLR extracellulaires ont pour ligands des composés endogènes (molécules impliqués dans l'inflammation) ou exogènes (composés d'origine microbiologique), tandis que les TLR intracellulaires reconnaissent des acides nucléiques issus de la dégradation des micro-organismes endocytés (Akira et al., 2006). Ces TLR, du fait de leur

implication dans l'immunité innée, se retrouvent exprimés à la surface de nombreuses cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes (T et B), les cellules dendritiques mais également certaines cellules épithéliales. Le ligand du TLR4, le LPS, nécessite pour sa fixation deux co-récepteurs : MD-2 et CD14. Le LPS est pris en charge par une protéine de liaison (LBP : LPS Binding Protein), ce qui permet la fixation au CD14. Le domaine extracellulaire du TLR4 recrute MD-2, et ce complexe peut accepter la liaison au LPS présenté par CD14 (Lu et al., 2008). Suite à l'interaction TLR4/MD-2/CD14, le récepteur se dimérise et recrute différentes protéines adaptatrices grâce à l'interaction entre les domaines TIR. Deux voies de signalisation sont activées : la voie MyD88 (Myeloid Differentiation primary response protein 88) et la voie TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing-interferon- β). Les

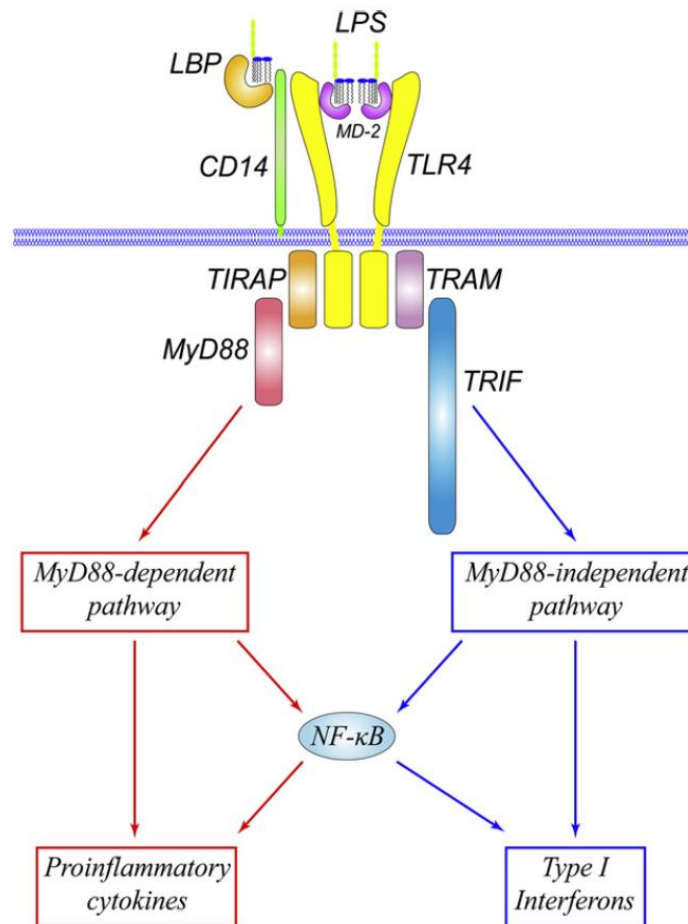


Figure 8 : Schéma des voies de signalisation associées au TLR4, d'après Lu et al., 2008. La stimulation du TLR4 par le LPS induit une cascade de signalisation aboutissant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

adaptateurs de ces voies sont TIRAP (TIR Adaptor Protein) et TRAM (TRIF-Related Adaptor Molecule), respectivement (Figure 8). La cascade de signalisation MyD88-dépendante est retrouvée pour l'ensemble des TLR, alors que la voie TRIF n'est retrouvée que pour les TLR3 et 4 (Akira et al., 2006). En aval, la signalisation continue également par 2 voies distinctes : la première fait intervenir des protéines kinases (telles que IRAK : IL-1R Associated Kinase) qui aboutit à la dégradation d'I κ B (Inhibitor κ B). Les sous-unités NF- κ B (Nuclear Factor κ B) libérées peuvent être adressées au niveau nucléaire et y agir comme facteur de transcription pour réguler de manière positive des gènes cibles de cytokines pro-inflammatoires. La seconde voie consiste en l'activation des kinases de la famille JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38. Le facteur nucléaire AP-1 peut ainsi, comme NF- κ B, agir sur la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération et la différenciation. Comme d'autres TLR, le TLR4 est exprimé par les cellules immunitaires mais également par des cellules épithéliales. En particulier dans le rein, son expression est retrouvée majoritairement au niveau des tubules contournés proximaux et distaux (Wolfs et al., 2002). Cependant, il a été montré que l'expression du TLR4 pouvait être augmentée par l'action de cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'interféron- γ (IFN- γ) et le TNF- α , suggérant ainsi une boucle de régulation positive, responsable de l'entretien de l'état pro-inflammatoire. Dans ce travail, l'attention a été portée sur l'action de MUC1 dans un modèle d'atteinte rénale aiguë induite par le LPS. De manière intéressante, la littérature rend déjà compte de plusieurs études associant MUC1 et signalisation des TLR. En effet, MUC1 a montré un rôle inhibiteur dans la cascade de signalisation des TLR2, 3, 4, 7 et 9 dans un modèle de culture cellulaire macrophagique (Ueno et al., 2008). Dans un modèle pulmonaire, l'équipe du Dr Kato a proposé que l'inhibition de la signalisation des TLR3 et 5 était consécutive à une inhibition du recrutement des protéines adaptatrices, respectivement TRIF et MyD88 (Kato et al., 2012, 2014).

V. Mucines et rein

A. Expression des mucines

1. Rein sain

L'expression des mucines dans le rein est relativement précoce et débute dès la vie embryonnaire. Lors des premières semaines de vie, on retrouve l'expression de MUC1, MUC3 et MUC6 (Leroy et al., 2003). Dans le rein adulte, MUC1 reste la mucine majoritaire. Par des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR et hybridation *in situ*), les ARNm de *MUC3*, *MUC4*, *MUC6*, *MUC11* et *MUC12* sont également retrouvés, mais avec une expression protéique faible voire inexistante. La protéine MUC20 a pu être mise en évidence par immunohistochimie (IHC), dans les tubules contournés proximaux (TCP) (Higuchi et al., 2004).

2. Rein pathologique

L'augmentation de l'expression de certaines mucines a été détectée dans divers processus pathologiques rénaux. On notera principalement l'augmentation de MUC20 dans différents modèles murins mimant des atteintes rénales (Higuchi et al., 2004). MUC1 étant la mucine la plus exprimée, l'augmentation de son expression est également retrouvée dans de nombreuses pathologies, dans les carcinomes rénaux mais également dans des anomalies du développement rénal entraînant des malformations (Leroy et al., 2003). De manière intéressante, les 3 mucines présentes au cours du développement embryonnaire rénal (MUC1, MUC3, MUC6) sont également celles retrouvées dans les cellules cancéreuses rénales (Leroy et al., 2002).

B. Expression de MUC1

Dans le rein adulte sain, MUC1 est retrouvée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales des tubules contournés distaux (TCD) et des tubes collecteurs (TC) (Leroy et al., 2002). Cependant, notre équipe a pu observer, sur des coupes de rein humain, une néo-expression de MUC1 dans les tubules contournés proximaux (TCP) lors d'une nécrose tubulaire aiguë (Gibier et al., 2017). Dans les cellules cancéreuses, on retrouve une surexpression de MUC1 associée à une délocalisation sur tout le pourtour de la membrane suite à la perte de polarité. Cependant, il s'agit

d'une forme aberrante de MUC1, appelée TA-MUC1. Cette forme se caractérise par une hypoglycosylation générale du cœur protéique, et la présence de chaînes glycaniques plus courtes (terminaison précoce par un acide sialique) (Brockhausen et al., 1995; Mann et al., 1997). La surexpression de MUC1 est retrouvée dans l'ensemble des sous-types histologiques de carcinome rénal, mais surtout dans le CRCC (Leroy et al., 2002). De manière intéressante, la surexpression de MUC1 et sa localisation cytoplasmique sont corrélées aux facteurs pronostics du carcinome rénal, comme la classification TNM et le grade de Führman. Cela se traduit, en clinique, par une probabilité de survie plus faible chez les patients dont les CRCC surexpriment MUC1 (Figure 9).

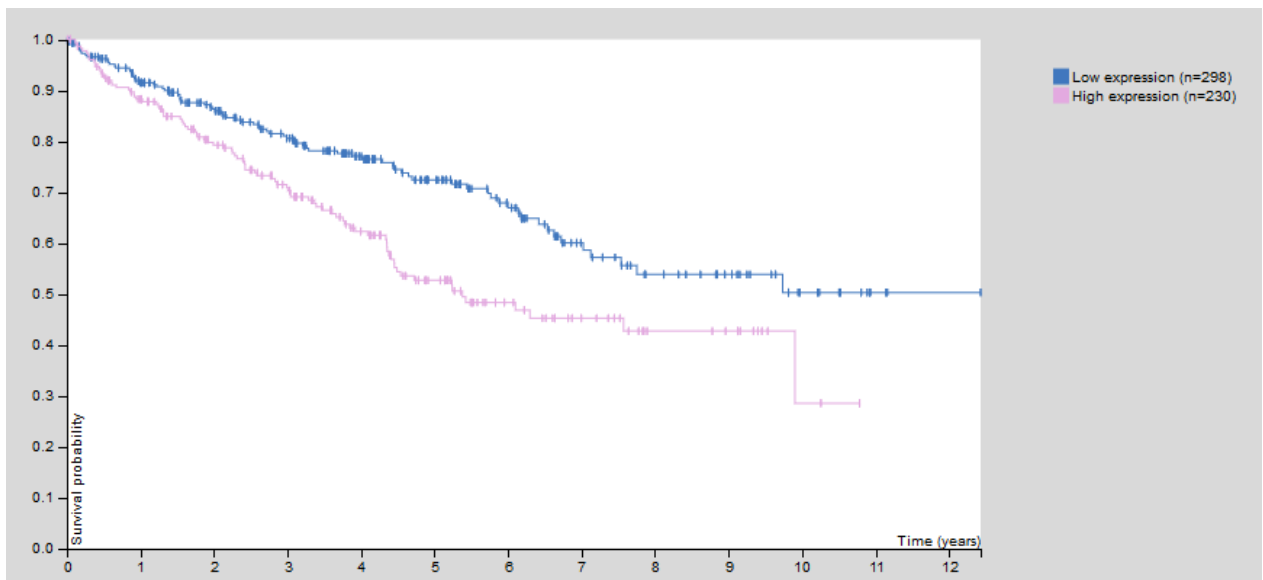


Figure 9 : Courbe de survie des patients atteints de carcinome rénal à cellules claires. Courbe réalisée sur une cohorte de patients atteints de CRCC, tous stades confondus, en fonction de l'expression de MUC1. www.proteinatlas.org

VI. Résultats acquis

Notre équipe s'intéresse aux mucines, et plus particulièrement à MUC1, depuis longtemps. Ce projet de thèse s'inclut donc dans un projet d'équipe plus large. A ce titre, notre groupe a déjà pu montrer, dans le CRCC, que MUC1 est surexprimée dans le tissu tumoral rénal et que cette surexpression est corrélée à la sévérité de la pathologie. Dans des modèles cellulaires, nous avons pu montrer que la surexpression de MUC1 engendre l'augmentation des propriétés de prolifération, de migration et d'invasion (Bouillez et al., 2014, Figure 10). Ce mécanisme fait intervenir des enzymes protéolytiques membranaires comme les sheddases ADAM10/17 et la γ -sécrétase afin de permettre la translocation nucléaire de MUC1-CT. Dans le noyau, nous avons également montré que MUC1 peut induire la transcription de *SNAI1*, un acteur majeur de la TEM, en stabilisant l'interaction entre la β -caténine et le promoteur de *SNAI1* (Gnemmi et al., 2014). Cette activation de la TEM est un processus important pour la régénération des cellules rénales.

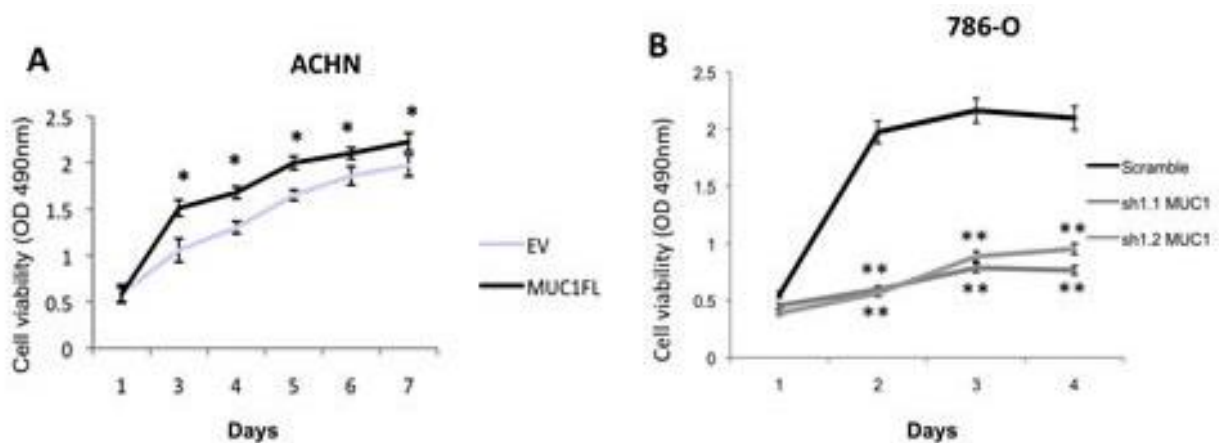


Figure 10 : Courbe de prolifération des modèles cellulaires de CRCC, d'après Bouillez et al., 2014. Mesure de la viabilité cellulaire par test MTS après transfection d'un vecteur codant pour MUC1 (A) ou à l'inverse de shRNA ciblant *MUC1* (B). ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Notre équipe s'est donc intéressée à étudier le rôle de MUC1 sur l'atteinte rénale aiguë, en mettant en place un modèle murin d'atteinte rénale induite par ischémie/reperfusion (c'est-à-dire par clampage/déclampage du pédicule rénal) mais également en étudiant des tissus de patients sains ou souffrant d'une atteinte rénale aiguë de type nécrose tubulaire (Gibier et al., 2017). Nous avons donc mis en évidence, chez les patients, une néo-expression de MUC1 au niveau des TCP en cas

d'atteinte rénale (Figure 11). L'étude approfondie du modèle murin a permis de confirmer les observations déjà disponibles dans la littérature : la présence de MUC1 au niveau des cellules rénales entraîne un effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation (Pastor-Soler et al., 2015) .Cependant, l'étude menée sur des temps tardifs après la reperfusion a mis en lumière un fait intéressant, à savoir l'apparition d'un phénotype non plus anti-inflammatoire mais pro-fibrosant, empêchant ainsi une régénération rénale efficace (Gibier et al., 2017). L'ensemble de ces résultats obtenus par le laboratoire a donc été le point de départ de ce travail de thèse visant à déterminer le rôle de MUC1 en pathologie rénale.

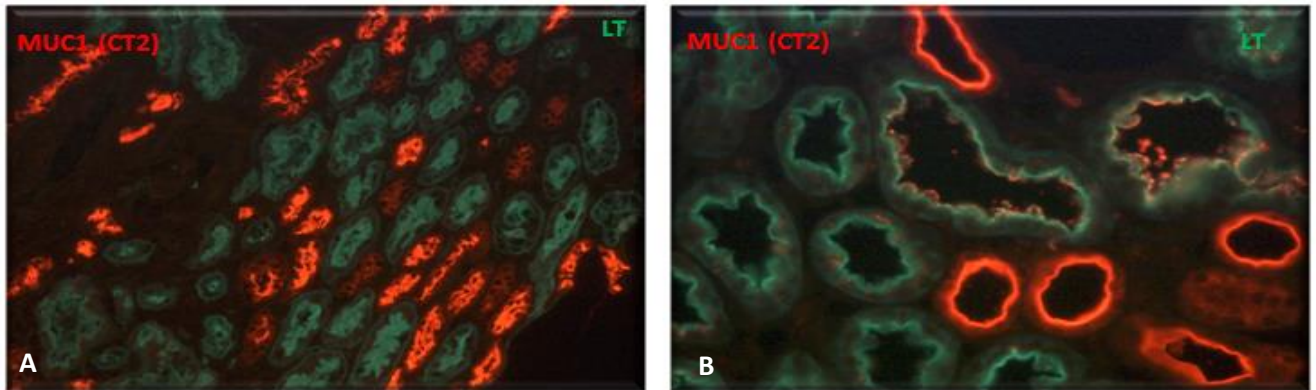


Figure 11 : Expression de MUC1 dans les tubules rénaux, d'après Gibier *et al.*, 2017. Immunofluorescence réalisée sur des biopsies de rein sain (A) ou issues de patients présentant une suspicion de nécrose tubulaire aiguë (B). Marquage LT (Lectine *Lotus tetragonolobus*, FITC) vert spécifique des TCP ; marquage rouge spécifique de MUC1. Grossissement x100.

Objectifs du projet

Ce projet s'articule autour du rôle de MUC1 en pathologie rénale. Nous nous sommes focalisés sur l'insuffisance rénale aiguë d'une part, et le carcinome rénal à cellules claires d'autre part. Bien que d'étiologies différentes, MUC1 peut constituer un dénominateur commun entre ces deux pathologies. Nos objectifs ont été :

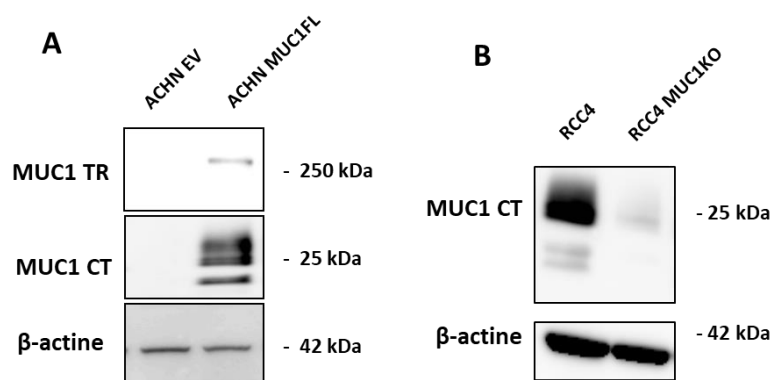
- Dans la chimiorésistance du carcinome rénal :
 - De caractériser les deux modèles cellulaires de carcinome rénal présentant une expression différente de MUC1
 - De déterminer la sensibilité de ces modèles à divers composés utilisés en thérapeutique
 - D'explorer les mécanismes pouvant conduire à la chimiorésistance des cellules de carcinome rénal
- Dans l'insuffisance rénale :
 - De caractériser et de valider le modèle d'atteinte rénale induite par le LPS
 - De mettre en évidence le rôle de MUC1 sur les voies de signalisation cellulaire induite par la stimulation du TLR4
 - De démontrer l'interaction entre MUC1 et TLR4 ainsi que le rôle de MUC1 sur le recrutement de MyD88

RESULTATS

Résultats partie 1 - chimiorésistance

I. Validation des modèles cellulaires

Les expériences ont été réalisées sur deux lignées cellulaires de carcinome rénal à cellules claires, les cellules ACHN et les cellules RCC4. La lignée ACHN a pour particularité de ne pas exprimer MUC1, alors que la lignée RCC4 exprime MUC1. La stratégie a donc été, pour les cellules ACHN, de surexprimer MUC1 par transfection stable ; pour les cellules RCC4, d'inhiber l'expression de MUC1 par une stratégie CRISPR/Cas9. Nous avons donc vérifié, par Western Blot, les expressions de MUC1 dans les différents clones utilisés. Le clone ACHN transfecté avec un vecteur vide (EV), mis en place dans notre équipe depuis 2014, ne présente aucune expression de MUC1, tandis que le clone transfecté avec un plasmide codant pour MUC1FL présente une forte surexpression de MUC1 (Figure 12 A). A l'inverse, dans les cellules RCC4, le clone non modifié présente une expression de MUC1 basale, mais cette expression est fortement diminuée dans le clone modifié par CRISPR/Cas9 (Figure 12 B).



Bouillez et al., 2014

Figure 12 : Expression de MUC1 dans les modèles cellulaires. Western-blot réalisés sur des lysats cellulaires de cellules ACHN (A) ou RCC4 (B). La révélation a été faite par des anticorps dirigés contre les parties TR ou CT de MUC1. Le contrôle de charge est vérifié grâce à l'homogénéité de l'expression de la β-actine.

II. Etude des propriétés de prolifération et de migration

Afin de caractériser les propriétés de ces modèles cellulaires, un suivi de la prolifération par mesure de la confluence cellulaire a été réalisé grâce à la technologie

Incucyte®. Les cellulesensemencées au nombre de 5000 par puits représentent environ 1% de la confluence totale du puits, fixant de ce fait un point de départ pertinent pour la prise de mesure. Dans les deux modèles, on peut noter une phase d'initiation sans augmentation réelle de la confluence dans les premières 24h, représentant le temps nécessaire pour les cellules de sédimer et de s'ancrer au fond du puits. Une fois ce laps de temps passé, on observe une augmentation de la confluence du puits, synonyme de prolifération des cellules. Pour les cellules ACHN EV, le puits est à 50% de confluence environ 96h après l'ensemencement, et la phase de plateau s'amorce après 156h soit plus de 6 jours (Figure 13 A). En revanche, on note que pour le clone ACHN MUC1+, la pente de la courbe est plus forte, avec une confluence de 50% atteinte en moins de 72h et un plateau atteint en 108h soit 4,5 jours. Pour les cellules RCC4, on observe relativement la même tendance de prolifération que pour les ACHN EV. En effet, la confluence de 50% est atteinte en quasiment 96h, et le plateau de confluence maximale s'installe vers 168h soit 7 jours après ensemencement (Figure 13 B). Pour les cellules RCC4 MUC1KO, la prolifération est beaucoup plus lente : le stade de 50% de confluence est atteint en environ 140h soit près de 6 jours. Le plateau de confluence maximale n'est d'ailleurs pas atteint sur la période de mesure. Un autre caractère spécifique des cellules cancéreuses a été évalué pour caractériser les modèles cellulaires : la capacité de migration. Pour mesurer cette capacité, des tests de réparation de blessure du tapis cellulaire ont été effectués. Sur un tapis cellulaire confluent, des blessures standardisées ont été réalisées grâce au Woundmaker (Essen Bioscience). Le pourcentage de confluence de la blessure, également mesuré grâce à l'Incucyte®, permet d'apprécier la vitesse de migration des cellules. On peut ainsi remarquer, dans les deux modèles, que la blessure est pratiquement refermée en 72h. Cependant, dans les cellules ACHN, on peut observer que les cellules du clone MUC1+ migrent plus vite que celles du clone EV. Cette augmentation s'observe dès 12h post-blessure sous forme d'une simple tendance mais qui devient statistiquement significative à partir de 24h ($55,8\% \pm 3,7$ pour le clone ACHN EV vs $80\% \pm 5,6$ pour le clone MUC1+, $p < 0,01$, Figure 13 C). Pour les cellules RCC4, on observe le même résultat que pour la prolifération : les cellules RCC4 MUC1KO prennent plus de temps pour refermer la blessure. La différence devient également statistiquement significative après 24h ($56,8\% \pm 0,8$ vs $39,4\% \pm 4,7$, $p < 0,01$, Figure 13 D).

Le modèle de transfection stable ACHN MUC1+ et le modèle d'inhibition par CRISPR/Cas9 RCC4 MUC1KO sont donc pertinents et fonctionnels pour étudier plus en détail la chimiorésistance induite par MUC1.

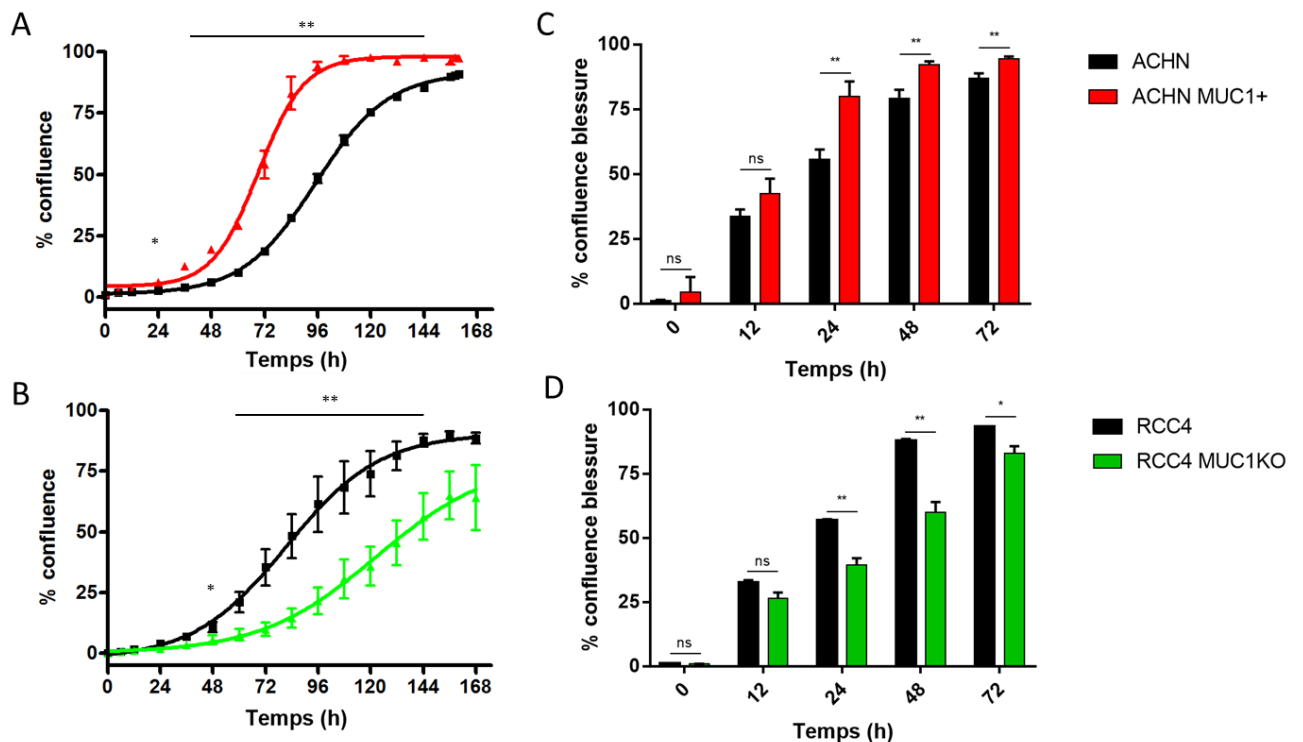


Figure 13 : Mesure des capacités de prolifération et de migration des modèles cellulaires. Mesure de la confluence du puits contenant des cellules ACHN EV et MUC1FL (A) ou RCC4 et RCC4 MUC1KO (B) par Incucyte®. Les cellules contrôles sont représentées par la courbe noire, les cellules ACHN MUC1+ en rouge et les cellules RCC4 MUC1KO en vert. Mesure de la confluence relative de la blessure réalisée par Woundmaker dans les cellules ACHN EV et MUC1FL (C) ou RCC4 et RCC4 MUC1KO (D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

III. Sensibilité des modèles aux molécules thérapeutiques

Nous avons ensuite traité les différents types cellulaires avec différentes molécules de chimiothérapie. Nous avons d'abord utilisé des molécules dites de chimiothérapies classiques puis des produits utilisés en thérapie ciblée (dans le cas du carcinome rénal à cellules claires, des ITK). Ces molécules ont été incubées pendant 72h avec les cellules, puis la viabilité cellulaire a été déterminée grâce au test MTS.

Les mesures d'absorbance décroissantes permettent ensuite de déterminer la concentration inhibitrice 50% (IC50), élément révélateur de la sensibilité des cellules à un produit donné. Comme attendu, on remarque que les cellules ACHN surexprimant

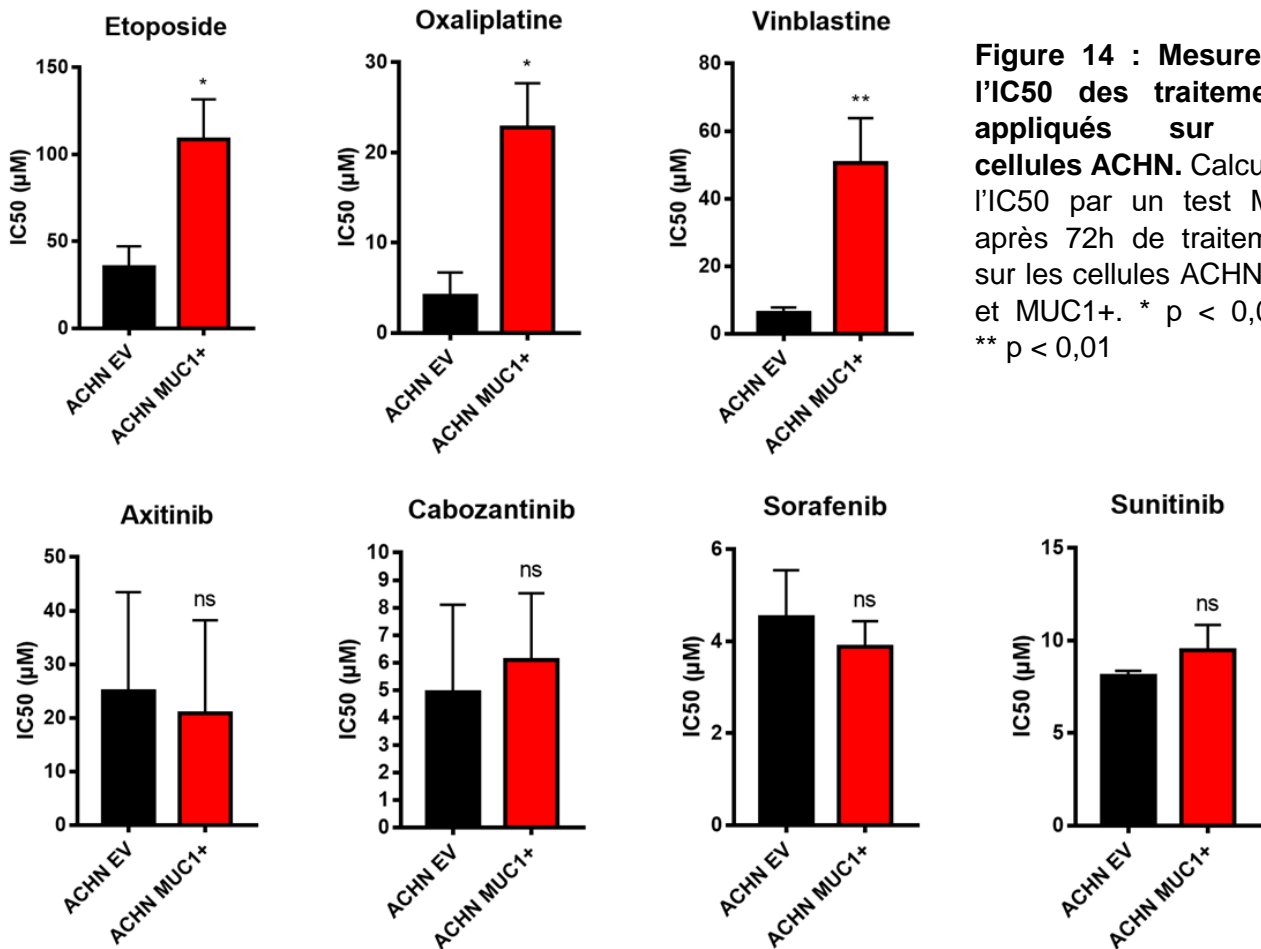
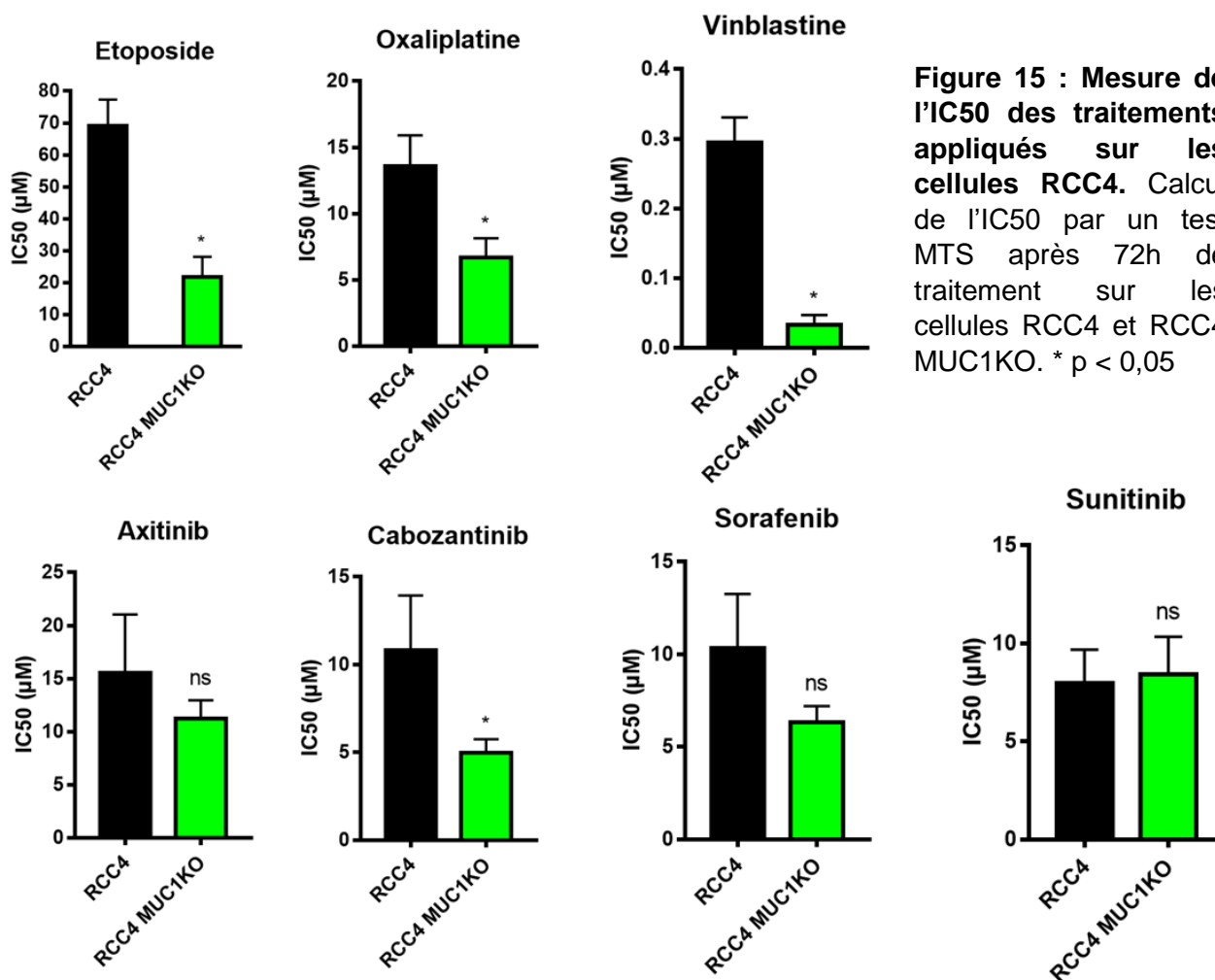


Figure 14 : Mesure de l'IC50 des traitements appliqués sur les cellules ACHN. Calcul de l'IC50 par un test MTS après 72h de traitement sur les cellules ACHN EV et MUC1+. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

MUC1 présentent une IC50 plus importante. Par exemple, pour l'étoposide, l'IC50 passe de 35 μM pour les cellules EV à 115 μM pour les cellules MUC1+ (Figure 14). Le même profil est obtenu avec les autres chimiothérapies classiques testées : oxaliplatine et vinblastine. En revanche, on n'observe aucune différence entre les IC50 des ITK testés : sunitinib, cabozantinib, sorafenib et axitinib, malgré une tendance pour le sunitinib mais qui reste non significative.

