



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
– Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de
Biotechnologies**

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Contribution à l'étude de l'expression de certaines protéines
membranaires de la famille des « claudines » dans les différents types de
cancer du sein.**

Présenté par Melle. Belgardi Khadidja et Mr. Bensassi Mohamed Rafik

Devant le Jury :

M Sour S.	GRADE	MCB	Présidente	USDB1
M Mokrane A.	GRADE	MCB	Examinatrice	USDB1
M Lebaili N.	GRADE	Professeur	Promotrice	ENS Kouba

Session 2019 / 2020

Sommaire

Dédicace

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à nos familles, pour leur amour et leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique.

Je dédie également ce travail à mon oncle Mohamed chérif qui est décédé le 06/09/2017 atteint d'un cancer.

Un grand merci à ma daronne que je lui en serai éternellement reconnaissant.

A mes chères cousines Ahlem Imen et Sara, à toute l'équipe du Centre d'imagerie Médicale Ouled yaich Blida.

A nos amis Riad Rachem, Fatma Houari, Amine Rachem, Rachad Oueld cherif et Adlen Rachem qui étaient toujours d'une aide précieuse et un soutien moral et intellectuel.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre gratitude à Madame **Pr. Lebaili Nemcha** en tant que directrice de mémoire pour ses conseils constructifs qui nous ont permis de mener à bien ce projet de mémoire et de nous avoir accueillie au sein de l'ENS de Kouba.

Nous remercions également les membres de jury qui ont accepté de juger ce travail de mémoire de Master, Docteur **Sour S** Maitre de conférence B et Docteur **Mokrane A** Maitre de conférence B.

Merci à vous tous pour le temps que vous avez bien voulu consacrer à ce manuscrit.

Nous aimerions aussi gratifier les efforts de Monsieur **Ghellab** docteur au niveau de laboratoire d'anatomopathologie de Pierre et Marie curie (CPMC) à Mustapha Bacha qui a eu l'amabilité de répondre à nos questions et de nous fournir les explications nécessaires.

Nous désirons aussi remercier les professeurs de l'Université Saad Dahleb, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Nous tenons à remercier spécialement Madame **Pr. Djazouli-Alim**, Madame Dr.**Benazouz Fella** et Madame Dr Mokrane Ahlem, Madame Amad Faiza et Monsieur **Pr Djazouli Zahr Eddine** qui furent les premiers à nous faire découvrir l'amour et la passion pour la biologie.

Liste des Figures

Figure 1 : Anatomie de la glande mammaire.....	4
Figure 2 : Drainage sanguin et lymphatique de la glande mammaire	6
Figure 3 : Hiérarchie et organisation cellulaire de la glande mammaire	7
Figure 4 : Conséquences des lésions de l'ADN et niveaux d'intervention présumés de BRCA1, BRCA2 et p53.....	17
Figure 5 : Spectre des mutations germinales identifiées dans les gènes BRCA1 et BRCA2	18
Figure 6 : Les différentes jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales (jonction serrée, jonction adhérente desmosomes et jonction communicante).....	19
Figure 7 : Structure schématique d'une jonction serrée	20
Figure 8 : Représentation schématique d'un monomère de Claudine	22
Figure 09 : Mécanisme d'action des molécules d'ARNsi.....	31
Figure 10 : Coupe histologique mammaire témoin d'une femme en période d'inactivité	39
Figure 11 : Aspect microscopique de carcinome intracanauxaire de bas grade	40
Figure 12 : Aspect microscopique de carcinome intracanauxaire de haut grade	40
Figure13 : Aspect microscopique d'hyperplasie lobulaire atypie in situ	41
Figure14 : Aspect microscopique B et macroscopique A du carcinome canalauxaire infiltrant	42
Figure 15 : Aspect macroscopique A et microscopique B du carcinome lobulaire infiltrant	43
Figure 16 : Localisation de la Claudine 1 dans les tissus mammaires sains et cancéreux ; dans un tissu mammaire sain, la Claudine 1 est localisée au niveau de la membrane cellulaire dans un tissu mammaire cancéreux, le tissu mammaire est désorganisé avec une perte	44
Figure 17 : Coloration immunohistochimique Claudin-4 dans les noyaux de tumeur du sein, montrant des exemples de notation claudine-4 aux scores 0, 1, 2 et 3. Les noyaux sont marqués en violet La Claudine en brun	45
Figure 18 : Images au microscope optique d'expression de la Claudine 7 dans le CCIS et CCI de haut et de bas grade nucléaire par rapport à l'épithélium mammaire	

normal N. T: Tissu tumoral	47
Figure 19 : images aux microscopies optiques montrant la perte d'expression de Claudine-7 dans le CLIS (L) par rapport à l'épithélium mammaire normal adjacent (N)	48

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification TNM par stade.....	12
Tableau 02 : Classification par grade.....	12
Tableau 03 : Répartition des réactifs de la déshydratation et de l'imprégnation dans les bacs de l'automate	34
Tableau 04 : Répartition des dilutions des anticorps et le temps de contact	37
Tableau 05 : Répartition des tumeurs « Claudin 1-low » et « Claudin 1-high » au sein des différents sous-types moléculaires. Le pourcentage de tumeurs est indiqué pour chaque sous-type avec le nombre de cas correspondant	44
Tableau 06 : Répartition des cas avec perte d'expression de claudine-7 selon le type des tumeurs et le grade histologique	46

Liste des Abréviations

A

ACR: Américain Collègue Of radiologie

ADN : Acide Desoxyribo Nucléique

AMPc : Adénosine

Apkc: atypical protein kinase C

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNdb : Acide Desoxyribo Nucléique double brin

B

BI-RADS:Breast Imaging-Reporting and Data System

BRCA1 et 2 : Breast cancer 1et 2

C

CCIS : carcinome canalaire in situ

CHEK2 : Chekpoint Kinase 2

CLIS : carcinome lobulaire in situ

CPE : l'entérotoxine de Clostridium perfringens

CSC : cellule souche cancéreuse

C-1 : Claudine -1

C-4 : Claudine-4

C-7: clatine-7

E

EGF: Epidermal Growth Factor

EMT: Transition épithélium-mésenchyme

H

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

I

IRM :Imagerie par résonance magnétique

J

JAM: junctional adhésion molécule

K

KB: kilobases

KDA: kilo Dalton

M

MAP-K: Mitogen-activated protein kinases

MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7

MUPP1: Multi-PDZ domaine Protein 1

P

PDZ: Postsynaptic density protein, Drosophila lethal Disc large tumor suppressor protein; Zonula Occludens protein

PKA: phosphokinase A

PTEN: The phosphatase and tensin homolog

PR : Progestérone

R

RE : Réticulum Endoplasmique

S

siRNA: small interfering RNA

T

TGF- β : Transforming growth factor beta

TGZ: Troglitazone

TP53: Tumor protein 53

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Z

ZO: Zonula occludens

ZO-1: Zonula occludens-1

ZO-2: Zonula occludens-2

Résumé

Le cancer du sein est une maladie complexe et hétérogène caractérisée par l'altération des Claudines. L'étude de l'expression de ces protéines devrait contribuer à mieux comprendre la progression et le développement des métastases inhérents de différents types de cancer mammaire, mais aussi à établir leurs rôles dans le diagnostic et le pronostic, voir comme cible thérapeutique.

Dans ce contexte on s'est intéressés à différentes études réalisées sur l'expression de Claudine 1, 4 et 7 dans les différents types de cancer du sein.

L'expression des Claudines 1, 4 et 7 a été examinée par l'analyse immunohistochimique dans une cohorte de 222 carcinomes mammaires invasifs, cohorte de 299 de tumeurs mammaires, et dans une série de CCIS, CCI, et CLIS, respectivement.

Sur 222 tumeurs 84% expriment faiblement la Claudine-1, distribuée sur différents sous type moléculaire du cancer mammaire ; cette perte d'expression est associée à l'augmentation du potentiel invasif et de récurrence. Néanmoins, sur 299 tumeurs 47.5% exprime fortement la Claudine-4 alors que dans 52.5% elle est faiblement exprimée. Quant à la Claudine-7, son étude dans une série de carcinome canalaire in situ et invasif de bas grade à haut grade montre une perte d'expression significative. Cette dernière est en inversement proportionnelle au grade histologique.

Enfin, il ressort de toutes ces observations que la famille de protéines de jonctions serrées < les claudines > pourraient jouer un rôle crucial dans la tumorigénèse mammaires et semblent être des candidats potentiels dans le diagnostic différentiel entre les cancer du sein invasif et non invasifs.

Mots clés : cancer du sein, protéines transmembranaires, diagnostic, claudine, immunohistochimie, carcinome mammaire invasif

Abstract

Breast cancer is a complex and heterogeneous disease characterized by alteration of the Claudins. The study of the expression of these proteins should help to better understand the progression and development of the inherent metastases of different types of breast cancer, but also to establish their roles in diagnosis and prognosis, and even as a therapeutic target.

In this context, we were interested in various studies carried out on the expression of Claudine 1, 4 and 7 in different types of breast cancer.

The expression of Claudins 1, 4 and 7 was examined by immunohistochemical analysis in a cohort of 222 invasive mammary carcinomas, cohort of 299 mammary tumors, and in a series of DCIS, CCI, and CLIS, respectively.

Out of 222 tumors 84% weakly express Claudine-1, distributed on different molecular type of mammary cancer; this loss of expression is associated with an increase in the invasive potential and recurrence. Nevertheless, out of 299 tumors 47.5% strongly expresses Claudine-4 while in 52.5% it is weakly expressed. As for Claudine-7, its study in a series of low-grade to high-grade invasive ductal carcinoma in situ shows a significant loss of expression. The latter is inversely proportional to the histological grade.

Finally, it emerges from all these observations that the tight junction protein family <the claudins> could play a crucial role in breast tumorigenesis and appear to be potential candidates in the differential diagnosis between invasive and non-invasive breast cancer.

Keywords: breast cancer, transmembrane proteins, diagnosis, claudin, immunohistochemistry, invasive mammary carcinoma.

ملخص

سرطان الثدي هو مرض معقد وغير متجانس يتميز بتغيير كلودين. يجب أن تساعد دراسة التعبير عن هذه البروتينات على فهم أفضل لتطور وتطور النقائل المتأصلة في أنواع مختلفة من سرطان الثدي ، ولكن أيضاً لتحديد دورها في التشخيص والتشخيص ، وحتى كهدف علاجي.

في هذا السياق ، كنا مهتمين بالدراسات المختلفة التي أجريت حول التعبير عن كلودين 1 و 4 و 7 في أنواع مختلفة من سرطان الثدي.

تم فحص التعبير عن كلودين 1 و 4 و 7 من خلال التحليل المناعي الكيميائي في مجموعة من 222 سرطان الثدي الغازي ، ومجموعة من 299 أوراماً في الثدي ، وفي سلسلة من DCIS ، و CCI ، و CLIS ، على التوالي.

من أصل 222 ورماً ، 84% يعبرون بشكل ضعيف عن كلودين-1 ، موزعة على أنواع جزيئية مختلفة من سرطان الثدي ؛ يرتبط فقدان التعبير هذا بزيادة الغزو والتكرار. ومع ذلك ، من بين 299 ورماً ، يعبر 47.5% عن كلودين 4 بقوة بينما في 52.5% يتم التعبير عنها بشكل ضعيف. أما بالنسبة لـ Claudine-7 ، فإن دراستها في سلسلة من حالات سرطان الأفتنية الغازية منخفضة الدرجة إلى عالية الدرجة في الموقع.

يظهر فقداً كبيراً في التعبير. هذا الأخير يتناسب عكسياً مع الدرجة النسيجية.

أخيراً ، يتضح من كل هذه الملاحظات أن عائلة بروتين التوصيل الضيق <الكلودين> يمكن أن تلعب دوراً مهماً في تكوين أورام الثدي ويبدو أنها مرشحة محتملة في التشخيص التفريقي بين سرطان الثدي الغازي وغير الغازي.

الكلمات المفتاحية : سرطان الثدي ، بروتينات الغشاء ، التشخيص ، الكلودين ، الكيمياء النسيجية المناعية ، سرطان الثدي الغازي.

TABLES DES MATIERES

Introduction	1
Chapitre I : Données bibliographiques	3
1- Le sein	4
1.1. Anatomie descriptive de sein	4
1.1.1. Glande mammaire	4
1.1.2. Tissu de soutien	5
1.1.3. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques	5
1.2. Aspect histologique	6
2. Cancer du sein	7
2.1. Définition d'un cancer du sein	7
2.2. Les facteurs du risque	7
2.3. Epidémiologie	9
2.4. Le développement d'un cancer du sein : cancérogénèse du sein	9
2.4.1. Anatomie pathologique et types du cancer du sein	10
2.4.1.1. Les cancers in situ	10
2.4.1.2. Les cancers infiltrant	10
2.5. Stades et grades du cancer du sein	11
2.5.1. Stades du cancer du sein	11
2.5.2. Grades du cancer du sein	12
2.6. Diagnostic	13
2.6.1. Diagnostic clinique et imagerie	13
2.6.2. Diagnostic anatomopathologique	14
2.6.3. Diagnostic biologique	15
2.7. Dépistage	15
2.8. Génétique du cancer du sein	16
2.8.1. Les gènes majeurs de prédisposition héréditaire au cancer du sein	16
2.8.1.1. Le gène BRCA1 et BRCA2	16
2.8.1.2. Les mutations BRCA1 et BRCA2	17
3. Claudines et jonctions intercellulaires serrées Généralités	18
3.1. Définition	21

3.2.	Structure des Claudines	21
3.3.	Organisation génomiques des Claudines	22
3.4.	Fonction des Claudines	23
3.4.1.	Propriétés électrophysiologiques	23
3.4.2.	Maintien de la polarité épithéliale	24
3.4.3.	Régulation de la prolifération	24
3.5.	Mode d'expression des Claudines	25
3.6.	Régulation des Claudines	26
3.6.1.	Régulation de l'expression des Claudines	27
3.6.2.	Régulation post-transcriptionnelle	27
3.7.	Claudines et cancer	27
3.7.1.	Expression des Claudines dans les cancers	27
3.7.2.	Rôle des Claudines dans la tumorigénèse	28
3.8.	Rôle des Claudines dans le diagnostic, le pronostic et la thérapie des cancers	28
3.8.1	Rôle diagnostique et pronostique	28
3.8.2.	Rôle comme cible thérapeutique	29
3.8.2.1.	Thérapie basée sur les anticorps	29
3.8.2.2.	Thérapie basée sur les siRNA	30
	Chapitre II : Matériels et méthodes	32
1.	Etude Histopathologique	33
1.1	Fixation	33
1.2	Déshydratation	33
1.3	Inclusion en paraffine (Enrobage)	34
1.4	Coupe	34
1.5	Déparaffinage	35
1.6	Coloration	35
2.	Étude Immunohistochimique	36
2.1	Principe	36
2.2	Mode opératoire	36
2.2.1.	Démasquage et restauration antigénique	36
2.2.2	Blocage de l'activité enzymatique endogène	36
2.2.3	Application des anticorps	36

Chapitre III : Résultats et discussion	38
Résultats	39
Discussion	49
Conclusion et perspectives Références bibliographique	51
Références bibliographiques	53

Introduction

Le cancer du sein demeure une maladie mal connue qui menace l'identité féminine.

En Algérie comme partout dans le monde, le cancer du sein est le premier cancer féminin et la cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes, il touche plus d'un million de nouveaux cas par an, et il est responsable de plus de 400 000 décès dans le monde. (1)

Les récentes avancées dans les analyses moléculaires à grande échelle ont permis de mieux définir l'hétérogénéité de cette maladie et d'identifier de nouveaux sous-types moléculaires. Un des objectifs de la recherche sur le cancer du sein est d'étudier l'expression de certaines protéines transmembranaires « Claudines » dans différents types de cancer mammaire ou le diagnostic de ce dernier reste différentiel. Afin d'identifier une nouvelle stratégie de diagnostic et de pronostic ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques envisageables.

Le cancer du sein se manifeste souvent par de multiples altérations moléculaires (1), parmi ceux-ci, l'altération des Claudines qui sont les principales protéines de scellement de jonctions serrées. (1) Ces protéines assurent le maintien de cellule-cellule et jouent un rôle central dans la régulation de la perméabilité paracellulaire et l'établissement de la barrière physiologique des tissus épithéliaux. Cependant leurs rôles dans la progression du cancer restent inexplorés.

Des études préliminaires ont montré que les cellules tumorales surexprimant les claudines peuvent être ciblées avec succès via plusieurs approches. Certains exemples concernent l'efficacité thérapeutique anti-tumorale in vitro et in vivo de l'anti-claudine-4 pour les cancers pancréatiques et ovariens (2), la thérapie du carcinome hépatocellulaire expérimentale utilisant siRNA de la claudine-10 (3) et la prévention de la croissance tumorale par le traitement des souris avec un virus contenant l'isoforme 2 de la Claudine -18 avec l'injection des cellules tumorales surexprimant cette Claudine (4). Par ailleurs, l'étude du profil d'expression des gènes de diverses claudines a été réalisée dans plusieurs cancers et leur expression différentielle peut être utilisée afin de confirmer le diagnostic histologique de certains cancers et en exclure d'autres (5) (6) (7) (8).

Dans ce mémoire, Nous rapportons les données bibliographiques en rapport avec le sujet en décrivant tout d'abord l'anatomie et le cancer du sein. Nous rapportons quelques données épidémiologiques, puis nous décrivons les différents types de ce cancer in situ et invasif afin de mieux comprendre le mécanisme de la cancérogenèse mammaire. Une autre partie de ces

données concerne les Claudines, leurs expressions et leurs régulations. Enfin, nous nous sommes intéressés dans ce travail aux différentes études réalisées sur le profil d'expression De certaines protéines transmembranaires « les claudines » dans les différents types de cancer du sein, dans le but d'établir leurs rôles dans le diagnostic et pronostic de ces cancers.

Chapitre I : Données bibliographiques

1-Le sein

1.1-Anatomie descriptive de sein

1.1.1-Glande mammaire

La glande mammaire est une glande exocrine dont la principale fonction est la production de lait. C'est une glande cutanée au même titre que les glandes sudoripares et sébacées. Elle est incluse entièrement dans le pannicule adipeux sous-cutané et rattachée à la peau par ses seuls canaux excréteurs. Elle repose sur le fascia superficialis et des tractus fibreux unissant ce dernier à la peau subdivisent le corps adipeux en loges (9) (Figure 1).