Concernant les cellules RCC4, la même tendance s'observe avec cette fois-ci une augmentation de la sensibilité des cellules MUC1KO par rapport aux cellules RCC4, ce qui se traduit par une IC50 plus faible (Figure 15). Comme pour les cellules ACHN, les ITK ne semblent pas avoir une différence d'action notable, sauf pour le cabozantinib (10,8 μM \pm 4,6 pour les cellules RCC4 vs 4,9 μM \pm 1,1 pour les cellules RCC4 MUC1KO). On observe néanmoins une tendance pour l'axitinib et le sorafenib.

Les cellules surexprimant MUC1 présentent donc une résistance plus importante aux différentes drogues de chimiothérapie classique testées. Cependant, la sensibilité des cellules aux ITK ne semble pas dépendre de MUC1.



IV. Expression et activité des transporteurs membranaires d'efflux

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'un des mécanismes les plus connus de chimiorésistance développée par les cellules : l'action des pompes d'efflux de la famille des transporteurs ABC. Cette famille regroupant de nombreuses protéines transmembranaires, nous nous sommes focalisés sur les six premiers membres du groupe ABCC (les plus étudiés) ainsi qu'ABCB1, connu sous le nom de glycoprotéine P (P-gp) et ABCG2, connu sous le nom de BCRP. Nous avons d'abord mesuré l'expression relative des gènes codant pour ces protéines par RT-qPCR. Dans les cellules ACHN, on remarque que l'expression de ces transporteurs est globalement

augmentée dans le clone MUC1+ (Figure 16 A). Par exemple, ABCC1 présente une augmentation d'expression relative de 3,8 fois ($\pm 1,05$), ABCC2 2,6 fois ($\pm 0,29$), ABCC3 3,4 ($\pm 0,17$) ABCC4 3,9 ($\pm 0,1$) et ABCC5 2,4 ($\pm 0,04$) dans les cellules ACHN MUC1+ par rapport aux cellules ACHN EV. En revanche, bien qu'on observe une légère tendance à l'augmentation, la différence d'expression n'est pas significative pour ABCC6. L'expression de la P-gp ne semble également pas impactée. L'augmentation d'expression la plus importante est retrouvée pour ABCG2, avec une expression relative 11,7 fois supérieure ($\pm 1,8$). Cette observation est concordante avec les résultats obtenus préalablement dans l'équipe : l'étude transcriptomique réalisée entre les cellules ACHN EV et ACHN MUC1+ a montré une surexpression nette du gène *ABCG2* dans les cellules surexprimant MUC1. Concernant les cellules RCC4, les différences sont moins importantes. On retrouve cette fois-ci des diminutions d'expression dans les cellules MUC1KO (Figure 16 B). On remarque d'abord que l'expression d'ABCC2 ne semble pas diminuer par rapport au clone RCC4 ($0,92 \pm 0,05$). Ensuite, aucune expression d'ABCG2 n'a été retrouvée dans les deux clones RCC4 ou MUC1KO. Concernant les autres gènes, on peut remarquer une inhibition de l'expression relative allant d'environ 15% pour ABCC3 à environ 75% pour ABCC6. L'expression d'ABCC1 est quant à elle inhibée à 30%.

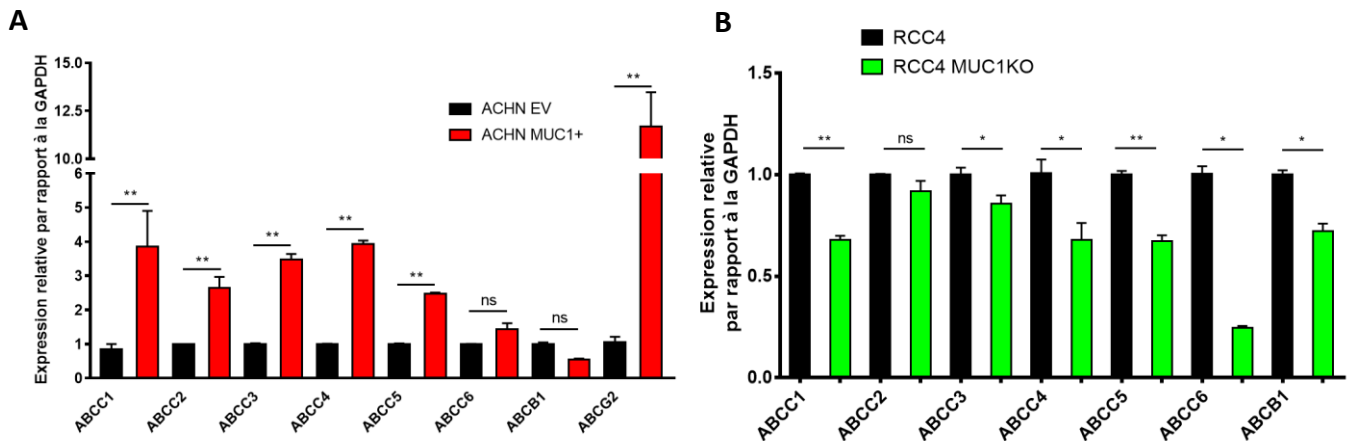


Figure 16 : Expression relative des transporteurs de la famille ABC. Expression relative mesurée par RT-qPCR et calculée par rapport à la GAPDH dans les cellules ACHN EV (noir) et MUC1+ (rouge) (A) ou RCC4 (noir) et RCC4 MUC1KO (vert) (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Nous avons ensuite choisi de mesurer, en plus de l'expression, l'activité de ces transporteurs membranaires grâce au kit EFLUXX ID Gold (Enzo®). Ce protocole repose sur une analyse en cytométrie en flux de la fluorescence des cellules traitées par un composé fluorescent et par des inhibiteurs spécifiques des pompes d'efflux. Les cellules sont d'abord mises en présence ou non des inhibiteurs de pompes. Ensuite, le composé d'intérêt est ajouté et pénètre dans les cellules pour y être métabolisé en un composé fluorescent. La cellule va naturellement chercher à expulser la molécule hors du compartiment cytoplasmique, ce qui entraîne une diminution de la fluorescence. Dans les cellules non traitées, on mesure ainsi une

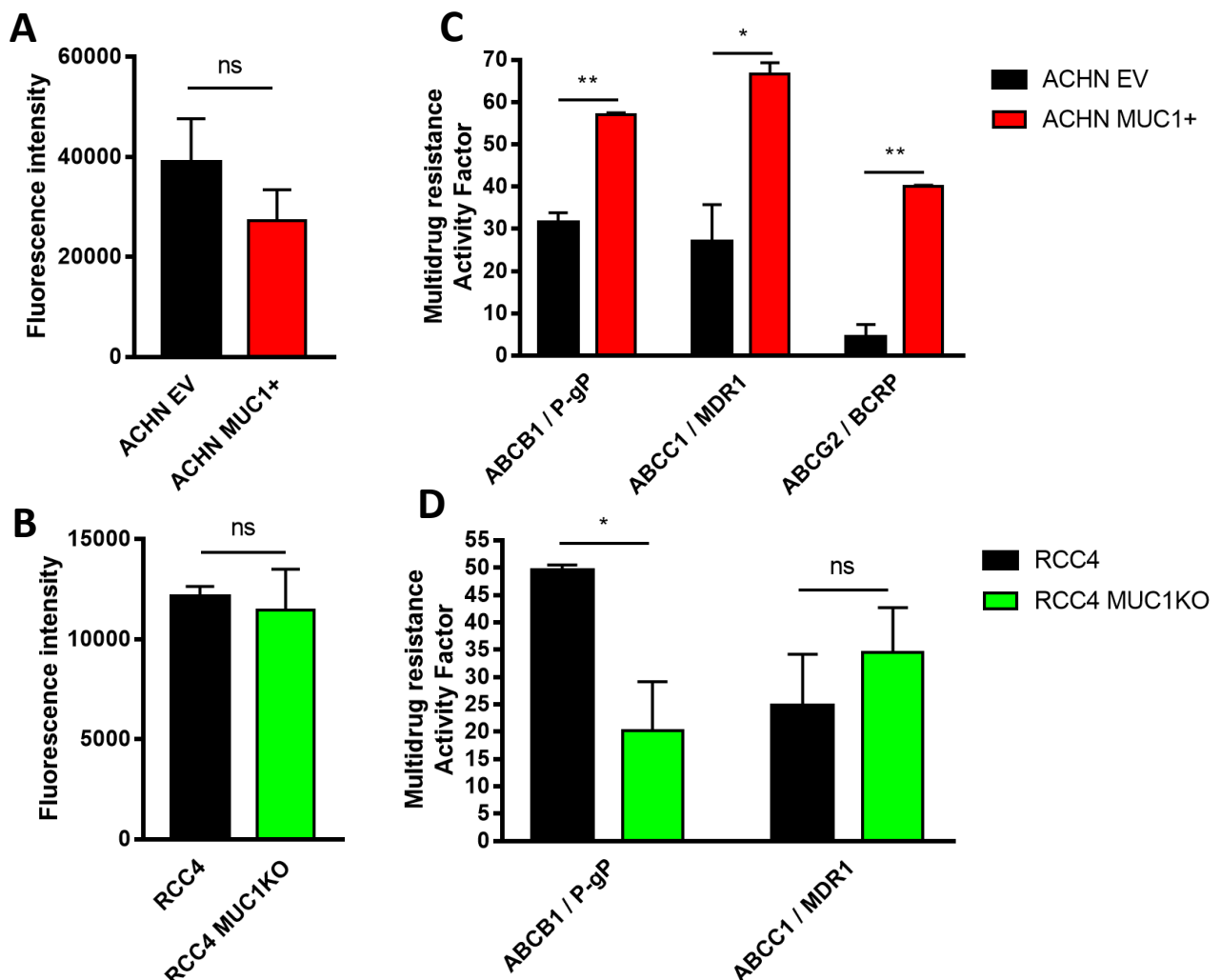


Figure 17 : Evaluation de l'activité des transporteurs d'efflux par cytométrie en flux. Mesure de la fluorescence moyenne par cellule détectée dans les cellules ACHN (A) ou RCC4 (B) après traitement avec le composé EFLUXX Gold. Calcul du facteur d'activité des transporteurs d'efflux après traitement des cellules par un inhibiteur spécifique dans les cellules ACHN (C) ou RCC4 (D) selon la formule $MAF = 100 \times (\text{Fluo inhib} - \text{Fluo initiale}) / \text{Fluo inhib}$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

fluorescence basale, résiduelle. Dans les cellules traitées par un inhibiteur spécifique, on s'attend à bloquer ce phénomène d'efflux du composé et donc un maintien de la fluorescence cellulaire. La différence mesurée entre les conditions « traité par inhibiteur » et « non traité par inhibiteur » permet de calculer un facteur d'activité du transporteur. Dans les expériences réalisées, nous n'avons pas observé de différence significative entre les fluorescences moyennes basales des deux groupes de cellules. En effet, les cellules ACHN MUC1+ semblent présenter une fluorescence moyenne plus faible que les cellules ACHN EV ($38\,994 \pm 8\,636$ vs $27\,178 \pm 6\,259$, $p = 0,33$) (Figure 17 A). Pour les clones RCC4 et RCC4 MUC1KO, la fluorescence semble également identique, sans pouvoir dégager une tendance particulière ($12\,642 \pm 498$ pour les cellules RCC4, $11\,455 \pm 2\,046$ pour les cellules RCC4 MUC1KO) (Figure 17 B). En revanche, le calcul du facteur d'activité, grâce à la formule $MAF = 100 \times (\text{Fluo inhib} - \text{Fluo initiale}) / \text{Fluo inhib}$ fait apparaître des différences. En effet, le clone ACHN EV présente une activité relative de $31,5 \pm 2,8$ pour la P-gp, $26,9 \pm 8,8$ pour MDR1 et $4,3 \pm 3,8$ pour BCRP. Cette activité monte respectivement à $57,1 \pm 0,4$ pour la P-gp, $66,7 \pm 2,6$ pour MDR1 et $40,1 \pm 0,2$ dans le clone ACHN MUC1+, suggérant ainsi une augmentation de l'activité de ces transporteurs d'efflux dans les cellules surexprimant MUC1. Pour les cellules RCC4, nous n'avons pas testé l'activité de la pompe BCRP étant donné l'absence de son expression dans les deux clones RCC4. Concernant la pompe MDR1, bien qu'ayant retrouvé une diminution d'expression au niveau transcriptionnel, nous n'observons pas de différence dans l'activité relative de cette pompe. La seule différence significative est retrouvée pour la P-gp, avec une activité relative qui passe de $49,5 \pm 1$ pour le clone RCC4 à $20,1 \pm 9$ pour le clone RCC4 MUC1KO ($p < 0,05$).

Les deux modèles présentent donc une modification dans l'expression des transporteurs de la famille ABC : une augmentation pour les cellules ACHN MUC1+ par rapport aux cellules ACHN EV, et une diminution pour les cellules RCC4 MUC1KO par rapport aux cellules RCC4. Cette modification d'expression s'accompagne aussi d'une modification de leur activité, avec une activité globalement plus importante dans les cellules qui surexpriment MUC1.

V. Importance de la transition épithélium-mésenchyme

Afin de pousser plus en avant notre étude de la chimiorésistance induite par MUC1, nous nous sommes intéressés à un phénomène largement étudié et associé à l'acquisition d'un phénotype résistant : la TEM. La première particularité et la plus facilement observable est le changement de morphologie : les cellules épithéliales en cours de TEM présentent un phénotype plus fusiforme. Nous avons pu observer ce phénomène dans nos deux modèles cellulaires. Pour les cellules ACHN, la TEM a été longuement étudiée dans l'équipe (Gnemmi et al., 2014). Les premières observations visuelles ont révélé une morphologie très différente entre les cellules ACHN EV (Figure 18 A) et les cellules ACHN MUC1+ (Figure 18 B). Les cellules ACHN s'organisent en amas, relativement bien délimités, et conservent une morphologie de type épithéliale avec des cellules de forme régulière. Concernant les cellules ACHN MUC1+, on peut remarquer que la forme est beaucoup plus fusiforme, signe d'un phénotype mésenchymateux. De plus, l'organisation semble plus anarchique, avec des cellules non organisées qui cherchent à s'étendre au maximum. Le modèle RCC4 et RCC4 MUC1KO, développé depuis peu, est encore non étudié. Les cellules RCC4, qui expriment MUC1, présentent effectivement un phénotype de cellules plutôt mésenchymateuses, avec de nombreux prolongements cytoplasmiques et une organisation en longs regroupements (Figure 18 C), tel qu'on a pu l'observer pour les cellules ACHN MUC1+. A l'inverse, pour le clone RCC4 MUC1KO, les cellules semblent plus épithéliales et mieux organisées, comme les cellules ACHN EV. (Figure 18 D).

Comme nous avons pu le montrer dans un paragraphe précédent, les cellules ACHN MUC1+ présentent une prolifération et une migration plus importante que les cellules ACHN EV, en faveur d'un phénotype plus mésenchymateux. A l'inverse, les cellules RCC4 MUC1KO présentent quant à elles des capacités de prolifération et de migration plus faibles que leurs contrôles RCC4. L'une des caractéristiques des cellules en TEM est également d'avoir un caractère invasif plus marqué. Nous avons choisi d'évaluer ce caractère grâce à des expériences d'invasion en chambre de Boyden recouverte de Matrigel. Le principe de cette expérience repose sur l'attractivité d'un milieu riche en sérum, situé de l'autre côté d'une membrane poreuse recouverte de Matrigel. Les cellules, par un effet chimioattractant, ont tendance à se diriger vers le milieu le plus riche. Pour cela, elles digèrent le Matrigel (faisant office de membrane basale) puis

migrent à travers les pores de la membrane. Le comptage du nombre de cellules retrouvées de l'autre côté de la chambre est révélateur du caractère invasif des cellules. Pour les cellules ACHN, nous pouvons observer une nette différence entre le nombre de cellules ACHN EV et ACHN MUC1+ ayant migré à travers la membrane : on retrouve en moyenne 58 cellules ACHN EV par champ et 104 cellules ACHN MUC1+ par champ, suggérant ainsi que les cellules MUC1+ ont une meilleure capacité à digérer la membrane basale et envahir le tissu (Figure 19 C). Par contre, bien que les résultats de prolifération et de migration soient significatifs, on n'observe pas de différence dans le caractère invasif des cellules RCC4 par rapport aux cellules RCC4 MUC1KO (27 cellules/champ vs 29 cellules/champ, respectivement) (Figure 19 F).

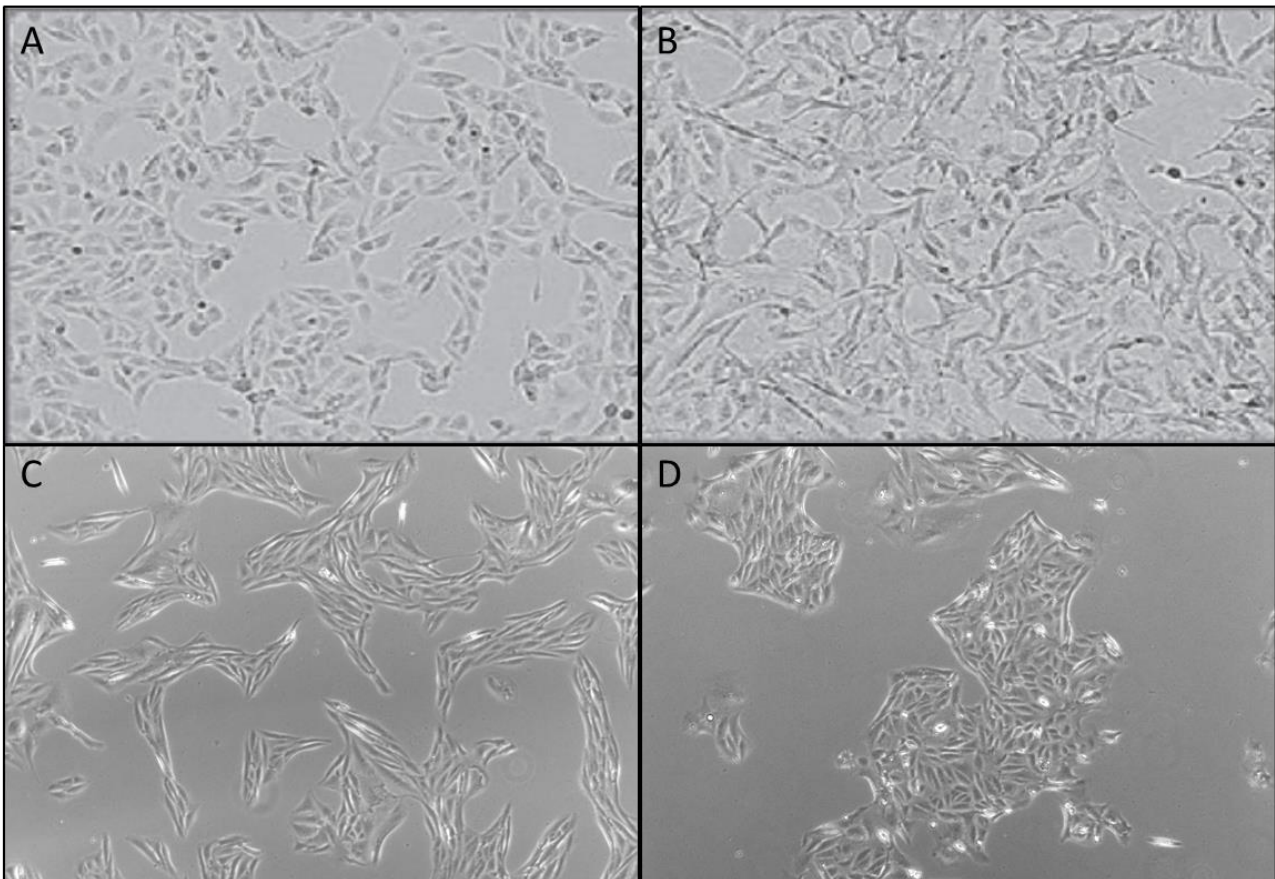


Figure 18 : Observation microscopique des cellules ACHN et RCC4. Cellules en culture issues du clone ACHN EV (A) et MUC1+ (B) d'après Gnemmi *et al.*, 2014 ou du clone RCC4 (C) et RCC4 MUC1KO (D), observées en microscopie optique au grossissement x200.

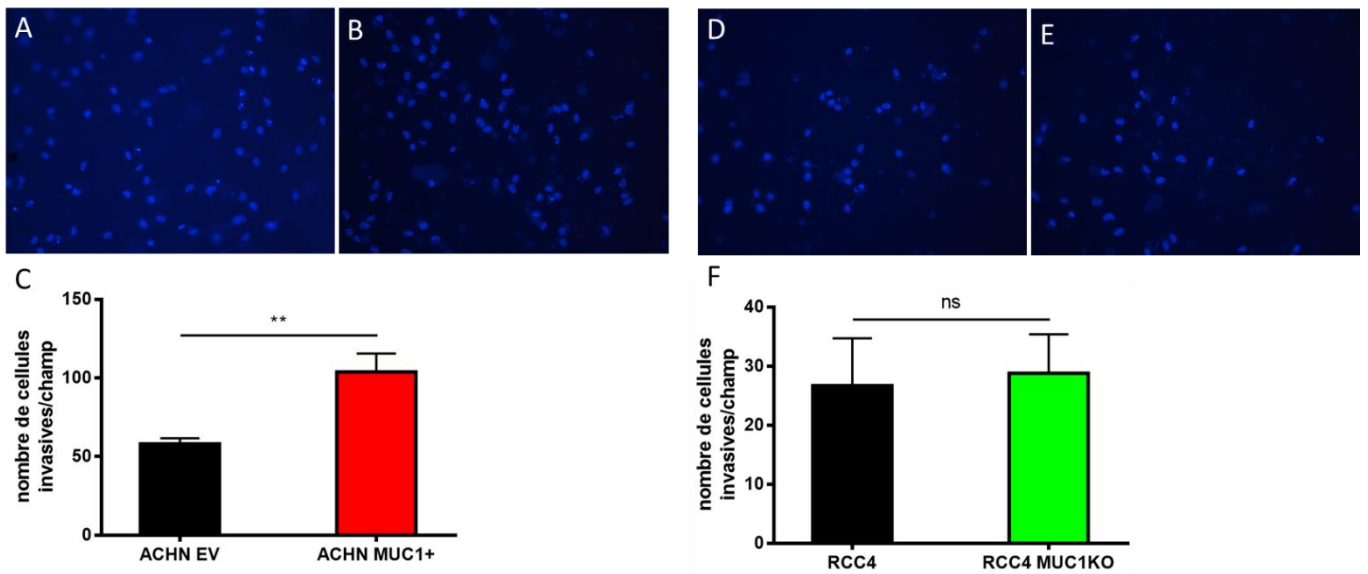


Figure 19 : Mesure du caractère invasif des cellules ACHN et RCC4. Observation microscopique des cellules ayant migré à travers la chambre de Boyden recouverte de Matrigel, après coloration au DAPI : cellules ACHN EV (A) et ACHN MUC1+ (B) ou cellules RCC4 (D) et RCC4 MUC1KO (E). Comptage du nombre moyen de cellules par champ puis comparaison statistique pour les cellules ACHN (C) et RCC4 (F). ** p < 0,01

Résultats partie 2 - inflammation

Nous avons mis en place un modèle murin d'exposition au LPS chez des souris mâles et femelles. Cependant, nous avons pu remarquer un « effet sexe » : les mâles présentent une réponse très faible voire nulle au traitement. Les résultats présentés sont donc ceux obtenus uniquement chez les femelles.

I. Résultats *in vivo*

A. Validation du modèle murin

1. Souffrance rénale

La première étape de vérification du modèle murin a été d'évaluer si l'injection de LPS entraîne bien une souffrance rénale. Habituellement, en clinique, le premier indice d'une IRA est la diminution de la fonction de filtration du rein. Dans ce modèle murin, nous avons choisi de mesurer la concentration sanguine en urée. En effet, en cas de dysfonctionnement rénal et donc de défaut d'élimination, on retrouve une augmentation de l'urémie. Les résultats obtenus sur le sérum des souris montrent que l'injection de LPS entraîne bien une augmentation de l'urémie par rapport à l'injection de PBS (Figure 20), et la concentration mesurée chez les souris KO Muc1 est significativement supérieure à celle mesurée chez les souris WT ($2,45 \pm 0,24$ mg/dL vs $1,91 \pm 0,16$ mg/dL, $p < 0,05$, respectivement).

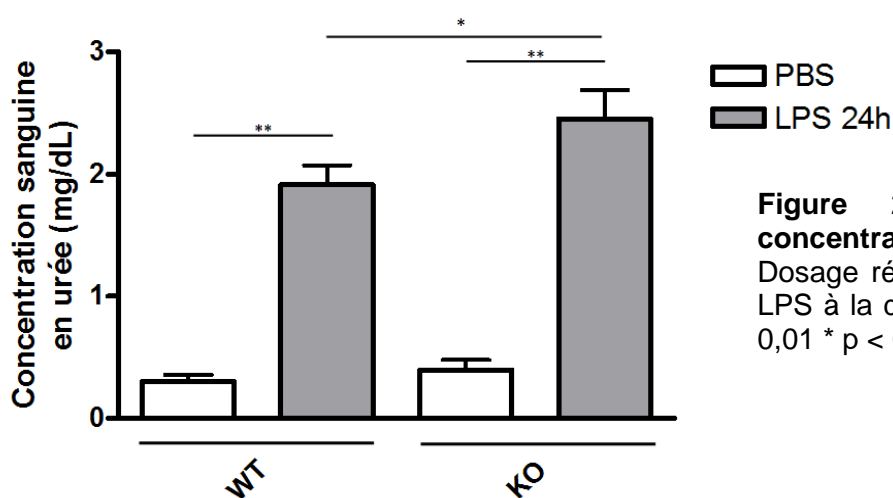
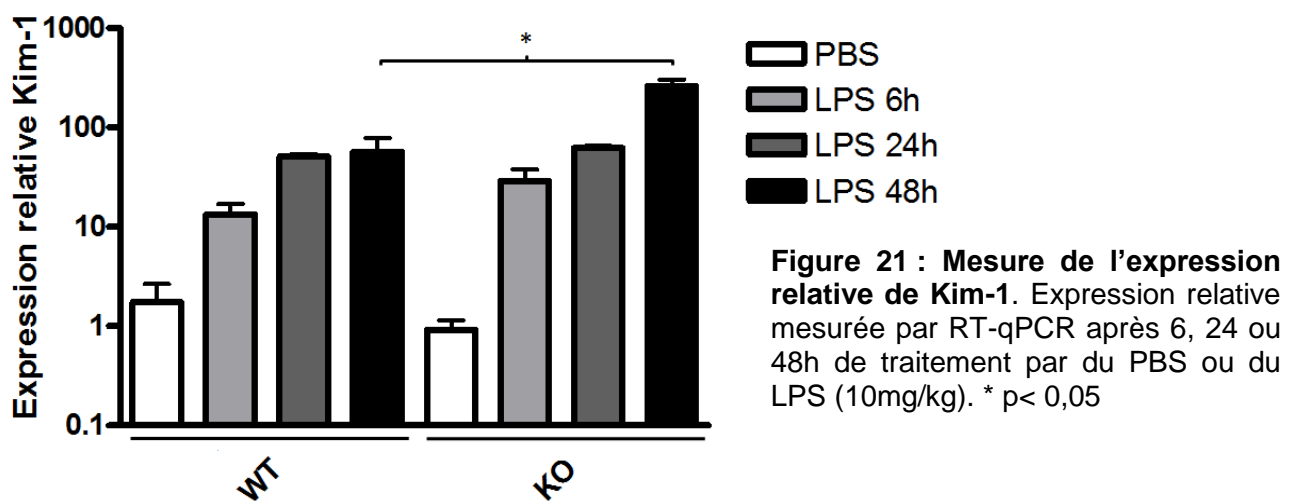


Figure 20 : Mesure de la concentration sanguine en urée. Dosage réalisé 24h après injection de LPS à la dose de 10mg/kg. n=3 ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

Un autre moyen de mettre en évidence l'atteinte rénale est de mesurer l'expression de Kim-1 (Kidney Injury Molecule 1). Cette molécule n'est peu ou pas exprimée à l'état basal dans un rein sain, mais son expression augmente fortement lors d'une atteinte rénale. Nous avons donc suivi l'expression de cette protéine dans les reins de souris selon une cinétique 6h-24h-48h de traitement au LPS. Nous pouvons ainsi observer, chez les souris WT, une augmentation de l'expression relative de Kim-1 dès 6h de traitement, et qui s'accroît après 24h (Figure 21). Cette augmentation se retrouve également chez les souris KO Muc1, dans des proportions qui semblent plus importantes sur les deux premiers points de la cinétique. Pour le temps 48h, on observe une expression relative de Kim-1 significativement supérieure chez les souris KO Muc1 par rapport aux souris WT ($x261 \pm 60$ vs $x57 \pm 30$, $p < 0,05$).



Le modèle d'injection de LPS mis au point entraîne donc une atteinte rénale, plus importante pour les souris KO Muc1 que pour les souris WT.

2. Expression de Tlr4 et de Muc1

Notre étude se focalisant sur le rôle de Muc1 sur la signalisation du Tlr4, nous avons ensuite mesuré l'expression de ces deux protéines dans notre modèle. Concernant Muc1, nous avons évalué son expression dans les souris WT, avec ou sans traitement au LPS. Le modèle de souris KO Muc1 est connu et validé depuis plus de 20 ans (Spicer *et al.*, 1995), nous n'observons donc pas d'expression de Muc1 à l'état basal et pas d'induction suite au traitement au LPS (résultat non présenté). Pour les souris

WT, en revanche, nous pouvons observer une augmentation de l'expression relative de Muc1 après 6h et 24h de traitement des souris au LPS ($3,5 \pm 0,5$; $4,4 \pm 1,5$ respectivement, Figure 22). Cependant, ce taux d'expression tend à se normaliser au cours du temps car on observe une diminution après 48h ($2,2 \pm 0,9$).

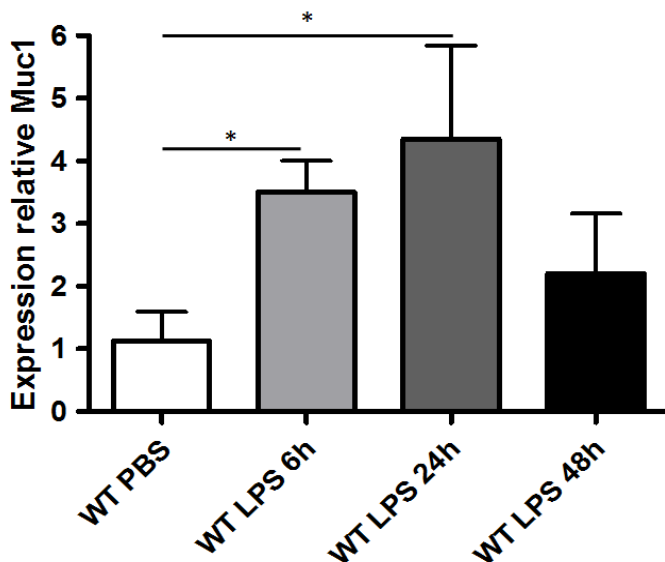


Figure 22 : Mesure de l'expression relative de Muc1. Expression relative mesurée par RT-qPCR après 6, 24 ou 48h de traitement par du PBS ou du LPS (10mg/kg) sur des reins de souris WT. * $p < 0,05$

Cette augmentation, visualisée au niveau transcriptionnel, n'est pourtant pas retrouvée au niveau protéique sur le rein total (Figure 23). En effet, le Western Blot réalisé sur un lysat de rein total montre que le traitement au LPS n'entraîne pas d'augmentation de l'expression protéique de Muc1.

Nous nous sommes ensuite intéressés au Tlr4, dont l'expression relative a été mesurée dans les souris WT et KO Muc1. On peut ainsi remarquer que malgré de nombreuses variations, on n'observe pas de différence significative dans l'expression du Tlr4 en fonction du statut génétique ou du traitement (Figure 24).