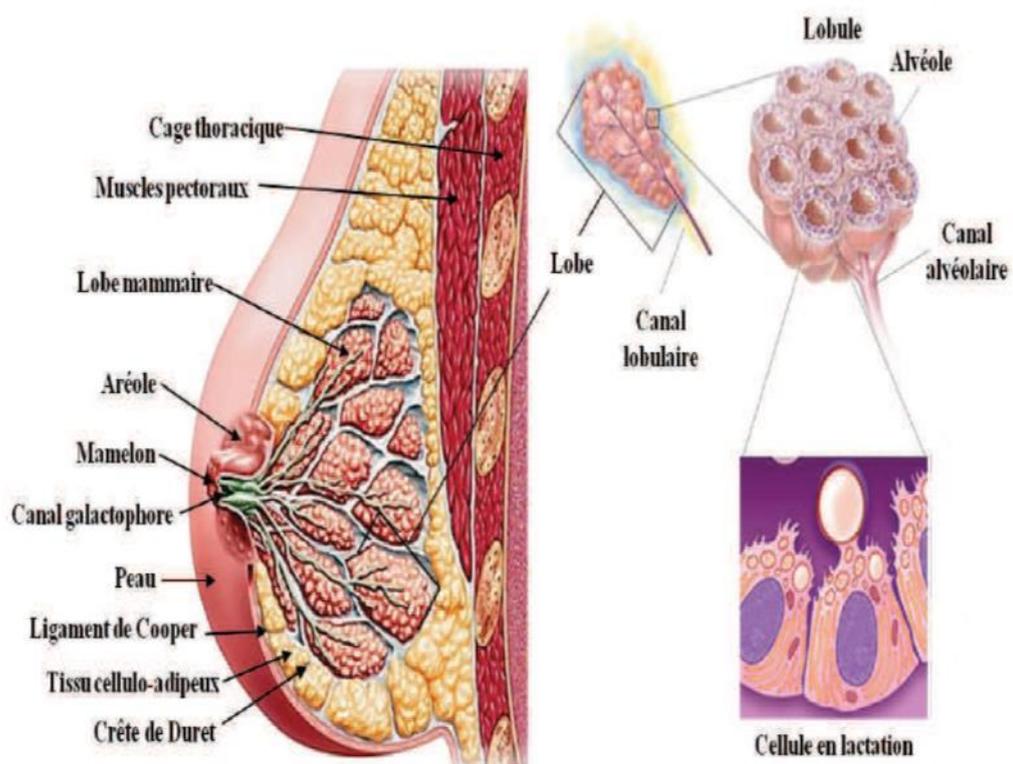


Figure 1 : Anatomie de la glande mammaire. (9)

1.1.2-tissu de Soutien

Etroitement lié au tissu glandulaire, la quantité de tissu adipeux est en grande partie responsable du volume des seins, lequel n'a aucun effet sur la production et la qualité du lait.

On distingue deux couches graisseuses : La couche antérieure pré glandulaire qui n'existe pas au niveau de la plaque aréolo-mamelonnaire. Elle est cloisonnée par des travées conjonctives : les ligaments de Cooper qui relient la peau à la glande en formant les crêtes de Ducret.

La couche postérieure est limitée par le fascia superficialis, elle est séparée de l'aponévrose du grand pectoral par du tissu conjonctif. L'ensemble peau-glande-graisse glisse sur le grand pectoral (10).

1.1.3-les vaisseaux sanguins et lymphatiques

Le sang en provenance de l'aisselle et du sternum irrigue le sein et l'approvisionne en éléments nutritifs et en hormones.

Les vaisseaux lymphatiques, voisins des vaisseaux sanguins, transportent la lymphe en direction des aisselles, mais aussi dans une moindre mesure, de la clavicule et du sternum.

Sue son chemin, la lymphe emporte notamment les cellules mortes et dégénérées ainsi que les agents pathogènes, autrement dit, les « débris » de l'organisme. Ces déchets sont éliminés, c'est-à-dire décomposés et évacués, dans les ganglions lymphatiques situés sur le parcours à l'aide des lymphocytes. Le système lymphatique joue un rôle important dans la défense de l'organisme ; il contribue à prévenir ou à combattre les infections et les maladies.

On trouve de grands groupes de ganglions lymphatiques sous l'aisselle, en dessous et en dessus de la clavicule ainsi qu'ailleurs dans le corps (11).



Figure 2 Drainage sanguin et lymphatique de la glande mammaire, ganglions lymphatiques en vert, les lobules en violet, tissu adipeux et conjonctif en jaune, les canaux galactophores en rouge (11)

1.2-Aspect histologique

La glande mammaire est constituée de lobes et de canaux galactophoriques entourés de tissu conjonctif dense dans lequel cheminent des vaisseaux sanguins. Les acini sont groupés de façon très dense autour d'un canalicule intra-lobulaire (ou canal alvéolaire) (12).

Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent pour former un canal lobulaire (ou canalicule extra-lobulaire). Cette petite structure forme un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour donner un canal galactophore et l'ensemble des lobules qu'il draine forme un lobe glandulaire (13). La glande mammaire est donc une glande tubulo-acineuse de type composée puisqu'elle est formée de 15 à 20 unités glandulaires indépendantes (lobes) qui sont séparées par du tissu conjonctif dense chaque lobe ayant son propre canal galactophore qui s'ouvre à l'extérieur au niveau du mamelon après s'être élargit en un sinus galactophorique (12).

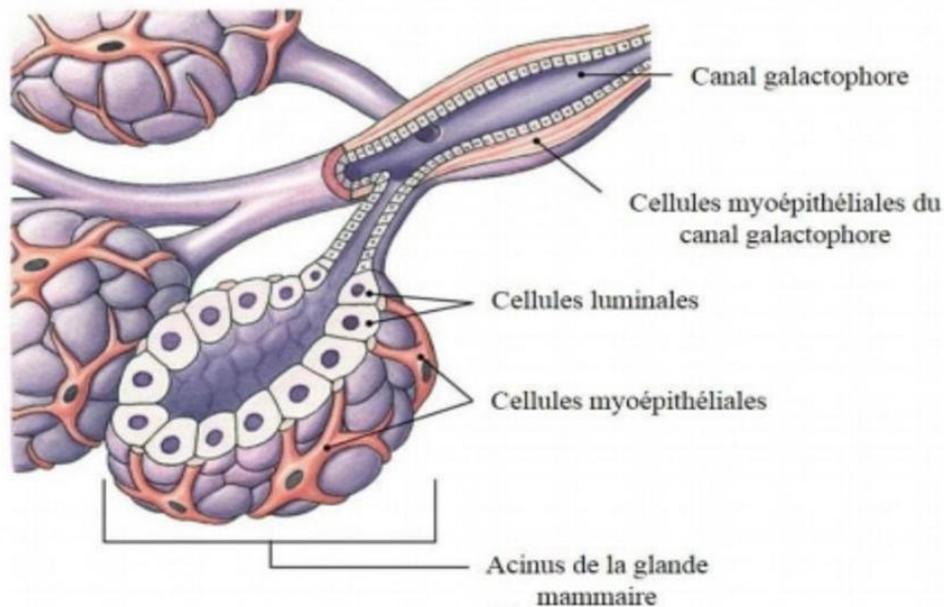


Figure 3 hiérarchie et organisation cellulaire de la glande mammaire (12)

2. Cancer du sein

2.1. Définition d'un cancer du sein

Cancer du sein est un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif (14). Le terme de « cancer du sein » désigne seulement les tumeurs malignes potentiellement agressives du sein, tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes (14).

La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir des cellules épithéliales des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinomes canaux) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires. Dans des cas rares, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en carcinome in situ sans rupture de la lame basale, par opposition au carcinome infiltrant (15).

2.2. Les facteurs de risque

Le risque de développer un cancer mammaire peut être influencé par différents facteurs : génétiques, hormonaux et environnementaux.

Facteurs génétiques

Les gènes BRCA1 et BRCA2 des gènes suppresseurs de tumeurs accordés à un mode de transmission autosomique dominant, les mutations de ces derniers sont à l'origine d'environ 80

à 90 % des cancers familiaux. Cependant il existe d'autres prédispositions autosomiques dominantes du cancer du sein ; Les mutations constitutionnelles du gène CHEK2 sont retrouvés dans 5% des cancers familiaux et les femmes porteuses d'une altération du gène CHEK2 ont deux fois plus de risque de développer un cancer du sein, indépendamment d'éventuels antécédent familiaux. Les mutations du gène TP53 (syndrome de Li-Fraumeni) sont impliquées dans moins de 1% des cancers familiaux. Enfin, les mutations du gène PTEN (syndrome de Cowden) se retrouvent dans une très faible proportion de syndrome familial de cancer du sein **(16)**.

Facteurs environnementaux

Le rôle des facteurs alimentaires avec excès de graisse animale, souvent source d'obésité, est discuté et expliquerait l'incidence croisée avec le cancer de l'endomètre. L'obésité après 50 ans augmente le risque de cancer du sein d'environ 20% **(17)**. Le rôle de l'irradiation a été prouvé par les explosions atomiques d'Hiroshima, ainsi que les expositions professionnelles aux polluants environnementaux et les agents chimiques **(18)**.

Le niveau socio-économique : il est mis en évidence par la plupart des études que les femmes qui ont un niveau de vie élevée ont un risque multiplié par 2.

Le tabagisme et la consommation d'alcool augmenterait le risque de 200% **(19)**.

Le facteur viral : de multiples études sont en cours dans ce domaine étant donné qu'une implication virale a déjà été prouvée pour plusieurs tumeurs. Les virus ont la faculté d'intégrer leur génome dans l'ADN des cellules hôtes. On peut donc comprendre dans quelle mesure, ils peuvent être impliqués dans cette pathologie, puisqu'ils pourraient générer des mutations génétiques engendrant le cancer.

Facteurs hormonaux

L'exposition prolongée et précoce (âge précoce des premières menstruations) ; voir tardives (ménopause) aux hormones ovariens notamment l'œstrogène augmente le risque du cancer du sein.

Le développement d'un cancer mammaire est étroitement liés aux changements amorcés lors de la grossesse ; vitesse de prolifération cellulaire et inversement lié au degré de différenciation.

L'allaitement fait diminuer le risque d'apparition du cancer mammaire en entraînant une diminution à l'exposition cumulative aux œstrogènes**(20)**.

2.3. Epidémiologie

Selon l'OMS, l'incidence du cancer du sein fait rage quel que soit le pays où il est diagnostiqué avec 1.38 million de nouveaux cas par an dans le monde (OMS, 2016). C'est le cancer le plus fréquent chez la femme. Son incidence est variable d'un pays à l'autre selon son appartenance au groupe développé ou en voie de développement avec 690.000 nouveau cas pour chaque groupe (21).

Son incidence varie de 19.3 pour 100.000 femme en l'Afrique de l'est(22), à 89.7 pour 100.000 femmes pour l'Europe de l'ouest (23) et > 80 pour 100.000 dans les pays développés du monde, à l'exception du Japon, et < 40 pour 100.000 dans la plupart des pays en voie de développement (24).

Pour l'Algérie le cancer du sein occupe la première place des cancers chez la femme. La prévalence du cancer du sein sur 5 ans est de 15 160 de 2003 à 2008 avec un taux d'incidence de 28.8 pour 100.000 femme le nombre de nouveau cas est estimé à 4170 (25).

Alors que l'enquête nationale du comité cancer 2005 a annoncée 6000 cas et 9000 cas de cancer du sein dont l'âge moyen est de 45 ans ont été détectés au courant de l'année 2009. Dans les 3 principaux registres Algériens. L'incidence standardisée selon l'âge est de 21,6, 17,03 Et 34,49 pour 105 femmes pour les registres d'Alger, Sétif et Oran, respectivement (26).

Le nombre de décès par cancer du sein dans le monde est de 458 000. Il est toujours la première cause de mortalité féminine que ce soit dans les pays développés (269000) ou en voie de développement (189 000) avec un taux de mortalité compris entre 6-19 pour 100000 femmes (24). En Algérie le taux de mortalité est de 15.6 pour 100 000 femmes avec une mortalité dont 2197 cas par an (27).

2.4. Le développement d'un cancer du sein : cancérogénèse du sein

Le cancer du sein se développe à partir de cellules souches mammaires ou progénitrices, qui deviennent CSC capables de s'auto-renouvelés. La progression tumorale est liée au type d'altération génétique voir fluctuations hormonales, et ainsi à son environnement. Les cancers de sous-type luminal proviendraient de CSC ou de progéniteurs déjà engagés donnant une descendance capable de se différencier en cellules lumorales de façon plus ou moins complète (luminaux A et luminaux B, respectivement). Les cancers de sous-type basal auraient au contraire pour origine des cellules donnant une descendance capable de s'engager dans la différenciation myoépithéliale ou dans les deux lignages(28).

Cependant, le cancer du sein peut se présenter à différents endroits dans le sein, la grande majorité est issue de cancérisation de l'épithélium glandulaire (adénocarcinomes), soit dans les lobes (cancer intralobulaire), soit dans les canaux galactophoriques (canalaire). Les adénocarcinomes peuvent eux-mêmes être subdivisés en fonction de leurs caractéristiques d'infiltration des tissus environnants (29).

2.4.1. Anatomie pathologique et types du cancer du sein

2.4.1.1. Les cancers in situ

Ce sont les types les plus fréquents des carcinomes du sein non infiltrant. Ils sont caractérisés par une prolifération carcinomateuse qui se développe dans la lumière des canaux et des lobules, sans franchir la membrane basale et sans envahir le tissu conjonctif. Les carcinomes mammaires in situ sont rares (2 à 3 % des cas) et généralement de bon pronostic mais peuvent toutefois évoluer, dans 20 à 50 % des cas, vers une forme infiltrante(29)

- **Les carcinomes canaux in situ (CCIS) :** cette forme de cancer se définit comme une lésion intracanaulaire caractérisée par une prolifération cellulaire accrue, des atypies cellulaires légère marquées et parfois une tendance vers un carcinome mammaire infiltrant. (30)

- **Les carcinomes lobulaires in situ (CLIS) :** La néoplasie lobulaire est faite d'une prolifération uniforme et monotone des acini situés dans les lobes, et ont tendance à diffuser sur un mode pagétoïde sous l'épithélium des canalicules intra et extra lobulaire ainsi que des canaux galactophores de plus gros calibre. (30)

2.4.1.2. Les cancers infiltrant

Ces carcinomes représentent la grande majorité de cancers du sein (98 %). Ils présentent un envahissement du tissu conjonctif de soutien par les cellules cancéreuses, après avoir traversé la membrane basale les cellules cancéreuses entrent alors en contact avec des vaisseaux sanguins et lymphatiques à l'origine d'une possible diffusion métastatique. Il existe plusieurs types de carcinomes invasifs. (30)

- **Carcinome canalaire infiltrant (CCI) :** Il s'agit de la forme la plus fréquente des cancers du sein représentant environ 80% des carcinomes mammaires infiltrants. Il s'agit le plus souvent d'une tumeur palpable, plus rarement d'une image mammographie isolée, avec un aspect macroscopique variable selon la taille de la tumeur, et à contours stellaire, irréguliers. Les contours sont mal définis avec une consistance ferme à dure et une couleur blanc- grisâtre à la coupe.

Avec un aspect microscopique très variés en fonction du degré de différenciation, la capacité des cellules tumorales à former des tubes, glandes, travées, ou massifs. La taille des cellules, les atypies nucléaires confèrent un aspect morphologique différent à chaque tumeur la densité en structures tumorales dépend du stroma plus ou moins abondant. De même les mitoses sont plus ou moins nombreuses. La présence d'une composante intracanaulaire parfois très développée modifie également l'aspect de la tumeur, son pronostic et les possibilités de prise en charge thérapeutique. **(30)**

- **Carcinome lobulaire infiltrant (CLI) :** C'est un cancer invasif représentant 5 à 15 % des cancers. Il peut se traduire par une masse palpable plus ou moins bien définie, associée à une opacité mammographique ou à une surdensité palpable, avec un aspect macroscopique irrégulier et mal défini.

Microscopiquement : les cellules sont non cohésives, de petite taille, à noyau rond à chromatine fine, et à cytoplasme abondant. Ces cellules sont isolées ou organisées en fils indiennes, dans un stroma fibreux. Les mitoses sont plus souvent rares. **(30)**

2.5. Stades et grades du cancer du sein

La classification des cancers du sein est associée aux propriétés histologiques, moléculaires et cliniques.

2.5.1. Stades du cancer du sein

Classification TNM : basée 3 critères sur la taille et l'infiltration de la tumeur à la cage thoracique ou à la peau (T), l'invasion ou non des ganglions lymphatiques, le nombre et leur emplacement (N) et la présence ou non de métastases (M). Chaque critère est évalué et associé à un chiffre dont la valeur augmente avec la gravité. Les tumeurs sont ensuite classées par stade d'évolution allant du stade 0 qui correspond à un cancer localisé (non invasif) jusqu'au stade IV qui désigne un cancer métastatique (tableau 1) **(31)**

Tableau 01 classification TNM par stade (31)

Stade	Description
0	Tis: carcinome in situ N0: absence d'envahissement ganglionnaire régional M0: absence de métastases à distance
I	T1: tumeur ≤ 2 cm N0: absence d'envahissement ganglionnaire régional M0: absence de métastases à distance
II	T0 à T3: pas de signe de la tumeur primitive à tumeur > 5 cm N0 à N1: absence d'envahissement ganglionnaire régional ou envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires M0: absence de métastases à distance
III	T0 à T4: pas de signe de la tumeur à de toutes tailles avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau N0 à N3: absence d'envahissement ganglionnaire régional à envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires ou des ganglions mammaires internes homolatéraux M0: absence de métastases à distance
IV	T0 à T4: pas de signe de la tumeur à de toutes tailles avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau N0 à N3: absence d'envahissement ganglionnaire régional à envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires ou des ganglions mammaires internes homolatéraux M1: présence de métastases à distance

2.5.2. Grades du cancer du sein

Un système de classification par grade Selon l'OMS, permet de déterminer l'agressivité de la tumeur basée sur trois critères morphologiques des cellules tumorales : l'apparence des cellules cancéreuses, la forme du noyau et l'activité mitotique. (31)

Tableau 02 classification par grade (31)

Grade	Score total	Description
I (bas)	3 à 5	Cellules bien différenciées, architecture préservée, faible hétérogénéité Noyau de petite taille avec contour uniforme Activité mitotique faible
II (intermédiaire)	6 ou 7	Cellules modérément différenciées Noyau de taille petite à moyenne avec contour uniforme Activité mitotique modérée
III (haut)	8 ou 9	Cellules indifférenciées, perte de l'architecture normale, hétérogénéité élevée Gros noyau avec forme variable Activité mitotique élevée

2.6. Diagnostic

2.6.1. Diagnostic clinique et imagerie

Le cancer du sein est généralement découvert par la femme elle-même lors de modifications au niveau des seins, troubles ou symptômes remarquables, autrement le médecin réalise un examen clinique détaillé prenant en compte les éléments suivants :

- A la Palpation la taille de la masse, sa mobilité et sa localisation ainsi que la forme du mamelon et de l'aréole, avec une attention particulière aux modifications et aux nodules dans le sein, dans le creux axillaire ainsi que dans la région de la clavicule et du sternum. **(32)**
- Mammographie : La mammographie est habituellement considérée comme l'une des méthodes les plus efficaces pour détecter les cancers du sein. Sa fiabilité diagnostique est supérieure à l'examen clinique ; notamment chez les femmes âgées de plus de 45 ans. Sa sensibilité pour la détection des cancers varie de 81% et 96%.