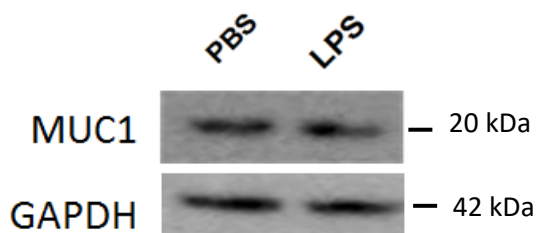


Figure 23 : Expression de Muc1 dans les souris WT. Western Blot réalisé sur des lysats de rein de souris WT après 24h de traitement au PBS ou au LPS (10mg/kg). La GAPDH est utilisé comme marqueur de charge.

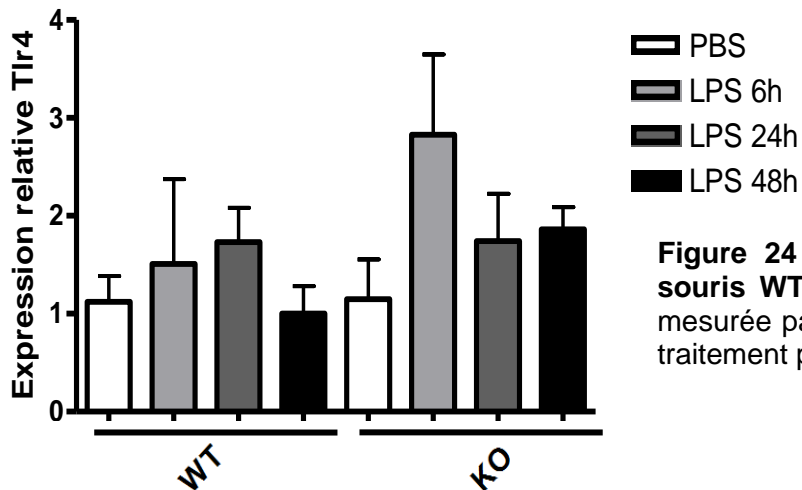


Figure 24 : Expression du Tlr4 dans les souris WT et KO Muc1. Expression relative mesurée par RT-qPCR après 6, 24 ou 48h de traitement par du PBS ou du LPS (10mg/kg).

3. Réponse inflammatoire

Après avoir mis en évidence une souffrance rénale au niveau biologique et étudié l'expression de nos protéines d'intérêt, nous avons cherché à quantifier la réponse inflammatoire. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'Il-6, une des cytokines pro-inflammatoires dont l'expression est augmentée lors de la stimulation du Tlr4. L'expression de cette cytokine est régulée par NF- κ B, située en aval de la cascade de signalisation et qui nécessite préalablement une translocation nucléaire. Nous avons donc vérifié, par immunohistochimie, si la localisation nucléaire de la sous-unité p-65 de NF- κ B était plus importante après injection de LPS (Figure 25). On peut ainsi observer que le traitement au LPS, chez les souris WT, induit une légère augmentation du nombre de noyaux marqués pour p65 après 6 et 24h ($3,5 \pm 1,5$; $7,1 \pm 2,2$ respectivement), puis une réduction après 48h ($2,5 \pm 0,5$). Par contre, chez les souris KO Muc1, l'injection de LPS entraîne une augmentation beaucoup plus importante du nombre de noyaux marqués p65 : après 6h de traitement, on observe en moyenne $30,8 \pm 5,2$ noyaux marqués ; après 24h $15,3 \pm 2,5$ noyaux marqués et après 48h $7,6 \pm 2,3$ noyaux marqués.

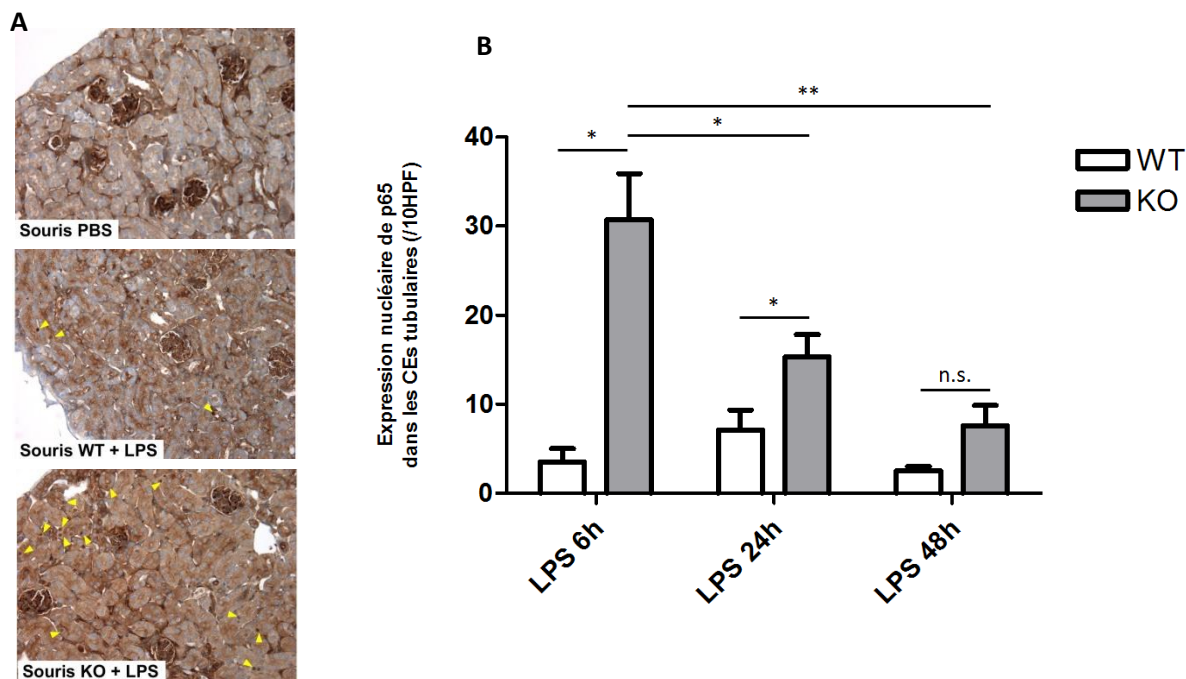
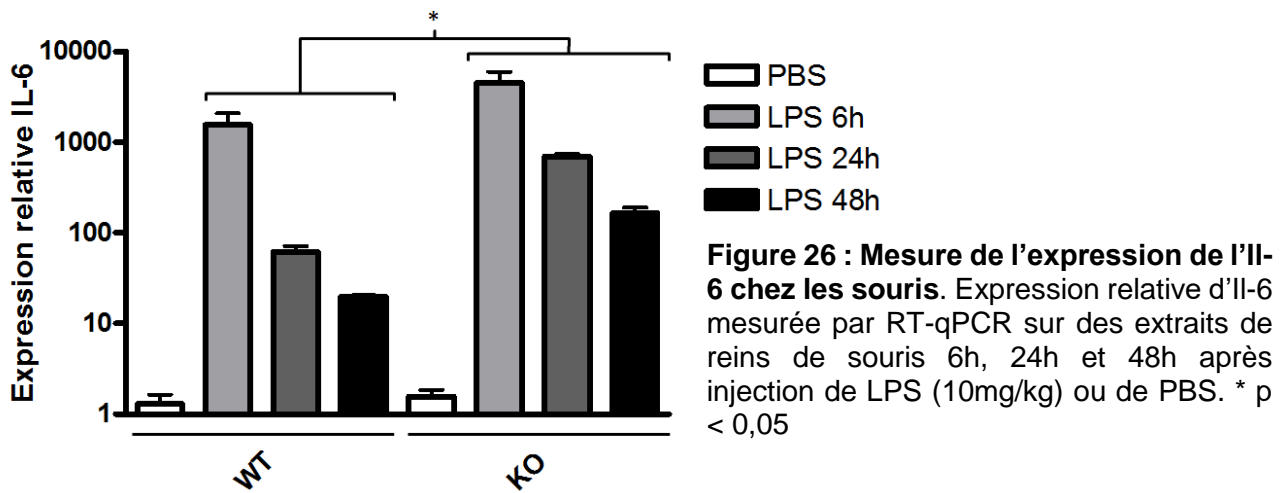
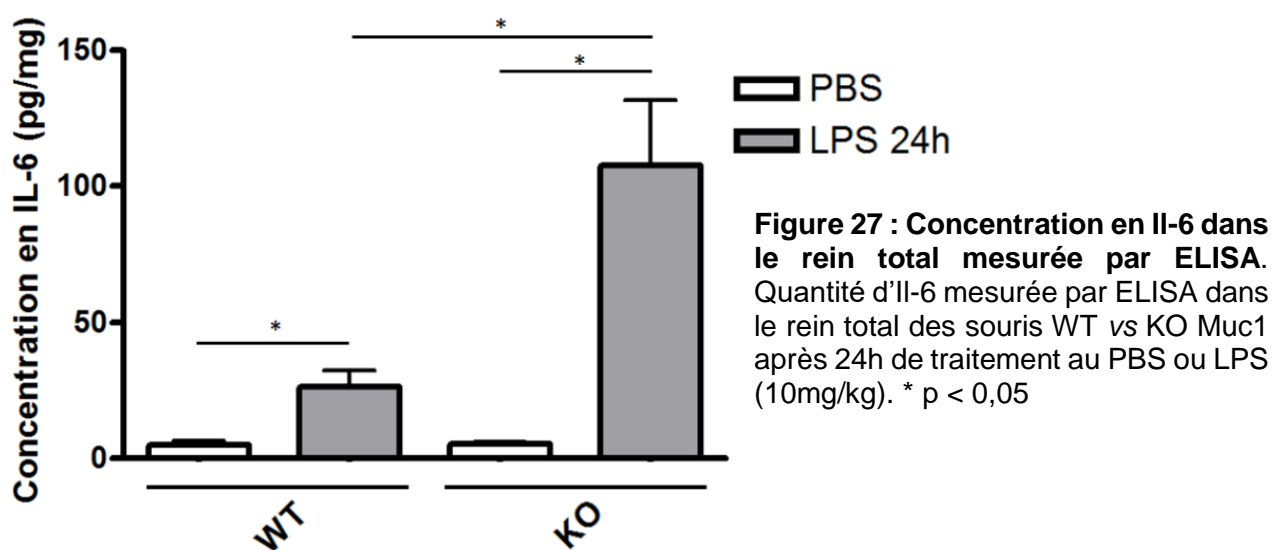


Figure 25 : Expression nucléaire de p65. (A) Immunohistochimie réalisée après 6h de traitement au LPS (10 mg/kg) ou PBS sur des reins de souris. Noyaux marqués par p65 indiqués par les flèches jaunes. (B) Comptage moyen des noyaux de cellules épithéliales marqués par p65 sur 10 champs observés en immunohistochimie sur des reins de souris. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'Il-6, afin de déterminer si la translocation nucléaire de p65 entraîne bien une activation de ses gènes cibles. Nous avons étudié l'expression relative de l'Il-6 au niveau transcriptionnel, par RT-qPCR (Figure 26). On peut ainsi observer que l'injection de LPS entraîne une augmentation rapide et importante de l'expression relative de l'Il-6, avec une expression plus de 1500 fois supérieure au contrôle PBS chez les souris WT après 6h de traitement. Cette expression diminue ensuite rapidement pour atteindre 20 fois à 48h. En revanche, chez les souris KO, cette augmentation est significativement supérieure pour les 3 points de la cinétique. En effet, l'expression relative d'Il-6 est environ 4500 fois supérieure au contrôle PBS 6h après l'injection chez les souris KO. On peut observer la même tendance à une décroissance rapide pour atteindre une expression 165 fois supérieure au contrôle après 48h.



Pour aller plus loin dans l'étude de l'expression de l'IL-6, nous avons directement mesuré la quantité de protéines produite par les cellules grâce à un test ELISA. Cette quantification a été réalisée 24h après l'injection de LPS, en rapportant la quantité mesurée à la quantité totale de protéines dosées. De la même manière que pour les ARNm, on observe une augmentation de la concentration en IL-6 après traitement au LPS chez les souris WT et KO Muc1, mais la concentration mesurée pour les souris KO est significativement supérieure à celle mesurée chez les souris WT ($101,7 \pm 25,2$ pg/mg vs $26,3 \pm 6,2$ pg/mg, respectivement, $p < 0,05$) (Figure 27).



Ces résultats présentent donc une réponse inflammatoire induite par l'injection de LPS plus importante chez les souris KO Muc1 que chez les souris WT.

II. Résultats *in vitro*

A. Validation du modèle cellulaire

Afin de déterminer de manière plus fine le rôle de MUC1 sur la signalisation du TLR4, nous avons utilisé un modèle cellulaire HEK-TLR4 (InvivoGen), qui a la particularité d'être transfecté de manière stable avec le TLR4 mais également avec MD2 et CD14, les deux co-récepteurs nécessaires à la fonctionnalité de la voie. Notre premier objectif sur cette lignée a été de valider le modèle et de vérifier si la stimulation au LPS

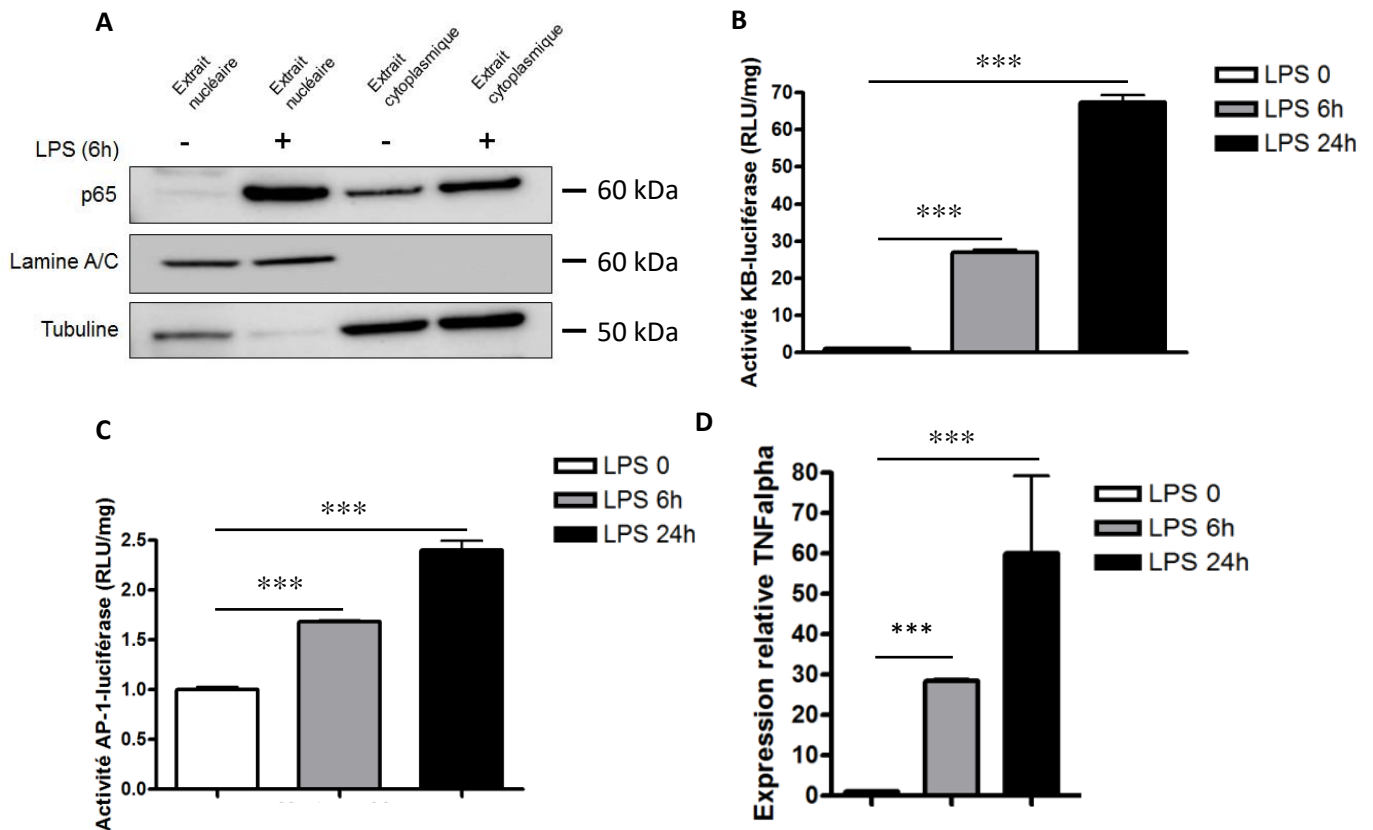


Figure 28 : Validation de la fonctionnalité du modèle cellulaire HEK-TLR4. (A) Western Blot réalisé après extraction nucléo-cytoplasmique sur des cellules ayant été traitées ou non au LPS. Contrôle nucléaire par la lamine A/C et contrôle cytoplasmique par la tubuline. (B et C) Mesure de l'activité luciférase exprimée en unité relative (RLU) rapportée à la quantité totale de protéines (mg), après transfection avec les vecteurs rapporteurs κ B-luc (B) ou AP-1-luc (C) n=4. (D) Expression relative du TNF α mesurée par RT-qPCR sur des extraits de cellules après 6h ou 24h de traitement au LPS ou sans traitement et transfectées avec un vecteur vide contrôle. *** p<0,005

s'accompagne d'une réponse cellulaire. Nous nous sommes focalisés sur l'aval de la cascade de signalisation, en vérifiant la localisation subcellulaire de p65. Nous pouvons ainsi observer que le traitement au LPS induit une augmentation globale de l'expression de p65 mais surtout une augmentation de sa localisation nucléaire (Figure 28 A). Comme évoqué dans le modèle murin, nous avons cherché à savoir si cette translocation nucléaire s'accompagne d'une activité transcriptionnelle, en mesurant l'activité des deux facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 grâce à des vecteurs rapporteurs luciférase comportant des éléments de réponse à ces 2 facteurs. Après 6h et 24h de traitement, l'activité κ B-luciférase est de 27,1 RLU/mg de protéines \pm 1,4 puis 67,4 RLU/mg de protéines \pm 3,9 (Figure 28 B). La même tendance est observée pour l'activité AP-1-luciférase, avec 1,7 RLU/mg de protéines \pm 0,03 après 6h et 2,4 RLU/mg de protéines \pm 0,2 après 24h (Figure 28 C). Enfin, nous nous sommes focalisés sur l'expression du TNF α , l'un des gènes cibles commun à ces voies. L'expression relative mesurée par RT-qPCR montre une augmentation à 6h de 28 fois par rapport au contrôle, et de 60 fois à 24h (Figure 28 D). Le modèle cellulaire HEK-TLR4 est donc fonctionnel.

B. Rôle de MUC1 sur la signalisation du TLR4

Les cellules HEK n'exprimant pas MUC1 à l'état basal, nous avons vérifié que la transfection d'un vecteur d'expression de MUC1 entraîne effectivement une expression de la protéine grâce à un Western Blot (Figure 29).

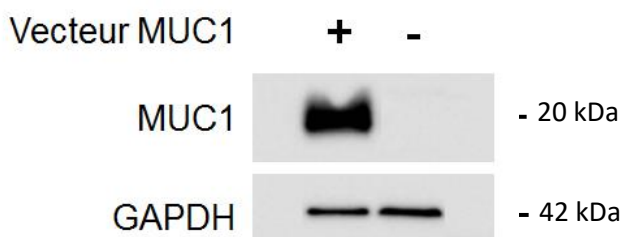


Figure 29 : Vérification de l'expression de MUC1 après transfection transitoire. Western Blot réalisé sur un extrait total après 48h de transfection avec un vecteur d'expression de MUC1. Contrôle de charge réalisé par la GAPDH.

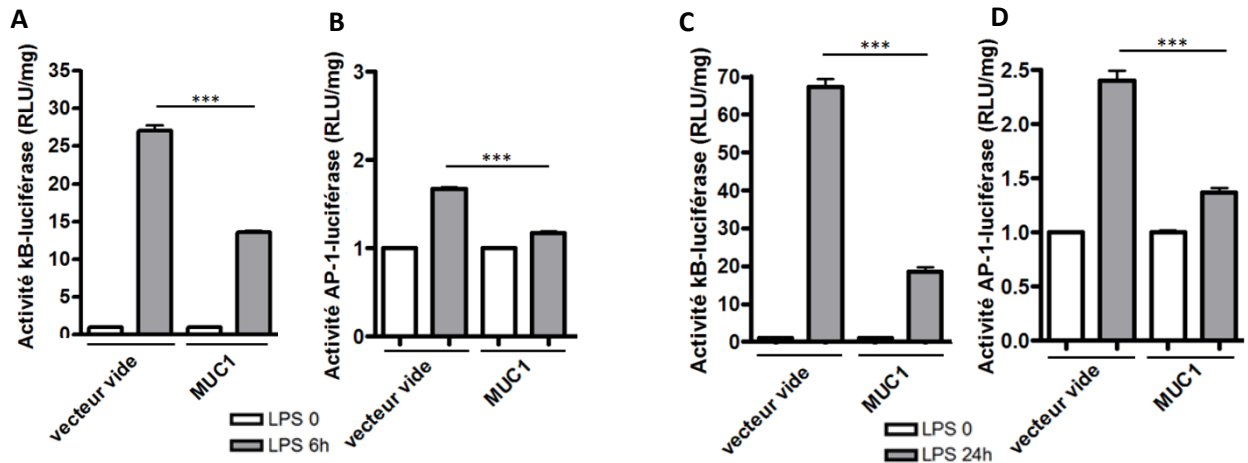


Figure 30 : Mesure des activités κ B- et AP-1-luciférase après transfection de MUC1. Activité luciférase mesurée après un traitement LPS de 6h (A et B) ou 24h (C et D) et après co-transfection du vecteur plasmidique codant pour MUC1 et des vecteurs rapporteurs κ B-luc (A et C) ou AP-1-luc (B et D). *** $p < 0,005$

Nous avons ensuite repris les mesures d'activité κ B- et AP1-luciférase, cette fois-ci après avoir transfecté le vecteur d'expression codant pour MUC1 FL. Par rapport à la condition où MUC1 n'est pas exprimée, on remarque une diminution des activités luciférase pour les deux plasmides rapporteurs, et aussi bien à 6h qu'à 24h. En effet, les activités κ B-luciférase qui étaient de $27,1 \text{ RLU/mg} \pm 1,4$ à 6h de traitement LPS et $67,4 \text{ RLU/mg} \pm 3,9$ à 24h, diminuent respectivement à $13,6 \text{ RLU/mg} \pm 0,3$ (Figure 30 A) et $18,5 \text{ RLU/mg} \pm 2,3$ (Figure 30 B). De même, pour les activités AP-1-luciférase, on passe de $1,7 \text{ RLU/mg} \pm 0,03$ après 6h et $2,4 \text{ RLU/mg} \pm 0,2$ après 24h à $1,2 \text{ RLU/mg} \pm 0,04$ (Figure 30 C) et $1,4 \text{ RLU/mg} \pm 0,08$ (Figure 30 D), respectivement. L'expression du $\text{TNF}\alpha$ a elle aussi été quantifiée après transfection de MUC1 et stimulation au LPS.

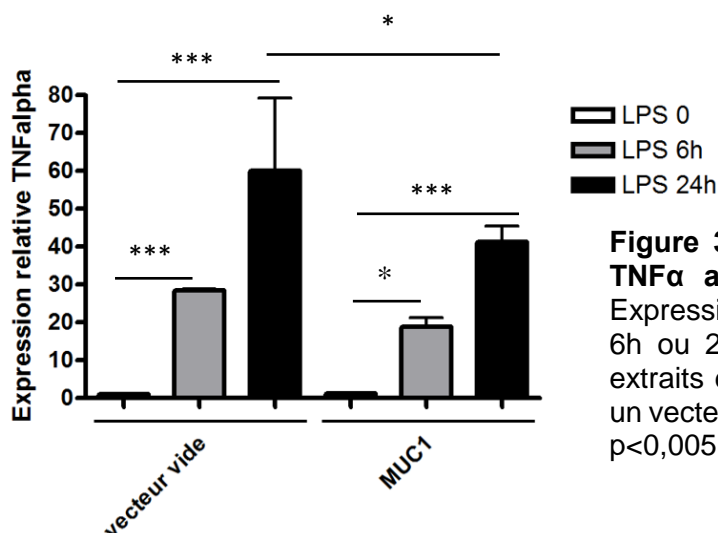


Figure 31 : Mesure de l'expression relative du TNF α après transfection d'un vecteur MUC1. Expression relative mesurée par RT-qPCR après 0, 6h ou 24h de traitement au LPS sur des ARNm extraits de cellules HEK TLR4 et transfectées avec un vecteur vide ou un vecteur codant pour MUC1. *** $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Bien que la stimulation soit toujours efficace (mise en évidence par une augmentation de l'expression relative du TNF), on remarque que cette augmentation est plus modérée dans les cellules surexprimant MUC1, et ce surtout après 24h de traitement au LPS (Figure 31).

Muc1 entraîne donc une inhibition de la voie de signalisation du TLR4, avec pour conséquence une diminution de l'expression de ses gènes cibles.

C. Détermination du domaine de MUC1 impliqué dans l'inhibition de la signalisation du TLR4

Enfin, pour terminer l'étude du rôle de MUC1 sur la signalisation du TLR4, nous avons cherché à savoir si les domaines fonctionnels de MUC1 étaient impliqués dans l'inhibition de la voie de signalisation. Nous nous sommes intéressés aux domaines TR et CT. L'équipe dispose de vecteurs d'expression codant pour MUC1 délétée pour son TR (dTR) et pour MUC1 délétée pour sa queue cytoplasmique (dCT). Nous les

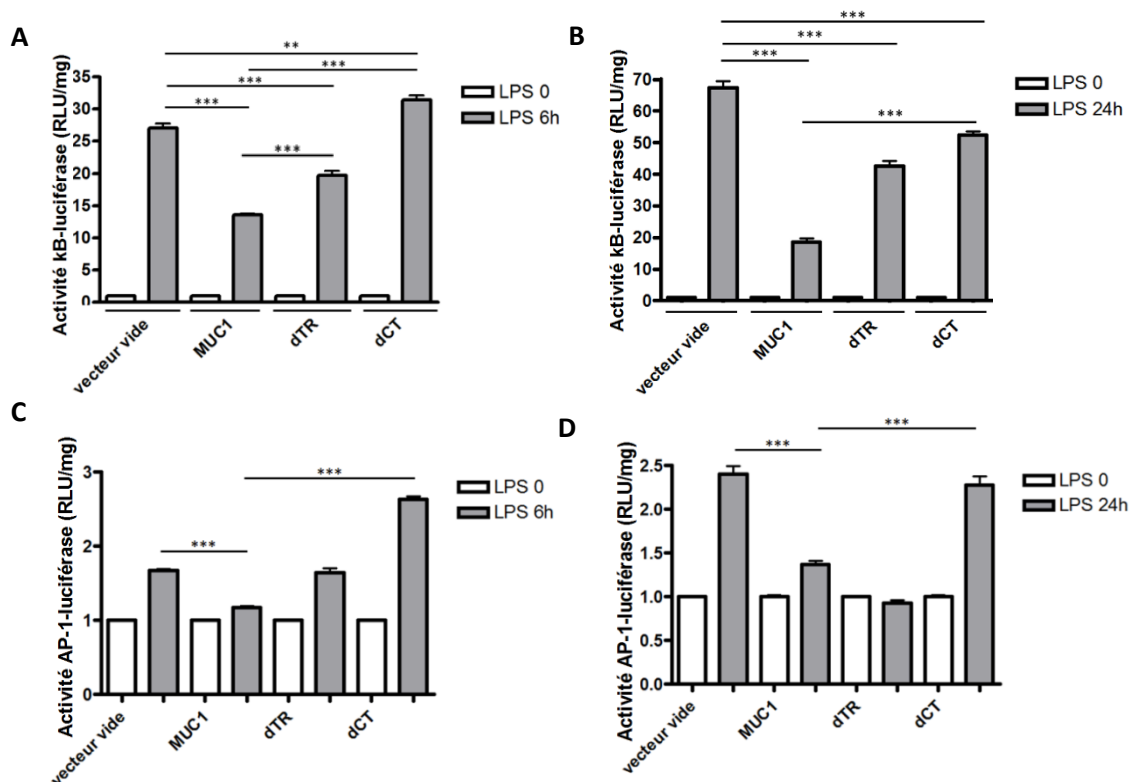


Figure 32 : Mesure des activités luciférase après transfection des vecteurs MUC1, MUC1 dTR et MUC1 dCT. Activité κB-luciférase mesurée après 6h (A) ou 24h (B) de traitement LPS. Activité AP-1-luciférase mesurée après 6h (C) ou 24h (D) de traitement LPS. Co-transfection de vecteurs d'expression vide ou codant pour MUC1, MUC1 dTR ou MUC1 dCT. *** p<0,005 ; ** p<0,01

avons donc transfecté dans les cellules HEK-TLR4 et réalisé les mêmes études d'activité luciférase, après 6h ou 24h de traitement au LPS ou sans traitement. Pour l'activité κ B-luciférase, comme présenté précédemment, la transfection du vecteur MUC1 entraîne une diminution de l'activité κ B-luciférase par rapport au vecteur vide, après 6 et 24h de traitement. Cependant, on remarque que la transfection des deux vecteurs MUC1 dTR et dCT entraîne un retour partiel à l'activité basale mesurée avec le vecteur vide. On peut également noter que l'activité κ B-luciférase mesurée après la transfection du vecteur MUC1 dCT et après 6h de traitement est significativement supérieure au contrôle vecteur vide ($31,5 \text{ RLU/mg} \pm 1,3$ vs $27,1 \text{ RLU/mg} \pm 1,4$) (Figure 32 A et B). Pour l'activité AP-1-luciférase, on remarque le même motif, avec une activité au même niveau que le contrôle vecteur vide après transfection du vecteur MUC1 dTR et 6h de traitement, et une activité supérieure avec la transfection du vecteur MUC1 dCT. De manière intéressante, pour le temps 24h, on remarque que la transfection du vecteur MUC1 dTR n'entraîne aucune modification de l'activité luciférase avec ou sans traitement LPS. Cependant, on retrouve bien le retour à l'activité basale mesurée avec le vecteur vide pour la transfection du vecteur MUC1 dCT (Figure 32 C et D).

D. Etude de l'interaction entre MUC1 et TLR4

La littérature disponible mentionne que le rôle de MUC1 sur la signalisation d'autres membres de la famille des TLR (en particulier TLR3 et 5) passe par une interaction directe empêchant le recrutement des protéines adaptatrices. Nous avons donc émis, dans notre cas, l'hypothèse de l'existence d'un complexe MUC1-TLR4, possiblement associé à des protéines adaptatrices. Afin de répondre à cette question, la première technique envisagée a été la co-immunoprécipitation (co-IP), suivie de la révélation par Western Blot. Cependant, cette technique nécessite des anticorps validés reconnaissant les protéines. Dans notre cas, la difficulté de mettre au point un anticorps reconnaissant le TLR4 nous a amené à transfecter les cellules avec un plasmide codant pour TLR4HA (TLR4 marqué par 3 molécules d'hémagglutinine) et de réaliser la co-IP non pas avec un anticorps anti-TLR4 mais avec un anticorps anti-HA. Nous avons donc co-transfecté les cellules HEK-TLR4 avec les vecteurs plasmidiques codant respectivement pour MUC1 et TLR4HA, puis réalisé l'immunoprécipitation grâce aux billes magnétiques Dynabeads (Invitrogen)

présentant soit l'anticorps anti-MUC1 soit l'anticorps anti-HA. La révélation a été faite par Western Blot, avec également soit l'anticorps anti-MUC1 soit l'anticorps anti-HA. On peut ainsi retrouver nos deux protéines d'intérêt lorsque l'immunoprécipitation et la révélation sont faites avec le même anticorps (Figure 33, rectangles bleus). Le résultat intéressant est retrouvé lorsqu'on immunoprécipite avec l'anticorps anti-HA et qu'on révèle avec l'anticorps anti-MUC1 : on observe bien que TLR4HA et MUC1 ont co-précipité ensemble (Figure 33, rectangle vert). En revanche, la réciproque n'est pas vérifiée dans nos expériences : nous n'avons pas réussi à mettre en évidence le TLR4HA après immunoprécipitation par anti-MUC1 et révélation par anti-HA (Figure 33, rectangle rouge), malgré plusieurs tentatives. Ce résultat encourageant mais

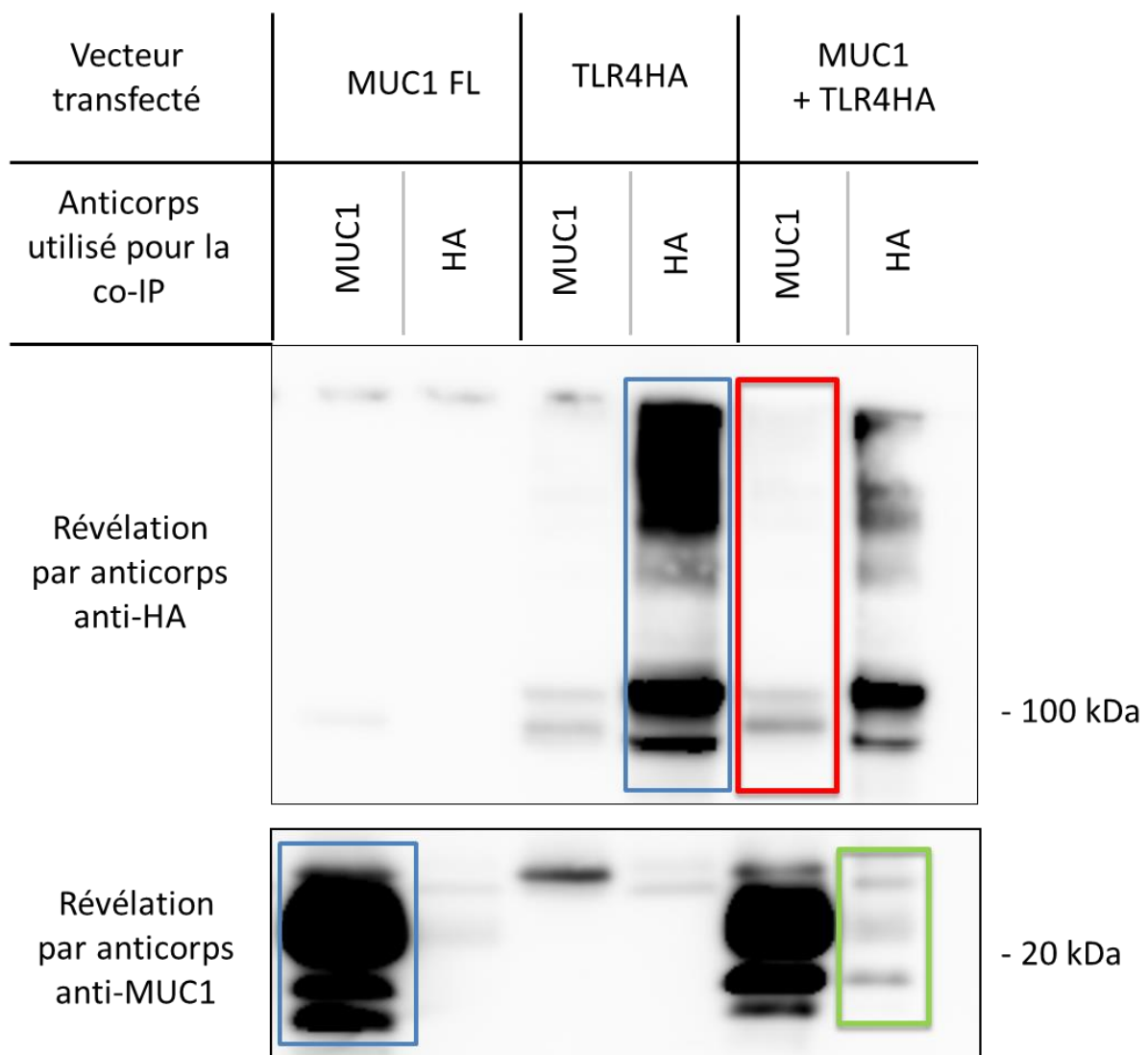


Figure 33 : Co-immunoprécipitation MUC1-TLR4HA. Co-IP réalisée sur un lysat de cellules transfectées MUC1, TLR4HA ou MUC1+TLR4HA. Immunoprécipitation réalisée avec des billes magnétiques Dynabeads puis révélation par Western Blot.

néanmoins incomplet nous a poussé à utiliser une deuxième technique de mise en évidence de macro-complexes moléculaires : le Proximity Ligation Assay (PLA). Le principe du PLA est l'émission d'un signal fluorescent sous forme de spot en cas d'interaction entre deux membres d'un complexe moléculaire. Nous avons appliqué la même stratégie que pour la co-IP, à savoir la transfection préalable d'un vecteur codant pour TLR4HA. Pour assurer un contrôle de transfection, nous avons également ajouté un plasmide codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein).

Dans la première expérience, nous avons cherché à montrer l'interaction entre MUC1 et TLR4HA, au niveau basal et après stimulation au LPS. Dans la condition où le vecteur vide a été transfecté, on n'observe aucun marquage significatif dans les cellules avec ou sans traitement au LPS (Figure 34 A et B). Cela permet cependant

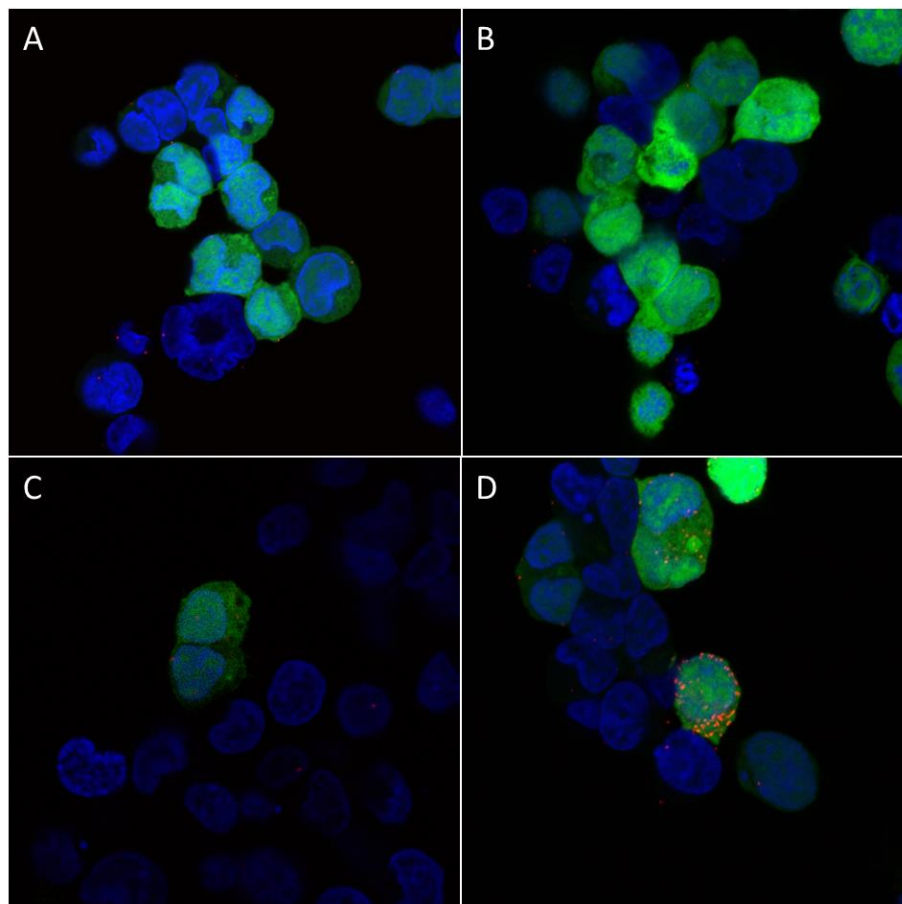


Figure 34 : Proximity Ligation Assay (PLA) réalisé entre les protéines MUC1 et TLR4HA. PLA réalisé sur les cellules HEK-TLR4 transfectées avec la GFP et soit un vecteur vide (A, B) soit un vecteur codant pour MUC1 (C, D), non traitées (A, C) ou traitées au LPS (B, D). Marquage nucléaire au DAPI (bleu) et cytoplasmique à la GFP (vert). Signal positif du PLA représenté par le marquage en spots (rouge). Grossissement x400

d'évaluer le bruit de fond. La transfection avec le vecteur MUC1 sans traitement n'induit pas de marquage non plus, signe que les deux protéines ne colocalisent pas à l'état basal (Figure 34 C). Cependant, l'ajout de LPS entraîne l'apparition d'un signal membranaire dans les cellules transfectées, suggérant un recrutement de MUC1 au niveau du TLR4 uniquement en présence de son ligand (Figure 34 D).

Dans la seconde expérience, nous nous sommes focalisés sur le complexe MyD88-TLR4. En effet, MyD88 est une protéine adaptatrice dont le recrutement et l'interaction avec le TLR4 sont nécessaires pour la transduction du signal. Le but est de déterminer si l'ajout de LPS entraîne bien le recrutement de MyD88 au niveau du TLR4, et si la présence de MUC1 diminue ce recrutement. On peut ainsi observer que MyD88 semble présent au niveau membranaire dans chaque condition (Figure 35). On peut remarquer cependant un signal plus important chez les cellules transfectées avec le vecteur vide et traitées au LPS (Figure 35 B), par rapport aux cellules traitées mais transfectées avec MUC1 (Figure 35 D). Pour affiner ce résultat visuel, nous avons quantifié le nombre de spots par cellule transfectée (verte) grâce à un logiciel automatisé (Qupath). Le seuil de positivité du signal a été fixé à 5 spots/cellule afin de s'affranchir du bruit de fond résiduel du marquage. On observe ainsi, de manière quantitative, que les cellules transfectées vecteur vide et traitées au LPS présentent un marquage plus important (en moyenne 38 spots/cellule transfectée avec une médiane à 29) par rapport aux cellules transfectées MUC1 (en moyenne 22 spots/cellule transfectée avec une médiane à 17) (Figure 36).

Nous pouvons ainsi conclure qu'il existe effectivement un complexe membranaire MUC1-TLR4 lors de la stimulation des cellules au LPS. Cette interaction entraîne une inhibition quantitative du recrutement de MyD88, qui se traduit *in fine* par une diminution de l'activation de la voie de signalisation du TLR4.

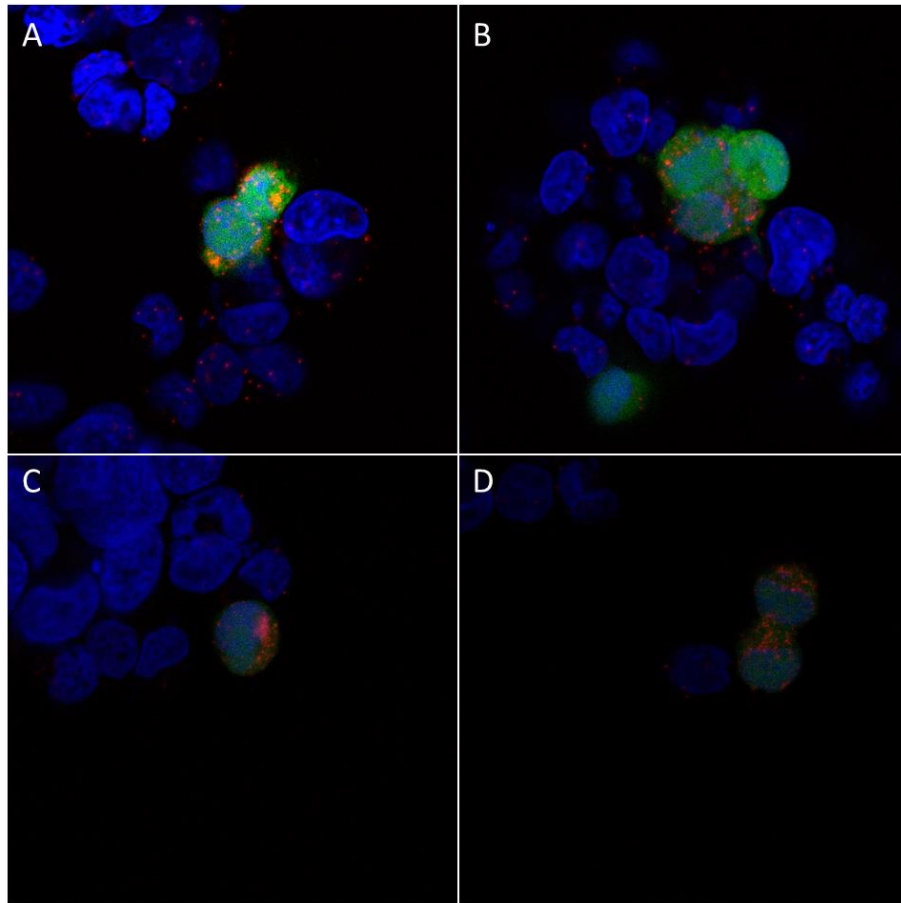


Figure 35 : Proximity Ligation Assay (PLA) réalisé entre les protéines MyD88 et TLR4HA. PLA réalisé sur les cellules HEK-TLR4 transfectées avec la GFP et soit un vecteur vide (A, B) soit un vecteur codant pour MUC1 (C, D), non traitées (A, C) ou traitées au LPS (B, D). Marquage nucléaire au DAPI (bleu) et cytoplasmique à la GFP (vert). Signal positif du PLA représenté par le marquage en spots (rouge). Grossissement x400

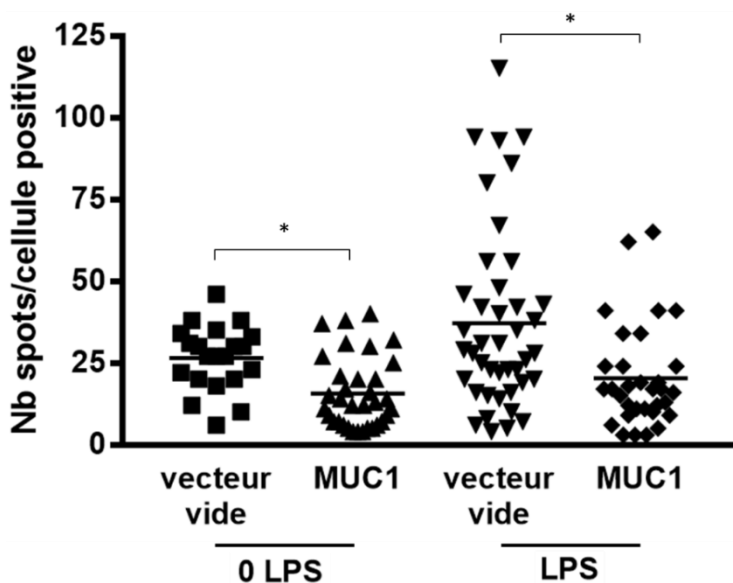


Figure 36 : Quantification du signal de PLA observé entre MyD88 et TLR4HA. Comptage automatisé du nombre de spots par cellule réalisé sur un minimum de 20 cellules positives (vertes) dans au moins 5 champs différents. * $p < 0,05$

DISCUSSION

Discussion et perspectives

I. Partie 1 – chimiorésistance

A. Discussion

MUC1 est une glycoprotéine fortement O-glycosylée exprimée à la surface d'un grand nombre de cellules épithéliales. Dans les pathologies tumorales, MUC1 a été longuement étudiée. En effet, plus de 2/3 des cancers tous organes confondus surexpriment MUC1. De manière intéressante, la protéine surexprimée se caractérise par une hypoglycosylation. Dans le carcinome rénal à cellules claires, notre équipe a déjà confirmé les résultats obtenus dans d'autres organes. Nous avons en effet pu montrer qu'un rein sain exprime MUC1 au niveau des TCD et des TC (Leroy et al., 2002). Dans le cas d'un cancer localisé, l'analyse immunohistochimique a montré une augmentation franche de l'expression de MUC1, d'autant plus marquée en cas de cancer métastatique. Une corrélation a de plus été retrouvée entre la délocalisation cytoplasmique de MUC1 et le mauvais pronostic du CRCC. Nous avons également pu montrer qu'il ne s'agit pas d'une simple corrélation, MUC1 étant impliqué directement dans le processus d'initiation tumorale. En effet, *MUC1* est un gène cible de la voie de l'hypoxie médiée par HIF1 α , voie majeure de cancérogenèse rénale (Aubert et al., 2009). Il existe de plus une boucle de régulation positive, car MUC1 peut également stabiliser HIF1 α et entraîner la régulation positive d'autres gènes impliqués dans l'angiogenèse, la résistance à l'apoptose, le métabolisme... (Chaika et al., 2012). Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence le rôle de MUC1 dans les propriétés des cellules tumorales. L'une de ces propriétés, la TEM, a été largement approfondie, et nous avons pu conclure que MUC1 est impliquée dans une boucle de régulation avec les différents acteurs transcriptionnels de la TEM, en particulier le facteur SNAIL (Gnemmi et al., 2014). Le travail présenté ici s'intéresse aux mécanismes de chimiorésistance du CRCC. Ces mécanismes revêtent une importance particulière, en effet le CRCC est connu comme l'un des cancers les plus chimio- et radorésistants. Il s'agit d'un réel problème de santé publique car l'arsenal thérapeutique à la disposition des cliniciens ne repose actuellement que sur des molécules dites de thérapie ciblée, comme les inhibiteurs de mTOR, les ITK et certaines immunothérapies. La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre, à terme, de rétablir une chimiosensibilité à des molécules plus communes. Dans cette optique, nous avons

développé des modèles cellulaires pertinents pour l'étude du rôle de MUC1 dans la chimiorésistance. Nous avons choisi deux lignées cellulaires commerciales de carcinome rénal : les cellules ACHN et les cellules RCC4. Ces 2 lignées se caractérisent par leur niveau d'expression de MUC1 : en effet, les cellules ACHN sont l'une des rares lignées de carcinome rénal n'exprimant pas du tout MUC1 à l'état basal. A l'inverse, les cellules RCC4 sont caractérisées par une expression de MUC1. Notre groupe, dès 2014, a mis en place un modèle de surexpression de MUC1 dans les cellules ACHN, obtenu par la transfection d'un vecteur plasmidique codant pour la forme complète de MUC1 (reprenant les domaines importants de la protéine, à savoir le TR et le CT). En revanche, le second modèle nécessite une inhibition de l'expression de MUC1. Pour les premières études, notre équipe avait choisi les cellules 786-O (une lignée de CRCC surexprimant MUC1), pour lesquelles l'inhibition de MUC1 avait été faite grâce à une stratégie d'ARN interférent basée sur les shRNA (short hairpin RNA). Cependant, suite à la transfection stable des constructions de shRNA ciblant *MUC1* puis au clonage, nous avons observé une perte progressive de la capacité d'inhibition par les shRNA au cours du temps. Nous avons donc naturellement cherché à créer un modèle stable afin de faciliter les expériences, grâce à la technique CRISPR/Cas9. Cette technique relativement récente permet le ciblage de la séquence d'ADN d'intérêt à inhiber grâce à un ARN guide puis l'action d'une endonucléase qui clive la séquence reconnue et enfin la réparation de la cassure par recombinaison homologue. Notre premier choix s'était porté sur les cellules 786-O : malgré de nombreux essais et une double transfection séquentielle des plasmides guides, nous n'avons pas réussi à obtenir une inhibition suffisante de MUC1 par cette technique, probablement à cause de l'hypertriploïdie des cellules 786-O et la présence d'un trop grand nombre d'allèles de MUC1. Nous avons donc choisi une autre lignée cellulaire disponible au laboratoire, la lignée RCC4. La stratégie CRISPR/Cas9 appliquée à ces cellules a permis une inhibition quasi-totale de l'expression de MUC1 dans les cellules. On pourra noter une expression résiduelle très faible de MUC1 dans le clone RCC4 MUC1KO choisi. Cependant, cette expression résiduelle n'est pas suffisante pour combler les différences obtenues dans les mesures des propriétés de prolifération et de migration.

Pour évaluer les capacités de prolifération et de migration, nous avons utilisé l'Incucyte, qui permet un suivi en temps réel de la confluence cellulaire tout en maintenant les cellules dans un environnement optimal (température, taux de CO₂ et

humidité). Pour la prolifération, nous avons simplement suivi l'augmentation de confluence du puits après ensemencement dans une plaque de culture standard. Pour la migration, la blessure a été faite grâce à un peigne standardisé dans le tapis cellulaire puis nous avons mesuré le retour à la confluence totale de la blessure. On peut ainsi remarquer que dans les deux populations cellulaires, les cellules qui surexpriment MUC1 (les cellules ACHN MUC1+ ou les cellules RCC4) présentent un caractère prolifératif et une capacité de migration plus importants que les cellules n'exprimant pas MUC1 (les cellules ACHN EV ou les cellules RCC4 MUC1KO). Ces deux phénomènes ont été mesurés sur une période de temps différente : en effet, la prolifération a été suivie sur 168h soit une semaine, tandis que la fermeture de la blessure dans le test de migration n'a pris que 72h. L'estimation du temps de doublement de nos lignées (autour de 72 à 96h) permet ainsi de conclure sur le fait que le test de blessure mesure bien la migration intrinsèque des cellules et non simplement une prolifération plus importante. De plus, dans notre protocole (Bouillez et al., 2014), le milieu de croissance des cellules n'est pas changé pendant la période de suivi, ce qui explique que la prolifération n'atteint parfois pas le plateau aux alentours de 100% de confluence.

Concernant les tests fonctionnels de chimiorésistance, nous avons réalisé des tests simples MTS, après avoir incubé les cellules avec des doses croissantes de molécules de chimiothérapies classiques et ciblées. La mesure des absorbances pour chaque concentration permet d'établir une courbe dose/réponse, et ainsi calculer l'IC50. Une IC50 plus haute traduit donc une résistance plus importante à la molécule testée. On peut ainsi observer, pour les drogues classiques de chimiothérapie, une augmentation significative de l'IC50 pour les cellules qui surexpriment MUC1, laissant suggérer le fait que MUC1 est impliquée dans la chimiorésistance. Cependant, cet effet retrouvé pour les drogues classiques n'est pas aussi net pour les ITK testés, avec parfois aucune différence dans les IC50. Une explication à cette absence de différence peut se trouver dans le mécanisme d'action de ces ITK. En effet, parmi les RTK inhibés, on retrouve le VEGFR, impliqué dans la néo-angiogenèse. Il est donc difficile d'observer un effet anti-angiogénique sur une monoculture de cellules cancéreuses. L'effet thérapeutique s'apprécie plutôt *in vivo*, dans un environnement complexe faisant intervenir la cellule cancéreuse et la cellule endothéliale.

Dans notre étude des mécanismes de chimiorésistance, nous nous sommes focalisés sur l'expression et l'activité des transporteurs d'efflux de la famille des ABC, en particulier du groupe C (ABCC) codant pour les protéines MRP. Ces protéines transmembranaires assurent un transport actif de molécules au travers de la membrane cellulaire. En situation physiologique, les substrats majoritaires sont des produits de diverses voies métaboliques : prostaglandines, dérivés stéroïdiens, conjugués du glutathion,... Ces pompes d'efflux prennent donc en charge une grande diversité de substrats. La proximité structurale entre de nombreux composés à visée thérapeutique et des molécules physiologiques implique que ces composés thérapeutiques soient eux-mêmes pris en charge par les pompes d'efflux, avant d'avoir pu exercer leur action au niveau intracellulaire. La cellule qui présente une expression et une activité de ces transporteurs plus importante possède de ce fait un avantage de survie indéniable face au traitement. Nous avons pu montrer, par RT-qPCR, qu'il existe une corrélation positive entre l'expression de MUC1 et l'expression de ces transporteurs : les cellules surexprimant MUC1 présentent aussi une expression plus importante des gènes *ABCC*. A l'inverse, les cellules dans lesquelles on ne retrouve pas d'expression de MUC1 sont caractérisées par une expression plus faible de ces gènes. Nous ne nous sommes pas focalisés sur le mécanisme exact de régulation des gènes *ABC* par MUC1 dans les modèles cellulaires de carcinome rénal. Cependant, des éléments de réponse ont été apportés par d'autres équipes, en particulier dans le cancer du pancréas. Par exemple, Nath *et al.* ont pu montrer que deux mécanismes pouvaient être à l'origine de ce phénomène. Selon leur première hypothèse, MUC1 peut activer directement la voie PI3K/Akt, qui a entre autres comme gènes cibles le gène *ABCC1*. Après son clivage, MUC1 peut également stabiliser des facteurs de transcription au niveau nucléaire, sur le promoteur du gène *ABCC1*, ce qui a pu être mis en évidence par des expériences de CHIP (Nath *et al.*, 2013b). Ce type de mécanisme a également été proposé par une équipe chinoise pour expliquer la résistance des cellules HeLa au paclitaxel (Jin *et al.*, 2017). Des expériences de CHIP ont montré que MUC1 est retrouvé sur le promoteur d'*ABCB1*, grâce à une interaction avec l'EGFR. L'hypothèse d'une régulation directe de MUC1 sur les promoteurs de gènes cibles par la stabilisation de facteurs de transcription pourrait donc être attrayante dans nos modèles également. Lorsqu'on transpose ce résultat *in vivo*, il est facile de faire un parallèle avec les cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, l'idée d'une cellule cancéreuse qui présente une résistance accrue au traitement (et

qui donc persiste dans la tumeur) se rapproche de la définition même d'une cellule souche cancéreuse. Cette idée prend tout à fait sens lorsqu'on s'intéresse aux marqueurs de CSC : parmi les marqueurs les plus utilisés (OCT4, SOX2, NANOG, CD133), on retrouve également ABCG2 (Ding et al., 2010). Enfin, cet argument se retrouve également dans le fait que MUC1, parmi ses nombreux rôles dans l'initiation et la progression tumorale, est également impliquée dans la promotion du phénotype souche et la plasticité cellulaire (Stroopinsky et al., 2013). Cependant, le rôle de ces transporteurs dans la dédifférenciation des cellules épithéliales en cellules souches reste mal connu.

Afin de pouvoir conclure sur l'activité à proprement parler des protéines d'efflux, nous avons ensuite réalisé un suivi de la fluorescence intracellulaire par cytométrie en flux. Ce test simple consiste en une incubation des cellules avec un composé qui sera métabolisé une fois dans le cytoplasme en une molécule fluorescente, dont l'intensité sera proportionnelle à la quantité présente dans la cellule. Ce composé, non essentiel pour la cellule, sera donc pris en charge par les pompes d'efflux précédemment mentionnées. L'intensité de fluorescence diminuera donc, et de manière proportionnelle à l'activité des transporteurs. A l'état basal, une cellule d'intensité faible sera donc caractérisée par une activité importante de ses pompes d'efflux. Le protocole proposé par le fabricant intègre l'utilisation d'inhibiteurs de ces pompes, afin de pouvoir calculer un rapport entre les fluorescences (cellule traitée avec un inhibiteur vs cellule non traitée) qui correspond à un facteur d'activité relatif de la pompe étudiée. Le premier fait notable est que pour les deux lignées, l'intensité moyenne de fluorescence n'est pas significativement différente, malgré une tendance à la baisse pour les cellules ACHN MUC1+. Ensuite, lorsqu'on met en regard expression et activité, on remarque que parfois la modification d'expression ne s'accompagne pas forcément d'une modification d'activité (comme pour ABCC1 dans les cellules RCC4) ou inversement, qu'une modification d'activité n'est pas due à une modification d'expression (ABCB1 pour les cellules ACHN). L'une des explications pourrait venir de la nature des inhibiteurs utilisés. En effet, pour les expériences de cytométrie, nous avons utilisé le vérapamil, le MK-571 et la novobiocine comme inhibiteurs de MDR1 (ABCB1), MRP1 (ABCC1) et BCRP (ABCG2) respectivement. Bien que présentés comme spécifiques, les nombreuses similarités structurales entre les protéines de la famille ABC impliquent donc que la spécificité de chaque inhibiteur n'est pas absolue

et qu'un même inhibiteur peut avoir une action sur différentes pompes proches en terme de structure. Une équipe de chimistes allemande a d'ailleurs proposé de nouveaux types de composés inhibant spécifiquement BCRP, sans inhiber les autres pompes (Pick et al., 2010) Ces résultats mettent donc en lumière le fait que les deux expériences (expression et activité) sont indissociables et doivent être analysées en parallèle afin d'avoir une vision globale du processus.

Dans un contexte clinique, l'étude des transporteurs ABC devient en revanche plus complexe. En effet, l'analyse des données du TCGA montre que, dans les CRCC, la surexpression des transporteurs ABCB1 et ABCG2, par exemple, est associée à une meilleure survie des patients, en dehors de toute notion de traitement. De plus, un point intéressant est que malgré les observations faites dans les cellules, il ne semble pas y avoir de corrélation positive entre l'expression de MUC1 et des transporteurs, ce qui semble logique car MUC1 est plutôt associée aux cancers de mauvais pronostics. Enfin, la prise en compte des traitements administrés aux patients peut encore compliquer la compréhension de tous ces mécanismes imbriqués : en effet, certaines études ont pu montrer que les ITK avait également un rôle inhibiteur sur les transporteurs membranaires (Beretta et al., 2017), bien qu'ils ne soient pas eux-mêmes des substrats de ces pompes (Jiao et al., 2018). Les problématiques soulevées par l'étude de ces transporteurs (expression, activité, inhibition) sont donc d'une importance indéniable, car l'idée d'en faire des cibles thérapeutiques a rapidement émergé. De nombreux composés sont actuellement à l'étude afin d'ajouter de nouvelles molécules dans l'arsenal thérapeutique disponible (Cui et al., 2015). Enfin, nous nous sommes intéressés à la TEM, processus connu pour faciliter l'acquisition d'un phénotype associé à la résistance. Les études déjà réalisées par notre équipe ont montré que les cellules ACHN présentent une différence importante de morphologie, avec des cellules ACHN MUC1+ plutôt fusiformes, caractéristique des cellules mésenchymateuses. L'étude des propriétés de prolifération et de migration, mais également de l'invasion confirme le phénotype mésenchymateux de ces cellules par rapport aux cellules ACHN EV. Pour les cellules RCC4, en revanche, il est plus difficile de faire une distinction nette entre les deux clones. En effet, nous avons pu observer des modifications dans les études de prolifération et de migration (avec des cellules RCC4 MUC1KO qui présentent une prolifération et une migration moins importante que les cellules RCC4). Par contre, nous n'avons vu aucune différence dans les

propriétés d'invasion, mesurées en chambre de Boyden. Loin d'être problématique, cette observation est un argument en faveur du caractère dynamique et réversible de la TEM. Les cellules présentent rarement tous les caractères de l'un ou l'autre des phénotypes (épithélial ou mésenchymateux), il s'agit plutôt d'un état fluctuant, en fonction des paramètres extérieurs. On pourrait ainsi considérer les cellules RCC4 comme en TEM partielle. Il est maintenant communément admis que la TEM partielle est un état plus « agressif » des cellules cancéreuses (Saitoh, 2018). La TEM partielle présente des états hybrides, possédant des caractéristiques relativement différentes en fonction du stade et des marqueurs exprimés, ce qui pourrait expliquer les différences observées en particulier pour les cellules RCC4 (Figure 37, Pastushenko and Blanpain, 2019).

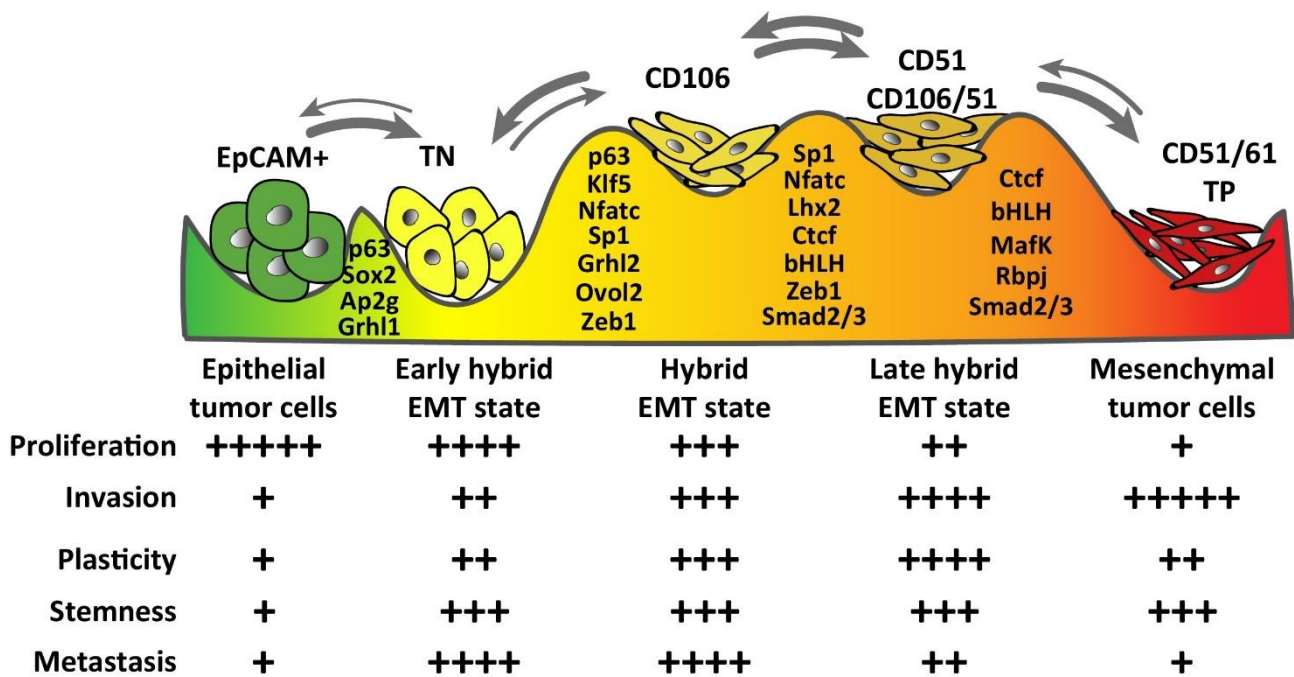


Figure 37 : Illustration des différents états de TEM, d'après Pastushenko et Blanpain, 2019. La TEM est présentée comme un état dynamique oscillant entre un phénotype épithélial (vert) et un phénotype mésenchymateux (rouge).