On regroupe les critères diagnostiques mammographies en 2 catégories principales ; les signes directs, dus à la tumeur :

- Canal unique dilaté sous l'aréole ou complexe inhabituel de canaux dilatés s'entendant sur une profondeur d'en moins 3 cm dans le sein qui doit absolument faire suspecter une tumeur maligne.
- Densification progressive dans une région particulière de sein est un indicateur important pour faire évoquer un carcinome devant toute zones de densité nouvelle n'était pas retrouvée lors d'examens précédents.

La fiabilité de la mammographie dépend de la nature des tissus ; est meilleur dans le type graisseux. Dépend également de la localisation des lésions ; est moindre dans la région sous-aréolaire. **(32)**

Deux cliqués par sein un de face et un d'oblique sont réalisés ; le radiologue classe la densité du sein en quatre catégories puis il recherche les anomalies. Celles-ci sont classées selon la classification BI-RADS et sont classées de 0 à 5 en fonction de leur degré de suspicion :

- ACR 0 : classification d'attente, quand des investigations complémentaires sont nécessaires
- ACR 1 : mammographie normale
- ACR 2 : anomalie bénigne
- ACR 3 : anomalie probablement bénigne nécessitant une surveillance à court terme

- ACR 4 : anomalie indéterminée ou suspecte devant faire l'objet d'un prélèvement histologie
- ACR 5 : lésion évocatrice de cancer nécessitant une exérèse.

Un examen échographie est en complément de la mammographie à la recherche des ganglions anormaux réalisé par des sondes de haute fréquence (10 à 14 MHz). Un cancer se présente en général comme une zone nodulaire solide hypoéchogène siégeant dans la glande. Les mensurations échographiques de nodules sont précises et fiables. Selon l'anomalie détectée et son apparence suspecte, le médecin décide ou non de réaliser d'autres examens comme une biopsie qui lui permettront de confirmer ou non le diagnostic de cancer.

IRM :est un examen réalisé grâce à un grand appareil cylindrique produit des ondes électromagnétiques, est un outil supplémentaire ne remplace ni la mammographie ni l'échographie qu'on emploie dans le cadre du bilan d'extension, à la recherche de récurrence locale après la chirurgie conservatrice, Pour faire la différence entre une anomalie bénigne et une anomalie cancéreuse dans le cadre du dépistage. (33)

2.6.2. Diagnostic anatomopathologique

L'examen anatomopathologique consiste à analyser au microscope des cellules ou des tissus prélevés sur un organe ; on parle aussi d'examen histopathologique. Cet examen permet d'établir de façon définitive le diagnostic de cancer. On parle de preuve histologique.

L'examen anatomopathologique de la biopsie : lorsqu'une anomalie est décelée, un prélèvement au niveau de cette anomalie doit être réalisé afin de l'analyser au microscope et d'établir un diagnostic. En effet, cet examen a pour but de :

Préciser le type de cancer dont il s'agit, déterminer jusqu'où les cellules cancéreuses se sont développées. Cela donne une première indication sur l'étendue de la maladie et contribue à définir le stade du cancer. (34)

L'examen anatomopathologique de la pièce opératoire : la pièce opératoire désigne tout ce qui est retiré lors d'une chirurgie (tumeur + tissu sain autour d'elle, ganglions, etc.). A l'issue de la chirurgie, toute pièce opératoire est envoyée au service de pathologie afin d'être analysée et d'établir un diagnostic.

Cet examen a pour objectif de :

-Décrire la pièce opératoire en précisant l'organe sur lequel le prélèvement a été effectué, le

type de prélèvement utilisé (chirurgie conservatrice, mastectomie, biopsie chirurgicale, autres); la localisation précise du prélèvement au niveau de l'organe concerné (sauf pour une mastectomie ou tout le sein est enlevé) ; la localisation de la tumeur dans l'organe, la taille de la tumeur.

- confirmer le type de cancer dont il s'agit et déterminer jusqu'où les cellules cancéreuses se sont développées. Cela permet de confirmer le stade du cancer.

- déterminer le stade du cancer, renseigner sur l'extension locale de la tumeur en précisant notamment si les marges d'exérèse sont envahies ou non et s'il existe des métastases au niveau des ganglions et en préciser leur nombre et leur taille. (34)

2.6.3. Diagnostic biologique

Lorsqu'un cancer du sein est diagnostiqué, des examens biologiques supplémentaires sont conduits sur les tissus prélevés lors de la biopsie afin de dresser une carte d'identité biologique de la tumeur aussi précise que possible.

L'analyse de prélèvement tissulaire permet généralement de définir le type de cancer du sein, le degré d'agressivité de la tumeur et des caractéristiques biologiques comme :

Les récepteurs hormonaux des œstrogènes (RE) ou ceux de la progestérone (RP). Leur présence prouve que le cancer est « hormonodépendant » et que sa croissance est favorisée par ces hormones. Le traitement consistera donc notamment à bloquer l'action de ces dernières.

Le récepteur HER2 à des facteurs de croissance épidermiques humains. Ce récepteur favorise la croissance de la tumeur quand il est présent en excès à la surface des cellules de tumeur mammaire.

La protéine KI67. Ce marqueur de prolifération des cellules tumorales renseigne sur l'agressivité de la tumeur. (35)

2.7. Dépistage

Un suivi gynécologique régulier, assuré par le médecin traitant ou par un gynécologue, est recommandé à toutes les femmes. La consultation permet, en effet, de surveiller de façon individuelle le risque de maladies bénignes ou malignes des seins et de l'appareil gynécologique. Dans ce cadre, à partir de 40 ans, on propose parfois aux femmes, en fonction des facteurs de risque, de bénéficier d'un dépistage individuel du cancer du sein.

Ce dépistage passe par la réalisation d'une radiographie des seins : la mammographie ou la

tomosynthèse (technique de mammographie plus sensible). Pour les femmes dont une parente a développé un cancer du sein avant 50 ans, et d'autant plus lorsqu'une mutation génétique associée a été identifiée, un suivi régulier est particulièrement important. Un examen clinique doit être pratiqué tous les six mois. Ce suivi repose, en outre, non seulement sur la réalisation de mammographies, mais aussi sur celle d'échographies et d'IRM mammaires.

Ce dernier examen doit être pratiqué tous les ans dès l'âge de 30 ans, ou cinq ans avant l'âge auquel est intervenu le cancer du sein le plus précoce de la famille (36).

2.8. Génétique du cancer du sein

2.8.1. Les gènes majeurs de prédisposition héréditaire au cancer du sein

2.8.1.1. Les gènes BRCA1/BRCA2

La mutation germinale de BRCA1 ou BRCA2 touche l'allèle normal. Cette observation constitue un argument très fort en faveur d'une activité de gène suppresseur de tumeur de BRCA1 et BRCA2. (37) (38)

Le gène BRCA1 pourrait faire partie d'une famille fonctionnelle de gènes récemment appelés caretakers (39), capables d'informer la cellule sur l'existence de lésions dans son ADN et de participer aux processus de réparation.

Les protéines BRCA1 et BRCA2 pourraient être des activateurs de transcription. Ces protéines présentent toutes deux des domaines possédant des propriétés d'activateurs transcriptionnels (40) (41). La protéine BRCA1 est un composant du complexe ARN polymérase II-holoenzyme (42) auquel il est lié via l'interaction entre son domaine BRCT et l'ARN hélicase I (43). De plus, BRCA1 est impliquée dans la réparation couplée à la transcription des lésions oxydatives de l'ADN. (44)

Le pouvoir antiprolifératif de BRCA1 in vitro pourrait être lié à sa capacité d'activer la transcription du gène p21 (45). Enfin, la protéine BRCA1 serait un co-activateur de la protéine p53, avec laquelle elle interagit physiquement. (46) (47)

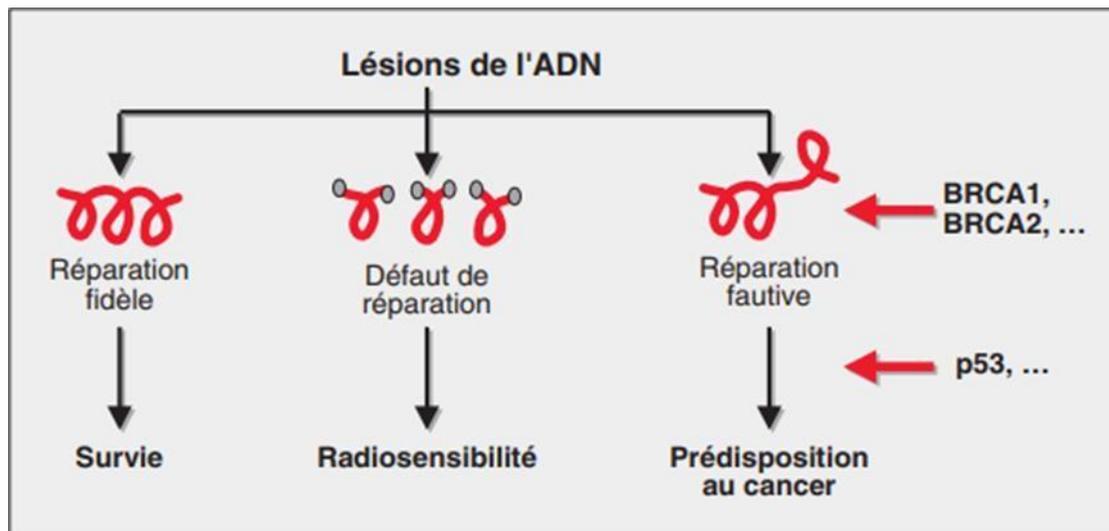


Figure 4 Conséquences des lésions de l'ADN et niveaux d'intervention présumés de BRCA1, BRCA2 et p53. (48)

2.8.1.2. Les mutations BRCA1 et BRCA2

Les mutations du gène BRCA1 sont associées à une augmentation considérable du risque de cancer du sein et de l'ovaire et à une faible augmentation du risque de cancer de la prostate et du côlon. Les mutations du gène BRCA2 confèrent un risque élevé de cancer du sein chez la femme jeune, un risque modéré de cancer du sein chez l'homme, et un risque faible de cancer affectant d'autres organes tels que l'ovaire, la prostate et le pancréas.

Les mutations affectant ces deux gènes entraînent un changement du cadre de lecture conduisant à un arrêt prématuré de la traduction et à la production potentielle de protéines tronquées de taille variable. Quelques mutations faux-sens ont été décrites, en particulier des mutations affectant les résidus cystéines du doigt Ring de BRCA1.

Enfin, certaines mutations « régulatrices » ont pour conséquence l'absence ou l'instabilité de l'ARNm de BRCA1 et conduisent donc à un allèle nul. Bien qu'il n'y ait aucun doute sur la relation causale entre ces mutations et la prédisposition au cancer. (49) (50)

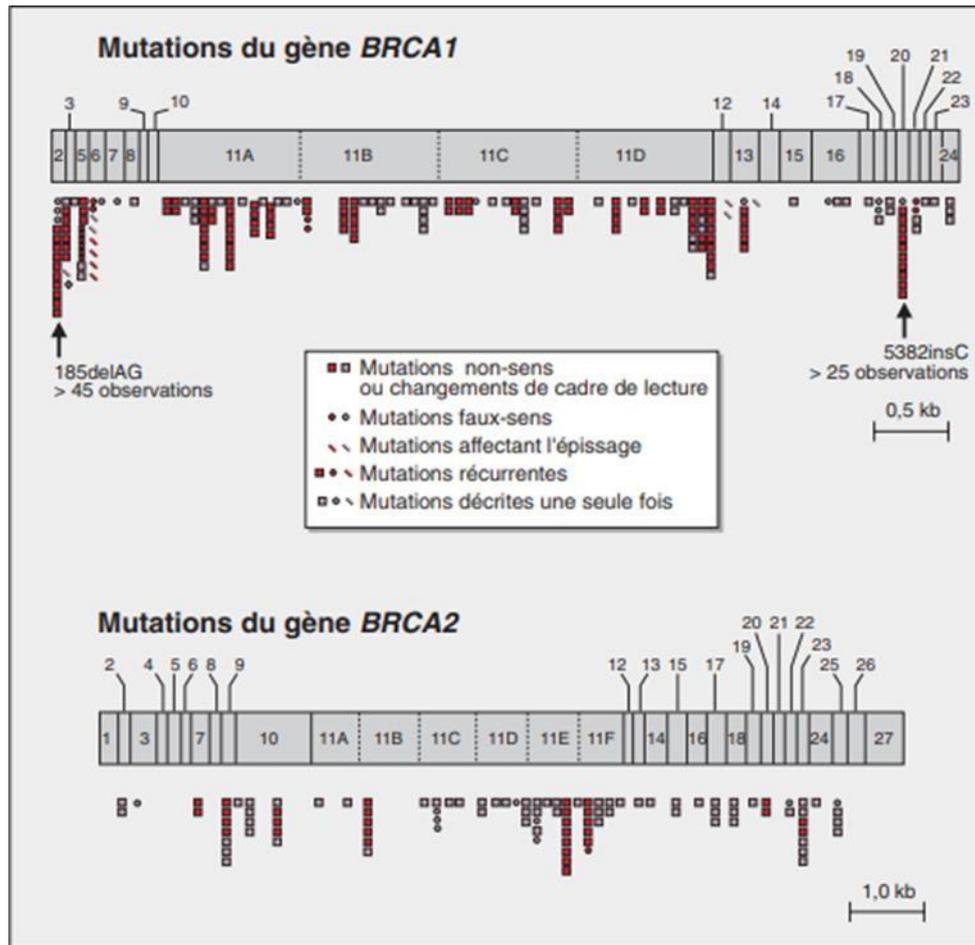


Figure 5 Spectre des mutations germinales identifiées dans les gènes **BRCA1** et **BRCA2**. (48)

3. Claudines et jonctions intercellulaires serrées Généralités

Les systèmes de jonction intercellulaire sont de trois types : occlusifs, d'ancrage et Communicantes. Les systèmes de type occlusifs et de type communicant sont toujours Jonctions cellule-cellule alors que les jonctions d'ancrage se rencontrent aussi bien entre deux cellules (zonula adherens et desmosomes) qu'entre une cellule et la matrice extracellulaire. Les jonctions cellule-cellule sont de quatre types différents : jonctions communicantes (gap Junction), desmosomes, jonctions adhérentes (zonulo adherens) et jonction serrées (zonula occlusifs) (Figure 7). Les trois derniers types de jonctions sont également appelés complexe jonctionnel (51).

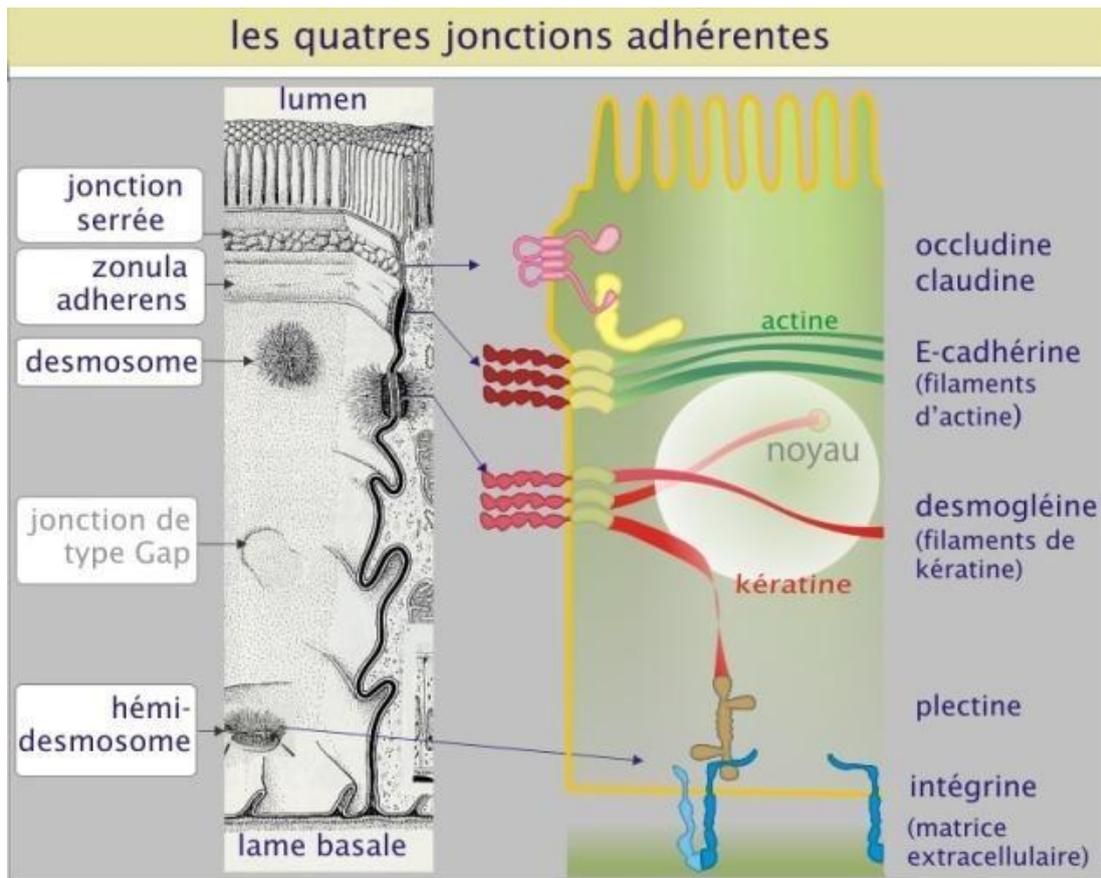


Figure 6 Les différentes jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales (jonction serrée, jonction adhérente desmosomes et jonction communicante) (52)

Les jonctions serrées (JS), appelées aussi jonctions étanches, jonctions imperméables, tight junctions ou zonula occludens, s'établissent entre les cellules épithéliales où elles déterminent une barrière physiologique de perméabilité sélective entre les compartiments extérieur et intérieur de l'organisme (53).

Les cellules épithéliales et endothéliales polarisées possèdent deux domaines membranaires, apical et basolatéral, dont la composition en lipides et protéines est différente. Les jonctions serrées séparent la membrane apicale du domaine basolatéral. Elles forment une barrière sélective régulant le passage des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire. En empêchant les protéines et lipides de la membrane apicale de diffuser dans la membrane basolatérale, et inversement, elles contribuent au maintien de la polarité cellulaire.