B. Perspectives

Dans ce travail, nous n'avons exploré qu'une petite partie des propriétés de MUC1 sur les cellules cancéreuses. En effet, comme nous avons pu le constater en introduction, MUC1 intervient dans tous les mécanismes de tumorigenèse et de progression

tumorale. Pour visualiser facilement cette ubiquité, il est intéressant de se baser sur les célèbres « hallmarks » du cancer, les caractères-clés des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011). En plus des 6 caractères originaux, 4 ont été ajoutés en 2011 au vu de l'avancée de la compréhension des mécanismes oncogéniques : le dérèglement métabolique, l'échappement immunitaire, la création d'un environnement inflammatoire pro-tumoral et l'instabilité génomique (Figure 38). Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction et dans les résultats de ce travail, MUC1 est aussi impliquée dans ces nouvelles propriétés, en particulier dans l'échappement immunitaire et la création d'une inflammation propice au développement tumoral. De nouvelles thérapies sont actuellement développées contre ces nouvelles cibles mécanistiques. On pense particulièrement à l'essor des immunothérapies dans le cancer du rein, avec l'importance des anti-PD-1 (nivolumab), anti-PD-L1 (Avelumab) et anti-CTLA4 (Ipilimumab), qui sont recommandées maintenant en première ligne des CRCC de mauvais pronostic. Il a déjà été montré que MUC1 jouerait un rôle dans la chimiorésistance de ces nouvelles thérapies, en augmentant l'expression de PD-1/PD-L1 (Bouillez et al., 2017a, 2017c). Nous envisageons donc, dans les perspectives de ce travail, d'étudier le rôle de MUC1 sur ce mécanisme d'échappement immunitaire dans nos modèles de cellules rénales. Notre lien avec le Centre de Biologie Pathologie et en particulier le service d'anatomopathologie nous donne accès à une collection de biopsies rénales (tissu tumoral et tissu sain adjacent) ainsi que des échantillons métastatiques. Nous prévoyons donc d'étudier la corrélation entre l'expression de MUC1 et de PD-L1, à la fois dans les tissus sains et pathologiques correspondant. Ces observations pourraient nous permettre d'évaluer et de prévoir la réponse à l'immunothérapie en fonction de l'expression de MUC1. Nous avons également, dans ce travail, évoqué la pompe ABCG2, d'abord comme pompe d'efflux puis ensuite comme marqueur de CSC. En se basant sur les observations de la littérature, il nous semble pertinent d'étudier le rôle de MUC1 sur le caractère souche des cellules tumorales. Pour cela, il est possible de mesurer différents paramètres liés au phénotype souche, le plus facile étant la capacité à former des sphères dans un milieu 3D. Nous envisageons également de suivre l'évolution des marqueurs précédemment cités, comme OCT4 et SOX2. Notre équipe possédant une expérience dans l'étude des miARN, nous envisageons de lier cette étude à celle du miR-145. En effet, ce microARN est largement décrit comme un miR suppresseur de tumeur et en particulier un répresseur de l'état souche (Xu et al., 2009). De plus, ce miARN est également

responsable d'une inhibition de l'expression de MUC1 (Wu et al., 2013). Il serait intéressant de lier tous ces éléments autour de l'étude des propriétés souches de nos cellules cancéreuses. Enfin, ce projet vise à avoir une portée à long terme en recherche translationnelle. Nous avons pu montrer que le clivage de MUC1 est un pré-requis indispensable à son activité oncogénique. La stratégie thérapeutique anti-MUC1 la plus avancée actuellement (le GO-203, inhibiteur peptidique de la translocation nucléaire en phase I/II) nécessite d'ailleurs que MUC1 ait subi le clivage pour agir. Selon notre hypothèse, le blocage du clivage de MUC1 en amont permettrait d'inhiber ses fonctions oncogéniques au niveau nucléaire et pourrait également restaurer une efficacité des anticorps anti-TA MUC1. Cette approche nécessite de connaître avec précision le site de clivage extracellulaire de MUC1 (le site intracellulaire étant déjà connu). Pour cela, il est nécessaire de mettre au point une étude fine de la protéine MUC1 à la surface des cellules cancéreuses mais également

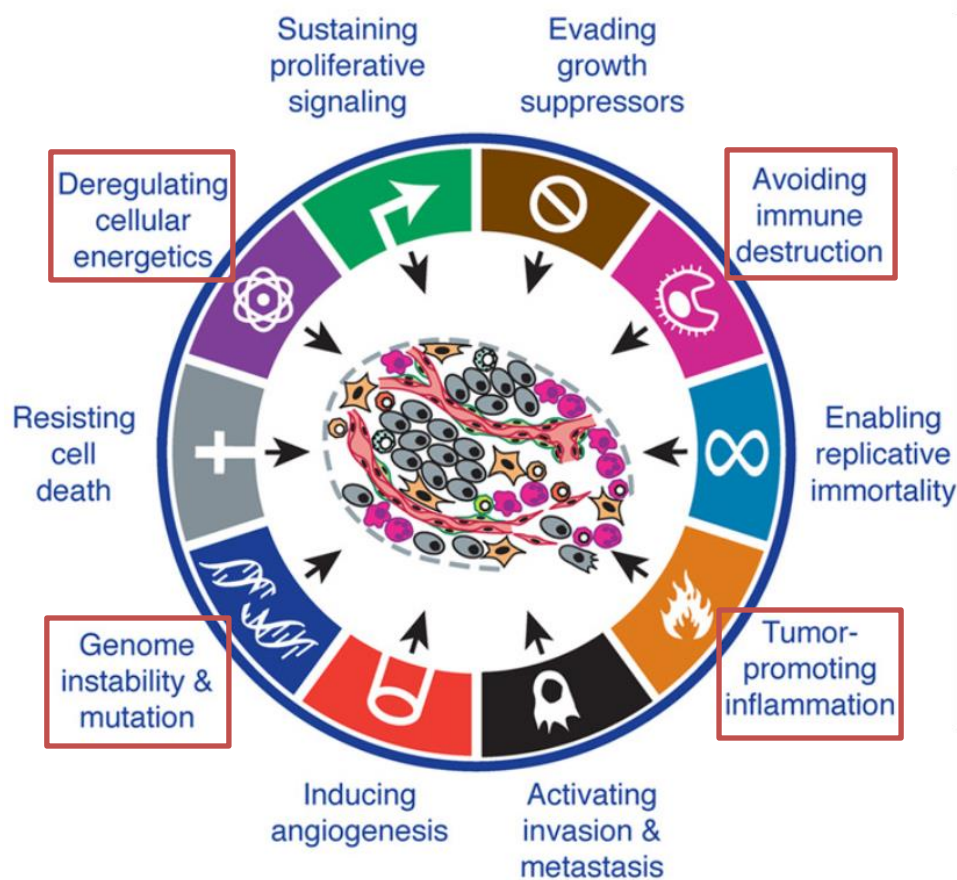


Figure 38 : Représentation des propriétés des cellules cancéreuses, d'après Hanahan et Weinberg, 2011. Les nouveaux caractères ajoutés en 2011 sont encadrés en rouge.

en intracellulaire. Nous avons d'ores et déjà mis au point un protocole d'immunoprécipitation de MUC1-CT, avec un anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale de la queue cytoplasmique. L'étape suivante est de caractériser par spectrométrie de masse la séquence protéique exacte des fragments de MUC1 immunoprécipités. Cela permettra d'identifier un ou des sites potentiels de clivage. Une fois les sites identifiés, le développement de composés peptidiques inhibant les protéases responsables du clivage (en particulier ADAM10/17) pourra être envisagé. *In fine*, le développement d'une telle molécule pourra permettre de réduire fortement le caractère agressif de la tumeur, et peut-être restaurer la chimiosensibilité des cellules cancéreuses.

II. Partie 2 – inflammation

A. Discussion

Après s'être intéressés au rôle de MUC1 dans la chimiorésistance du CRCC, nous avons cherché à approfondir les résultats déjà obtenus par l'équipe sur la régulation de la réaction inflammatoire. Nous avons pu déjà montrer qu'à l'état basal, dans un rein sain, MUC1 s'exprime au niveau des TCD et des TC. Des analyses de biopsies de patients souffrant d'une atteinte rénale à type de nécrose tubulaire aiguë ont montré la néo-expression de MUC1 au niveau des TCP (Gibier et al., 2017). Cette néo-expression traduit des changements importants au niveau des cellules rénales spécialisées : d'abord une atteinte à l'intégrité (insuffisance rénale aiguë) puis une correction de l'inflammation. Cependant, le passage à la chronicité peut engendrer un remodelage qui possède toutes les caractéristiques d'un tissu cicatriciel et fibrotique. De nombreux modèles animaux ont donc été développés pour élucider ces mécanismes dont la compréhension pourrait être importante pour la prise en charge des patients qui en souffrent. Au sein du laboratoire, nous avons d'abord développé un modèle de souffrance rénale par ischémie/reperfusion (I/R). Ce modèle présente un intérêt indéniable car la succession des événements est la même que celle observée en clinique : une atteinte pré-rénale suivie d'une phase d'initiation, une phase d'extension, une phase de maintien puis une phase de réparation (Sutton et al., 2002). Nous avons ainsi pu démontrer que l'induction de Muc1 au niveau des TCP s'accompagne d'une atténuation de la souffrance rénale (ce qui n'est pas observé dans les souris KO Muc1) et ainsi confirmer les résultats de la littérature (Pastor-Soler

et al., 2015). La première conclusion a donc été que Muc1 possède un rôle néphroprotecteur. Nos observations ont été menées jusqu'à 14 jours après la reperfusion et ont mis en lumière un fait intéressant : la régénération rénale n'est pas totale et un processus fibrotique se met en place. De plus, le rôle néphroprotecteur de Muc1 observé pour la phase précoce est ici inversé : les souris KO Muc1 présentent un tissu cicatriciel moins important que les souris WT, ce qui signifie que Muc1 possède à présent un rôle pro-fibrotique, confirmant les observations cliniques (Gibier et al., 2017). La suite de ce travail a été de développer un autre modèle de souffrance rénale, plus simple à mettre en place et engendrant uniquement une atteinte rénale aiguë. Nous avons donc développé un modèle d'injection de LPS, un composé bactérien très immunogène, afin de simuler une inflammation septique (telle que celle rencontrée chez les patients hospitalisés). Le LPS est capable de se fixer au récepteur Tlr4 et entraîner une cascade de signalisation aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Un point intéressant qui peut être mis en parallèle avec le modèle d'I/R est que le LPS n'est pas un ligand exclusif du Tlr4. En effet, les cellules épithéliales, sous l'effet de différents stimuli (pouvant aller jusqu'à la mort de la cellule) peuvent libérer la protéine HMGB1, capable de se lier et d'activer le Tlr4 comme le LPS. Dans le cas d'une activation du Tlr4 sans ligand exogène, on parle d'inflammation stérile : c'est le cas pour le modèle d'I/R, dans lequel les cellules épithéliales sont soumises à un stress important et peuvent ainsi venir contribuer à l'inflammation en libérant HMGB1 (Kaczorowski et al., 2009). L'étude du modèle d'injection de LPS est donc pertinente car elle pourrait permettre encore une meilleure compréhension du modèle d'I/R. Nous avons donc observé que le modèle murin d'injection de LPS se traduit bien par le déclenchement d'une réaction inflammatoire : nous avons d'abord observé une perte de fonction rénale symbolisée par l'élévation de l'urémie sérique, puis nous nous sommes intéressés à la cascade de signalisation du Tlr4. Nous avons observé une relocalisation nucléaire de p65 suivie d'une augmentation de l'expression d'Il-6. Cette augmentation au niveau transcriptionnel s'est également traduite au niveau protéique, avec une augmentation de la concentration d'Il-6 dans le rein des souris traitées. Nous avons également confirmé les résultats obtenus dans le modèle d'I/R : l'absence de Muc1 chez les souris KO Muc1 a engendré une réponse inflammatoire plus importante et moins contrôlée que chez les souris WT, ce qui valide notre hypothèse du rôle néphroprotecteur de Muc1. Comme évoqué en préambule des résultats *in vivo*, les expériences ont été réalisées sur un panel contenant autant de

mâles que de femelles, mais les souris mâles ont présenté une réponse rénale quasi-nulle à l'injection de LPS. De plus, bien que le LPS soit un composé immunogène, aucune surmortalité liée à l'injection n'a été remarquée. Nous n'avons pour l'instant aucune hypothèse pour expliquer ce phénomène, et la littérature rapporte des exemples qui semblent donner des résultats opposés : parfois les mâles semblent plus sensibles au LPS (Cai et al., 2016), parfois ce sont les femelles qui expriment plus d'hormones associées au stress (Girard-Joyal et al., 2015). L'une des explications pourrait provenir de la variabilité des différents fonds génétiques utilisés. En effet, ces deux études ont utilisés la souche CD1, connue pour sa meilleure sensibilité à l'atteinte rénale (Greite et al., 2017). Cependant, dans notre modèle, le KO a été réalisé sur des souris C57BL/6J (Spicer et al., 1995), qui présentent une sensibilité moins importante au niveau rénal.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme par lequel MUC1 agit sur la signalisation du TLR4, nous avons utilisé un modèle cellulaire commercial avec une voie du TLR4 fonctionnelle, que nous avons d'abord validé. Après transfection du vecteur plasmidique codant pour MUC1, nous avons pu valider les résultats observés chez les souris, à savoir une diminution de l'activité transcriptionnelle des facteurs NF- κ B et AP-1 par rapport aux cellules n'exprimant pas MUC1. L'expression du TNF α , un des gènes cibles de cette voie, a également diminué. Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'un des domaines fonctionnels de MUC1 pouvait être impliqué dans l'inhibition de la voie de signalisation. Nous avons donc pour cela utilisé deux autres constructions plasmidiques, codant pour MUC1 dTR et MUC1 dCT. L'étude des activités luciférase après transfection de ces différentes constructions montre que l'absence de la queue cytoplasmique entraîne une activité similaire (voire supérieure) à l'activité mesurée avec un vecteur vide. Cela implique que la queue cytoplasmique serait l'élément essentiel à l'action de MUC1 sur la voie de signalisation du TLR4. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus par une autre équipe dans un modèle d'atteinte pulmonaire aiguë. En effet, cette équipe a pu mettre en évidence que MUC1 interagit avec le TLR5 activé en inhibant le recrutement de ses protéines adaptatrices. Les auteurs ont envisagé un mécanisme passant par une phosphorylation de la queue cytoplasmique de MUC1 sous l'action de l'EGFR (Kato et al., 2012) et de ce fait une inhibition du recrutement de MyD88 sur le récepteur. La même équipe s'est également focalisée sur le TLR3, qui possède la particularité de ne

pas faire intervenir MyD88 mais plutôt la protéine TRIF. Ils ont montré le même rôle inhibiteur de MUC1 sur le recrutement de cette protéine et une diminution de l'inflammation (Kato *et al.*, 2014). Notre hypothèse s'inscrit donc logiquement dans la littérature actuelle : MUC1 prend place dans une boucle de contrôle de l'inflammation. La stimulation du TLR4 par son ligand entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines, après stimulation de leur récepteur respectif, déclenchent une autre cascade de signalisation qui a pour particularité d'aboutir à l'augmentation de l'expression de MUC1 (Choi *et al.*, 2011). Comme nous l'avons suggéré, MUC1 intervient ensuite pour réguler cette inflammation en empêchant la voie de signalisation de s'auto-entretenir. Cela permet à terme d'atténuer la réponse inflammatoire et expliquerait donc le rôle protecteur de MUC1 (Kato *et al.*, 2014, Figure 39).

Nos études ont été réalisées sur des lysats de rein total, expliquant l'absence apparente de variation dans l'expression protéique de Muc1. La néo-expression de MUC1 dans les TCP observée chez les patients souffrant de nécrose tubulaire aiguë est un processus liée à une régulation fine. Une équipe française a pu mettre au point une culture primaire de TCP afin de s'affranchir des autres types cellulaires présents au niveau rénal (Legouis *et al.*, 2015). En plus des différents types de cellules épithéliales, le rein possède également des cellules immunitaires, résidentes ou recrutées suite à une inflammation. Leur étude revêt une importance capitale ; en effet, MUC1 est également exprimée à la surface des cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques,...) (Cloosen, 2004; Xu *et al.*, 2014) où elle possède le même rôle de contrôle et d'atténuation de la réponse inflammatoire. Des cellules dendritiques issues de souris KO Muc1 présentent, après stimulation, une expression plus importante de cytokines inflammatoires, ce qui confirme les résultats observés dans les cellules épithéliales (Williams *et al.*, 2010). A propos des macrophages, notre groupe a mené une étude poussée de la composante immunitaire mise en jeu dans l'inflammation rénale, qui a fait l'objet d'un autre projet de thèse. Les résultats que nous avons obtenus montrent que les macrophages M1 (pro-inflammatoires) expriment MUC1 de manière plus importante et surtout produisent plus de cytokines inflammatoires que les macrophages non activés (M0) ou M2 (anti-inflammatoires). Les souris KO Muc1 présentent de plus une proportion de ces macrophages M1 plus

importante que les souris WT, ce qui implique un contrôle de la réaction inflammatoire moins strict.

Enfin, notre modèle cellulaire HEK-TLR4 a été un outil particulièrement pertinent pour l'étude mécanistique du rôle de MUC1 sur le TLR4. Nous avons naturellement utilisé ce même modèle pour mettre en évidence la potentielle interaction entre MUC1 et le complexe TLR4/MyD88 formé lors de la stimulation du récepteur. Notre première approche avait été l'étude en co-immunoprécipitation suivie d'une révélation par Western Blot. Il s'agit d'une technique simple pour laquelle nous avons utilisé le kit Dynabeads (Invitrogen). La particularité de ce protocole est l'utilisation de billes magnétiques couplées de façon covalente avec les anticorps utilisés pour la co-IP. Cela permet de s'affranchir des complications liées à l'apparition des chaînes légères et lourdes des anticorps lors de la révélation. Dans notre cas, malgré les nombreux tests d'anticorps anti-TLR4, nous n'avons pas pu mettre au point d'anticorps spécifique. Nous avons donc envisagé l'utilisation d'une version marquée du TLR4, grâce à un plasmide commercial codant pour TLR4-HA, qui a été transfecté dans les cellules HEK-TLR4. La co-IP a donc été réalisée avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-MUC1. Malgré plusieurs essais, nous n'avons pas réussi à obtenir un résultat complet, car le signal obtenu après immunoprécipitation par l'anticorps anti-MUC1 et la révélation par l'anticorps anti-HA correspondait à une fixation non spécifique (observée dans tous les puits). Un signal après immunoprécipitation par l'anticorps anti-HA et révélation par l'anticorps anti-MUC1 avait cependant été observé, nous encourageant à poursuivre l'étude mais en employant une autre technique. Nous avons donc envisagé le PLA. Cette technique d'imagerie cellulaire repose sur la proximité entre les 2 molécules d'intérêt : si elles sont suffisamment proches, les anticorps primaires puis secondaires seront eux aussi suffisamment proches pour que les sondes oligonucléotidiques portées par les anticorps secondaires puissent s'hybrider et faire apparaître un signal fluorescent sous forme de spot où chaque spot correspond à une interaction protéique permettant ainsi la quantification des interactions dans chaque cellule. Nous avons donc étudié 2 couples de protéines : d'abord l'interaction MUC1-TLR4HA puis l'interaction MyD88/TLR4HA. La première expérience a pour but de mettre en évidence une action directe de MUC1 sur le récepteur. Concernant la seconde, notre but n'a pas été de confirmer l'interaction de MyD88 et TLR4HA (requis pour l'activation de la voie), mais d'évaluer de manière

semi-quantitative le rôle de MUC1 sur le complexe récepteur – protéine adaptatrice. Un contrôle de transfection a été réalisé par la cotransfection d'un vecteur GFP, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité de transfection et de différencier les cellules positives du bruit de fond. Nous avons donc pu observer que MUC1 et TLR4HA n'interagissent que lorsqu'il y a stimulation du récepteur par le LPS. En revanche, on observe un signal positif dans toutes les conditions de l'expérience MyD88/TLR4HA (présence ou absence de MUC1, présence ou absence de traitement au LPS). Nous avons avancé l'idée que les cellules sont saturées en TLR4 : d'abord par la transfection initiale du fabricant (Invitrogen), puis ensuite par la transfection du vecteur TLR4HA. Le pool disponible dans la cellule de MyD88 risque forcément d'interagir avec les récepteurs présents en très grand nombre à la membrane. Cependant, malgré ce qui s'apparente à un bruit de fond parasite, nous avons pu observer que l'ajout de LPS sur ces cellules entraîne une augmentation du signal fluorescent, indiquant que MyD88 est recrutée en plus grand nombre sur le récepteur TLR4HA pour activer la voie de signalisation. Dans les cellules qui expriment MUC1, ce recrutement semble moins

important. Nous avons donc compté le nombre de spots dans chaque cellule positive, afin de traduire de manière quantitative les observations visuelles. Nous avons ainsi déterminé que le signal est significativement moins important dans les cellules exprimant MUC1.

B. Perspectives

Nous avons pu évoquer la boucle de contrôle de l'inflammation dans laquelle prend place MUC1. Dans la phase précoce de l'inflammation, les récepteurs TLR vont être activés à la fois par les composés exogènes (LPS, flagelline,...) mais également par des composés endogènes sécrétés par les cellules souffrantes (HMGB1). L'activation de ces récepteurs entraîne naturellement la production de cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF α), qui vont à leur tour activer leurs propres récepteurs. La réponse inflammatoire qui en découle va activer la synthèse et l'expression de MUC1, qui viendra inhiber la signalisation des TLR en inhibant le recrutement des

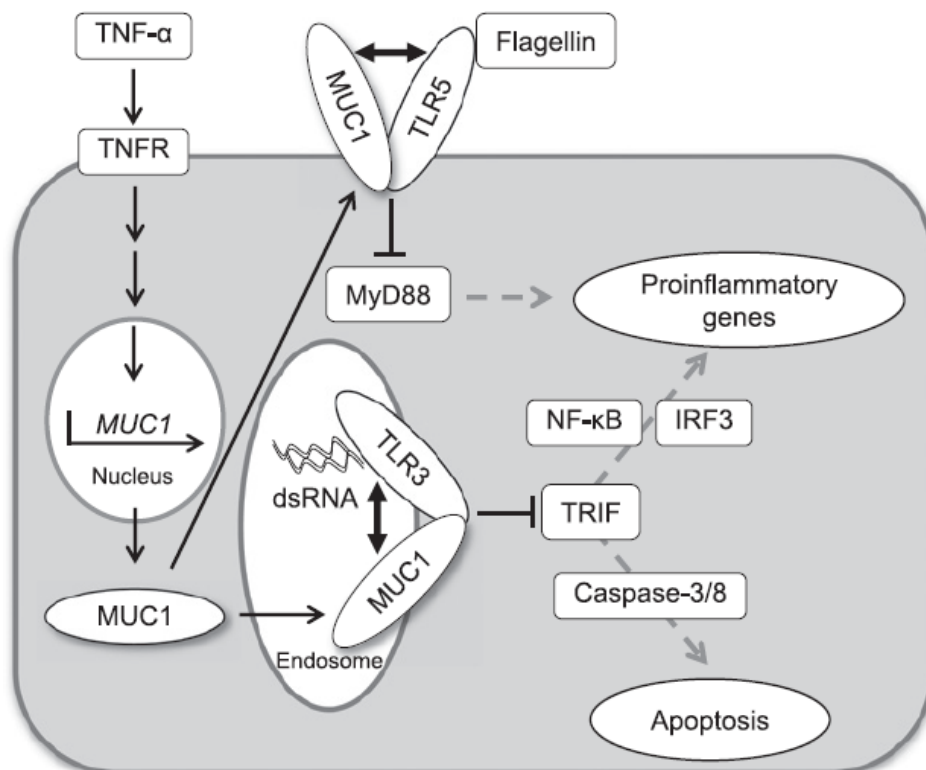


Figure 39 : Boucle de régulation de l'inflammation, d'après Kato et al., 2014. Les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression de MUC1, puis MUC1 interagit avec les TLR pour inhiber la cascade de signalisation à l'origine de l'expression des cytokines.

protéines adaptatrices par l'intermédiaire de la queue cytoplasmique. On obtient donc un état d'équilibre dans lequel l'inflammation est contrôlée puis spontanément résolutive. Les molécules surnuméraires de MUC1 sont ensuite clivées, ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome. Dans le cadre d'une inflammation chronique, nous formulons l'hypothèse qu'il existe un moment à partir duquel l'expression de MUC1 ne suffit plus pour atténuer l'activation des voies de signalisation. Le clivage qui auparavant conduisait à la dégradation de MUC1 entraîne désormais la translocation nucléaire de MUC1-CT. A partir de ce moment, MUC1-CT exerce les mêmes fonctions que dans les cellules cancéreuses : fixation et stabilisation de facteurs de transcription sur des promoteurs de gènes cibles. Parmi tous les facteurs de transcription régulés par MUC1, NF- κ B pourrait être la pierre angulaire de cette hypothèse. MUC1-CT, qui possède un site de fixation pour NF- κ B, stabiliserait ce facteur de transcription au niveau du promoteur des gènes cibles évoqués dans ce projet, comme le TNF α ou l'IL-6. Cela aurait comme conséquence l'entretien de l'environnement inflammatoire par une production continue de cytokines inflammatoires. Mais NF- κ B peut également réguler l'activité de nombreux autres gènes cibles, en particulier ceux impliqués dans la promotion de la TEM. Dans l'inflammation, la TEM est associée au remodelage épithélial. Cela pourrait donc expliquer l'apparition du phénotype pro-fibrotique observé dans les phases tardives, en particulier pour l'I/R.

Ce versant inflammation du projet « MUC1 et pathologies rénales » développé par notre groupe présente donc un avancement encourageant. Nous avons pu montrer que le rôle néphroprotecteur de MUC1 s'exerce dans les cellules épithéliales par interaction directe entre le récepteur TLR4 et la protéine adaptatrice MyD88. Des études émanant d'autres équipes mais également de notre groupe ont également mis en lumière le rôle anti-inflammatoire de MUC1 dans les cellules immunitaires (en particulier les macrophages). Cependant, dans les modèles animaux, nous n'avons pas encore élucidé la part de chaque composante de l'inflammation (épithéliale ou immunitaire) dans l'environnement hétérogène qu'est le rein total. L'expertise du laboratoire du Dr Hertig, à Paris, nous permettra de réaliser une culture primaire à partir de TCP isolés selon leur protocole (Legouis et al., 2015) Ces TCP pourront être traités au LPS afin de caractériser finement les mécanismes des cellules épithéliales conduisant à la néo-expression de MUC1. Il est également envisageable de traiter les animaux au LPS puis d'en récupérer les TCP par la même technique. Cela nous

permettra d'appréhender ce phénomène dans un cadre restreint (traitement des TCP isolés) ou dans un cadre global (isolation des TCP après traitement).

APPENDICE TECHNIQUE

Appendice technique

I. Expériences *in vivo*

A. Animaux

Pour les expériences *in vivo*, des souris C57BL/6J Wild Type (WT) ou KO Muc1 (Spicer *et al.*, 1995) ont été utilisées. Elles ont été hébergées en animalerie Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) sous le protocole APAFiS #6728. En fonction des conditions, les souris ont reçu 200 µL de LPS Ultrapure (InvivoGen™) à la concentration de 1 mg/mL soit une dose de 10 mg/kg ou 200µL de PBS 1X, injectés en intra-péritonéal (IP). Après 6h, 24h et 48h, les reins des souris injectés ont été récupérés dans de la carboglace et conservés directement à -80°C pour l'extraction d'ARNm et de protéines ou dans du formol en vue d'une inclusion en paraffine pour marquage immunohistochimique. Le système Microvet a été utilisé pour récupérer le sang de la veine de la queue après exposition à une lampe chauffante.

B. Dosage de l'urémie

Le dosage de l'urémie a été réalisé le Cobas® 8000 (Service Biochimie, CBP, CHRU Lille).

C. Extraction des ARN totaux à partir du tissu

Les ARN totaux ont été extraits selon le protocole du kit « miRNeasy miniKit® » (Qiagen™) et dosés par spectrophotométrie.

D. RT-qPCR

La rétro-transcription des ARN a été réalisée sur 2 µg d'ARN dans un volume de 20 µL selon les recommandations du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Invitrogen™). Le mélange réactionnel pour chaque condition a été préparé sur glace comme suit :

- 4 µL RT Buffer (10X)
- 1,6 µL dNTP Mix (25X)
- 4 µL RT Random Primers (10X)
- 2 µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- 8,4 µL Nuclease-Free H₂O.

Le mélange réactionnel a été mélangé à la dilution d'ARN pour un volume final de 40 µL puis placé dans un thermocycleur et soumis au protocole suivant :

- 10 min à 25°C (Hybridation)
- 120 min à 37°C (Elongation)
- 5 min à 85°C (Dénaturation)

La PCR quantitative Taqman® a été réalisée sur 100 ng (1µL) d'ADNc rétro-transcrit. Le mélange réactionnel a été préparé sur glace comme suit :

- 10 µL MasterMix (Applied Biosystem™)
- 8 µL Nuclease-Free H₂O
- 1 µL sonde Taqman correspondant au gène d'intérêt (ThermoFisher™)
(Tableau 1)

Le mélange réactionnel a été mélangé à 1 µL d'ADNc pour un volume final de 20 µL/puits puis soumis au protocole suivant en thermocycleur (C1000 Touch, Biorad™) :

- 2 min à 90 °C
 - 10 min à 95°C
 - 15 sec à 95°C
 - 60 sec à 60°C
- } 39 cycles

L'expression relative a été calculée par la formule $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) en prenant pour contrôle le gène *Ppia*.

Sondes murines	
<u>Gène</u>	<u>Référence</u>
Il-6	Mm00446190
Kim-1	Mm00506686
Muc1	Mm00449604
Ppia	Mm02342430
Tlr4	Mm00445273

Tableau 1 : Liste des sondes murines TaqMan utilisées en RT-qPCR

E. Extraction protéique

L'extraction protéique a été réalisée à partir d'un quart de rein de souris (préalablement congelé après récupération). L'homogénéisation a été réalisée dans 1 mL de PBS 1X enrichi en inhibiteurs de protéases (Complete Minitablet, Roche) grâce au GentleMACS Dissociator (Miltenyi). Les échantillons ont ensuite été recongelés à -80°C après ajout de 100 µL de Triton X-100. Avant le dosage, les échantillons ont été centrifugés 5 min à 10 000g. Le surnageant a été dosé par la technique BCA (BiCinchonic acid Assay).

F. Dosage protéique

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la technique BCA (acide bicinchonique) selon les recommandations du fournisseur (Pierce). Le calcul de la concentration protéique a été effectué grâce à l'établissement d'une courbe étalon de concentration croissante et connue de sérum albumine bovine (BSA). L'absorbance à 570 nm a été déterminée sur le Multiskan FC (Thermo Scientific).

G. Western Blot

Après le dosage de la concentration en protéines, l'équivalent de 10 µg de protéines a été ajouté dans un mélange réactionnel contenant 2 µL de SRA 10X (Sample Reducing Agent), 5 µL de LDS 4X (Lithium Dodecyl Sulfate) et une quantité suffisante d'eau pour atteindre un volume final de 20 µL. La dénaturation a été faite pendant 5 min à 96°C. Les échantillons préparés ont ensuite été déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide 4-12% (Invitrogen). La migration a été faite pendant 1h à 200V, dans un tampon MOPS 1X – 0,25% antioxydant.

Le transfert sur la membrane de nitrocellulose a été réalisé pendant 1h à 100V en milieu humide dans un tampon contenant 192 mM de Glycine, 25 mM de Tris, 20% v/v de méthanol et 0,005% v/v de SDS. L'efficacité du transfert a été visualisée par une coloration au Rouge Ponceau. La membrane de nitrocellulose a ensuite été saturée pendant 1h à température ambiante par une solution de lait écrémé dilué à 5% dans du TBS-T 1X (Tris Buffer Saline – Tween 20 0,05%). Après 3 lavages au TBS-T, la membrane a été incubée avec les dilutions d'anticorps primaires décrites dans le Tableau XX, pendant 2h à température ambiante. Après 3 nouveaux lavages au TBS-T 1X, la membrane a été incubée 1h à température ambiante avec une dilution

d'anticorps secondaire au 1/10 000 dans du TBS-T. La révélation a été réalisée grâce au kit SuperSignal (Pierce) : la membrane a été incubée pendant 5 min à température ambiante dans un mélange volume/volume des réactifs du kit puis l'acquisition a été faite grâce au LAS4000 (Fujifilm).

Antigène	Clone et/ou référence	Poids moléculaire (kDa)	Espèce	Dilution
NF-κB p65	D14E12 XP (Cell Signaling)	65	Lapin	1/1000
β-actine	A5441 (Sigma Aldrich)	42	Souris	1/5000
GAPDH	(FL-335) sc-25778 (Santa Cruz)	42	Lapin	1/5000
MUC1	(CT-2) ab 80952 (Abcam)	20	Hamster	1/500
Lamine A/C	(636) sc-7292 (Santa Cruz)	62-69	Souris	1/500
α tubuline	(DM1A) T9026 (Sigma)	50	Souris	1/500

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot

H. ELISA

La concentration en Il-6 des reins a été mesurée par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), grâce au kit « eBioScience Ready-Set-Go ! » (Affymetrix). La révélation a été faite par spectrophotométrie aux longueurs d'onde de 450 nm et 570 nm sur le Multiskan FC (Thermo Scientific). La concentration a été exprimée en pg/mg de protéines totales.

I. Immunohistochimie

L'automate Ventana Benchmark a été utilisé pour le déparaffinage, la réhydratation et le pré-traitement des tissus animaux inclus en paraffine. Les lames ont ensuite été incubées 15min dans de l'eau oxygénée 3% puis dans le Dako Cytomation Blocking System. Elles ont été incubées à 4°C sur la nuit avec l'anticorps primaire dilué au 1/100

(NF- κ B-p65, D14E12 XP, Cell Signaling). L'anticorps secondaire biotinylé a ensuite été appliqué sur les lames pendant 1h à température ambiante. Enfin, la révélation a nécessité le kit Vectastain Elite ABC ainsi qu'une coloration à l'hématoxyline. Les lames ont été observées au microscope optique Leica DM 4000B.

II. Expériences *in vitro*

A. Lignées cellulaires

1. Lignées cancéreuses rénales

Nous avons utilisé 2 lignées cancéreuses rénales : les cellules ACHN et RCC4. Les cellules ACHN ont été achetées auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit d'une lignée dérivée d'une effusion pleurale métastatique d'un carcinome rénal chez un homme de 22 ans. Elles ont été entretenues dans un milieu MEM (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de L-Glutamine, 1% de Pyruvate de sodium et 0,1% d'Acides Aminés Non Essentiels (NEAA). Les cellules RCC4 ont été obtenues auprès du Dr D. Bernard (Centre Léon Bérard, Lyon). Elles ont été entretenues dans un milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, 1% de Pénicilline-Streptomycine et 1% de L-Glutamine. Les cellules ont été réensemencées de manière hebdomadaire selon le protocole suivant :

- Lavage au PBS 1X
- Ajout de Trypsine + EDTA 0,05% et incubation 5 min à 37°C
- Récupération dans un volume suffisant de milieu de culture
- Centrifugation pendant 5 min à 1500 rpm
- Aspiration du surnageant et reprise du culot dans du milieu neuf
- Comptage en cellule de Malassez
- Réensemencement à raison de $0,5 \times 10^6$ cellules/T25 ou 1×10^6 /T75
- Incubation à 37°C, 5% CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité.