En microscopie électronique, les jonctions serrées se présentent comme une série de points de

fusion des feuillettes externes des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes où l'espace intercellulaire est totalement éliminé. Au niveau de ces jonctions, les membranes fusionnent le long de crêtes linéaires formées par une succession de protéines membranaires (claudines et occludine) engrenées les unes avec les autres à la manière d'une fermeture éclair. Ces lignes de fermeture s'entrecroisent pour former un réseau continu qui entoure l'apex de chaque cellule constituant une barrière (54).

Des études effectuées pendant ces deux dernières décennies ont montré que diverses protéines impliquées dans la transduction de signaux et le trafic membranaire sont associées aux jonctions serrées. Ces derniers servent de lien d'intégration et de transmission de signaux nécessaires à la régulation de leur assemblage et à la polarisation cellulaire, mais aussi à la modulation de l'expression des gènes requise pour la prolifération et la différenciation cellulaires (55).

Les jonctions serrées sont formées par cinq types de protéines transmembranaires : claudines, occludine, tricelluline, JAM (junctional adhesion molecule) et Crumb.

Ces protéines membranaires (Claudine, occludine et JAM) constituent le noyau d'un échafaudage moléculaire relié à une multitude de protéines cytoplasmiques (56).

Parmi ces protéines, les Claudines constituent l'objet de notre travail de recherche.

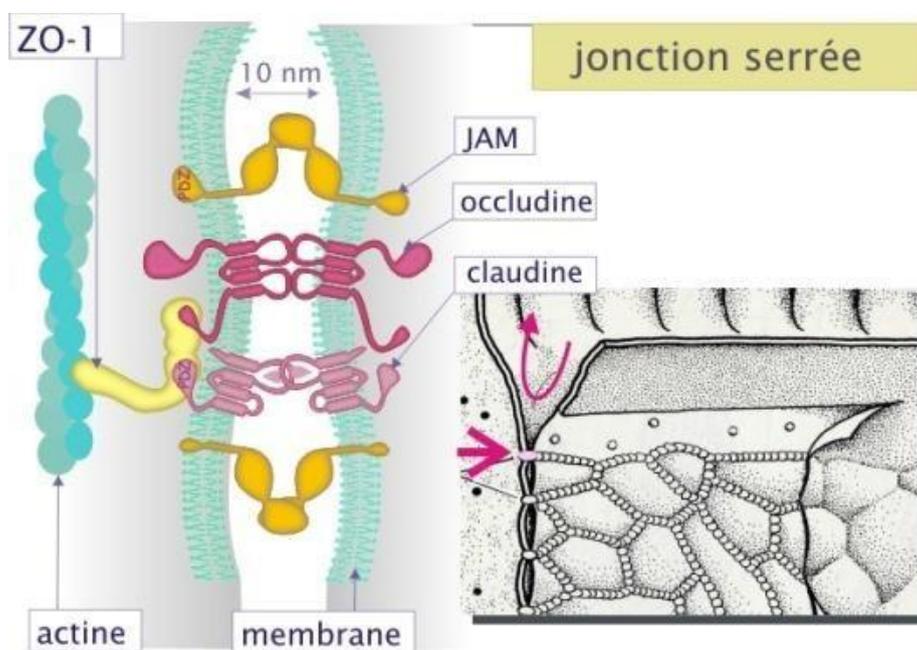


Figure 7 Structure schématique d'une jonction serrée (IJsbrand Kramer, Gérard Tramu - Université Bordeaux 1 France) (52)

3.1. Définition

Le mot Claudine dérive du latin < claudere > qui signifie fermer. Les claudines-1 et -2 ont été découvertes pour la première fois en 1998 (57). Plusieurs autres Claudines ont été découvertes par la suite et, chez les mammifères, la famille des claudines compte actuellement 27 membres qui sont des protéines de 20 à 27 KDa. L'homme et le chimpanzé ne contiennent pas la claudine-13. Les Souris et les Rats possèdent toutes les claudines(58).

Les claudines sont des protéines essentielles déterminantes dans la formation, la structure et les fonctions des jonctions serrées. Certaines claudines sont ubiquitaires et d'autres sont exprimées de façon très spécifique à chaque tissu. La combinaison des divers claudines exprimées dans un même épithélium détermine les propriétés de la barrière épithéliale.

Selon les nécessités de l'épithélium, diverses claudines sont exprimées, et ceci conduit à des barrières plus ou moins étanches.

3.2. Structure des Claudines

La structure des claudines consiste en quatre domaines transmembranaires, une région intracellulaire NH₂ - terminale (-7 résidus d'acides aminés), une longue première boucle extracellulaire (41 à 55 résidus), une deuxième boucle extracellulaire plus courte (10 à 21 résidus) et une région intracellulaire COOH - terminale dont la séquence en acides aminés varie considérablement entre les différents membres de la famille des claudines (figure8).

A l'exception de la Claudine-12, la région C-terminale de toutes les Claudines se termine par le motif YV par l'intermédiaire duquel les claudines se lient aux domaines PDZ des protéines ZO(59). Cette région contient également un site de phosphorylation. Les domaines PDZ sont des modules de 80 à 90 résidus d'acides aminés, initialement découverts dans les protéines suivantes : (Postsynaptic density protein ; Drosophila lethal Disc large tumor suppressor protein ; Zonula occludens protein).

La plupart des Claudines possèdent un motif conservé, GLWxxC (8-10aa) C dans la première boucle extracellulaire. Celle-ci contient également des acides aminés chargés qui déterminent la sélectivité des charges dans le transport paracellulaire ; et deux cystéines qui formeraient un pont disulfure stabilisant la conformation de la protéine. La deuxième boucle extracellulaire contient un site de liaison à l'entérotoxine de Clostridium perfringens (CPE) dans les claudines-

3 et -4. Les claudines forment entre les cellules voisines des interactions homotypiques et hétérotypiques et dans la même cellule des complexes homomériques et hétéromériques, responsables de la formation des filaments des jonctions serrées (60).

L'alignement des séquences de 21 Claudines (61) a révélé une très grande similitude de structure chez la majorité des Claudines, surtout au niveau des domaines transmembranaires. L'exception est faite pour la claudine-16 qui contient 66 résidus d'acides aminés dans la région N-terminale ; pour la claudine-18 qui possède une extension dans la deuxième boucle extracellulaire et pour la claudine-23 dont la queue terminale est plus longue.

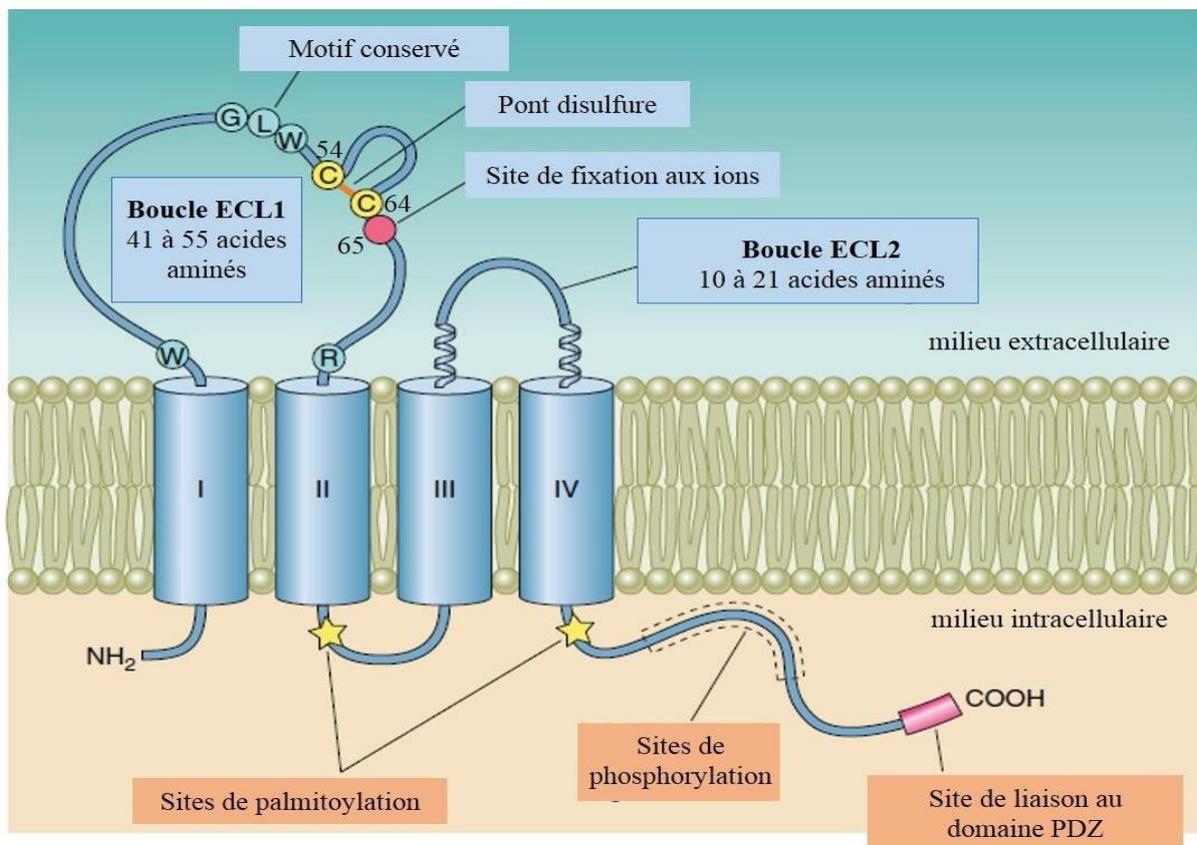


Figure 8 Représentation schématique d'un monomère de Claudine (62)

3.3. Organisation génomiques des Claudines

En général, les claudines. Le résultat est que leurs gènes sont typiquement courts, de l'ordre de quelques Kb. L'arbre phylogénétique a révélé que les claudines formaient une famille de protéines intimement liée. En effet à l'exception de la claudine-16 et la claudine-23 qui sont

très différents, les autres claudines, notamment la claudine-6 et la -9 sont très similaires suivies des claudines 3 4 et 7 (61).

Plusieurs paires de gènes de claudines qui sont très similaires dans leur séquence ou leur arrangement en intron/exon, sont intimement proches dans le génome humain. Les exemples concernent les gènes des claudine-6 et -9 (localisés à seulement 200 paires de bases l'un de l'autre) sur le chromosome 16 ; les gènes des claudine-22 et-24 sur le chromosome 4 ; les gènes des claudine-8 et -17 sur le chromosome 21 et les gènes des claudine-3 et 4 sur le chromosome 7 (58).

A ce jour, on ne sait pas si cet arrangement génomique entraîne une corégulation de ces gènes mais ceci est vérifié au moins dans le cas des claudines-3, et -4 pour lesquelles une expression coordonnée a été montrée dans des tissus normaux et tumoraux (61).

3.4. Fonction des Claudines

Outre leur rôle dans la formation des jonctions serrées et dans l'adhésion cellulaire. Les Claudines sont potentiellement impliquées dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire mais aussi dans le maintien de la polarité épithéliale et la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales.

3.4.1. Propriétés Electrophysiologique

Il est aujourd'hui clairement établi que les claudines jouent un rôle central dans la régulation de la perméabilité paracellulaire et l'établissement de la barrière physiologique des tissus épithéliaux. Les données recueillies à partir d'études récentes sur la physiologie des claudines fournissent des preuves incontestables sur le rôle des claudines dans la détermination de la sélectivité du transport paracellulaire (63). Probablement par la formation de canaux ou pores qui permettent un passage sélectif de petites molécules ou ions à travers l'espace paracellulaire (64). La perméabilité sélective de ces canaux dépend de la concentration et du type de Claudine exprimé par la cellule épithéliale ou endothéliale : la Claudine 16 donne des canaux pour le Mg^{2+} dans la branche large ascendante de l'anse de Henle(65). La claudine-2 qui forme des pores à cations à haute conductance est exprimée dans le tubule néphrétique proximal et semble être responsable de la quantité substantielle de la réabsorption paracellulaire de Na^+ dans ce segment. Les claudines-4 et -8 fonctionnent comme barrières à cations et sont exprimées dans le segment distal où elles protégeraient contre la dissipation des gradients transtubulaires de

Na⁺, K⁺ et H⁺. L'influence des claudines sur les propriétés de barrière est tellement sensible que les isoformes d'une même Claudine peuvent créer des pores paracellulaires avec des sélectivités ioniques différentes(66). En raison du manque de disponibilité des outils électrophysiologiques utilisés pour la caractérisation des canaux membranaires, il n'a pas été possible d'assigner à chaque Claudine sa conductance spécifique. De par leur fonction dans la perméabilité paracellulaire sélective, les claudines contribuent au maintien d'une homéostasie physiologique appropriée en réponse aux besoins de chaque tissu(67).

3.4.2. Maintien de la polarité épithéliale

Les JS possèdent deux complexes jonctionnels de signalisation hautement impliqués dans la régulation de la polarité cellulaire : le complexe CRB3/palsl/PATJ et le complexe Par3/Par6/aPKC liant le Cdc42(56).

Par ailleurs, les Claudines et les JAM sont associées, via leur région cytoplasmique C- terminale liant les domaines PDZ, aux protéines ZO-1 et MUPP 1. Celle-ci sont capables de croisées les oligomères JAM aux filaments des jonctions serrées que forment les Claudines. Ainsi, les composants impliqués dans la polarité cellulaire et la barrière épithéliale peuvent être interdépendant et régulés de façon réciproque. De ce fait, L'interaction des Claudines avec ces protéines peut aider à l'établissement de la polarité cellulaire.

En conséquence, toute délocalisation ou altération de l'expression des Claudines pourrait être à l'origine d'une perturbation de la polarité cellulaire, phénomène profondément impliqué dans la biologie des cancers(68). Des études complémentaires sur la polarité cellulaire pourraient améliorer la connaissance du rôle des Claudines dans les événements physiopathologiques épithéliaux.

3.4.3. Régulation de la prolifération

Les claudines contribuent à la régulation de la prolifération et de la différenciation à travers les voies de transduction du signal. L'expression de plusieurs Claudines est affectée dans différents types de cancer. Cependant, la question si ces altérations sont une cause ou une conséquence de la carcinogenèse n'est pas encore élucidée. Récemment, ont suggéré un rôle de la claudine-1 dans la transformation maligne et l'apparition des métastases dans le cancer du côlon. Par ailleurs les Claudines sont associées à certains adaptateurs tels que les MUPP1 et Zo-1 et -2. Ces protéines peuvent lier et inactiver des oncogènes viraux et autres oncogènes. Des facteurs de

transcription régulant l'expression des gènes, tels que ZONAB, peuvent également être recrutés au niveau des jonctions serrées. On pense que la liaison de ces adaptateurs aux oncogènes et aux stimulateurs de la prolifération résulte dans leur inactivation suggérant un rôle dans la suppression de la prolifération (69).

3.5. Mode d'expression des claudines

L'étude de l'expression de toutes les Claudines dans les différents tissus n'a pas été exhaustive. Cependant, Les résultats et observations rapportés ont pu mettre en évidence un mode d'expression spécifique à chaque tissu ou organe. Ce mode d'expression est supposé déterminer les caractéristiques de perméabilité paracellulaire propres à ces tissus ou organes. La plupart des tissus coexpriment plusieurs Claudines dans des combinaisons variant selon les nécessités de l'épithélium ce qui conduit à des barrières plus ou moins étanches.

En utilisant la technique d'analyse en série de l'expression des gènes ou SAGE pour Serial Analysis Gene Expression de 21 Claudines, ont montré que les gènes des Claudines 1, 2, 3, 5, 7, 11, 12 et 15 étaient exprimés dans un grand nombre de tissus différents.

Par contre, les claudines 14, 16, 17, 20 et 22 avaient un mode d'expression beaucoup plus restreint. La claudine-17, a été trouvée uniquement dans le rein et à des taux faibles. Les claudines-3, -4 et -7 sont exprimées dans la majorité des cellules épithéliales. La claudine-5 est hautement exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires. Elle est également très exprimée, avec la claudine-2 dans le cerveau. La claudine-6 est fréquemment exprimée dans les cellules souches embryonnaires mais rarement dans les autres tissus. Le gène de la claudine-12 est le plus exprimé dans la majorité des tissus(61).

La claudine-1 est très exprimée dans l'épiderme de la peau. La claudine-6 est également exprimée dans l'épiderme de la peau mais à un degré moindre par rapport à la claudine-1. Dans le poumon, l'épithélium des bronches et bronchioles exprime les claudines -1, -3, -4, -5, et -7(70), mais n'exprime pas les claudines-2,-6,-9,-11, 15 et -16. La claudine-18 contient deux isoformes : la claudine-18.1 est spécifique au poumon et la claudine-18.2 est spécifique à l'estomac(71). Des études récentes ont montré le rôle fondamental de la claudine-19 dans la fonction rénale et aussi dans le développement de la rétine(72). La claudine-9 serait indispensable pour la préservation des cellules sensorielles de l'organe de Corti(73).

L'expression des Claudine -1 à -16 dans les différents segments néphrétiques du rein chez la souris a été examinée par (74). Les claudines -1 et -2 sont exprimées dans la capsule de Bowman,

les claudines -2, -10 et -11 dans tubul proximal, la claudine-2 dans la branche fine descendante de l'anse de Henle, les claudines -3, -4 et -8 dans la branche fine ascendante de l'anse de Henle, les claudin-3, -10, -11, et -16 dans la branche large ascendante de l'anse de Henle, les claudine-3 et -8 dans le tubule distal, et les claudine-3, 4, et -8 dans le canal collecteur (73). Ces expressions spécifiques à chaque segment néphrétique du rein mettent en évidence la relation spécificité tissulaire-fonction physiologique de perméabilité paracellulaire des claudines.

De même, en essayant de comprendre la physiologie des claudines dans le tractus gastro-intestinal (74), ont observé une expression des claudines-7, -8, -12, -13, et -15 dans le duodénum, jéjunum, ileum, et/ou dans le colon, avec des variations remarquables du niveau de l'expression de ces claudines le long du tractus intestinal par contre, les claudine-6, -9, -10, -11, -14, -16, -18, et -19 n'étaient pas exprimées dans l'intestin. Ceci pourrait refléter des différences dans les propriétés de perméabilité paracellulaire de l'intestin et fournit aussi une source d'étude de ces derniers dans les désordres intestinaux.

Chez l'Homme, très peu de données sont disponibles concernant l'expression des claudines dans le mésothorium certains auteurs ont montré une absence d'expression des claudines -3, -4 et -7. Dans ce type de tissu Chez la souris, la Claudine -15 a été observée dans la plèvre et le péritoine. Une meilleure connaissance de l'expression des claudines dans les tissus normaux fournirait une très grande opportunité d'étude en matière de comparaison entre les tissus anormaux et les tissus sains (75).

3.6. Régulation des Claudines

Les propriétés de barrière des claudines peuvent être potentiellement influencées par des signaux de l'environnement, par les changements au cours du développement et par des altérations d'adhésion cellulaire. Une régulation de la fonction des Claudines peut se produire au niveau de l'expression des gènes ou au niveau post-transcriptionnel notamment par une phosphorylation.