2. Lignée rénale non cancéreuse

L'inflammation a été étudiée dans la lignée HEK-TLR4 (InvivoGen™). Il s'agit d'une lignée embryonnaire rénale immortalisée et transfectée de manière à exprimer les protéines nécessaires à la voie de signalisation du LPS : TLR4, MD2 et CD14. Les

cellules ont été entretenues dans un milieu DMEM (Gibco™) supplémenté par 10% de Sérum de Veau Fœtal, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline + Streptomycine, 100 µg/mL de Normocine®, 10 µg/mL de Blastidicine® et 50 µg/mL d'Hygromycine B Gold®. Les conditions de culture ont été identiques à celles décrites pour les lignées cancéreuses ACHN et RCC4. Le LPS (1 mg/mL, Invivogen) a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 1 µg/mL.

B. Transfections

1. Lignées cancéreuses : transfections stables des modèles d'étude

Les transfections ont été réalisées selon les recommandations du kit « Lipofectamine LTX & Plus Reagent » (Invitrogen). Pour les cellules ACHN, la transfection stable a été réalisée avec un plasmide codant pour MUC1 pleine longueur (MUC1FL) obtenu auprès du Dr S. Gendler (Mayo Clinic). Les cellules contrôles ont été obtenues par transfection du vecteur vide correspondant (EV). La sélection du clone d'intérêt a été faite par du G418 (6 µL/mL) et grâce à une dilution limite. Pour les cellules RCC4, la stratégie CRISPR/Cas9 a été mise en place grâce au kit « EMA (MUC1) Human Gene Knockout Kit » (Origene). Les cellules ont été transfectées avec un plasmide donneur (EF1a-GFP-P2A-Puro) et soit un plasmide scramble (cellules contrôles) soit un plasmide guide dirigé contre *MUC1* (cellules RCC4 MUC1KO). La sélection a été faite par traitement à la puromycine (2 µg/mL) et dilution limite, puis l'expression de la GFP a été visualisée par microscopie à fluorescence (EVOS, ThermoScientific).

2. Lignée non cancéreuse : transfections transitoires

Les cellules HEK-TLR4 ont également été transfectées, de manière transitoire, grâce au kit « Lipofectamine LTX & Plus Reagent » (Invitrogen). Les cellules ont étéensemencées à raison de 250 000 cellules par puits en plaque 24 puits. Le lendemain, 250ng de plasmide ont été utilisés pour la transfection. Selon les conditions de chaque expérience, les plasmides utilisés ont été les suivants :

- Vecteur vide (EV)
- MUC1 pleine longueur
- MUC1 délétée de son TR
- MUC1 délétée de sa CT

- TLR4-HA (Invitrogen) pUNO1
- Vecteur rapporteur NF- κ B : p3NF- κ B-luc
- Vecteur rapporteur AP-1 : pGL-2-AP-1-luc

Les analyses ont été réalisées après 48h de transfection.

C. Etude des propriétés de prolifération et de migration

La prolifération et la migration ont été étudiées grâce à la technologie Incucyte. Pour la prolifération, 5 000 cellules ont étéensemencées dans chaque puits d'une plaque 96 puits, en laissant une couronne de PBS sur les puits extérieurs. Dès l'ensemencement, les cellules ont été placées dans l'enceinte de l'Incucyte, dans des conditions de culture normales. Chaque puits a été photographié à 2 endroits, toutes les deux heures. Après 168h soit 7 jours, les pourcentages de confluence ont été exportés et visuellement examinés pour éliminer toute erreur de mise au point de la caméra.

Pour la migration, 15 000 cellules ont étéensemencées dans chaque puits d'une plaque 96 puits ImageLock (Essen Biosciences) puis incubées dans des conditions de culture normales pour obtenir un tapis cellulaire confluent après 72h. Une fois la confluence atteinte, une blessure standardisée a été réalisée dans le tapis grâce au Woundmaker (Essen Biosciences). Un lavage au PBS 1X a été réalisé afin d'éliminer les cellules décollées par le peigne puis du milieu neuf a été ajouté avant de placer la plaque dans l'Incucyte. Chaque puits a été photographié en son centre (grâce au système ImageLock) toutes les deux heures dès la réalisation de la blessure. Les données de confluence relative de la blessure ont été exportées 72h après le test de blessure puis vérifiées visuellement.

D. Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée par un test MTS. Les cellules ont étéensemencées à raison de 5000 cellules/100 μ L dans chaque puits de plaque 96 puits. Les gammes de traitements ont été réalisées dans un volume de 100 μ L de milieu approprié et appliquées le lendemain de l'ensemencement (pour constituer un volume final de 200 μ L), en laissant un puits non traité (dans lequel 100 μ L de milieu seul ont été ajoutés) comme contrôle. Après 72h de culture dans des conditions d'incubation classiques, 20 μ L de réactif contenant du MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution

Cell Proliferation Assay, Promega) ont été ajoutés aux 200µL de milieu puis les plaques ont été à nouveau incubées 1h dans les conditions classiques. La révélation a été faite par mesure d'absorbance à 492nm sur le Spectramax i3 (Molecular Devices).

E. Extraction des ARN totaux à partir d'une culture cellulaire

Les ARN totaux ont été extraits grâce au kit « NucleoSpin® miRNA » (Macherey-Nagel) et dosés par spectrophotométrie (Nanodrop)

F. RT-qPCR

Les RT-qPCR ont été réalisées telles que décrites précédemment, avec le gène *GAPDH* comme gène de ménage. (Tableau 3).

Sondes humaines	
<u>Gène</u>	<u>Référence</u>
GAPDH	Hs02786624
TNFα	Hs01113624
ABCC1	Hs01561504
ABCC2	Hs00960489
ABCC3	Hs00978452
ABCC4	Hs00988721
ABCC5	Hs00981089
ABCC6	Hs01081203
ABCB1	Hs00184500
ABCG2	Hs01053790

Tableau 3 : Liste des sondes humaines TaqMan utilisées en RT-qPCR

G. Cytométrie en flux

L'activité des transporteurs d'efflux a été déterminée par cytométrie en flux selon les recommandations du kit « EFLUXX-ID Gold » (Enzo Technologies). Les cellules ont été décollées par trypsinisation puis comptées. Une solution à 1×10^6 cellules/mL a été réalisée puis incubée 5 min à 37°C avec les inhibiteurs spécifiques décrits par le protocole (vérapamil, MK-571 et Novobiocine) ou avec du milieu contenant 5% de DMSO (contrôle). Le composé Efluxx Gold a ensuite été ajouté puis les cellules ont

été à nouveau incubées 30 min à 37°C. Juste avant le passage au cytomètre, 5 µL d'iodure de propidium ont été ajoutés pour évaluer la viabilité cellulaire. Les analyses ont été réalisées sur le CytoFLEX (Beckman Coulter).

H. Etude des propriétés d'invasion

Les propriétés d'invasion ont été mesurées par expérience en chambre de Boyden. Les cellules ont été décollées par trypsinisation puis comptées. Elles ont été ensuite ensemencées dans un milieu sans sérum, à raison de 50 000 cellules/chambre de Boyden recouverte de Matrigel (BD Bio-Coat). Sous la chambre, dans la plaque, un milieu de culture riche en sérum (10%) a été ajouté pour favoriser la migration des cellules à travers les pores de la membrane. Après 24h, les chambres ont été retirées puis les cellules n'ayant pas migré ont été éliminées par frottement énergique au coton-tige. Les dispositifs ont ensuite été incubés 5 min dans une solution de fixation-perméabilisation à base de méthanol, issue du kit de coloration Diff-Quick, puis dans 3 bains de lavage successifs au PBS 1X. La membrane a ensuite été découpée précautionneusement au scalpel puis montée entre lame et lamelle dans un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories).

I. Activité luciférase

Après la transfection, les cellules ont été lysées sous l'action de 100 µL de PLB (Passive Lysis Buffer, Promega) puis centrifugées pendant 5 min à 14 000 rpm. Le surnageant récolté a été déposé en plaque 96 puits opaque. L'activité luciférase a été mesurée après ajout de 100 µL de luciférine et 3 secondes d'incubation. La normalisation a été faite en rapportant l'activité luciférase mesurée à la concentration en protéines.

J. Extraits nucléaires et cytoplasmiques

Les extraits nucléo-cytoplasmiques ont été réalisés selon le protocole décrit par (Perrais, 2002).

K. Western Blot

Les cellules ont été grattées manuellement puis centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min. Un lavage a été réalisé grâce à du PBS 1X pour éliminer la contamination par les protéines du milieu de culture. Le culot cellulaire obtenu après une deuxième

centrifugation a été lysé par 50µL de tampon RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay) supplémenté en inhibiteurs de protéases (Complete Minitablet, Roche). La lyse a été suivie d'une incubation rotative à 4°C pendant une heure puis d'une centrifugation pendant 20 min à 4°C. Le dosage dans le surnageant et le Western Blot ont été réalisés comme décrits précédemment.

L. Proximity Ligation Assay

Les expériences de PLA ont été réalisées selon les recommandations du kit Duolink® PLA Fluorescence Red (Sigma Aldrich®), sur les cellules HEK-TLR4 transfectées selon les conditions précisées. Les anticorps primaires reconnaissant MUC1 (ab109185, Abcam), MyD88 (ab133739, Abcam) et HA (sc-7392, Santa-Cruz) ont été utilisés à la dilution 1/200. Les images ont été obtenues grâce au microscope confocal Zeiss LSM 710 AiryScan (Plate-forme de microscopie photonique, Pôle Recherche, Faculté de Médecine). La quantification a été réalisée grâce au logiciel Qupath : détection des cellules sur la base du canal DAPI, vérification visuelle de la bonne reconnaissance de la morphologie cellulaire, comptage automatisé du nombre de spots par cellule. Les cellules étaient considérées positives pour un nombre de spots supérieur à 5.

III. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous la forme moyenne +/- erreur-type de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism. Les comparaisons ont été faites grâce au test ANOVA (Analyse de la variance), à un ou deux facteurs selon les conditions du test. Les tests ANOVA à deux facteurs ont été suivis d'un post-test de Bonferroni pour déterminer les différences entre chaque condition. Une *p*-value inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Agata, N., Ahmad, R., Kawano, T., Raina, D., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2008). MUC1 Oncoprotein Blocks Death Receptor-Mediated Apoptosis by Inhibiting Recruitment of Caspase-8. *Cancer Research* 68, 6136–6144.

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

Ahmad, R., Raina, D., Trivedi, V., Ren, J., Rajabi, H., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2007). MUC1 oncoprotein activates the I κ B kinase beta complex and constitutive NF- κ B signalling. *Nat. Cell Biol.* 9, 1419–1427.

Ahmad, R., Raina, D., Joshi, M.D., Kawano, T., Ren, J., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2009). MUC1-C Oncoprotein Functions as a Direct Activator of the Nuclear Factor- κ B p65 Transcription Factor. *Cancer Research* 69, 7013–7021.

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

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.

Albrecht, H., and Carraway, K.L. (2011). MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small. *Cancer Biother. Radiopharm.* 26, 261–271.

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

B

Bensalah, K., Albiges, L., Bernhard, J.-C., Bigot, P., Bodin, T., Boissier, R., Correas, J.-M., Gimel, P., Hetet, J.-F., Long, J.-A., et al. (2018). Recommandations françaises du Comité de Cancérologie de l'AFU – Actualisation 2018–2020 : prise en charge du cancer du rein. *Progrès en Urologie* 28, R5–R33.

Beretta, G.L., Cassinelli, G., Pennati, M., Zuco, V., and Gatti, L. (2017). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 142, 271–289.

Bitler, B.G., Menzl, I., Huerta, C.L., Sands, B., Knowlton, W., Chang, A., and Schroeder, J.A. (2009). Intracellular MUC1 Peptides Inhibit Cancer Progression. *Clinical Cancer Research* 15, 100–109.

Bleyer, A.J., Kidd, K., Živná, M., and Knoch, S. (2017). Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease* 24, 86–93.

Bouillez, A., Gnemmi, V., Gaudelot, K., Hémon, B., Ringot, B., Pottier, N., Glowacki, F., Butruille, C., Cauffiez, C., Hamdane, M., et al. (2014). MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget* 5, 754–763.

Bouillez, A., Rajabi, H., Jin, C., Samur, M., Tagde, A., Alam, M., Hiraki, M., Maeda, T., Hu, X., Adeegbe, D., et al. (2017a). MUC1-C integrates PD-L1 induction with repression of immune effectors in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 36, 4037–4046.

Bouillez, A., Adeegbe, D., Jin, C., Hu, X., Tagde, A., Alam, M., Rajabi, H., Wong, K.-K., and Kufe, D. (2017b). MUC1-C promotes the suppressive immune microenvironment in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 6.

Bouillez, A., Adeegbe, D., Jin, C., Hu, X., Tagde, A., Alam, M., Rajabi, H., Wong, K.-K., and Kufe, D. (2017c). MUC1-C promotes the suppressive immune microenvironment in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 6, e1338998.

Brockhausen, I., Yang, J.M., Burchell, J., Whitehouse, C., and Taylor-Papadimitriou, J. (1995). Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 233, 607–617.

C

Cai, K.C., van Mil, S., Murray, E., Mallet, J.-F., Matar, C., and Ismail, N. (2016). Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. *Brain Behav Immun* 58, 327–337.

Chaika, N.V., Gebregiworgis, T., Lewallen, M.E., Purohit, V., Radhakrishnan, P., Liu, X., Zhang, B., Mehla, K., Brown, R.B., Caffrey, T., et al. (2012). MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 13787–13792.

Chawla, L.S., and Kimmel, P.L. (2012). Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* 82, 516–524.

Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., et al. (2009). The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clin Cancer Res* 15, 5323–5337.

Chen, Y., Zhao, Y.H., Kalaslavadi, T.B., Hamati, E., Nehrke, K., Le, A.D., Ann, D.K., and Wu, R. (2004). Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 155–165.

Chen, Y., Wang, L., Zhu, Y., Chen, Z., Qi, X., Jin, L., Jin, J., Hua, D., and Ma, X. (2015). Breast cancer resistance protein (BCRP)-containing circulating microvesicles contribute to chemoresistance in breast cancer. *Oncol Lett* 10, 3742–3748.

Choi, S., Park, Y.S., Koga, T., Treloar, A., and Kim, K.C. (2011). TNF- α is a key regulator of MUC1, an anti-inflammatory molecule, during airway *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *44*, 255–260.

Cloosen, S. (2004). Mucin-1 is expressed on dendritic cells, both in vitro and in vivo. *International Immunology* *16*, 1561–1571.

Cui, H., Zhang, A.J., Chen, M., and Liu, J.J. (2015). ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Curr Drug Targets* *16*, 1356–1371.

D

Dahiya, R., Lesuffleur, T., Kwak, K.S., Byrd, J.C., Barbat, A., Zweibaum, A., and Kim, Y.S. (1992). Expression and characterization of mucins associated with the resistance to methotrexate of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Res.* *52*, 4655–4662.

Deng, M., Qin, Y., Chen, X., Wang, Q., and Wang, J. (2019). MiR-206 inhibits proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by targeting the MUC1 gene. *Onco Targets Ther* *12*, 849–859.

Devuyst, O., Olinger, E., Weber, S., Eckardt, K.-U., Knoch, S., Rampoldi, L., and Bleyer, A.J. (2019). Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* *5*, 60.

Dhanisha, S.S., Guruvayoorappan, C., Drishya, S., and Abeesh, P. (2018). Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* *122*, 98–122.

Ding, X., Wu, J., and Jiang, C. (2010). ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci* *86*, 631–637.

Dvela-Levitt, M., Kost-Alimova, M., Emani, M., Kohnert, E., Thompson, R., Sidhom, E.-H., Rivadeneira, A., Sahakian, N., Roignot, J., Papagregoriou, G., et al. (2019). Small Molecule Targets TMED9 and Promotes Lysosomal Degradation to Reverse Proteinopathy. *Cell* *178*, 521-535.e23.

E

Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., Grünwald, V., Gillessen, S., and Horwich, A. (2019). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* *30*, 706–720.

F

Ferreira, C.S.M., Matthews, C.S., and Missailidis, S. (2006). DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol.* *27*, 289–301.

Fiedler, W., DeDosso, S., Cresta, S., Weidmann, J., Tessari, A., Salzberg, M., Dietrich, B., Baumeister, H., Goletz, S., Gianni, L., et al. (2016). A phase I study of PankoMab-

GEX, a humanised glyco-optimised monoclonal antibody to a novel tumour-specific MUC1 glycopeptide epitope in patients with advanced carcinomas. *Eur. J. Cancer* 63, 55–63.

Fu, X., Tang, N., Xie, W.-Q., Mao, L., and Qiu, Y.-D. (2020). MUC1 promotes glycolysis through inhibiting BRCA1 expression in pancreatic cancer. *Chin J Nat Med* 18, 178–185.

G

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

Gameiro, J., Agapito Fonseca, J., Jorge, S., and Lopes, J.A. (2018). Acute Kidney Injury Definition and Diagnosis: A Narrative Review. *J Clin Med* 7.

Gendler, S.J., Burchell, J.M., Duhig, T., Lamport, D., White, R., Parker, M., and Taylor-Papadimitriou, J. (1987). Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6060–6064.

Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E.N., and Wilson, D. (1990). Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265, 15286–15293.

Gibier, J.-B., Hémon, B., Fanchon, M., Gaudelot, K., Pottier, N., Ringot, B., Van Seuningen, I., Glowacki, F., Cauffiez, C., Blum, D., et al. (2017). Dual role of MUC1 mucin in kidney ischemia-reperfusion injury: Nephroprotector in early phase, but pro-fibrotic in late phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863, 1336–1349.

Girard-Joyal, O., Faragher, A., Bradley, K., Kane, L., Hrycyk, L., and Ismail, N. (2015). Age and sex differences in c-Fos expression and serum corticosterone concentration following LPS treatment. *Neuroscience* 305, 293–301.

Gnemmi, V., Bouillez, A., Gaudelot, K., Hémon, B., Ringot, B., Pottier, N., Glowacki, F., Villers, A., Vindrieux, D., Cauffiez, C., et al. (2014). MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ β -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett.* 346, 225–236.

Gong, W., Ekmü, B., Wang, X., Lu, Y., and Wan, L. (2020). AGR2-induced glucose metabolism facilitated the progression of endometrial carcinoma via enhancing the MUC1/HIF-1 α pathway. *Hum. Cell.*

GongSun, X., Zhao, Y., Jiang, B., Xin, Z., Shi, M., Song, L., Qin, Q., Wang, Q., and Liu, X. (2019). Inhibition of MUC1-C regulates metabolism by AKT pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cell. Physiol.* 234, 12019–12028.

Goode, G., Gunda, V., Chaika, N.V., Purohit, V., Yu, F., and Singh, P.K. (2017). MUC1 facilitates metabolomic reprogramming in triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* 12, e0176820.

Greite, R., Thorenz, A., Chen, R., Jang, M.-S., Rong, S., Brownstein, M.J., Tewes, S., Wang, L., Baniassad, B., Kirsch, T., et al. (2017). Renal ischemia-reperfusion injury causes hypertension and renal perfusion impairment in the CD1 mice which promotes progressive renal fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 314, F881–F892.

H

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hata, T., Rajabi, H., Yamamoto, M., Jin, C., Ahmad, R., Zhang, Y., Kui, L., Li, W., Yasumizu, Y., Hong, D., et al. (2019). Targeting MUC1-C Inhibits TWIST1 Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 18, 1744–1754.

Higuchi, T., Orita, T., Nakanishi, S., Katsuya, K., Watanabe, H., Yamasaki, Y., Waga, I., Nanayama, T., Yamamoto, Y., Munger, W., et al. (2004). Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *J. Biol. Chem.* 279, 1968–1979.

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

Hossain, M.K., and Wall, K.A. (2016). Immunological Evaluation of Recent MUC1 Glycopeptide Cancer Vaccines. *Vaccines (Basel)* 4.

Hu, Y., Duan, J., Zhan, Q., Wang, F., Lu, X., and Yang, X.-D. (2012). Novel MUC1 aptamer selectively delivers cytotoxic agent to cancer cells in vitro. *PLoS ONE* 7, e31970.

Huang, H.-Z., Yin, Y.-F., Wan, W.-J., Xia, D., Wang, R., and Shen, X.-M. (2019). Up-regulation of microRNA-136 induces apoptosis and radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells by inhibiting the expression of MUC1. *Exp. Mol. Pathol.* 110, 104278.

Huang, T.-Q., Bi, Y.-N., Cui, Z., Guan, J.-P., and Huang, Y.-C. (2020). MUC1 confers radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells. *Bioengineered* 11, 769–778.

J

Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., Song, S., Wang, Q., and Wang, Y. (2018). Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer* 17, 36.

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

Jin, W., Liao, X., Lv, Y., Pang, Z., Wang, Y., Li, Q., Liao, Y., Ye, Q., Chen, G., Zhao, K., et al. (2017). MUC1 induces acquired chemoresistance by upregulating ABCB1 in EGFR-dependent manner. *Cell Death & Disease* 8, e2980–e2980.

Jonasch, E., Gao, J., and Rathmell, W.K. (2014). Renal cell carcinoma. *BMJ* 349, g4797–g4797.

Jonckheere, N., and Van Seuning, I. (2010). The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie* 92, 1–11.

Julian, J., Dharmaraj, N., and Carson, D.D. (2009). MUC1 is a substrate for γ -secretase. *Journal of Cellular Biochemistry* 108, 802–815.

K

Kaczorowski, D.J., Tsung, A., and Billiar, T.R. (2009). Innate immune mechanisms in ischemia/reperfusion. *Front Biosci (Elite Ed)* 1, 91–98.

Kato, K., Lillehoj, E.P., Park, Y.S., Umehara, T., Hoffman, N.E., Madesh, M., and Kim, K.C. (2012). Membrane-tethered MUC1 mucin is phosphorylated by epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells and associates with TLR5 to inhibit recruitment of MyD88. *J. Immunol.* 188, 2014–2022.

Kato, K., Lillehoj, E.P., and Kim, K.C. (2014). MUC1 Regulates Epithelial Inflammation and Apoptosis by PolyI:C through Inhibition of Toll/IL-1 Receptor-Domain-Containing Adapter-Inducing IFN- β (TRIF) Recruitment to Toll-like Receptor 3. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 51, 446–454.

Kato, K., Uchino, R., Lillehoj, E.P., Knox, K., Lin, Y., and Kim, K.C. (2016). Membrane-Tethered MUC1 Mucin Counter-Regulates the Phagocytic Activity of Macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54, 515–523.

Kharbanda, A., Rajabi, H., Jin, C., Raina, D., and Kufe, D. (2013). Oncogenic MUC1-C promotes tamoxifen resistance in human breast cancer. *Mol. Cancer Res.* 11, 714–723.

Kharbanda, A., Rajabi, H., Jin, C., Tchaicha, J., Kikuchi, E., Wong, K.-K., and Kufe, D. (2014). Targeting the Oncogenic MUC1-C Protein Inhibits Mutant EGFR-Mediated Signaling and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* 20, 5423–5434.

Koh, H., Park, H., Chandimali, N., Huynh, D.L., Zhang, J.J., Ghosh, M., Gera, M., Kim, N., Bak, Y., Yoon, D.-Y., et al. (2017). MicroRNA-128 suppresses paclitaxel-resistant lung cancer by inhibiting MUC1-C and BMI-1 in cancer stem cells. *Oncotarget* 8, 110540–110551.

Kosugi, M., Ahmad, R., Alam, M., Uchida, Y., and Kufe, D. (2011). MUC1-C oncoprotein regulates glycolysis and pyruvate kinase M2 activity in cancer cells. *PLoS ONE* 6, e28234.

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

Kufe, D.W. (2009a). Functional targeting of the MUC1 oncogene in human cancers. *Cancer Biology & Therapy* 8, 1197–1203.

Kufe, D.W. (2009b). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* 9, 874–885.

L

Legouis, D., Bataille, A., Hertig, A., Vandermeersch, S., Simon, N., Rondeau, E., and Galichon, P. (2015). Ex vivo analysis of renal proximal tubular cells. *BMC Cell Biology* 16.

Leroy, X., Copin, M.-C., Devisme, L., Buisine, M.-P., Aubert, J.-P., Gosselin, B., and Porchet, N. (2002). Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology* 40, 450–457.

Leroy, X., Devisme, L., Buisine, M.-P., Copin, M.-C., Aubert, S., Gosselin, B., Aubert, J.-P., and Porchet, N. (2003). Expression of human mucin genes during normal and abnormal renal development. *Am. J. Clin. Pathol.* 120, 544–550.

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

Liang, X., Li, Z., Men, Q., Li, Y., Li, H., and Chong, T. (2018). miR-326 functions as a tumor suppressor in human prostatic carcinoma by targeting Mucin1. *Biomed. Pharmacother.* 108, 574–583.

Ligtenberg, M.J., Buijs, F., Vos, H.L., and Hilkens, J. (1992). Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res.* 52, 2318–2324.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.

Luo, H., Guo, W., Wang, F., You, Y., Wang, J., Chen, X., Wang, J., Wang, Y., Du, Y., Chen, X., et al. (2015). miR-1291 targets mucin 1 inhibiting cell proliferation and invasion to promote cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 34, 2665–2673.

M

Maeda, T., Hiraki, M., Jin, C., Rajabi, H., Tagde, A., Alam, M., Bouillez, A., Hu, X., Suzuki, Y., Miyo, M., et al. (2018). MUC1-C Induces PD-L1 and Immune Evasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 78, 205–215.

Mann, B., Klussmann, E., Vandamme-Feldhaus, V., Iwersen, M., Hanski, M.L., Riecken, E.O., Buhr, H.J., Schauer, R., Kim, Y.S., and Hanski, C. (1997). Low O-acetylation of sialyl-Le(x) contributes to its overexpression in colon carcinoma metastases. *Int. J. Cancer* 72, 258–264.

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

Moniaux, N., Escande, F., Porchet, N., Aubert, J.P., and Batra, S.K. (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front. Biosci.* 6, D1192-1206.

N

Nabavinia, M.S., Gholoobi, A., Charbgo, F., Nabavinia, M., Ramezani, M., and Abnous, K. (2017). Anti-MUC1 aptamer: A potential opportunity for cancer treatment. *Med Res Rev* 37, 1518–1539.

Nath, S., and Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine* 20, 332–342.

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

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

Nicolazzi, C., Caron, A., Tellier, A., Trombe, M., Pinkas, J., Payne, G., Carrez, C., Guerif, S., Maguin, M., Baffa, R., et al. (2020). An antibody drug conjugate targeting MUC1 associated carbohydrate CA6, shows promising anti-tumor activities. *Mol. Cancer Ther.*

O

Olou, A.A., King, R.J., Yu, F., and Singh, P.K. (2020). MUC1 oncoprotein mitigates ER stress via CDA-mediated reprogramming of pyrimidine metabolism. *Oncogene* 39, 3381–3395.

P

Panchamoorthy, G., Jin, C., Raina, D., Bharti, A., Yamamoto, M., Adeebge, D., Zhao, Q., Bronson, R., Jiang, S., Li, L., et al. (2018). Targeting the human MUC1-C oncoprotein with an antibody-drug conjugate. *JCI Insight* 3, e99880.

Pastor-Soler, N.M., Sutton, T.A., Mang, H.E., Kinlough, C.L., Gendler, S.J., Madsen, C.S., Bastacky, S.I., Ho, J., Al-bataineh, M.M., Hallows, K.R., et al. (2015). Muc1 is protective during kidney ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 308, F1452–F1462.

Pastushenko, I., and Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* 29, 212–226.

Pemberton, L.F., Rughetti, A., Taylor-Papadimitriou, J., and Gendler, S.J. (1996). The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells. *J. Biol. Chem.* 271, 2332–2340.

Perez-Vilar, J., and Hill, R.L. (1999). The Structure and Assembly of Secreted Mucins. *J. Biol. Chem.* 274, 31751–31754.

Perrais, M. (2002). Induction of MUC2 and MUC5AC Mucins by Factors of the Epidermal Growth Factor (EGF) Family Is Mediated by EGF Receptor/Ras/Raf/Extracellular Signal-regulated Kinase Cascade and Sp1*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 32258–32267.

Pick, A., Klinkhammer, W., and Wiese, M. (2010). Specific inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP). *ChemMedChem* 5, 1498–1505.

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

Pitroda, S.P., Khodarev, N.N., Beckett, M.A., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (2009). MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5837–5841.

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

Pyzer, A.R., Stroopinsky, D., Rosenblatt, J., Anastasiadou, E., Rajabi, H., Washington, A., Tagde, A., Chu, J.-H., Coll, M., Jiao, A.L., et al. (2017). MUC1 inhibition leads to decrease in PD-L1 levels via upregulation of miRNAs. *Leukemia* 31, 2780–2790.

Q

Quoix, E., Lena, H., Losonczy, G., Forget, F., Chouaid, C., Papai, Z., Gervais, R., Ottensmeier, C., Szczesna, A., Kazarnowicz, A., et al. (2016). TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME): results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *The Lancet Oncology* 17, 212–223.

R

Raetz, C.R.H., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700.

Raina, D., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2004). The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279, 20607–20612.

Raina, D., Kosugi, M., Ahmad, R., Panchamoorthy, G., Rajabi, H., Alam, M., Shimamura, T., Shapiro, G.I., Supko, J., Kharbanda, S., et al. (2011). Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 10, 806–816.

Raina, D., Ahmad, R., Rajabi, H., Panchamoorthy, G., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2012). Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *Int. J. Oncol.* 40, 1643–1649.

Raina, D., Uchida, Y., Kharbanda, A., Rajabi, H., Panchamoorthy, G., Jin, C., Kharbanda, S., Scaltriti, M., Baselga, J., and Kufe, D. (2014). Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 33, 3422–3431.

Rajabi, H., and Kufe, D. (2017). MUC1-C Oncoprotein Integrates a Program of EMT, Epigenetic Reprogramming and Immune Evasion in Human Carcinomas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1868, 117–122.

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

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

Rajabi, H., Alam, M., Takahashi, H., Kharbanda, A., Guha, M., Ahmad, R., and Kufe, D. (2014). MUC1-C oncoprotein activates the ZEB1/miR-200c regulatory loop and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 33, 1680–1689.

Ren, J., Agata, N., Chen, D., Li, Y., Yu, W., Huang, L., Raina, D., Chen, W., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2004). Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell* 5, 163–175.

Ren, J., Bharti, A., Raina, D., Chen, W., Ahmad, R., and Kufe, D. (2006). MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90. *Oncogene* 25, 20–31.

S

Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem* 164, 257–264.

Scelo, G., and Larose, T.L. (2018). Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J Clin Oncol* 36, 3574–3581.

Schroeder, J.A. (2001). Transgenic MUC1 Interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and Correlates with Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Mouse Mammary Gland. *Journal of Biological Chemistry* 276, 13057–13064.

Shukla, S.K., Purohit, V., Mehla, K., Gunda, V., Chaika, N.V., Vernucci, E., King, R.J., Abrego, J., Goode, G.D., Dasgupta, A., et al. (2017). MUC1 and HIF-1 α Signaling

Crosstalk Induces Anabolic Glucose Metabolism to Impart Gemcitabine Resistance to Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 32, 71-87.e7.

Siragusa, M., Zerilli, M., Iovino, F., Francipane, M.G., Lombardo, Y., Ricci-Vitiani, L., Di Gesù, G., Todaro, M., De Maria, R., and Stassi, G. (2007). MUC1 Oncoprotein Promotes Refractoriness to Chemotherapy in Thyroid Cancer Cells. *Cancer Res* 67, 5522–5530.

Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R.J., and Chen, Z.-S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer* 31, 58–72.

Spicer, A.P., Rowse, G.J., Lidner, T.K., and Gendler, S.J. (1995). Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J. Biol. Chem.* 270, 30093–30101.

Stroopinsky, D., Rosenblatt, J., Ito, K., Mills, H., Yin, L., Rajabi, H., Vasir, B., Kufe, T., Luptakova, K., Arnason, J., et al. (2013). MUC1 is a potential target for the treatment of acute myeloid leukemia stem cells. *Cancer Res* 73, 5569–5579.

Susantitaphong, P., Cruz, D.N., Cerda, J., Abulfaraj, M., Alqahtani, F., Koulouridis, I., Jaber, B.L., and Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology (2013). World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 8, 1482–1493.

Sutton, T.A., Fisher, C.J., and Molitoris, B.A. (2002). Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 62, 1539–1549.

T

Tagde, A., Rajabi, H., Bouillez, A., Alam, M., Gali, R., Bailey, S., Tai, Y.-T., Hideshima, T., Anderson, K., Avigan, D., et al. (2016). MUC1-C drives MYC in multiple myeloma. *Blood* 127, 2587–2597.

Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J.M., Graham, R., and Beatson, R. (2018). Latest developments in MUC1 immunotherapy. *Biochemical Society Transactions* 46, 659–668.

Thathiah, A., and Carson, D.D. (2004). MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochemical Journal* 382, 363–373.

Thathiah, A., Blobel, C.P., and Carson, D.D. (2003). Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme/ADAM 17 Mediates MUC1 Shedding. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3386–3394.

Tréhoux, S., Lahdaoui, F., Delpu, Y., Renaud, F., Leteurtre, E., Torrisani, J., Jonckheere, N., and Van Seuning, I. (2015). Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2392–2403.

U

Uchida, Y., Raina, D., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2013). Inhibition of the MUC1-C oncoprotein is synergistic with cytotoxic agents in the treatment of breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 14, 127–134.

Ueno, K., Koga, T., Kato, K., Golenbock, D.T., Gendler, S.J., Kai, H., and Kim, K.C. (2008). MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38, 263–268.

W

Wang, X., Zhou, X., Zeng, F., Wu, X., and Li, H. (2020). miR-485-5p inhibits the progression of breast cancer cells by negatively regulating MUC1. *Breast Cancer*.

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

Williams, M.A., Bauer, S., Lu, W., Guo, J., Walter, S., Bushnell, T.P., Lillehoj, E.P., and Georas, S.N. (2010). Deletion of the mucin-like molecule muc1 enhances dendritic cell activation in response to toll-like receptor ligands. *J Innate Immun* 2, 123–143.

Wolfs, T.G.A.M., Buurman, W.A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M.A.R.C., Hiemstra, P.S., and van 't Veer, C. (2002). In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, 1286–1293.