3.6.1. Régulation de l'expression des claudines

Un processus important associé au changement d'expression des claudines est la transition épithélium-mésenchyme ou transition qui est impliquée dans le développement embryonnaire mais aussi dans les phénomènes de cicatrisation et potentiellement dans la tumorigenèse.

Dans les cultures de cellules épithéliales murines des glandes mammaires, la surexpression du facteur de transcription Snail induit une EMT avec en même temps régulation négative des

claudines -3, -4 et -7(76), les gènes des claudines contiennent dans leurs promoteurs des motifs E-Box auxquels Snail peut se lier directement et réprimer la transcription (60).

L'expression des claudines peut être régulée par plusieurs facteurs de croissance et cytokines, donnant des réponses différentes selon la combinaison des stimuli et des types de claudines analysés. Après un traitement des cellules épithéliales rénales à l'EGF, l'expression des claudines-3 et -4 augmente tandis que celle de la claudine-2 diminue. Ces changements sont médiés par la MAP Kinase (77). Le facteur de croissance transformant, TGF- β et aussi capable d'induire la surexpression des claudines réduisant ainsi la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales. Les cellules transformées par Ras perdent le marquage membranaire de la claudine-1 et montrent un marquage plutôt cytoplasmique par translocation. Cependant, après inhibition par la MAP kinase, la claudine-1 retrouve sa localisation membranaire initiale (78).

3.6.2. Régulation post-transcriptionnelle

Plusieurs études ont mis en évidence une régulation de la fonction des claudines par une phosphorylation, contribuant selon les besoins de la cellule à l'augmentation ou à la diminution de la barrière physiologique des jonctions serrées. C'est ainsi par exemple, que dans les lignées de cancer ovarien, la phosphorylation de la claudine-3 médiée par la PKA est associée à une diminution de la résistance électrique transcellulaire ou TER. Par contre, dans des cultures de cellules endothéliales de la barrière hémato-céphalique, traitées par AMPc, la phosphorylation de la claudine-5 augmente plutôt la TER (61).

3.7. Claudines et cancer

3.7.1. Expression des Claudines dans les cancers

Claudine 1

La dérégulation de l'expression de la C-1 et sa délocalisation membranaire sont à l'origine d'une pathologie ; le cancer du sein (79). L'expression de la C-1 est généralement absente ou fortement diminuée dans le cancer du sein (80). En effet, 84 % des tumeurs mammaires expriment d'une façon faible la C-1, ces tumeurs sont appelées « claudin 1-low » (81). En revanche, dans 16% des cas, C-1 est fortement exprimée. Ces tumeurs sont appelées « claudin 1-high ».

Claudine 4

La C-4 est surexprimée dans le cancer du sein (82) (80). Néanmoins, son expression est

contradictoire, absente dans le carcinome invasif de grade 1, et fortement exprimée dans les carcinomes invasifs de grade 2 et 3 (80), ainsi que dans les carcinomes mammaires primaires comparé à l'épithélium normal mammaire (82).

L'expression de la C-4 est associée au sous type basal de cancer du sein (83). **Claudine 7**
L'expression de la C-7 est non détectée dans le cancer canalaire in situ, le carcinome lobulaire in situ, ainsi que le carcinome canalaire invasif du sein par rapport à l'épithélium normal mammaire (84).

La perte de C-7 s'associe étroitement à l'architecture discohésive généralement observée dans les lésions de haut grade, suggérant un rôle fonctionnel potentiel de la C-7 dans la progression du cancer du sein. Tandis que le mécanisme de perte de Claudine 7 dans le cancer du sein pourrait être attribué au promoteur de hyperméthylation (85). Cela n'a pas été le cas dans le carcinome canalaire invasif.

3.7.2. Rôle des Claudines dans la tumorigénèse

Il semblerait que la localisation de la C-1 ait une importance capitale dans le processus de cancérogenèse car sa délocalisation des jonctions serrées vers le cytoplasme a été mise en évidence dans nombreux types de tumeurs mammaires (80). La localisation nucléaire de la C-1 module aussi l'agressivité de ces cellules en augmentant leur potentiel invasif (86).

Plusieurs études récentes ont examiné l'état de méthylation de C-4 dans différents types de tumeur, et il est possible que l'hypométhylation du promoteur Claudine-4 peut être responsable de sa surexpression dans le cancer du sein, comme cela a été rapporté pour le cancer des ovaires (87) (88).

Il est largement admis que la perte d'adhésion cellulaire est un événement précoce dans le processus de métastase, permettant la libération de cellules cancéreuses individuelles des tumeurs primaires. La perte de la C-7 puisse jouer un rôle dans le développement du cancer (89).

3.8. Rôle des claudines dans le diagnostic, le pronostic et la thérapie des cancers

3.8.1 Rôle diagnostique et pronostique

De nombreuses études ont montré que la Claudine-1 est un marqueur de la TEM et joue un rôle

dans la migration cellulaire, sa perte d'expression est corrélée à un potentiel métastatique plus élevée. De plus, une répression de l'expression de la Claudine-1 est associée à une augmentation de la motilité des cellules cancéreuses mammaires non- invasives. Concernant la C-4, il a été suggéré que son expression est liée à un mauvais pronostic et dédifférenciation cellulaire (87) (90).

3.8.2. Rôle comme cible thérapeutique

L'expression de la C-1 comme piste de traitement ($\Delta 2$ -TGZ) dérivés de la TGZ des tumeurs mammaires joue un rôle crucial dans l'effet pro-apoptotique et dans la migration cellulaire.

Sur l'effet pro-apoptotique :

En effet la surexpression de la Claudine-1 induit l'apoptose des cellules triple-négatives « Claudin 1-low » MDA-MB-231 et Hs578T. De plus, elle est impliquée dans l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MDAMB-231. Par ailleurs, la surexpression de la Claudine-1 potentialise l'effet pro-apoptotique de la $\Delta 2$ -TGZ dans les cellules MDA-MB-231. Récemment, il a été montré que les cellules cancéreuses mammaires luminales MCF-7 surexprimant la c-1 présentent une sensibilité accrue à trois agents anticancéreux : le cisplatine, l'etoposide et le tamoxifene) (91).Cependant, la réexpression de la C-1 pourrait restaurer la sensibilité des cellules triple-négatives « claudin 1-low » aux agents de chimiothérapie classique.

Sur la migration cellulaire :

La réexpression de la c-1en particulier dans les tumeurs triple-négatives montre l'intensité de l'effet de ces dérivés sur la modification de la morphologie des cellules et l'inhibition de la migration cellulaire ces derniers sont associés à la perte des fibres de stress et à la formation des jonctions intercellulaires. Et donc, une corrélation entre l'espérance de vie des patientes et l'expression de la Claudine-1(92).

3.8.2.1. Thérapie basée sur les anticorps

La chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie apportent des résultats positifs dans le traitement des cancers. Cependant font généralement face à un manque d'efficacité et impliquent de nombreux effets secondaires car ils n'agissent pas uniquement sur la tumeur. De nouvelles thérapies ciblées freinent la croissance de la tumeur en agissant

spécifiquement sur des mécanismes contrôlant le développement de la tumeur.

Le Trastuzumab commercialisé sous le nom de Herceptin est un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le récepteur HER2, bloque le processus de division cellulaire.

Le Lapatinib commercialisé sous le nom de Tyverb, il bloque l'activité des kinases ce qui inhibe la voie HER2 et empêche ainsi la prolifération cellulaire(93).

Le Bevacizumab (Avastin) se fixe au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor) a pour but empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (94).

3.8.2.2. Thérapie basée sur les siRNA

L'ARN interférant se présente aujourd'hui comme une nouvelle stratégie de manipulation de l'expression des gènes impliquant le développement de petits ARN interférents ou small interfering RNA (siRNA) à des fins thérapeutiques. Dans les cancers les éléments clés des voies de signalisation cellulaire qui ne fonctionnent plus de manière appropriée peuvent être ciblés in vivo par ARNi.

L'interférence de l'ARN est un processus de régulation post-transcriptionnel endogène qui consiste en de petits ARN régulateurs, y compris des microARN (miARN) ou de petits ARN interférents (siARN) conduisant à un silencage des ARN messagers cibles (ARNm) dans une procédure spécifique à la séquence.

La thérapie moléculaire à l'aide de siRNA est une tendance récente et avancée dans l'inhibition multi-cibles de la croissance du cancer (95). Par ailleurs, le silencage génique intervient à différents niveaux comme la dégradation de l'ARNm, la modification de la chromatine et la répression de la traduction(96). Le mécanisme de l'ARNi est déclenché initialement par l'enzyme Dicer qui clive les ARN double brin (ARNdb) en ARNsi double brin courts de 21 à 25 nt. Le brin passager siARN est ensuite déroulé, et le brin guide siARN est chargé dans le complexe de silencing induit par l'ARN (RISC) conduisant au clivage des ARNm cibles par Argonaute 2 lorsque la séquence de brin guide est appariée avec une séquence complémentaire d'ARNm. Progrès et défis de l'administration ciblée de thérapies siRNA (97).

Des études montrent que l'inhibition de l'expression de la Claudine-1 par ARN interférence induit une diminution de la migration cellulaire en modifiant l'expression de gènes clés impliqués dans la TEM(98), et aussi une relocalisation membranaire de la β -caténine favorisant

son rôle d'adhérence cellulaire, inhibant la voie pro-proliférative et anti- apoptotique ainsi qu'en augmentant le clivage de la caspase 8 et de PARP (99).

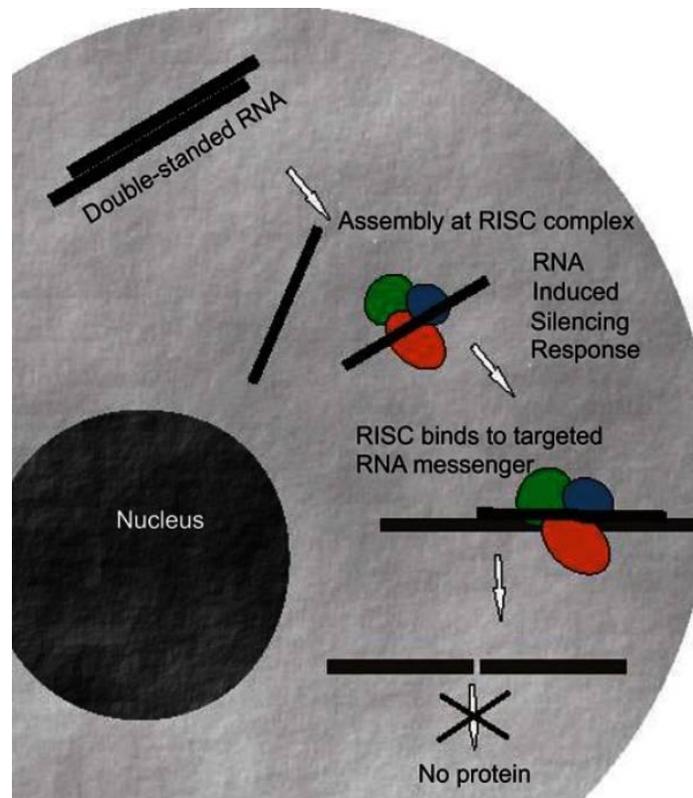


Figure 9 Mécanisme d'action des molécules d'ARNsi (100)

Cependant, une restriction majeure dans les applications thérapeutiques des siRNA est la faible absorption cellulaire des siRNA non modifiés car ils ne peuvent pas pénétrer les cellules avec une efficacité élevée. Pour cette raison, les molécules d'ARNsi doivent être conjuguées avec un système de support approprié. De plus, leur dégradation rapide dans le cytoplasme cellulaire et le plasma conduit à de courtes demi-vies. Pour cette raison, de nombreuses stratégies impliquant la combinaison de supports non viraux biocompatibles et polyvalents avec des siRNA contenant des modifications et des séquences optimisées ont abouti à des médicaments potentiels à base d'ARNi en tant que médicaments efficaces dans la clinique (101).

Chapitre II : Matériels et méthodes

1- Etude Histopathologique

L'étude a été réalisée sur une cohorte de 88 de carcinomes primaires de seins et 10 tissus mammaires normaux prélevés à l'hôpital universitaire Saint-Vincent I, Dublin entre 1994 et 2005, une moyenne d'âge de 60 ans (entre 30 et 81 ans) et sur une cohorte de 325 cas récoltés du 1 janvier au 31 décembre 2014 au CHU IBN Rochd Annaba, en prenant en compte l'identité du malade et le profile anatomopathologique, dont 242 cas atteints de CCI, 55 CLI, 23 CCI, CCIS, 5 CLI et CLIS.

Le panel de lignées de cellules mammaires sélectionnés et les tissus mammaires sains et de cancer du sein récoltés sont soumis au traitement des étapes de la technique histologique selon un programme de circulation dans un automate.

L'analyse histologique permet de mettre en évidence les différents éléments tissulaires et de les différencier entre eux pour permettre l'étude de leur structure et leur morphologie et de mettre en évidence leurs modifications pathologiques.

La technique histologique suivie consiste en étapes suivantes :

1.1 Fixation

Les prélèvements sont immergés dans une solution de formol à 4% pendant 1h. Cette fixation a pour but de conserver les structures puisque à l'air libre tout prélèvement tissulaire s'autodégrade spontanément (putréfaction). Certaines molécules possèdent la propriété de créer des ponts chimiques empêchant cette dégradation. Ces molécules sont des fixateurs. On recommande un volume de fixateur égal à 5 fois le volume du prélèvement.

- La mise dans les cassettes :

Les prélèvements sont ensuite mis dans des cassettes et rincés avec l'eau du robinet pour les débarrasser de l'excès de formol.

1.2. Déshydratation

Cette étape se déroule en circulation qui est réalisée à l'aide d'un appareil automatique, l'automate de déshydratation qui comporte 12 baignoires de solvants.

La déshydratation consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. L'agent déshydratant le plus utilisé est l'alcool (éthanol) à des concentrations croissantes qui présente une très grande miscibilité à l'eau.

Les bains suivants contiennent un agent éclaircissant, le xylène qui permet de remplacer l'éthanol. Celui-ci étant miscible avec la paraffine.

L'imprégnation en paraffine dans les deux derniers bains, est l'étape terminale de la circulation. Ces étapes durent vingt-deux (22) heures.

Tableau 03 Répartition des réactifs de la déshydratation et de l'imprégnation dans les bacs de l'automate

Bac	Nombre du bac	Durée
Alcool à 50%	1	Deux heures
Alcool à 70%	1	Deux heures
Alcool à 90%	1	Deux heures
Alcool à 100%	4	Huit heures (deux heures pour chaque bac)
Xylène purifié ou toluène	3	Six heures (deux heures pour chacun)
Paraffine	2	Deux heures (Une heure pour chacun)

1.3. Inclusion en paraffine (Enrobage)

On utilise pour cette étape un appareil avec deux plaques ; une plaque chauffante et l'autre refroidissante. Cette étape consiste à enlever les échantillons déshydratés des cassettes et les inclure dans de la paraffine chaude dans les moules métalliques utilisés selon le nombre de fragments biopsiques obtenus, bien orientés dans le sens de coupe. Ils sont ensuite placés dans la plaque refroidissante pour la réalisation des blocs de paraffine. Le refroidissement de la paraffine à +4°C amène sa solidification en un bloc prêt à être coupé.

1.4. Coupe

Elle se fait à l'aide d'un microtome pour la réalisation des rubans de coupes fines dont

l'épaisseur est de 3µm à 5µm. Ces derniers sont étalés sur une lame de verre après avoir été imbibées d'eau dans un bain-Marie à 41°C contenant de l'eau.

1.5. Déparaffinage

L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour réaliser les coupes) implique son élimination préalablement à la coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes nécessite une étape de déparaffinage et de réhydratation. Pour cela, les lames portant les coupes sont d'abord mises dans l'étuve à 37°C pendant 20 minutes. Ensuite, elles font l'objet d'un passage par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène ou xylène) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100 % (compatible avec le solvant précédent) jusqu'à 70 % (compatible avec l'eau), avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale.

1.6. Coloration

La coloration repose sur l'affinité particulière de certains tissus ou constituants cellulaires pour une substance colorante déterminée. La coloration utilisée est celle de l'Héματοxyline Eosine (H.E). L'Héματοxyline est une substance plutôt basique, qui colore les noyaux en violet donc colore les acides nucléiques. L'Eosine est une substance plutôt acide, qui colore le cytoplasme en rose donc colore les protéines.

Après réhydratation, les coupes sont colorées. Elles sont d'abord plongées dans l'hémalun de Masson pendant 5 à 10 minutes, rincées par trois bains successifs dans l'eau de conduite puis dans l'eau distillée. Les coupes sont ensuite recouvertes d'une goutte d'éosine directement sur la lame. Après deux minutes de coloration, les coupes sont rincées par l'eau sous le robinet puis dans l'eau distillée. Il faut alors procéder à la déshydratation, opération inverse de celle menée au début, avant de pouvoir faire le montage dans la résine. La déshydratation est réalisée en plongeant successivement les lames dans deux bains d'alcool à 95 % puis dans deux bains d'alcool à 100 % et enfin dans deux bains de solvant (toluène ou xylène). À la sortie du solvant, une goutte de résine de montage (par exemple, Eukit) est disposée sur la coupe et une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. La résine polymérise en une vingtaine de minutes mais on peut accélérer le processus en plaçant la lame sur une plaque d'histologie à 50°C. La préparation microscopique est alors prête pour l'observation.

2- Étude Immunohistochimique

2.1. Principe

Comme toute technique immunohistochimique, le principe consiste à localiser les antigènes d'intérêt (claudine-1, claudine-4 et claudine-7) dans les tissus (biopsies). Le réactif principal est un anticorps (anti- claudine-1, anti- claudine-4 et anti- claudine-7) dirigé contre l'antigène à marquer.

Des traceurs (molécules fluorescentes, enzymes, etc...) fixés directement ou indirectement sur cet anticorps permettent de visualiser la réaction Antigène-Anticorps (Ag-Ac).

Un marquage immunoenzymatique est ici appliqué. Le marqueur enzymatique utilisé est la peroxydase de Raifort dont l'activité, en présence du diaminobenzidine (DAB) et d'eau oxygénée, produit un précipité brun stable et permanent.

2.2. Mode opératoire

2-2.1. Démasquage et restauration antigénique

Le démasquage des sites antigénique est fait sous la chaleur par immersion des coupes dans le tampon de citrate de sodium 10 mM (pH 6,0) dans un module PT (LabVision) pendant 15 min à 95° C.

2.2.2. Blocage de l'activité enzymatique endogène

L'activité de la peroxydase endogène a été bloquée par incubation avec 3% de peroxyde d'hydrogène pendant 10/30 min.

2.2.3. Application des anticorps

Toutes les coupes sont ensuite marquées par les anticorps sus-mentionnés avec des dilutions appropriées selon le tableau 4.

Les coupes sont lavées dans un tampon phosphate salin avec 0,1% de Tween 20 (PBS-T).

Tableau 04répartition des dilutions des anticorps et le temps de contact

Anticorps	Dilution	temps
claudine-4	1: 1 000	1h
claudine-7	1: 500	16h
Claudine-1	1 :500	16h

IgG anti-lapin biotinylée ont été utilisées comme anticorps secondaires pour la claudin-7. Isotype de contrôle d'immunoglobuline G anti-souris pour la claudine-4, la biotine endogène a été bloquée à l'aide du Kit Vectastain, les coupes ont été lavées encore une fois avec le tampon phosphate salin puis incubées pendant 30min à une température ambiante.

Les coupes ont été déshydratées avec l'alcool clarifié par le xylène et contre colorées par HE. Après le montage les coupes sont prêtes pour l'observation. Les images de microscopie confocale ont été obtenues à l'aide d'un Nikon PCM 2000.

Chapitre III : Résultats et discussion

Résultat

L'étude histopathologique de 325 cas dont 242 cas atteints de CCI, 55 CLI, 23 CCI, CCIS, 5 CLI et CLIS montre différents aspects microscopiques des tumeurs en comparaison avec une coupe témoin coloration (HE / Van-Gieson).

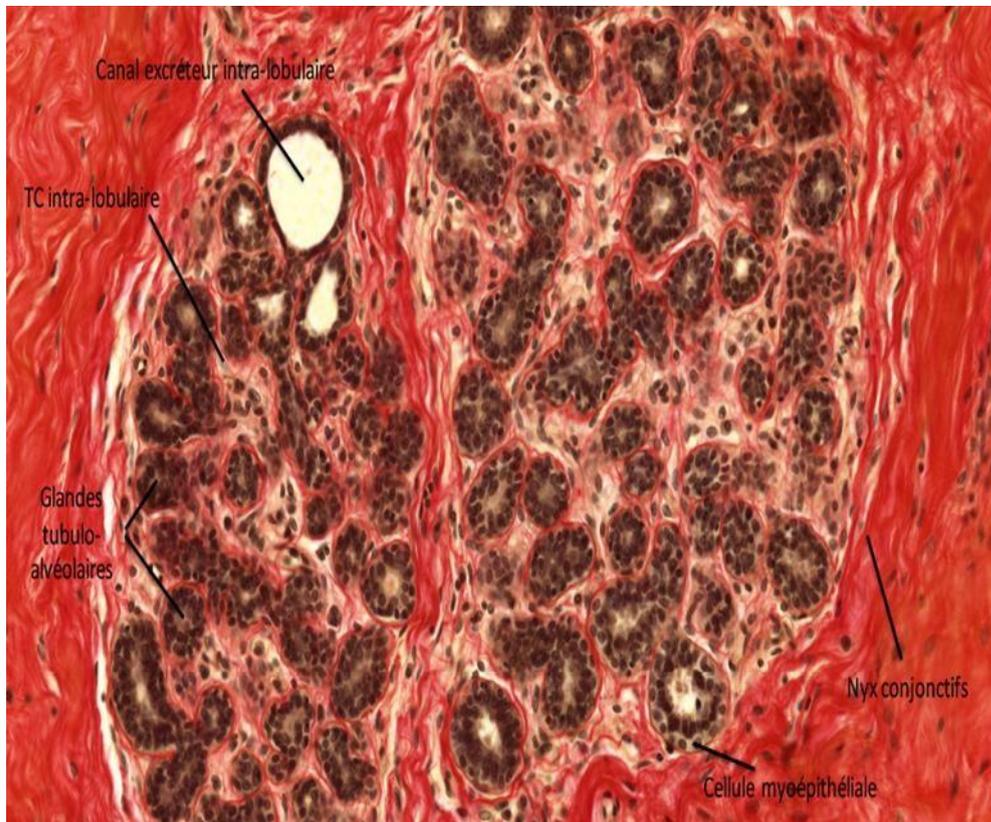


Figure 10 Coupe histologique mammaire témoin d'une femme en période d'inactivité (x40) (102)

Les glandes tubulo-alvéolaires comportent deux assises cellulaires :

- la plus externe comprend des cellules myoépithéliales plus ou moins espacées, à petit noyau souvent sombre. a plus interne est constituée de cellules cubiques régulièrement disposées à noyau arrondi ou ovoïde, bien nucléolé. Il s'agit des cellules sécrétoires au repos.
- Des canaux : qu'il s'agisse de canaux intra- ou inter-lobulaires, leur organisation est semblable à celle des tubulo-alvéoles. Toutefois, à leur niveau la couche conjonctive se renforce au tour de la vitrée et la lumière est généralement plus large.

- Le tissu conjonctif intra-lobulaire est pauvre en fibres de collagènes et riche en cellules (fibroblastes, fibrocytes, macrophages, plasmocytes, lymphocytes).

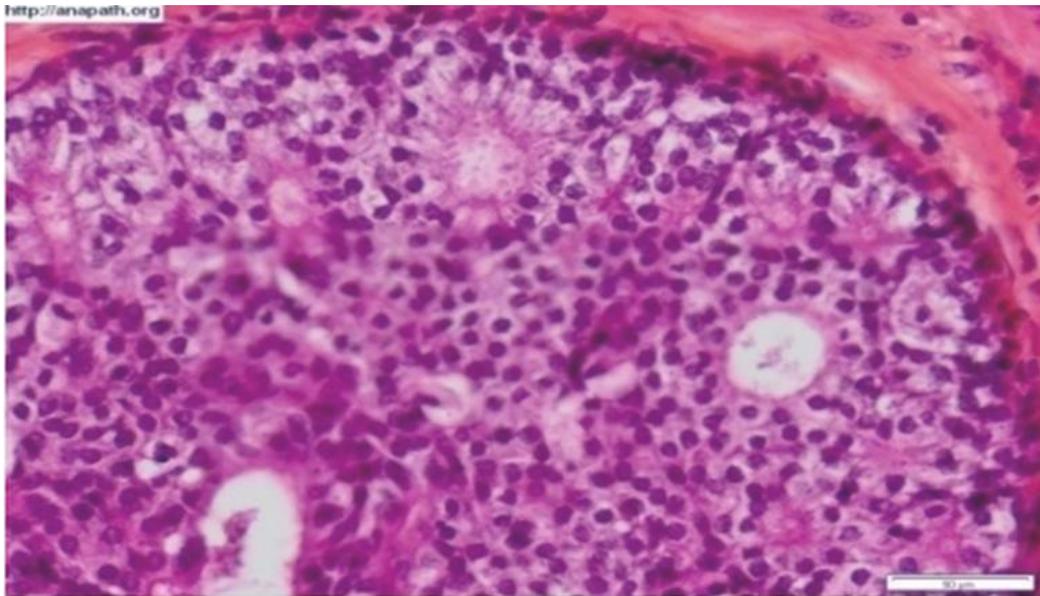


Figure 11 Aspect microscopique de carcinome intracanalair de bas (103)

- Anisocaryose faible dont la taille du noyau est 1.5 à 2 fois plus grande que la taille des globules rouges, avec une chromatine fine et rarement des nucléoles ou des mitoses.

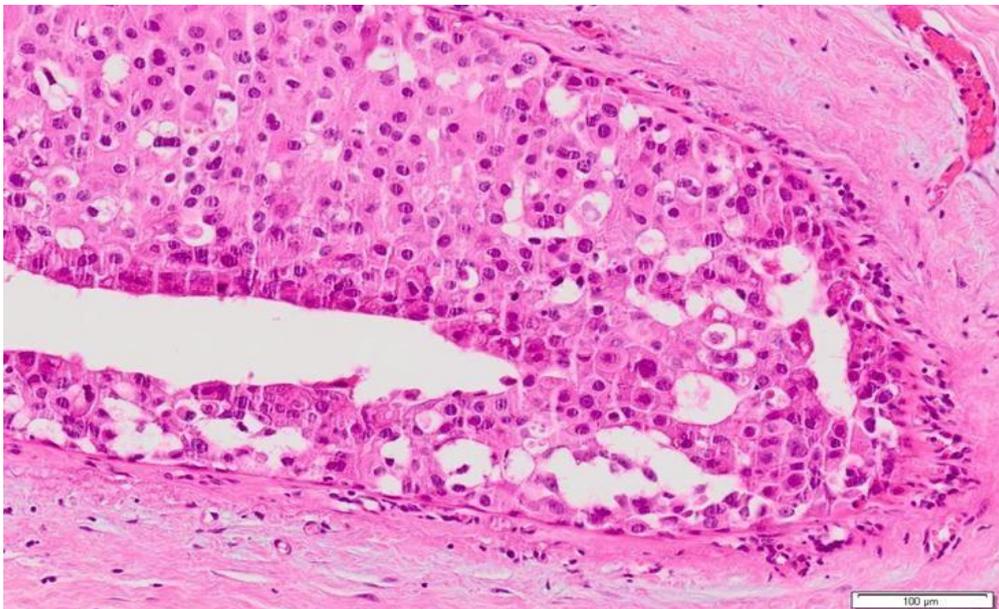


Figure 12 Aspect microscopique de carcinome intracanalair de haut (103)

-Cette lésion est caractérisée par une prolifération intracanalair de cellules pléomorphes avec atypies nucléaires marquées, souvent associée à des nécroses (comédocarcinome).

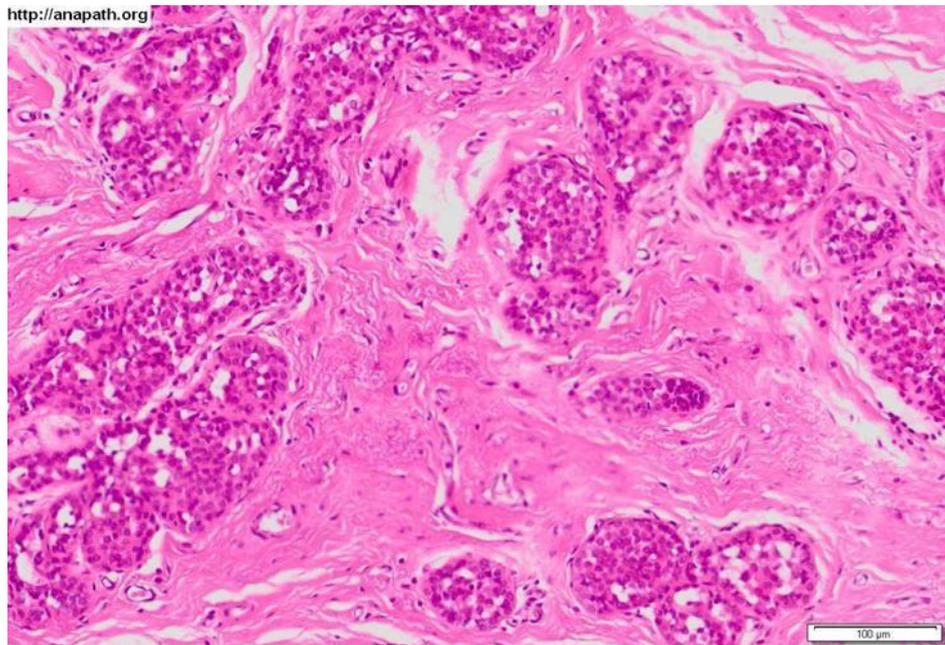
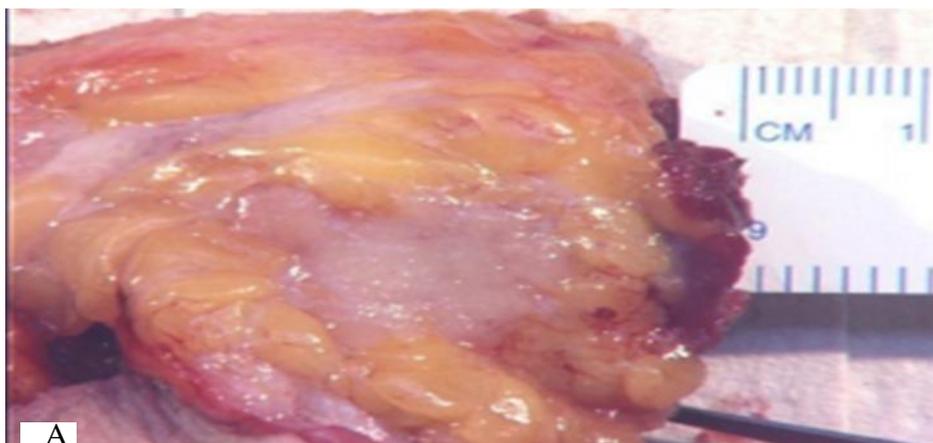


Figure 13 Aspect microscopique d'hyperplasie lobulaire atypie in situ (103)

-Prolifération de cellules monomorphes ne comblant pas totalement la lumière des canalicules (persistance d'une petite lumière). Noyaux arrondis, rarement nucléolés, avec un cytoplasme peu abondant.



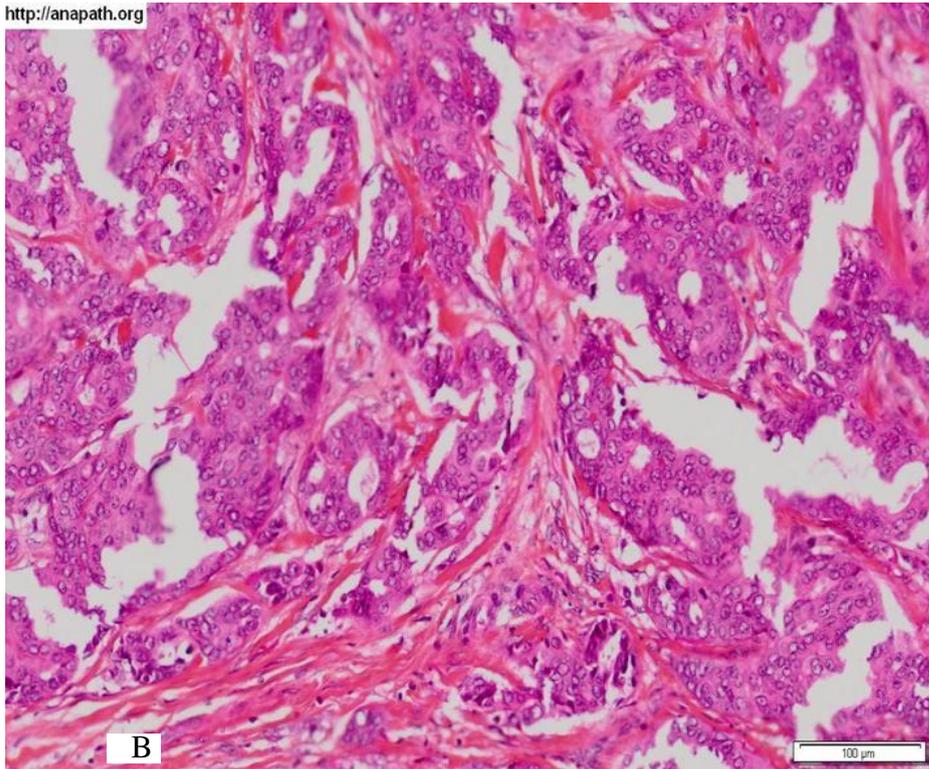


Figure 14. Aspect microscopique B et macroscopique A du carcinome canalaire infiltrant (103)

-Le carcinome canalaire infiltrant est gradé (Scarff et Bloom) en fonction de trois critères :le degré de différenciation selon le pourcentage de structures glandulaires (bien, moyennement ou peu différencié), le degré d'anisocaryose des cellules tumorales et le nombre de mitoses par unité de surface. La tumeur infiltre le parenchyme mammaire et comporte un stroma plus ou moins fibreux et plus ou moins inflammatoire. Une composante intracanaulaire est souvent associée.



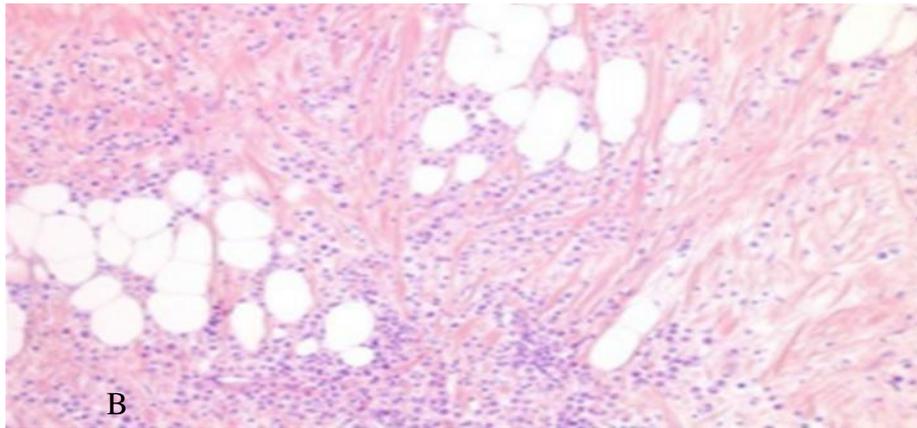


Figure 15 Aspect macroscopique A et microscopique B du carcinome lobulaire infiltrant (103)

-les cellules sont non cohésives, de petites tailles, à noyau rond à chromatine fine, à cytoplasme abondant. Ces cellules sont organisées en fils indienne, dans un stroma fibreux.

Les mitoses sont les plus souvent rares, et sont fréquemment associées à des lésions de carcinome lobulaire in situ.