Wu, H., Xiao, Z., Wang, K., Liu, W., and Hao, Q. (2013). MiR-145 is downregulated in human ovarian cancer and modulates cell growth and invasion by targeting p70S6K1 and MUC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 693–700.

Wu, X., Chen, J., Wu, M., and Zhao, J.X. (2015). Aptamers: Active Targeting Ligands for Cancer Diagnosis and Therapy. *Theranostics* 5, 322–344.

Wykes, M., MacDonald, K.P.A., Tran, M., Quin, R.J., Xing, P.X., Gendler, S.J., Hart, D.N.J., and McGuckin, M.A. (2002). MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 72, 692–701.

X

Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., and Kosik, K.S. (2009). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137, 647–658.

Xu, W., Atkins, M.B., and McDermott, D.F. (2020). Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer. *Nat Rev Urol* 17, 137–150.

Xu, X., Padilla, M.T., Li, B., Wells, A., Kato, K., Tellez, C., Belinsky, S.A., Kim, K.C., and Lin, Y. (2014). MUC1 in Macrophage: Contributions to Cigarette Smoke-Induced Lung Cancer. *Cancer Research* 74, 460–470.

Y

Yamada, N., Nishida, Y., Tsutsumida, H., Hamada, T., Goto, M., Higashi, M., Nomoto, M., and Yonezawa, S. (2008). MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res.* 68, 2708–2716.

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

Yi, F.-T., and Lu, Q.-P. (2017). Mucin 1 promotes radioresistance in hepatocellular carcinoma cells through activation of JAK2/STAT3 signaling. *Oncol Lett* 14, 7571–7576.

Yin, L., and Kufe, D. (2011). MUC1-C Oncoprotein Blocks Terminal Differentiation of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by a ROS-Mediated Mechanism. *Genes Cancer* 2, 56–64.

Yin, L., Huang, L., and Kufe, D. (2004). MUC1 Oncoprotein Activates the FOXO3a Transcription Factor in a Survival Response to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 279, 45721–45727.

Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., Yokoyama, S., Kitamoto, S., Kitajima, S., and Goto, M. (2011). Mucins in human neoplasms: clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathol Int* 61, 697–716.

You, F., Jiang, L., Zhang, B., Lu, Q., Zhou, Q., Liao, X., Wu, H., Du, K., Zhu, Y., Meng, H., et al. (2016). Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Sci. China Life Sci.* 59, 386–397.

Yu, B., You, W., Chen, G., Yu, Y., and Yang, Q. (2019). MiR-140-5p inhibits cell proliferation and metastasis by regulating MUC1 via BCL2A1/MAPK pathway in triple negative breast cancer. *Cell Cycle* 18, 2641–2650.

Z

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

Zhang, C., Liu, J., Zhong, J.F., and Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research* 5, 22.

Zhang, J., Wang, L., Jiang, J., and Qiao, Z. (2020). Elevation of microRNA-512-5p inhibits MUC1 to reduce radioresistance in cervical cancer. *Cell Cycle* 19, 652–665.

Zhao, P., Meng, M., Xu, B., Dong, A., Ni, G., and Lu, L. (2017). Decreased expression of MUC1 induces apoptosis and inhibits migration in pancreatic cancer PANC-1 cells via regulation of Slug pathway. *Cancer Biomark* 20, 469–476.

Complete Manuscript Title:

MUC1 mitigates renal injury and inflammation in endotoxin induced acute kidney injury by inhibiting the TLR4-MD2 axis and reducing pro-inflammatory macrophages infiltration.

Authors:

Jean-Baptiste Gibier^{*1,2}, Thomas Swierczewski^{*1}, Marie Csanyi^{1,2}, Brigitte Hemon¹, Francois Glowacki^{1,3}, Patrice Maboudou⁴, Isabelle Van Seuningen¹, Christelle Cauffiez¹, Nicolas Pottier¹, Sebastien Aubert^{1,2}, Michael Perrais¹, Viviane Gnemmi^{1,2}.
(*equal contribution)

1 : Univ. Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

2 : CHU Lille, Institute of Pathology, F-59000 Lille, France

3 : CHU Lille, Nephrology Department, F-59000 Lille, France

4 : CHU Lille, Biochemistry Emergency Department, F-59000 Lille, France

Corresponding author informations :

Dr Jean-Baptiste Gibier, Centre de Biologie Pathologie, CHU Lille, F-59000, Lille, France.
jeanbaptiste.gibier@chru-lille.fr ; Phone : +33 3 20 44 54 54 ; Fax : +33 03 20 44 47 27

Running Head:

Role of MUC1 during LPS-induced AKI.

Conflicts of Interest and Source of Funding:

The authors have no financial conflicts of interest to disclose

Abstract

Sepsis is the leading cause of acute kidney injury (AKI) in critical care patients. A cornerstone of sepsis-associated AKI is dysregulated inflammation driven by excessive activation of TLR4 pathway. MUC1, a membrane bound mucin expressed in both epithelial tubular cells and renal macrophages, has been shown to be involved in the regulation of TLRs. Therefore we hypothesized that MUC1 could mitigate the renal inflammatory response to TLR4 activation. To test this hypothesis, we used a murine model of endotoxin-induced AKI by i.p. injection of lipopolysaccharide (LPS). We showed that Muc1^{-/-} mice have a more severe renal dysfunction, an increased activation of the tissular NF-κB pathway and secreted more pro inflammatory cytokines compare to Muc1^{+/+} mice. By flow cytometry, we observed that the proportion of M1 (pro-inflammatory) macrophages in the kidneys of Muc1^{-/-} mice was significantly increased. In human and murine primary macrophages, we showed that MUC1 is only induced in M1 type macrophages and that macrophages derived from Muc1^{-/-} mice secreted more pro-inflammatory cytokines. Eventually, in HEK293 cells, we showed that (i)-MUC1 cytosolic domain (CT) seems necessary for the negative regulation of TLR4 (ii) by proximity ligation assay, MUC1-CT is in close relationship with TLR4 and acts as a competitive inhibitor of the recruitment of MYD88. Overall our results support that in the context of endotoxin-induced AKI, MUC1 plays a significant role in controlling disease severity by regulating negatively the TLR4-MD2 axis.

Keywords:

LPS - MUC1 - Acute Kidney Injury - Inflammation - TLR4 - MYD88

Introduction

Sepsis induced acute kidney injury (AKI) is a common issue in critically ill patients in particular in intensive care units where its incidence is rising. It is associated with a high mortality and the risk of developing chronic comorbidities (1). It also represents a significant economic burden for the hospital. Despite those consequences on public health care, the pathogenesis of sepsis induced AKI is still incompletely understood and descriptions of its underlying mechanisms are required for the development of new therapeutics (2).

One key step in the pathogenesis of sepsis induced AKI is the regulation of the immune inflammatory response. Toll-like receptors (TLRs) play a pivotal role in this regard (3). TLRs are type I transmembrane proteins characterized by an intracellular Toll/IL1 receptor homology domain that are expressed by immune and non immune cells. They harbor receptors called pattern recognition receptors that are needed to trigger the activation of the innate immune system and the protective self-defense mechanisms in response to an invading pathogen (4). However, in case of excessive TLR activation, it leads to sustained and inappropriate pro-inflammatory response causing bystander tissue damage. Thus, precise control of TLR signaling in response to an injury is critical (5). In the kidney, TLR4 has been described as the main TLR involved during both sepsis and endotoxin-induced AKI (6-8). Even though many experimental studies have shown beneficial effects of blocking this receptor with exogenous molecules in LPS models of AKI (9, 10), data are still missing about the endogenous mechanisms that regulate its activation.

The membrane-bound mucin MUC1 is a large O-glycoprotein localized to the apical membrane of convoluted distal tubules and collecting ducts in the adult kidney (11). Unlike most of the others membrane-bound mucins, MUC1 has a cytosolic tail capable of signal transduction and is also expressed at the surface of a subset of immune cells (macrophages, dendritic cells and lymphocytes) (12). Several studies have suggested that MUC1 could be a negative regulator of inflammation in response to infectious stimuli (13-15). In particular, through its cytosolic region, MUC1 has been reported to inhibit TLR activation in immune and non immune cell types (16-22). However there is currently no data supporting a similar function of MUC1 in kidney.

In this study, using a model of endotoxin induced AKI, we present evidences that MUC1 has a previously unknown renoprotective function in this model. We showed that MUC1 is expressed in pro-inflammatory macrophages in mice and human and that its expression mitigates the inflammation after LPS stimulation. Moreover our results support that MUC1

anti-inflammatory effects are mainly driven through the inhibition of the TLR4-MD2 axis via its cytoplasmic domain.

Methods

Animals

Animal experiments were approved by the Animal Care and Research Committee of Nord Pas-de-Calais (protocol number CEEA 2016081119216614). Animals were housed in standard cages under constant temperature (24 °C), with a 12:12-h light-dark cycle. They were fed a standard diet and had free access to tap water. Germline Muc1 knockout mice, (C57BL/6 background) were generously provided by Dr. Sandra Gendler (Mayo Clinic, Scottsdale, USA). Heterozygous males and females (Muc1^{-/+}) were mated to produce WT (Muc1^{+/+}) and Muc1 homozygous knockout mice (Muc1^{-/-}). The genotypes of the mice were determined by PCR to identify female littermates for experiments as previously described (23). In every experiments, n=6 animals were used in each group.

Endotoxin induced acute kidney injury

In all experiments, 8- to 10-wk-old female mice were intra peritoneally injected with 10 mg/kg of pure *Escherichia coli* LPS serotype O111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Mice injected with sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) served as control. Mice were sacrificed at 6h, 24h or 48h and kidneys were harvested. Blood samples were obtained *via* tail bleeding under a warming lamp at 24h after LPS injection before sacrifice. They were centrifuged at 4 °C for 10 min at 1400g and serum was stored at -80 °C for later biochemical analysis. Blood urea nitrogen (BUN) concentrations were used to determine renal function and were measured with a AU480 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter, Brea, USA).

Histopathological examination

Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were sliced into 4- μ m-thick sections and stained with hematoxylin-eosin-saffron and periodic acid-Schiff. Slides were evaluated independently by two pathologists in a blinded manner, and representative images were recorded. Histological scores of acute tubular necrosis were established according to the percentage of involved tubules: score 1 < 10%, score 2 = 10%–25%; score 3 = 26%–50%; score 4 = 51%–75%; score 5 > 75%, as previously described (23).

For immunohistochemistry (IHC), paraffin-embedded renal sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol to water. Endogenous peroxidase activity was quenched on all sections with 0.3% H₂O₂. Anti-MUC1 (ThermoFisher, MA5-11202), anti-p65 (Abcam, phosphoS536, ab86299), anti-F4/80 (Bio-Rad, Cl:A3-1), anti-NIMP-R14 (Santa Cruz, sc-59338) were used as primary antibodies.

IHC scores were established as follows: For the neutrophils score, the number of NIMP-R14 positive cells per 10 high power fields of renal cortex was used. For the macrophages score, the number of F4/80 positive cells per 10 high power fields of renal cortex was used. For the phosphorylated p65 score, the absolute number of positive tubular cells nuclei per 10 high power fields of renal cortex was considered.

Flow cytometry

First, kidneys were homogenized using a gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec Inc., San Diego, USA). The fragments were then digested in 5 mL of complete DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/F12 1 : 1 medium (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 2 mg/mL collagenase IV (enzymatic activity: 200 U/mL) (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and 20% dispase (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). This step was performed three times at 37°C for 30 minutes, and the suspension was filtered with a mesh size of 70 µm after the last digestion steps. The cell suspension was washed twice in PBS and centrifuged for 5 minutes at 300 *g*. Erythrocytes were lysed using an RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, USA). After treatment with Fc-blocking Ab, cell surface staining was performed for 30 minutes on ice. Staining was performed with fluorochrome-labeled antibodies against CD45 (30-F11), Ly6G (1A8), MHC class II (M5/114), CD11b (M1/70), CD11c (N418), CD38 (90/CD38) and CD206 (C068C2) all purchased from BD Biosciences (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA). Antibodies were diluted in PBS containing 2% BSA to attenuate non specific signal. For each antibody, matched isotype controls (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA) were used to calibrate the multi-channels compensation and draw the gates. Cell viability was assessed with a Fixable Viability Stain (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA). Stained cells were analyzed on a BD LSRFortessa™X-20 cell analyzer (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA). Data were analyzed with Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter, Brea, USA).

RNA extraction and quantification by the reverse-transcription-quantitative polymerase chain reaction technique (RT-qPCR)

Total RNA extraction was performed with miRNeasy miniKit® (Qiagen Inc., Valencia, CA) and reverse transcription with the "High Capacity cDNA Reverse Transcriptase " kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The Taqman assay (Applied Biosystems, Foster City, USA) was used for RT-qPCR with human- and mouse-specific primers in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Peptidylprolyl isomerase A (Ppia) mRNA was used as an internal control. Transcript levels were calculated by the 2⁻ ΔΔCT method. Relative expression levels were

obtained by normalizing with respect to *Ppia* transcripts. For animals, relative expression levels of targeted genes were obtained by setting the expression level of Muc1 +/+ PBS-injected mice at 1. For *in vitro* studies, relative expression levels of targeted genes were obtained by setting the expression level of non committed macrophages from Muc1 +/+ mice at 1.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Cytokine concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using kits: Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go® (eBioscience, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions. A standard ELISA curve was generated for each plate. The Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was used for acquiring results.

Primary cultures of human macrophages

Human monocytes isolated by counterflow elutriation of peripheral blood mononuclear cells were purchased from the Plateforme DTC-CICBT0503, Institut de Biologie, CHU Hôtel Dieu de Nantes. To induce macrophage differentiation, human monocytes were treated with either 25ng/mL of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) (Peprotech, London, UK) or 100ng/mL of human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) (Peprotech, London, UK) for M1 and M2 polarization respectively. M1 human macrophages were obtained after 48h of stimulation by 50 ng/mL ultrapure LPS serotype O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) and 20 ng/mL human IFN- γ (Peprotech, London, UK). M2 human macrophages were obtained after 48 hours of stimulation by 20 ng/mL human IL-4 with 20 ng/mL human IL-13 (Peprotech, London, UK). Non-committed macrophages (M0 macrophages) that received only culture medium and GM-CSF were used as controls. Polarization of macrophages was assessed by RT-qPCR analysis for expression of their signature genes (IFN- γ and IRF5 as M1 markers and IL-10 and IRF4 as M2 markers).

Primary cultures of mouse macrophages

Mouse macrophages were isolated from 6- to 10-week-old C57BL6/J Muc1+/+ or Muc1-/- mice as follows. Bone marrow was harvested from the femurs and tibias, filtered through mesh size of 70 μ m and erythrocytes were lysed using an RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, USA). Remaining cells were cultured for 7 days in RPMI medium containing 5% Fetal Bovine Serum and 25 ng/mL murine macrophage colony-stimulating factor (mM-CSF) (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) to induce mouse bone marrow-derived macrophage differentiation. Mouse macrophages were seeded at 2.0×10^6 cells/well in 6-well plates and cultured for 2 days before differentiation into M1 cells with 100 ng/mL ultrapure LPS serotype

O111:B4 (Sigma, St. Louis, USA) plus 20 ng/mL murine IFN- γ (Peprotech, London, UK), or into M2 cells with 20 ng/mL murine IL-4 plus 20 ng/mL murine IL-13 (Peprotech, London, UK).

Mouse peritoneal macrophages were isolated from thioglycollate-treated mice. Thioglycollate Medium Brewer Modified (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA) was autoclaved and aged for at least 1 month prior to use. Mice were intra peritoneally injected with 1 mL of 4% thioglycollate. 3 days after the injection, peritoneal cells were harvested by peritoneal lavage with cold PBS used. Macrophages were enriched by adherence by plating peritoneal cells in DMEM medium for 3h. Non adherent cells were removed. Peritoneal macrophages were polarized into M1 or M2 macrophages according to the previously described procedure. Polarization of macrophages was assessed by RT-qPCR analysis for expression of their signature genes (CD86 and NOS2 as M1 markers and ARG1 and CHIL3 as M2 markers).

Cell line cultures and *in vitro* assays

HEK293 clones expressing TLR4-MD2-CD14 were purchased from Invivogen® (Invivogen, Toulouse, France). The cells were maintained at 37°C under a 5% CO₂ humidified atmosphere. For all *in vitro* assays, ultrapure *Escherichia coli* LPS serotype O111:B4 (Sigma, St. Louis, USA) was used.

Luciferase assay

HEK293-TLR4-MD2-CD14 cells were transiently transfected with the Lipofectamine LTX & Plus Reagent kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) as previously described (24). Different MUC1 expressing vectors were used: MUC1-Full Length (MUC1), MUC1 deleted for its Tandem Repeat domain (MUC1-dTR), MUC1 deleted for its Cytoplasmic Tail (MUC1- dCT) (all gifts from S.J. Gendler, Mayo Clinic, Scottsdale, USA) or an empty vector (EV). To determine NF- κ B activity in HEK293 cells, transient transfections were performed with Lipofectamine (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) as previously described (25). Co-transfection experiments were carried out in the presence of 0.5 μ g of p3NF- κ B-luciferase reporter plasmid or pGL2-AP1. Twenty-four hours after transfection, the cells were treated with ultrapure LPS serotype O111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) or PBS. After 24h incubation, cell lysate was measured for firefly luciferase activity with the Dual Luminescence Assay Kit (Promega Corporation, Madison, USA) using a luminometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Results were expressed as relative luciferase units normalized to protein quantity.

Proximity Ligation Assays

HEK293-TLR4-MD2-CD14 cells were transfected with plasmids containing an influenza hemagglutinin (HA)-tagged TLR4 (Invivogen, Toulouse, France) and a GFP reporter. The proximity ligation assay (PLA) was performed using the Duolink *in situ* Red Starter Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The conjugation of the antibodies was performed following the instructions of Duolink® In situ Probemaker: anti-MUC1 (Abcam, ab109185) or anti-MYD88 (Abcam, ab133739) primary antibodies were conjugated with PLA probe PLUS and anti-HA (Santa Cruz, F7, sc-7392) antibody with PLA probe MINUS.

The quantification of spots was performed using the software Qupath (26) on twenty-five GFP+ cells (randomly picked) in each group. Cell detection was performed on DAPI channel and visual assessment was used to assess the correct recognition of nuclei. In non-transfected cells, up to 5 spots corresponding to non specific signal or to superposition of cells could be observed, therefore all results were reduced by a factor 5.

Confocal microscopy was performed on a Zeiss® LSM 710 Live Microscope (Zeiss Humphrey Systems, Dublin, USA).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software 8.4, San Diego, USA). Data are presented as means \pm S.E.M. Comparisons between independent groups data were made using one-way (standard) analysis of variance (ANOVA). In the presence of between group correlations, two-way (nested) ANOVA models were chosen to account for the data's non-independency. All significant ANOVA global F-tests were followed by post-hoc tests (all possible comparisons) using the conservative Bonferroni correction to account for the multiple comparisons-linked type I error increase. In regard to ANOVA validation, we systematically assessed the assumption of normality by investigating the standardized residuals both graphically (plots inspection) and empirically (Shapiro-Wilk test). The assumption of homoscedasticity and the lack of influent points were also checked graphically. All tests were two-sided, and *P*-values $<.05$ were considered as significant.

Results

MUC1 has protective effects on LPS-Induced Renal Injury

To determine if MUC1 plays a role in endotoxin induced AKI, Muc1^{+/+} and Muc1^{-/-} mice were intraperitoneally injected with LPS a specific agonist of TLR4. BUN levels and Kidney-injury molecule-1 (Kim-1) transcripts were used for the assessment of renal injury at 24h. As shown in Fig 1-A, increase BUN levels were observed after LPS injection in both mice compared to controls (PBS). Furthermore, Muc1^{-/-} mice developed more severe acute renal failure than the Muc1^{+/+} mice at 24h after LPS (BUN levels: 78.8 mg/dl \pm 12.5 vs 10.9 mg/dl \pm 2.46; $p < 0.01$). In line with those results, RT-qPCR performed on whole-kidney from LPS treated Muc1^{-/-} mice revealed a significant higher level of Kim-1 transcripts as compared to Muc1^{-/-} LPS treated animals (Fig 1-B). Histological analysis of harvested kidneys at 24h after the injection of LPS revealed very discrete tubular damages and did not show any difference between the Muc1^{-/-} and Muc1^{+/+} treated groups (Fig 1-C). We hypothesized that this discrepancy with the functional tests may be related to a delay in the constitution of tissue injury and looked at different time points. At 6h after the injury, both Muc1^{+/+} and Muc1^{-/-} mice appeared to have subnormal kidney tubules (Fig 1-D). However at 48h, Muc1^{-/-} mice exhibited more severe manifestations of acute tubular necrosis (ie loss of brush border membranes, sloughing of tubular epithelial cells, dilation of tubules and cast formation) than Muc1^{-/-} (Fig 1-C,D). As LPS is known to induce NF- κ B signaling pathways, we also monitored the nuclear expression of the phosphorylated p65 subunit in tubular cells at 6h, 24h and 48h of the injection (Fig1-E,F). Both Muc1^{+/+} and ^{-/-} mice enhanced p65 nuclear translocation after LPS injection (Fig1-E). We found a higher proportion of stained nuclei at 6h in the Muc1^{-/-} treated mice compared to Muc1^{+/+} mice (Fig 1-F), suggesting that Muc1 expression is associated with NF- κ B signal pathway inhibition.

MUC1 mitigates the secretion of pro-inflammatory cytokines after LPS injection

To study the effect of the expression of Muc1 on the secretion of pro-inflammatory cytokines generated by LPS renal injury, the levels of IL-6, IL-1 β , Mcp-1, Tnf- α , and IL-18 in murine renal tissue were assessed by RT-qPCR at 24h after the injection of LPS (Fig 2-A to E). After LPS injection, both Muc1^{+/+} and ^{-/-} mice showed significant increase of renal transcripts of pro-inflammatory cytokines compared to controls (PBS). In the LPS treated groups, we found a significant increase in the relative expression of IL-6 and IL-1 β in the Muc1^{-/-} compared to Muc1^{+/+} mice (Fig 2-A,B). This effect was not observed for MCP-1, TNF- α and IL-18 (Fig 2-C to E). ELISA further showed that serum concentrations of IL-6 in treated Muc1^{-/-} mice

significantly exceeded those of their WT littermates (107.5 pg/mg \pm .54.1 vs 26.3 pg/mg \pm .12.4; $p < 0.001$) (Fig 2-F).

A neutrophilic infiltration of renal parenchyma and an upregulation of adhesion chemokines that mediate neutrophils recruitment such as ICAM-1 have been previously reported after LPS injection (7). So, we monitored the extent of neutrophils in the renal cortex of Muc1^{-/-} and Muc1^{+/+} mice at different time points (6h, 24h, 48h) by immunohistochemistry. We confirmed that LPS leads to an increase in the number of renal neutrophils in the renal cortex but we found no significant difference between the two treated groups (Fig 2-G). In support of this result, renal relative expression of ICAM-1 at 24h following LPS treatment was comparable between the two groups (Fig 2-H)

Recruitment of pro-inflammatory macrophages after LPS injection is reduced in WT mice

We hypothesized that the infiltration of macrophages within the kidneys might explain the difference in the secretion of pro-inflammatory cytokines between the two groups. To assess this hypothesis, immunohistochemistry with pan-macrophages marker F4/80 was performed on kidney sections at 24h. Even if LPS injection increases the absolute numbers of renal macrophages in all mice, we did not find any significant difference between Muc1^{-/-} and Muc1^{+/+} treated mice (Fig 3-A).

To gain further insights, renal macrophages were collected from harvested kidneys and analyzed by flow cytometry. In line with our immunohistochemistry results, we found an increased of MHCII⁺/CD11b⁺/CD11c^{low} phagocytic cells in kidneys of both Muc1^{+/+} and Muc1^{-/-} after LPS injection compared to control (PBS), but no significant difference between the two LPS treated groups (Fig 3-B). However, we noted a significant increase of the M1 macrophagic population (MHCII⁺/CD11b⁺/CD11c^{low}/CD38⁺) in the kidneys of Muc1^{-/-} mice compared to Muc1^{+/+} after LPS injection (Fig 3-C,D). Interestingly, the percentage of M2 phagocytic cells (MHCII⁺/CD11b⁺/CD11c^{low}/CD206⁺) followed an inverse tendency and was reduced in Muc1^{-/-} mice (Fig 3-E,D)

To validate these results, we also characterized the renal M1/M2 macrophage distribution in harvested kidneys by RT-qPCR. Increased mRNA expression of NOS2 (M1 marker) was observed in Muc1^{-/-} mice (Fig 3-F) whereas no significant difference was found for ARG1, a M2 marker (Fig 3-G).

MUC1 is mainly expressed in pro-inflammatory macrophages in both mice and human and mitigates the secretion of pro-inflammatory cytokines

First, we studied MUC1 expression in human macrophages obtained from elutriated monocytes. Using RT-qPCR, we showed that MUC1 relative expression was increased in M1 compared to M2 and M0 non-committed human macrophages (Fig 4-A). Moreover, we showed by immunofluorescence that MUC1 protein expression was only observed in M1 macrophages but not in M2 or M0 macrophages (Fig 4-B).

Then, in two populations of mouse macrophages: bone-marrow derived macrophages (mBMdM) and thioglycollate-elicited peritoneal macrophages (Mp), we confirmed that Muc1 expression was induced in M1 macrophages derived from Muc1^{+/+} mice (Fig4-C,D). Muc1 was not induced in murine M2 macrophages derived from Muc1^{+/+} mice (Fig4-C,D). Thereafter, we compare the relative expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) in both populations of macrophages derived from Muc1^{+/+} and Muc1^{-/-}. After M1 stimulation (LPS and IFN- γ), we observed that both mBMdM and peritoneal macrophages derived from Muc1^{-/-} showed a significant increased relative expression of IL-6 and IL-1 β compared to macrophages derived from Muc1^{+/+} mice (Fig 4-E,F,G). ELISA determination of IL-6 levels in the supernatants of mBMdM support those findings (Fig 4-I). TNF- α expression was increased in both M1 macrophages compare to M0, but its level did not significantly differ between Muc1^{+/+} and Muc1^{-/-} mice (Fig 4-H).

Anti-inflammatory activity of MUC1 during TLR4 activation is mainly dependent of its cytoplasmic tail which inhibits the recruitment of the intracellular adapter MYD88

To study the impact of MUC1 in LPS-TLR4 signaling pathway, we used HEK293 cells expressing TLR4-MD2-CD14 transfected with MUC1 expressing vector or an empty vector. First, we observed by RT-qPCR that MUC1 expression was associated with a significant inhibition of the pro-inflammatory cytokine TNF- α expression, after LPS stimulation (Fig 5-A). Then, because NF- κ B and activator protein 1 (AP1) are key downstream factors of the TLR4 signaling pathway, we examined whether MUC1 expression influences these pathways by using luciferase gene reporter assays. When the cells were co-transfected with vector expressing MUC1 full length (MUC1), MUC1 deleted of its tandem repeat domain (dTR) or MUC1 deleted of its cytoplasmic tail (dCT), transcriptional activity mediated by NF- κ B was significantly decreased (Fig 5-B). Interestingly, MUC1 and MUC1dTR expression decreased significantly transcriptional activity mediated AP1 compared to EV control but not

for MUC1dCT (Fig 5C) suggesting that MUC1 CT domain is involved for the anti-inflammatory effect of MUC1 against TLR4 activation.

Few studies have shown that MUC1 could inhibit TLR5 signaling pathway *via* inhibition of the recruitment of the intracellular adapter MYD88 (19). We hypothesized that MUC1 could also interact with TLR4 and block MYD88 recruitment. By using proximity ligation assay (PLA) which is a technique to detect in cell protein-protein interactions as punctuate spots that can be quantified, we were able to detect positive signals in cells expressing TLR4-HA and MUC1-CT (Fig 5-D) suggesting an interaction between the two proteins. Next, using an MYD88- TLR4-HA PLA assay, we compared the number of spots between HEK-293 cells transfected with either a MUC1 expressing vector or an empty vector. We showed a significant decrease in the absolute number of spots between the two conditions (Fig 5-E, F). This result confirms the inhibition of the MYD88 recruitment to TLR4 in MUC1 expressing cells.

Discussion

Although MUC1 is the most expressed mucin in the adult kidney (11), there are only limited data about its role in inflammatory kidney diseases. MUC1 is known to serve as a physical barrier for the epithelia towards the aggression by external pathogens (27). Recent data in the airways and in the digestive tract, suggest that MUC1 also exercise anti-inflammatory functions by acting on innate pattern recognition receptors in particular Toll-like receptors (TLRs) (12,14). We and others had reported a nephroprotective role of MUC1 during the early phases of an ischemia-reperfusion model of AKI (23,28) but data regarding its anti-inflammatory properties are lacking in the kidney. Moreover, the interaction of MUC1 and TLR4 which is the main TLR activated in the kidney in both ischemic and sepsis AKI has not been investigated properly. Yet, some reports suggest that MUC1 could negatively regulates TLR4 on both epithelial and immune cells (13,16).

For the first time we present evidence that MUC1 has a nephroprotective role in endotoxin-induced AKI. As we hypothesized, MUC1 mitigates the secretion of pro-inflammatory cytokines and the activation of NF- κ B pathway following LPS injection. This decrease of the pro-inflammatory stimuli within the kidney is associated with less tissular damages and better renal function. In line with what has been described in the airways and digestive tract, those results suggest that MUC1 expression prevents the development of an excessive inflammatory response to injury (12).

Influx of different types of inflammatory cells have been described in endotoxin induced AKI. Cunningham *et al* reported renal neutrophil infiltration between 6 and 48h after LPS injection (7,29). They found significantly less neutrophil in mice bearing an inactivating mutation of the TLR4 gene (29). However, our results provide that Muc1 expression seems to have no impact on neutrophils infiltration in kidney after LPS exposure as we failed to observe any difference between Muc1^{+/+} and Muc1^{-/-} treated mice in our model. Because MUC1 is not expressed on endothelial cells, this result suggests that TLR4 endothelial expression is required for the early leukocytes infiltration as it has been shown in ischemic model (30).

As macrophages are responsible for the early secretion of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced AKI (6), we also monitored the number and the phenotype of F4/80 positive cells. Interestingly, we did not notice any difference in the absolute numbers of macrophages between our two treated groups but we observed a major switch towards M1 phenotype in the Muc1^{-/-} mice that could account for the greater pro-inflammatory cytokines secretion in

this group. Those results support the notion that transition from M1 to M2 phenotype is a major protective event during endotoxin induced AKI as it has been reported previously (31).

To characterize the expression and the role of MUC1 in different types of macrophages, we performed *in vitro* polarization of both human and murine macrophages. Because renal macrophages are not only monocyte-derived macrophages but have various origins (32), we studied two populations of mouse macrophages to account for this complexity. As it has been reported by Ueno *et al*, we found MUC1 expression on M1 macrophages but not on none-committed or M2 macrophages (16). Moreover, we showed that both bone-marrow derived macrophages and thioglycollate-elicited peritoneal macrophages issued from Muc1^{-/-} generate more pro-inflammatory cytokines than macrophages derived from Muc1^{+/+} mice. Considering that pro-inflammatory secretion of cytokines in the endotoxin model is largely dependent on TLR4 pathway (33), those results suggest that the induction of MUC1 on M1 macrophages, which also expresses TLR4, may act as a regulatory mechanism to prevent excessive inflammation.

Our *in vitro* experiments bring new data supporting a direct inhibition of TLR4 by MUC1. As described in the literature, we found that MUC1 regulation of TLR4 seems mainly dependent on the MUC1-CT domain (16). Although less important, the effect of pMUC1-dTR could be secondary to steric hindrance limiting the binding of LPS to TLR4. In the lung, MUC1-CT has been shown to competitively inhibit the recruitment of MYD88 by TLR5 at the membrane (19). To investigate if a similar mechanism could occur, we used a PLA assay and show for the first time that MUC1-CT and TLR4 are in close relationship within the cells. Moreover, we showed that HEK-293 cells expressing MUC1 have a reduced recruitment of MYD88 following LPS exposure than cells transfected with an empty vector. The activation of TLR4 could also trigger a MYD88-independent pathway through the recruitment of TRIF (34). Because MUC1-CT may also be involved in the regulation of this step (35), further studies will be required to precise the respective role of MUC1 on the MYD88 dependant and independent pathways following TLR4 activation.

To conclude, our results support a previously unrecognized role of MUC1 as a nephroprotective agent in LPS-induced AKI through its anti-inflammatory function and the inhibition of TLR4 pathway. Interestingly, in a model of sepsis caused by cecal ligation and puncture (CLP), Wang *et al*. showed that the increased expression of MUC1 was associated with less histological damages in the kidneys and overall less inflammation (36). As TLR4 activation is a major mechanism responsible for sepsis-induced AKI, their results suggest

that MUC1 inhibition of TLR4 may also be important in alleviating kidney damages during sepsis.

Some important questions remained unanswered. In particular, we did not address the respective role of MUC1 in the epithelial and immune contingents. TLR4 is known to be expressed in leukocytes and also in epithelial tubular cells after LPS injection (37). Therefore MUC1 could negatively regulate TLR4 at different levels. Moreover, even if it is well established that cytokines secretion in endotoxin induced AKI is dependent from the immune systems, the question whether or not renal dysfunction is mediated by the epithelial remains controversial (33). As a consequence, we could not exclude that the nephroprotective effect of MUC1 after LPS injection reflects mostly a direct action of MUC1 on epithelial cells rather than a consequence of its anti-inflammatory effects on macrophages. This should prompt further studies to better elucidate those findings.

Figures

Fig 1: Muc1 mitigates renal dysfunction and histological tubular lesions in a mouse model of intra-peritoneal LPS injection. Mice (n=6 per group) were injected with pure *Escherichia coli* LPS serotype O111:B4 (10 mg/kg). (A): Blood samples were collected at 24h for BUN measurement. (B): Kidneys were harvested at 24h after the injection to measure out Kim-1. mRNA expression levels by RT-qPCR. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts. (C-F): Kidneys were harvested at 6, 24 and 48 hours after LPS injection for histological analysis (n=6 per group). (C-D): PAS stain was used to assess acute tubular necrosis (ATN). (C): Representative sections were captured (magnification x100). Severe lesions were shown (yellow arrows). (D): ATN histological score from WT and Muc1-KO mice. (E): Immunohistochemistry study performed with anti-p65 antibody (magnification x100). (F): Graphic presentations of immunohistochemistry results showing the score of p65-positive tubular epithelial cells from WT and Muc1-KO mice. All statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between WT and KO mice was as follows: * $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns = non-significant.