Claudine 1

Une étude sur 222 carcinomes mammaires de grade 3 montre que 84% (186/222) des tumeurs mammaires expriment faiblement la Claudine-1, dont 24.38% (54/186) de tumeurs lumineales ; 23.93% de tumeurs HER2 (53/186) ; 35.67% de tumeurs triple négatives (79/186). Ces tumeurs sont appelées « Claudin 1-low ». En revanche, dans 36/222 des cas (16%), la Claudine-1 est fortement exprimée, dont 1.33% (3/36) de tumeurs lumineales ; 3.55% (8/36) de tumeurs HER2 ; 11.11% (25/36) de tumeurs triple négatives, ces tumeurs sont appelées « Claudin 1-high ». (Tableau 5.) De nombreuses études suggèrent que la Claudine-1 pourrait agir comme suppresseur de tumeur dans ce type de cancer (91). Au sein des tumeurs « claudin-1 high », la distribution entre les différents sous types moléculaires est de 24.38% (54/186) tumeurs luminal ; 23.93% tumeurs HER2 (53/186) ; 35.67% tumeurs triple négative (79/186) (81). Une délocalisation de la Claudine-1 au niveau cytoplasmique dans ces tumeurs « Claudin 1-high » a été révélée. (81)

Tableau 05 Répartition des tumeurs « Claudin 1-low » et « Claudin 1-high » au sein des différents sous-types moléculaires. Le pourcentage de tumeurs est indiqué pour chaque sous-type avec le nombre de cas correspondant. (81)

Sous Type	Caudin-1	Claudin-1
luminal	24.38%	1.33%
HER	23.93%	3.55% (8)
Triple	35.67%	11.11% (25)
Total	84% (186)	16% (36)

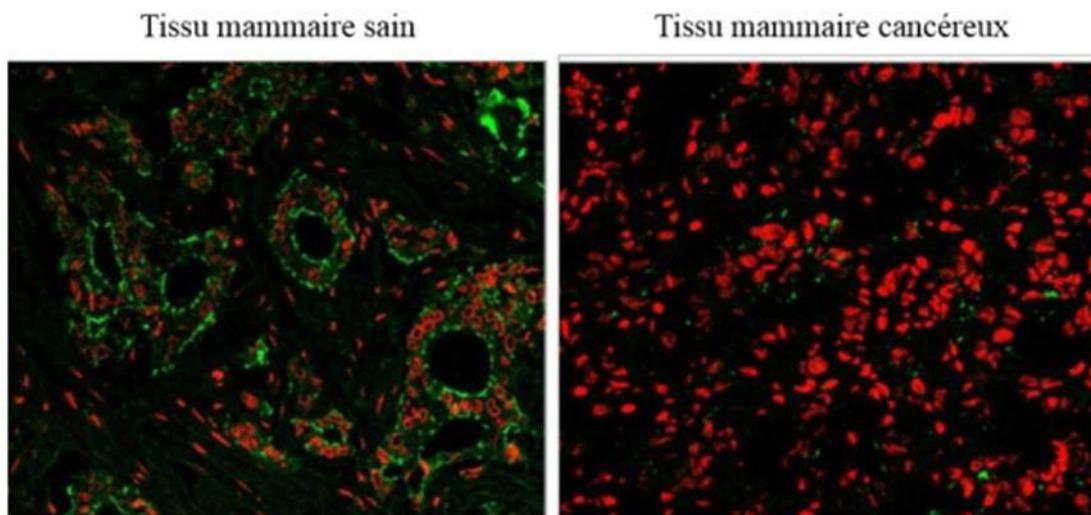


Figure 16 Localisation de la Claudine 1 dans les tissus mammaires sains et cancéreux ; dans un tissu mammaire sain, la Claudine 1 est localisée au niveau de la membrane cellulaire.

Dans un tissu mammaire cancéreux, le tissu mammaire est désorganisé avec une perte

Blanchard et ses collaborateurs montrent qu'une expression élevée de la Claudine-1 est retrouvée en grande majorité dans les tumeurs ER- (104). Ils identifient un sous-groupe de type « basal-like » qui présente une forte expression de la Claudine-1 dans 61% des cas. Ils montrent également une corrélation entre le niveau élevé de Claudine-1 dans la tumeur et l'âge élevé des patientes, supérieur à 55 ans.

Claudine-4

L'expression de la Claudine-4 dans 299 tumeurs mammaires (cohorte II) La coloration était principalement membranaire, avec quelques échantillons positifs à la claudine-4 présentant un faible niveau de marquage cytoplasmique. 299 tumeurs parmi les 512 tumeurs de la cohorte I (58,4%) ont fait l'objet de l'analyse. Les 213 autres tumeurs ont été écartées en raison de l'altération tissulaire lors du traitement antérieur des coupes, ses derniers ont été comparés. Sur les 299 tumeurs disponibles, 279 (93,3%) exprimaient la Claudine-4. L'immunohistochimie a été évaluée sur une échelle de 0 à 3 en fonction de l'intensité de l'immunomarquage. Une expression élevée de Claudine-4 a été définie comme une intensité d'immunomarquage ≥ 2 , et l'expression faible de la Claudine-4 a été définie comme une intensité de l'immunomarquage < 2 .

Sur la base de cette analyse, 142 tumeurs (47,5%) ont été classées comme exprimant des taux élevés de Claudine-4 et 157 tumeurs (52,5%) étaient classées comme exprimant de faibles niveaux de Claudine-4.

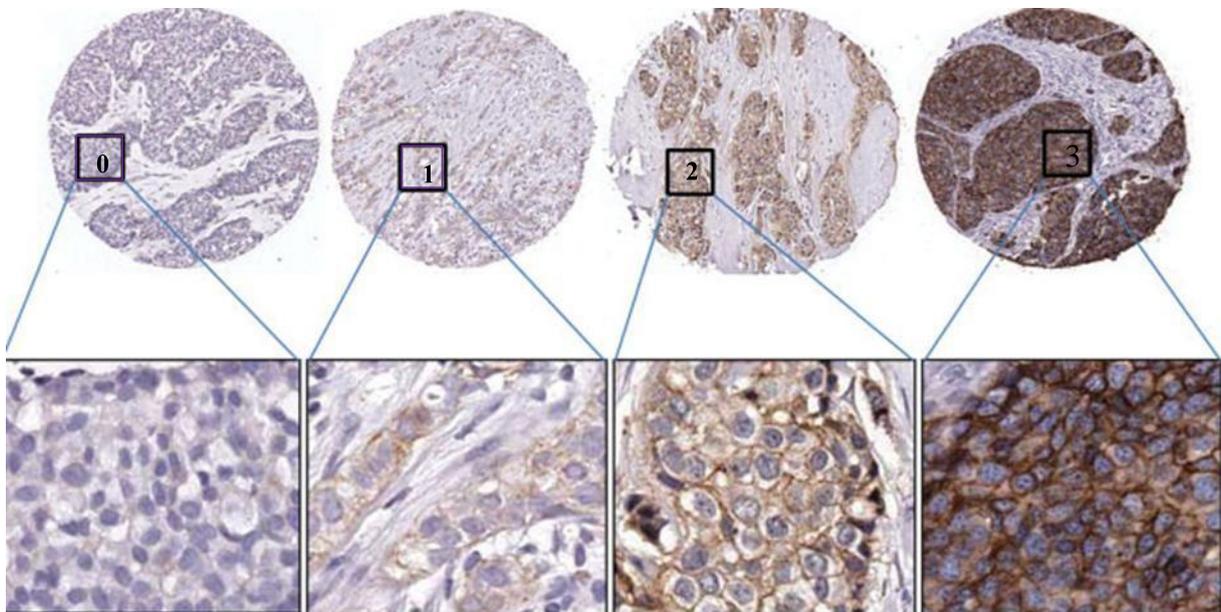


Figure 17 Coloration immunohistochimique Claudine-4 dans les noyaux de tumeur du sein, montrant des exemples de notation claudine-4 aux scores 0, 1, 2 et 3. Les noyaux sont marqués en violet La Claudine en brun. (105)

Claudine-7

Pour évaluer le potentielle de la perte d'expression de C-7, dans une série de CCIS et les CCI. Le CCIS a été révélé comme un précurseur direct de CCI, Ils ont d'abord examiné le schéma de coloration de C-7 dans une gamme de cas de CCIS, de grade nucléaire 1 (bas grade) au grade 3 (haut grade). Dans chaque cas, L'immunomarquage de Claudine-7 dans le CCIS a été comparée à celle de l'épithélium normal adjacent dont l'immunomarquage de la membrane était prédominante. L'analyse immunohistochimique n'a montré aucun changement de l'expression des C-7 dans les deux grades : grade 1 (0/10), grade 2 (0/14), tandis que 71% de grade 3 (10/14) ont montré une perte d'expression.

Ensuite, ils ont examiné le model de l'immunomarquage de C-7 dans le CCI en allant de grade 1 (bas grade) au grade 3 (haut grade) qui a été comparé dans chaque cas à celui vu dans l'épithélium normal présent dans la même section.

Quelques cas de CCI de grade 1 (1/6), de grade 2 (3/12) ont montré une perte d'expression de Claudine-7, tandis que 77% des cas de grade 3 (10/13) ont montré une perte significative de coloration.

L'analyse IHC de carcinome lobulaire in situ a montré une perte d'expression de C-7 dans 76% (13/17). (Figure 19)

Tableau 06 Répartition des cas avec perte d'expression de claudine-7 selon le type des tumeurs et le grade histologiques (106)

Histologie	Grade histologie	cas avec perte d'expression/ total des cas
CCIS	Grade nucléaire	
	1	0/10
	2	0/14
	3	0/14
CCI	Grade Elston	
	1	1/6
	2	3/12
	3	10/13
CLIS	/	13/17

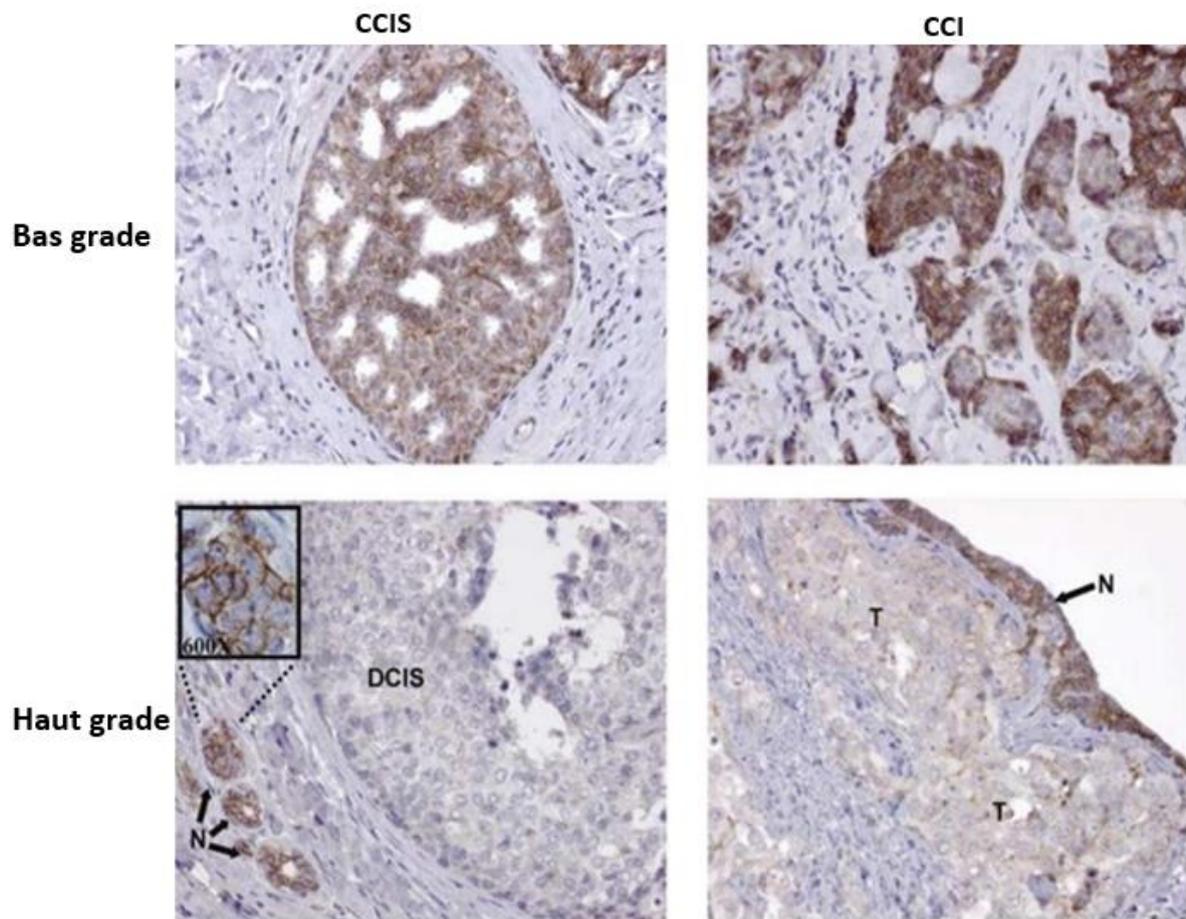


Figure 18. Images au microscope optique d'expression de la Claudine 7 dans le CCIS et CCI de haut et de bas grade nucléaire par rapport à l'épithélium mammaire normal N.T :Tissu tumoral (106)

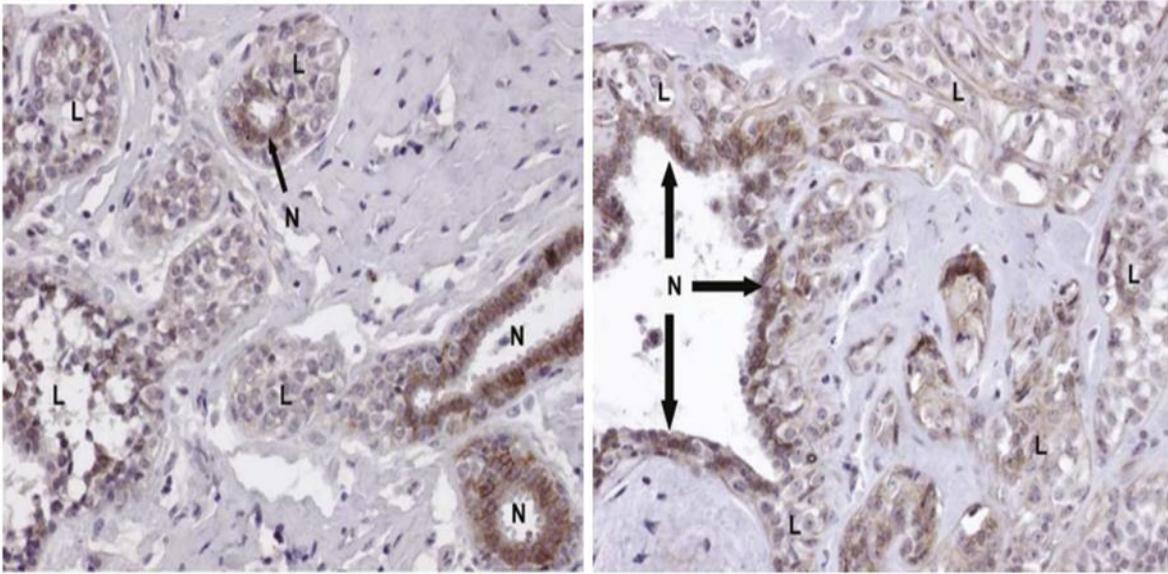


Figure 19. images aux microscopies optiques montrant la perte d'expression de Claudine-7 dans le CLIS (L) par rapport à l'épithélium mammaire normal adjacent (N) (106)

Discussion

Au sein des tumeurs « claudin-1 high », la distribution entre les différents sous types moléculaires est de 24.38% (54/186) de tumeurs lumineales ; 23.93% de tumeurs HER2 (53/186), 35.67% de tumeurs triple négative (79/186) **(81)**. De nombreuses études suggèrent que la Claudine-1 pourrait agir comme suppresseur de tumeur dans ce type de cancer. **(91)**

Plusieurs études rapportent que la perte d'expression de la Claudine-1 est corrélée à une augmentation du potentiel invasif des tumeurs et à un risque accru de récidence. Dans une étude de 83 cas, un groupe de patient ayant récidivé présente une tumeur de type « claudin1-low » dans 81% des cas (67/83), contrairement au groupe de patient n'ayant jamais récidivé 19% (16/83). **(107)**

La diminution de l'expression de la Claudine 1 est associée à l'augmentation du potentiel invasif ainsi qu'à la réémergence des tumeurs mammaires. **(108)** Récemment, dans des tumeurs triple-négatives, le phénotype « claudin 1-low » prédit un risque de récidence et de mort plus important chez ces patients contrairement aux patients ayant une tumeur exprimant la claudin-1 high.**(109)**

Blanchard et ses collaborateurs montrent qu'une expression élevée de la Claudine-1 est retrouvée en grande majorité dans les tumeurs ER-**(104)**. Ils identifient un sous-groupe de type « basal-like » qui présente une forte expression de la Claudine-1 dans 61% des cas. Ils montrent également une corrélation entre le niveau élevé de Claudine-1 dans la tumeur et l'âge élevé des patientes, supérieur à 55 ans. Les travaux de Lu sur 222 tumeurs ont confirmé ces données. **(81)**

Au sein des tumeurs « claudin 1-high », Une analyse immunohistochimique montre une délocalisation de la Claudine-1 au niveau cytoplasmique dans ces tumeurs « claudin 1-high ».

Ils ont procédé à l'analyse de l'expression de claudin-4 dans une grande cohorte de 299 échantillons sur une TMA (Cohorte II). Cette analyse a démontré un lien concluant entre l'augmentation de l'expression de la claudine-4 et la réduction de survie des patients. Au sein de cette cohorte, 279 tumeurs (93,3%) ont montré une immunoréactivité à la claudine- 4, similaire aux niveaux de l'immunoréactivité rapportés par des études antérieures. **(80) (110)**. Dans une étude précédente avec un nombre comparable d'échantillons (n=184), aucune association n'a été trouvée entre l'expression de la claudine-4 et le grade tumoral ou le statut des récepteurs hormonaux. **(110)** La raison est peut-être que dans ces 184 échantillons, 179 ont été classés comme positifs, et parmi ceux-ci, 134 ont été classés comme fortement positif, le reste

étant classé comme faiblement ou modérément positif.

Ce manque de distribution des scores peut être dû à un nombre disproportionné de tumeurs de haut grade dans cette cohorte, ou une discrimination inadéquate entre les niveaux de coloration. Autres études sur l'expression de cette protéine dans le cancer du sein ont trouvé une association avec des tumeurs de haut grade. **(111) (80)**

Quant à la Claudine 7, Il y a une corrélation inverse entre l'expression des claudines 7 et le grade nucléaire observé dans les lésions de CCIS ($P=0.001$) et aussi le grade histologique observé dans les lésions de CCI ($P=0.014$), ce qui éclaire la polémique autour du processus de progression du cancer du sein. Il est possible que le cancer du sein progresse d'une manière similaire à celle d'autres néoplasies intraépithéliales dans lesquelles les lésions de CCIS progressent en allant de bas grade à haut grade. **(89)**

Les lésions de CCIS de haut grade évolueraient alors vers des lésions de CCI de bas grade, qui pourraient par la suite évoluer vers des CCI de haut grade. **(89)**

Conclusion et perspectives

Il est largement admis que la perte des jonctions serrées est un événement précoce dans le processus de métastase, permettant la libération de cellules cancéreuses individuelles de tumeur primaire.

La C-1 pourrait agir comme un indicateur pronostique du cancer du sein, sa perte d'expression est corrélée à une augmentation du potentiel invasif des tumeurs ainsi qu'à la réémergence des tumeurs mammaires (104).

La c-4 est fortement ou faiblement exprimée dans le carcinome mammaire ce qui rend son utilité un mauvais pronostic.

La C-7 n'est pas exprimée dans le carcinome canalaire in situ, invasif et le carcinome lobulaire in situ. Le rôle fonctionnel de la C-7 dans le cancer du sein n'a pas encore été établi, cependant, il existe des preuves qui soutiennent son rôle dans l'adhésion cellulaire, ce qui suggère que sa perte d'expression pourrait jouer un rôle plausible dans les métastases des cancers du sein.