Fig 2: Muc1 has anti-inflammatory properties in the model of intra-peritoneal LPS injection. (A–E, H) Levels of mRNAs encoding pro-inflammatory markers (IL-6, IL-1 β , IL-18, and TNF- α) and adhesion molecules (ICAM, MCP-1) were determined by RT-qPCR at 24h (n=6 per group). Results were normalized with respect to control Ppia transcripts. (F) Concentration of IL-6 (pg/mL) was determined by ELISA on total protein extract. (G) Graphic presentation of immunohistochemistry results showing NIMP-R14-positive neutrophils in kidneys from WT and Muc1-KO mice. Inflammatory positive cells were counted in 10 randomly high-magnification ($\times 400$) fields per kidneys. All statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between WT and KO mice was as follows: * $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns = non-significant.

Fig 3: Muc1 influences the phenotype of infiltrating macrophages in the model of intra-peritoneal LPS injection. (A): Results of the quantification of F4/80-positive macrophages in the kidneys from WT and Muc1-KO mice (n=6 per group). Inflammatory positive cells were counted in 10 randomly high-magnification (magnification $\times 400$) fields per kidneys. (B–E): Flow cytometry results. (B): The percentage of MHCII⁺/CD11b⁺/CD11c^{low/int} phagocytic cells was increased 24h after LPS injection but was similar between the two mouse strains. (C–E): The percentage of M1 macrophages (CD38⁺) and M2 macrophages (CD206⁺) among each condition is presented. (F–G): NOS2 (M1 marker) and ARG1 (M2 marker) were used for RT-qPCR studies. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts. All statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between WT and KO mice was as follows: * $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ns = non-significant.

Fig 4: Muc1 is expressed in pro-inflammatory macrophages. (A–B): Human monocytes obtained by elutriation were differentiated in macrophages *in vitro*. (A): After polarization, the mRNA level of MUC1 was determined by RT-qPCR in M1, M2 and non committed macrophages. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts and the

values obtained of non committed macrophages were set at 1. (B): Immunofluorescence study with anti-MUC1 antibody MUC1 in non committed (M0), M1 and M2 macrophages. Similar results were observed by RT-qPCR in both murine bone marrow derived macrophages (bMfM) (C) and peritoneal macrophages (Mp) (D). Next, the relative expression of IL-6 was determined by RT-qPCR in M1 macrophages issued from Muc1^{-/-} or Muc1^{+/+} mice. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts and the values obtained of Muc1^{+/+} non committed macrophages were set at 1. (E, F) In both bMfM and Mp populations, IL-6 relative expression was higher in macrophages derived from Muc1^{-/-} mice compare to macrophages from Muc1^{+/+}. (G,H) In bMfM, we found similar results with IL-1 β by RT-qPCR however there was no significant difference regarding TNF- α relative expression between the M1 macrophages from Muc1^{+/+} or Muc1^{-/-} (I) Concentration of IL-6 (pg/mL) was determined by ELISA on the supernatants of M1 or non committed macrophages.

1-way ANOVA with Bonferroni correction was performed for Figures 4 A, C and D. All others statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between the macrophages was as follows: * $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ns = non-significant

Fig 5: MUC1 inhibits the TLR4 pathway. (A) HEK-293 cells expressing TLR4-MD2-CD14 were transfected with MUC1 or an empty vector (EV) and stimulated with LPS. The activation of the TLR4 pathway was monitored by RT-qPCR. Results were normalized with respect to control PPIA transcripts and the values of non stimulated EV-HEK-293 cells were set at 1. (B, C) New transfection experiments were performed with MUC1 full length or deleted from its cytoplasmic tail (dCT) or its tandem repeat (dTR). NF- κ B and AP-1 luciferase assays were used to monitored the response after LPS stimulation. (D) Proximity ligation assay (PLA) with anti-HA and anti-MUC1 antibodies was performed in HEK-293 cells transfected with TLR4-HA, MUC1 and a GFP reporter. Representative sections showing red spots in GFP⁺ cells (arrows). (E) Results of a PLA assay performed with anti-HA and anti-MYD88 antibodies. Representative sections showing increased number of spots in MUC1⁻ GFP⁺ cells compare to MUC1⁺ GFP⁺ cells. (F) Graphic presentations of PLA results showing the absolute number of spots in 25 GFP⁺ cells (randomly picked) in both groups (quantification was made with QuPath software). *In vitro* experiments are the results of n=3 repeated experiments with multiple replicates. All statistical analysis were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between the conditions was as follows: * $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ns = non-significant.

Acknowledgements:

Muc1-KO mice and the MUC1 expression vector were gifts from SJ Gendler (Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA). The M8 anti-MUC1 antibody was a gift from D. Swallow (University College London, UK). The authors are grateful to Nicolas Van Poucke (Institute of Pathology, CHRU Lille) and Rose-Marie Siminski & Marie-Hélène Gevaert (Department of Histology, Faculté de Médecine, Lille) for their technical help. The authors thank the staff of the High-Technology Animal Facility, Faculté de Médecine Pôle Recherche, Lille. They also thank Dr. Nathalie Jouy of the Flow Core Facility of BICeL (campus Hospitalo-universitaire IRCL, Lille) and Meryem Tardivel of the Bio Imaging Platform (BiceL, Lille).

References

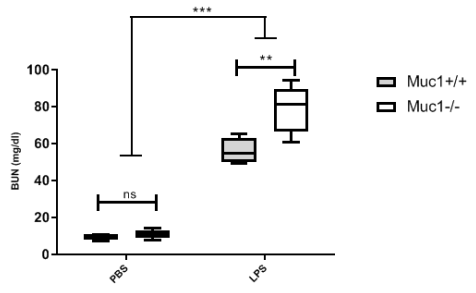
- 1- Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(6):999-1006. doi:10.1681/ASN.2010050484
- 2- Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int*. 2019;96(5):1083-1099. doi:10.1016/j.kint.2019.05.026
- 3- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):776-787. doi:10.1038/nri2402
- 4- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461. Published 2014 Sep 25. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- 5- Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock*. 2008;29(3):315-321. doi:10.1097/SHK.0b013e318157ee55
- 6- Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(3):573-588. doi:10.1111/apha.12798
- 7- Cunningham PN, Wang Y, Guo R, He G, Quigg RJ: Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. *J Immunol* 172: 2629–2635, 2004
- 8- Ramesh G, Zhang B, Uematsu S, Akira S, Reeves WB: Endotoxin and cisplatin synergistically induce renal dysfunction and cytokine production in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F325-F332, 2007
- 9- Fenhammar J, Rundgren M, Forestier J, Kalman S, Eriksson S, Frithiof R. Toll-like receptor 4 inhibitor TAK-242 attenuates acute kidney injury in endotoxemic sheep. *Anesthesiology*. 2011;114(5):1130-1137. doi:10.1097/ALN.0b013e31820b8b44
- 10- Fenhammar J, Rundgren M, Hultenby K, et al. Renal effects of treatment with a TLR4 inhibitor in conscious septic sheep. *Crit Care*. 2014;18(5):488. Published 2014 Sep 3. doi:10.1186/s13054-014-0488-y
- 11- Leroy X, Copin MC, Devisme L, et al. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002;40(5):450-457. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01408.x
- 12- Kato K, Lillehoj EP, Lu W, Kim KC. MUC1: The First Respiratory Mucin with an Anti-Inflammatory Function. *J Clin Med*. 2017;6(12):110. Published 2017 Nov 29. doi:10.3390/jcm6120110
- 13- Sheng YH, Triyana S, Wang R, et al. MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal Immunol*. 2013;6(3):557-568. doi:10.1038/mi.2012.98
- 14- Ng GZ, Menheniott TR, Every AL, et al. The MUC1 mucin protects against *Helicobacter pylori* pathogenesis in mice by regulation of the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2016;65(7):1087-1099. doi:10.1136/gutjnl-2014-307175

- 15- McAuley JL, Corcilius L, Tan HX, Payne RJ, McGuckin MA, Brown LE. The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol.* 2017;10(6):1581-1593. doi:10.1038/mi.2017.16
- 16- Ueno K, Koga T, Kato K, et al. MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(3):263-268. doi:10.1165/rcmb.2007-0336RC
- 17-Kato K, Uchino R, Lillehoj EP, Knox K, Lin Y, Kim KC. Membrane-Tethered MUC1 Mucin Counter-Regulates the Phagocytic Activity of Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(4):515-523. doi:10.1165/rcmb.2015-0177OC
- 18- Kato K, Lillehoj EP, Kim KC. MUC1 regulates epithelial inflammation and apoptosis by PolyI:C through inhibition of Toll/IL-1 receptor-domain-containing adapter-inducing IFN- β (TRIF) recruitment to Toll-like receptor 3. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;51(3):446-454. doi:10.1165/rcmb.2014-0018OC
- 19- Kato K, Lillehoj EP, Park YS, et al. Membrane-tethered MUC1 mucin is phosphorylated by epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells and associates with TLR5 to inhibit recruitment of MyD88. *J Immunol.* 2012;188(4):2014-2022. doi:10.4049/jimmunol.1102405
- 20- Menon BB, Kaiser-Marko C, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Suppression of Toll-like receptor-mediated innate immune responses at the ocular surface by the membrane-associated mucins MUC1 and MUC16. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):1000-1008. doi:10.1038/mi.2014.127
- 21- Williams MA, Bauer S, Lu W, et al. Deletion of the mucin-like molecule muc1 enhances dendritic cell activation in response to toll-like receptor ligands. *J Innate Immun.* 2010;2(2):123-143. doi:10.1159/000254790
- 22- Kyo Y, Kato K, Park YS, et al. Antiinflammatory role of MUC1 mucin during infection with nontypeable Haemophilus influenzae [published correction appears in Am J Respir Cell Mol Biol.2012 Apr;46(4):561. Gajhate, Sachin [corrected to Gajghate, Sachin]]. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46(2):149-156. doi:10.1165/rcmb.2011-0142OC
- 23- Gibier JB, Hémon B, Fanchon M, et al. Dual role of MUC1 mucin in kidney ischemia-reperfusion injury: Nephroprotector in early phase, but pro-fibrotic in late phase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(6):1336-1349. doi:10.1016/j.bbdis.2017.03.023
- 24- Gnemmi V, Bouillez A, Gaudelot K, Hémon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Villers A, Vindrieux D, Cauffiez C, Van Seuningen I, Bernard D, Leroy X, Aubert S, Perrais M. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ β -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett.* 2014 May 1;346(2):225-36. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.029.
- 25- Bouillez A., Gnemmi V., Gaudelot K., Hémon B., Ringot B., Pottier N., Glowacki F., Butruille C., Cauffiez C., Hamdane M., Sergeant N., Seuningen I. Van, Leroy X., et al MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget.* 2014; 5: 754-763.

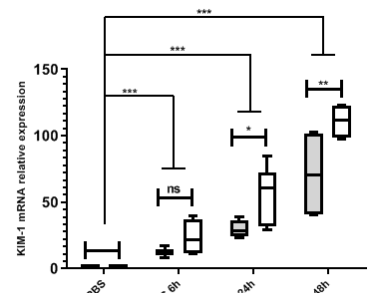
- 26- Bankhead, P. et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- 27- Dhar P, McAuley J. The Role of the Cell Surface Mucin MUC1 as a Barrier to Infection and Regulator of Inflammation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:117. Published 2019 Apr 24. doi:10.3389/fcimb.2019.00117
- 28- Pastor-Soler NM, Sutton TA, Mang HE, et al. Muc1 is protective during kidney ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(12):F1452-F1462. doi:10.1152/ajprenal.00066.2015
- 29- Cunningham, P. N., H. M. Dyanov, P. Park, J. Wang, K. A. Newell, R. J. Quigg. 2002. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J. Immunol*. 168:5817.
- 30- Chen J, John R, Richardson JA, Shelton JM, Zhou XJ, Wang Y, Wu QQ, Hartono JR, Winterberg PD, Lu CY. Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011 Feb;79(3):288-99. doi: 10.1038/ki.2010.381.
- 31- Li Y, Zhai P, Zheng Y, Zhang J, Kellum JA, Peng Z. Csf2 Attenuated Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Promoting Alternative Macrophage Transition. *Front Immunol*. 2020;11:1415. Published 2020 Jul 7. doi:10.3389/fimmu.2020.01415
- 32- Liu F, Dai S, Feng D, et al. Distinct fate, dynamics and niches of renal macrophages of bone marrow or embryonic origins. *Nat Commun*. 2020;11(1):2280. Published 2020 May 8. doi:10.1038/s41467-020-16158-z
- 33- Hato T, Winfree S, Kalakeche R, et al. The macrophage mediates the renoprotective effects of endotoxin preconditioning. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(6):1347-1362. doi:10.1681/ASN.2014060561
- 34- Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(3):573-588. doi:10.1111/apha.12798
- 35- Kato K, Lillehoj EP, Kim KC. MUC1 regulates epithelial inflammation and apoptosis by PolyI:C through inhibition of Toll/IL-1 receptor-domain-containing adapter-inducing IFN- β (TRIF) recruitment to Toll-like receptor 3. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(3):446-454. doi:10.1165/rcmb.2014-0018OC
- 36- Wang YM, Ji R, Chen WW, et al. Paclitaxel alleviated sepsis-induced acute lung injury by activating MUC1 and suppressing TLR-4/NF- κ B pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:3391-3404. doi:10.2147/DDDT.S222296
- 37- Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002;168(3):1286-1293. doi:10.4049/jimmunol.168.3.1286

Fig 1

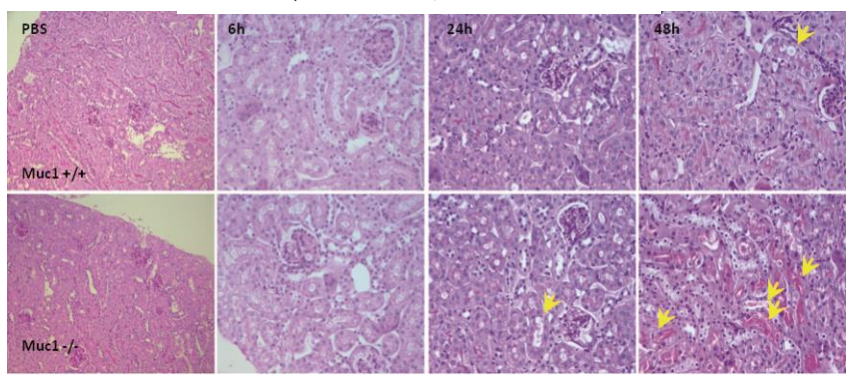
A



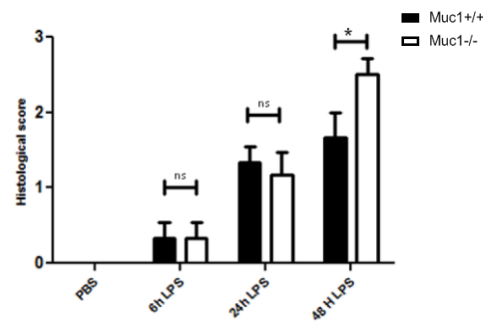
B



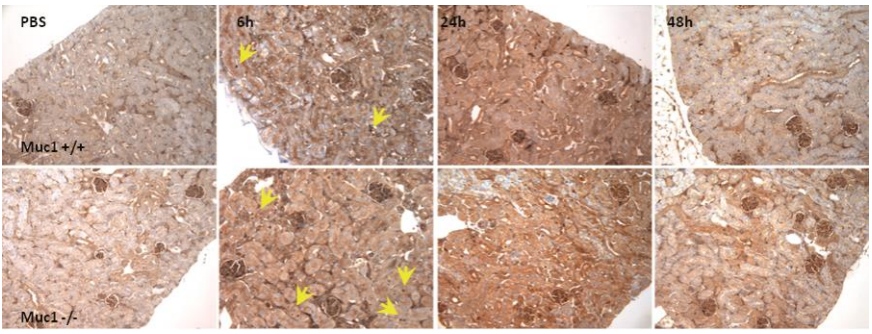
C



D



E



F

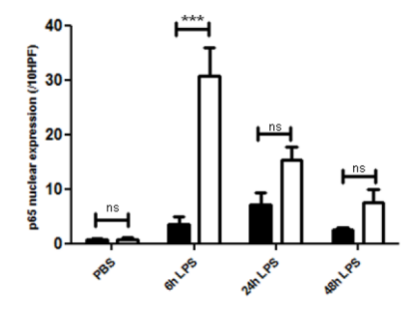


Fig 2

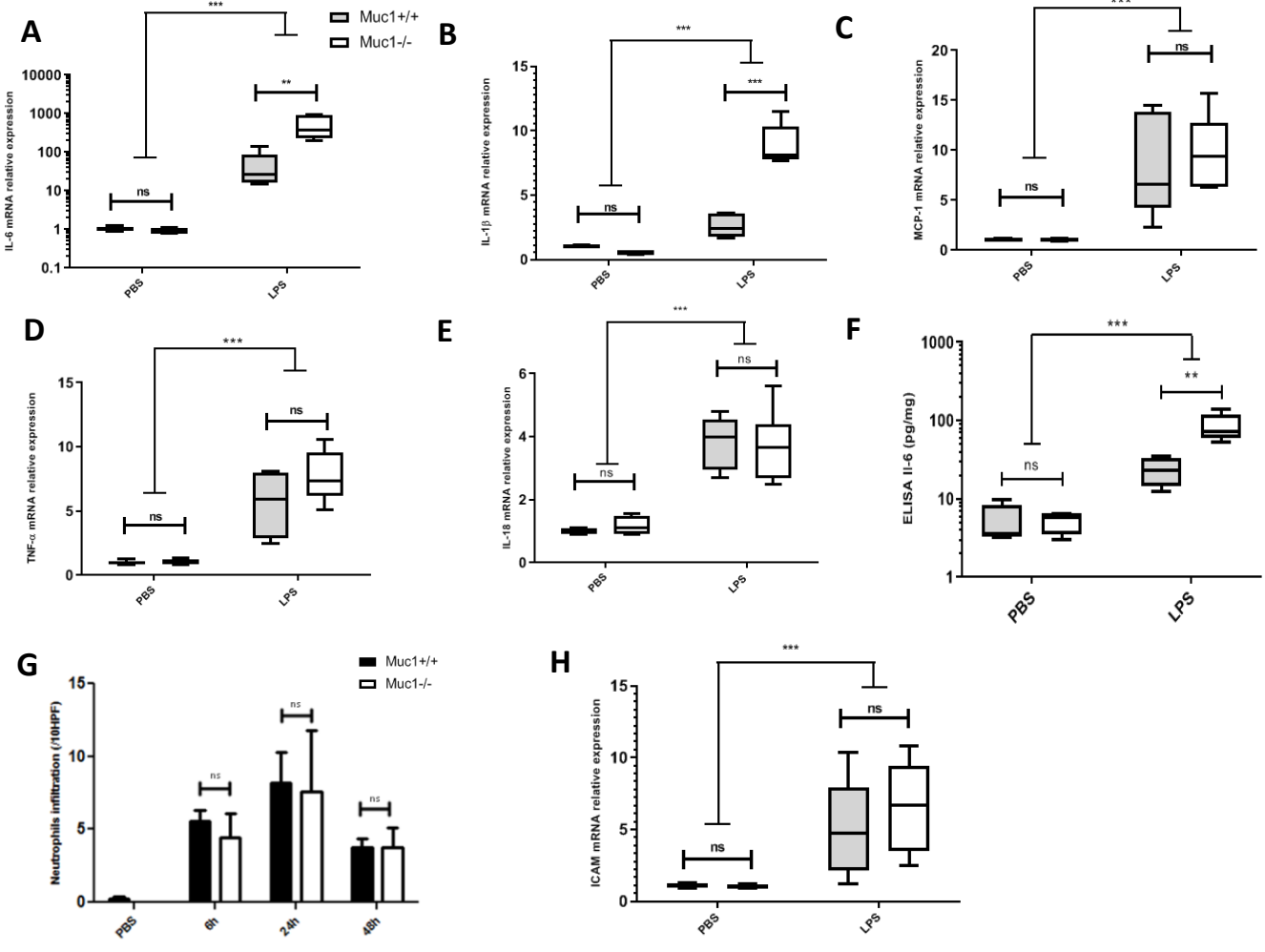


Fig 3

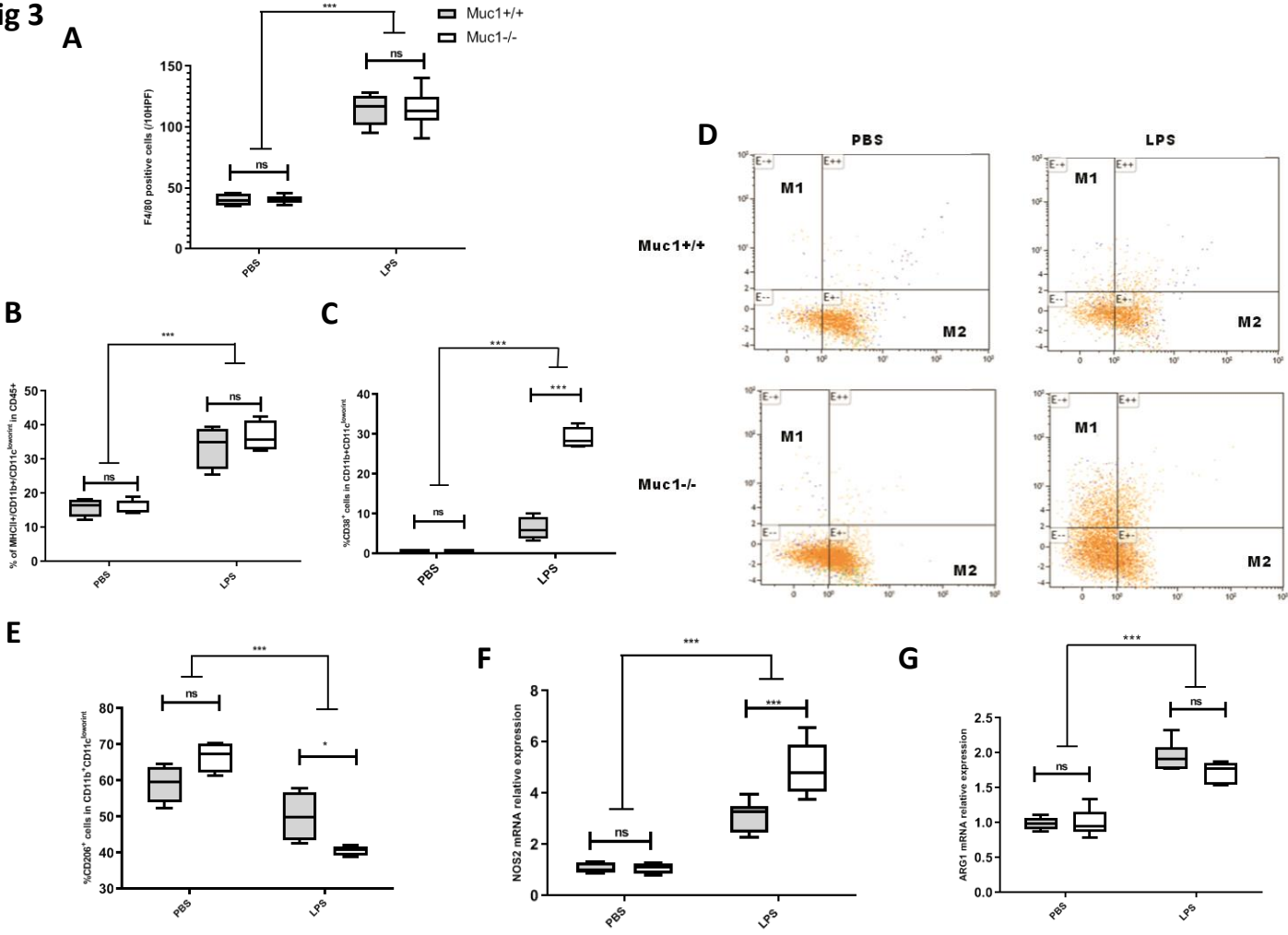
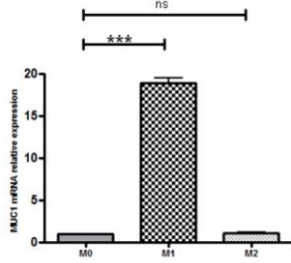
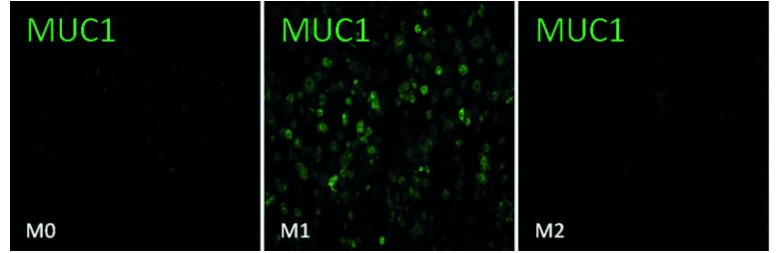


Fig 4 A

Human macrophages

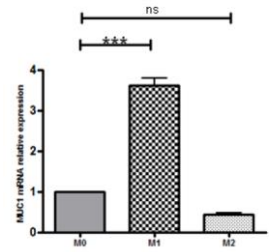


B



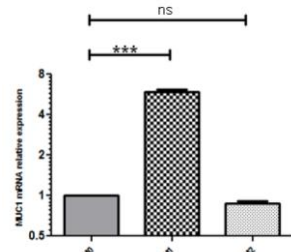
C

bM ϕ M



D

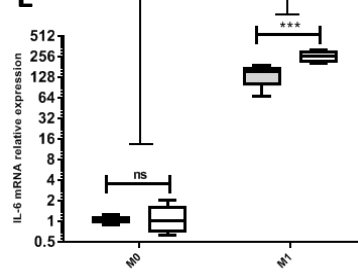
M ϕ



E

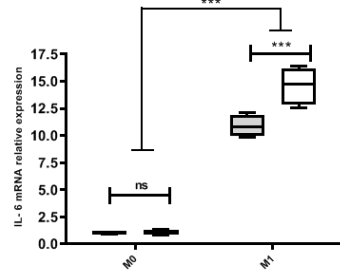
bM ϕ M

□ Muc1+/+
□ Muc1-/-



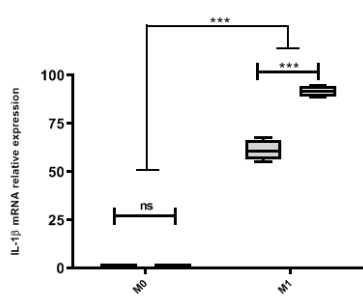
F

M ϕ



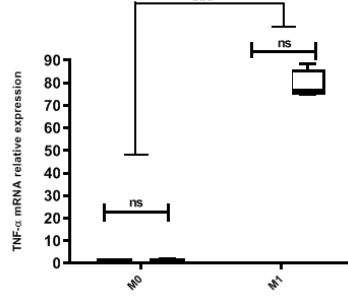
G

bM ϕ M



H

bM ϕ M



I

bM ϕ M

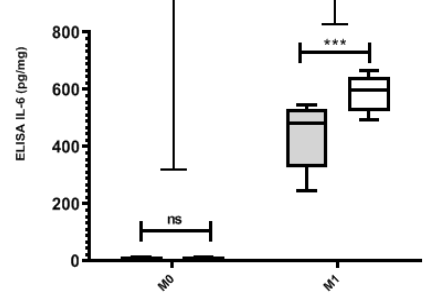
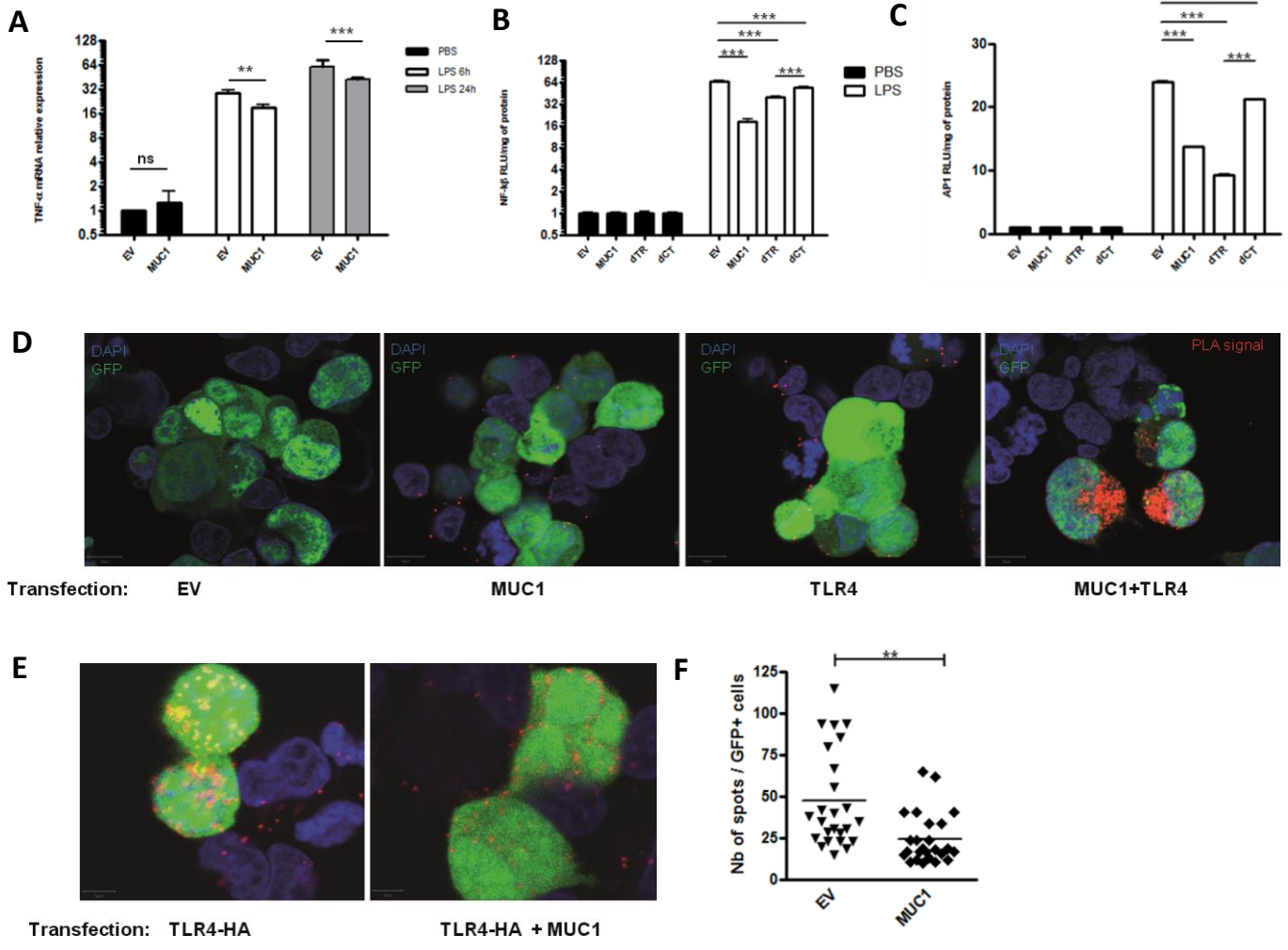


Fig 5



Université de Lille

Thèse de Doctorat d'Université

SWIERCZEWSKI Thomas

Titre de la thèse : Rôle de MUC1 en physiopathologie rénale : cancer et inflammation

Mots-clés : MUC1, chimiorésistance, carcinome rénal, inflammation

Résumé : La mucine MUC1, une O-glycoprotéine membranaire, joue un rôle important en physiopathologie rénale. Dans le rein sain, MUC1 est exprimée au pôle apical des cellules épithéliales des tubules contournés distaux et des tubes collecteurs. En revanche, l'apparition d'une souffrance rénale d'origine non tumorale s'accompagne d'une néo-expression de MUC1 dans les tubules contournés proximaux et de la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ou l'IL-6. En pathologie tumorale, MUC1 est connue pour être surexprimée dans les cellules épithéliales cancéreuses, sous une forme hypoglycosylée mais agissant comme une protéine-clé dans la progression tumorale. Notre équipe a déjà élucidé de manière précise le rôle de MUC1 dans le processus d'atteinte rénale aiguë induite par ischémie/reperfusion et dans le carcinome rénal à cellules claires. Ce travail vise à poursuivre ces hypothèses et à caractériser le rôle de MUC1 dans un modèle de sepsis rénal généré par exposition au LPS, ainsi que le rôle dans la chimiorésistance des cellules de carcinome rénal. Nous avons pu mettre en évidence que dans l'inflammation rénale septique, MUC1 agit comme un inhibiteur de la réaction inflammatoire en perturbant la signalisation du TLR4 et la libération des cytokines pro-inflammatoires. Cette action se produit au niveau membranaire, en amont de la cascade de signalisation, grâce à une inhibition du recrutement de MyD88 au niveau du TLR4, élément nécessaire pour la transduction du signal. De plus, nous avons pu mettre en place un nouveau modèle d'étude de l'implication de MUC1 dans le phénotype des cellules cancéreuses rénales grâce au développement d'un modèle CRISPR/Cas9 MUC1KO. Nous avons donc pu observer que les cellules surexprimant MUC1 présentent des capacités de prolifération et de migration accrues. Le point le plus important est que ces cellules surexprimant MUC1 sont aussi chimiorésistantes, et l'un des mécanismes proposés est l'augmentation de l'expression et de l'activité des transporteurs membranaires d'efflux de la famille ABC. Ce travail met donc en lumière le lien entre inflammation et cancer grâce au caractère protecteur de MUC1 : atténuation de la réaction inflammatoire d'une part et acquisition d'un phénotype cellulaire propice à la survie tumorale d'autre part.