En perspectives, il serait intéressant de poursuivre des investigations sur cette maladie afin d'établir une cartographie d'expression des claudines à plusieurs niveaux à savoir les biopsies humaines, les lignées cellulaires humaines et les xénogreffes tumorales afin de caractériser un phénotype de carcinome mammaire basée sur l'expression ou l'absence d'expression de claudines. Cela pourrait offrir une bonne opportunité pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en particulier celles ciblant les claudines.

Références bibliographiques

1. Bendaoud Bachir A., Approche moléculaire du cancer du sein dans la région du nord-ouest de l'Algérie : dérégulation de la voie de signalisation P13K/AKT dans l'oncogenese des tumeurs TNBC et HER2-positive. These pour l'obtention du diplôme de doctorat 3eme cycle en Biologie de la cellule normale et pathologique, Université Djillali Liabes, Sidi Bel-Abbes. P.143.
2. Suzuki Masayo, Kato-Nakano Mariko, Kawamoto Shinobu, Furuya Akiko, Abe Yuzuru, Misaka Hirofumi e.t al. Therapeutic efficacy of monoclonal antibody against Claudin4 for pancreatic and ovarian cancers. *Cancer Sci* 2009; 100 (9): 1623-30.
3. Ip YG Cheung ST, Lee YT, Ho JC, Sheung TF. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther* 2001;6(11): 2859-47.
4. Klamp T, Schumacher J, Huber G, Kühne C, et al. High titer specific auto-antibodies against claudin-18 isoform 2 induced by a chimeric FIBcAg virus-like particle vaccine kill tumor cells and inhibit the growth of metastases. *Cancer Res* 2011;71(2): 516-27.
5. Soini Y, Kinnula V, Kahlos K, Paakko P. Claudins in differential diagnosis between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma of the pleura. *J Clin Pathol* 2006;59:250-54.
6. Lodi C, Szcba E, Iloiczbauer A, Beitnunkir E, Sztrjarta A, Kupcsuik P et al. Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. *Modern Pathol* 2006; 19:460-469.
7. Moldvay J, Jackel M, Paska C, Soltesz I, Schaff Z, Kiss A. Distinct claudin expression in histologic subtypes of lung cancer. *Lung Cancer* 2007;57: 159-167.
8. Paschoud S, Bongiovanni M, Pache JC, Citi S. Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2007; 20(12):947-54.
9. Brette JP . Cancer du sein. Vol. -384p. PARIS: Ed MASSON, 2007. Brugge J, Hung MC, Mills GB. «A new mutational AKT activation in the PI3K pathway.» *Cancer Cell*, 2007; 12:104–107.
10. Université Médicale Virtuelle Francophone. Anatomie de la glande mammaire. 2011.

11. Brochures de la Ligue contre le cancer. Le cancer du sein. [en ligne]. 2015. [consulté le 05/09/2020]. url : <https://boutique.liguecancer.ch/brochures-materiel-dinformation/prevention/cancer-du-sein/le-cancer-du-sein/>
12. Drake R, Richard L. Vogl A, Mitchel L, Adam. Gray's anatomie pour les étudiants. Vol.1103 p. ISBN 978-2-8101-0151-1. PARIS: Elsevier Masson, 2010.
13. Netter F. Atlas d'anatomie humaine. 4e édition. Vol. 548 p. ISBN 978-2-294-08042-5. PARIS: Masson, 2007.
14. Bombonat Ai, Sgroi DC. «The molecular pathology of breast cancer progression.» the journal of pathology, 2011: 223: 307–317.
15. Tavassoli FA, Davilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. « Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.» IARC Press. Lyon, 2003.
16. (Morre J-F, Peanault-Llorca F, Apro MS, Salmon R. Le cancer du Sein [Internet]. New York: Springer; 2008 [cited 2015 Nov 22]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-2-287-36073-2>)
17. Kelsey JL and Bernstein L. «Epidemiology and prevention of breast cancer.» Annu Rev Public Health, 1996: 17:47-67.
18. Krajinovic M, Ghadirian P, Richer C, et al. « Genetic susceptibility to breast cancer in French-Canadians: role of carcinogen-metabolizing enzymes and gene-environment interactions.» Int J Cancer, 2001: 92(2):220–225.
19. Hamajima N, Hirose K, Tajima K et al. « Alcohol, tobacco and breast cancer- collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease.» Br J Cancer, 2002: 87:1234:1245.
20. (Nkondjock A, Ghadirian P. Facteurs de risque du cancer du sein. MS Médecine Sci. 2005;21(2):175–180).
21. Tardivon A and Malhaire C. «Cancer du sein (I). Épidémiologie, facteurs de risque, imagerie.» Gyneco-obstétricale, 2009: 1-30.
22. Desantis CE, Fedewa SA, Sauer AG, Kramer JVK, Smith RA, Jemal A, et al. «Breast

- Cancer Statistics, 2015: Convergence of Incidence Rates Between Black and White Women.» CA CANCER J CLIN, 2016: 66:31–42.
24. Ganiy OA and Ganiyu AR . «Epidemiology of Breast Cancer in Europe and Africa.» J Cancer Epidemiol, 2012: 915610.
 25. Betsy A. Kohler, Recinda L. Sherman, Nadia Howlader, Ahmedin Jemal, A. Blythe Ryerson, Kevin A. «Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State.» JNCI J Natl Cancer Inst , 2015: 107(6): djv048.
 26. Abid L. «Épidémiologie des cancers en Algérie: problématique des registres des cancers.» African Journal of Cancer, 2009: 1(2): 98–103.
 27. Belkacémi Y, Boussen H, Hamdi-Cherif M, Benider A, Errihani H, Mrabti H, et al. «Épidémiologie des cancers du sein de la femme jeune en Afrique du Nord.» 32 journées de la SFSPM. Strasbourg, 2010. 56-68.
 28. Corbex M, Bouzbidb S , Boffettac P. «Features of breast cancer in developing countries, examples from North-Africa.» European Journal of Cancer, 2014: 50(10):1808-1818. Coutte L, Dreyer C, Sablin MP, et al. «PI3K- AKT-mTOR pathway and cancer.» Bull Cancer, 2012: 99:173–80.
 29. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. Cancer Cell 2002; 2 : 367–76. [Google Scholar]
 30. Yerushalmi, R., Hayes, M.M., and Gelmon, K.A. (2009). Breast carcinoma--rare types: review of the literature. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 20, 1763– 1770.
 31. (23. Saglier J. Cancer du sein : questions et réponses au quotidien. Paris: Elsevier Masson; 2009. 24. Institut National du Cancer. Les Cancers du sein [Internet]. Institut National du Cancer. [cited 2015 Dec 19]. Available from: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-maladies-du-sein/Cancers-du-sein>)
 32. Geoffroy N., (2018). Role de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négative et son implication dans les effets anticancéreux de dérivés de la troglitazone. These de doctorat en biologie, santé, environnement, l'université de

lorraine, Nancy. P.150

33. (Anderson I, Hildell J., mühlw A., Petersson H. Number of projections in mammography. Influence on detection of breast cancer disease. AJR 1978 ; 130 :349-51)
34. Institut national du cancer(INC).ACCELERONS LES PROGRES FACE AUX CANCERS.url : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Diagnostic/Mammographie> (page consultées le 15/08/2020).
35. INSTITUT NATIONAL DU CANCER(INC). ACCELERONS LES PROGRES FACE AUX CANCERS. url : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Diagnostic/Examen-anatomopathologique> (pages consultées le 08/09/2020)
36. Fondation arc pour la recherche sur le cancer. Cancers du sein. url : <https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-sein/diagnostic-cancer> (pages consultées le 06/09/2020)
37. Fondation arc pour la recherche sur le cancer. Cancers du sein. url <https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-sein/depistage-cancer> (pages consultées le 06/09/2020)
38. Smith SA, Easton DF, Evans DGR, Ponder BAJ. Allele losses in the region 17q12-q21 in familial breast and ovarian cancer non-randomly involve the wild-type chromosome. Nat Genet 1992 ; 2 : 128-31.
39. Collins N, McManus R, Wooster R, et al. Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. Oncogene 1995 ; 10 : 1673-5.
40. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 1997 ; 386 : 761-3.
41. Monteiro ANA, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 13595-9.
42. Chapman MS, Verma IM. Transcriptional activation by BRCA1. Nature 1996 ; 382 :678-9.

43. Scully R, Anderson SF, Chao DM, et al. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 5605-10.
44. Anderson SE, Schlegel BP, Nakajima T, Wolpin ES, Parvin JD. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase α . *Nat Genet* 1998 ; 19 : 254-6.
45. Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA. BRCA 1 required for transcription-coupled repair of oxydative DNA damage. *Science* 1998 ; 281 : 1009-12.
46. Somasundaram K, Zhang HB, Zeng YX, et al. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 1997 ; 389 : 187-90.
47. Zhang HB, Somasundaram K, Peng Y, et al. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 1998 ; 16 : 1713-21.
48. Ouchi T, Monteiro ANA, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 2302-6.
49. Didier M, Jean F, et al. *Cancer gene therapy* 8, 759-770 (2001).
50. Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, et al. Germline mutations of the BRCA 1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet* 1995 ; 11 : 428-33.
51. Gayther SA, Mangion J, Russell P, et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet* 1997 ; 15 : 103- 51 ; Farquhar, M. G., et Palade, G.E .Junctional Complexes in various epithelia. *J. Cell Biol* 1963; 17:375-412.
52. Ijsbrand K, Gérard T, et al. Service d'ingénierie pédagogique numérique (SIPN) ; université bordeaux-1 ; UFR de science biologique ; unisciel 2013 URL. (consulté le 03.09.2020)
53. Cereijido, M., Contreras, R G., et Shoshanin ,L. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev.* 2004;84:1229-1262.
54. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:285-293.
55. Matter ,K., et Blada,M. Functional analysis of tight junction . *Methods* 2003;30:228-234

- McCune JM ., Naimikawa R., Kaneshina H., Shultz L.D., Liberman M.et Weissman IL. The scid- hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 1988;241:1632-1639.
56. Gonzale-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mal Biol* 2003; 81:1-44.
57. Furuse M, Fujita K ., Hiiragi T., Fujimoto K., et Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel integralIntegral Membrane Proteins Localizing at tight Junctions with No sequence Similarity to Occludin. *Journal of cell Biology*.1998; 141(7): 1539-1550.
58. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biologt* 2009, 10:235.
59. Sehneberger E.E. et Lynch R.D. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 286: 1213 -28.
60. Angelow S,Ahlstrom R et Yu AS. Biology of claudins . *Am J physiol Renal physiol* 2008; 295: 867-876.
61. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Carncer* 2006;6:186.
62. Geoffroy N., (2018). Role de la claudine 1 dans les cellules cancéreuses mammaires triple-négative et son implication dans les effets anticancéreux de dérivés de la troglitazone. These de doctorat en biologie, santé, environnement, l'université de lorraine, Nancy. P.150.
63. Will C.Fromm M., Muller D. Claudin tight junction proteins: Novel aspect in paracellular fransport. *Peritoneal Dialysis international* 2008 ; 28: 577-84 .
64. Claude P. Morphologicalfactors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the zonula occlodens.*J Membr Biol* 1978;39:219-232.
65. Anderson J-M. et van Itallie C. Phsiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002584.
66. Van Italie CM, Anderson JM.C laudins and epithelial paracellular transport . *Ann Rev Physiol* 2006;68:403-29.
67. Itoh M and bissell MJ. The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8:449-62.

68. Aijaz S, Balda MS et Matter K. Tight Junctions: Molecular Architecture and Function. *International. Review of Cytology* 2006; 248:261-298.
69. Balda MS, Garrett M.D. et Matter K. The ZO-1 associated tyrosine box factor ZO-2 regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell. Biol.* {2003};3:423-432.
70. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285: 1166-78.
71. Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, Kimura S. Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2001;21:7380-7390.
72. Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A.V., Waldegger, S., Lesslauer, A., et al. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 2006; 79:949-57.
73. Nakano, Y., Kim, S.H., Kim, H.M., Sanneman, J.D., Zhang, Y., Smith, R.J., et al. A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000610.
74. Saishin Y.K, Gotoh S., Furuse M., Takasuga A., Tano Y., et Tsukita S. Differential Expression Patterns of Claudins, Tight Junction Membrane Proteins, in Mouse Nephron Segments. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 875-86.
75. Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL. Translation of Microarray Data into Clinically Relevant Cancer Diagnostic Tests Using Gene Expression Ratios in Lung Cancer and Mesothelioma. *Cancer Res* 2002;62:4963-4967.
76. Fujita H., Chiba H., Yokozaki H. Differential Expression and Subcellular Localization of Claudin 7, 8, 12, 13, and 15 Along the Mouse Intestine. *J Histochem Cytochem* 2006; 54:933.
77. Kieran NE, Doran PP, Connolly SB, Greenan MC, Higgins DF, Leonard M, Godson CT, Taylor CT, Henger A, Kretzler M, Burne MJ, Rabb H, Brady HR. Modification of the trancriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by iipcxin analog. *Kidney Int* 2003;64(2):480-92.

78. Oliveira SS, Morgado-Diaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell. Mol. Life sci.* 2007; 64 17-28.
79. Krämer, F., White, K., Kubbies, M., Swisshelm, K., and Weber, B.H. (2000). Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum. Genet.* 107, 249–256.
80. Tokés, A.-M., Kulka, J., Paku, S., Szik, A., Páska, C., Novák, P.K., Szilák, L., Kiss, A., Bögi, K., and Schaff, Z. (2005). Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* 7, R296-305.
81. Lu, S., Singh, K., Mangray, S., Tavares, R., Noble, L., Resnick, M.B., and Yakirevich, E. (2013). Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod. Pathol.* 26, 485–495.
82. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 2004;164:1627–33.
83. Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, Tokes AM. Expression of tight junction protein Claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*, in press.
84. Nacht M, Ferguson AT, Zhang W, Petroziello JM, Cook BP, Gao YH, Maguire S, Riley D, Coppola G, Landes GM, Madden SL and Sukumar S. (1999). *Cancer Res.*, 59, 5464–5470.
85. Jones PA and Baylin SB. (2002). *Nat Rev Genet.*, 3, 415–428.
86. Zwanziger, D., Badziong, J., Ting, S., Moeller, L.C., Schmid, K.W., Siebolts, U., Wickenhauser, C., Dralle, H., and Fuehrer, D. (2015). The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness. *Endocr. Relat. Cancer* 22, 819–830.
87. Litkouhi B, Kwong J, Lo CM, Smedley JG, 3rd, McClane BA, Aponte M, Gao Z, Sarno JL, Hinnens J, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC, et al. Claudin-4 overexpression in epithelial ovarian cancer is associated with hypomethylation and is a potential target for modulation of tight junction barrier function using a C-terminal fragment of Clostridium

- perfringens enterotoxin. *Neoplasia* 2007;9:304–14.
88. Honda H, Pazin MJ, Ji H, Wernyj RP, Morin PJ. Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281:21433–44.
89. Kominsky, S.L.; Argami, P.; Korz, D.; Evron, E.; Roman, V.; Garrett, E.; Rein, A.; Sauter, G.; Kallioniemi, O-P.; Sukumar, S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003, 22, 2021-2033.
90. Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:233–41.
91. Zhou, B., Moodie, A., Blanchard, A.A.A., Leygue, E., and Myal, Y. (2015b). Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights. *J Clin Med* 4, 1960–1976.
92. Geoffroy Marine, Kleinclaus Alexandra, Grandemange Stephanie, Hupont Sebastien, Boisbrun Michel, Flament Stephane, Grillier-Vuissoz Isabelle, Kuntz Sanda. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017, 165 :517.
93. Carey, L.A., Rugo, H.S., Marcom, P.K., Mayer, E.L., Esteva, F.J., Ma, C.X., Liu, M.C., Storniolo, A.M., Rimawi, M.F., Forero-Torres, A., Wolff, A.C., Hobday, T.J., Ivanova, A., Chiu, W.-K., Ferraro, M., Burrows, E., Bernard, P.S., Hoadley, K.A., Perou, C.M., Winer, E.P., 2012. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 30, 2615–2623.
94. European Medicines Agency. 2012. http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/000582/WC500029260.pdf
95. Jain S, Pathak K, Vaidya A. Thérapie moléculaire utilisant l'ARNsi: tendances récentes et avancées de l'inhibition multi-cible de la croissance du cancer. *Int J Biol Macromol*. 2018; 116 : 880–892. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.077 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
96. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Silencage génique post-transcriptionnel par les siARN et les miARN. *Curr Opin Struct Biol*. 2005; 15 : 331–

341. doi: 10.1016 /j.sbi.2005.05.006 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
97. Lorenzer C, Lee SY, Lee SJ, Oh YK et coll. Stabilité et absorption cellulaire de complexes siARN polymérisés (poly-siARN) / polyéthylèneimine (PEI) pour un silençage génique efficace . J Control Release . 2009; 141 (3): 339–346. doi: 10.1016 /j.jconrel.2009.10.007 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
98. Fortier, A.-M., Asselin, E., and Cadrin, M. (2013). Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up- regulation. J. Biol. Chem. 288,11555-11571.
99. Liu, Y., Wang, L., Lin, X.-Y., Wang, J., Yu, J.-H., Miao, Y., and Wang, E.-H. (2012). Anti-Apoptotic effect of claudin-1 on TNF- α -induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. Tumour Biol. 33, 2307–2315.
100. Jain S, Pathak K, Vaidya A. Thérapie moléculaire utilisant l'ARNsi: tendances récentes et avancées de l'inhibition multi-cible de la croissance du cancer. Int J BiolMacromol. 2018; 116: 880-892. doi: 10.1016 / j.ijbiomac.2018.05.077 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
101. Dana H. CD166 comme marqueur de cellules souches? Une cible potentielle pour le traitement du cancer colorectal? J Stem Cell Res Ther. 2017; 1 (6): 6–9. doi: 10.15406 /jsrt.2016.01.00041 [CrossRef] [Google Scholar]
102. Laboratoire d'histologie et d'embryologie UFR de medccien de nantes .URL : <https://histologie.univ-nantes.fr/les-glandes-mammaires/> (pages consultées le 15/07/2020). International journal of médical and biomédical research.atlas des lesions mammaires. URL : https://anapath.org/sein_main.htm.(pages consultées le 01/08/2020).
103. Blanchard, A.A., Skiliris, G.P., Watson, P.H., Murphy, L.C., Penner, C., Tomes, L.,
104. Young, T.L., Leygue, E., and Myal, Y. (2009). Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. Virchows Arch. 454, 647-656.
105. Fiona Lanigan et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumor grade in breast cancer. International journal of cancer (IJC). 2009, 124, 2091-2097.
106. Scott L Kominsky et al. loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of

- the breast oncogene, 2003, 355, 2021-2033.
107. Morohashi, S., Kusumi, T., Sato, F., Odagiri, H., Chiba, H., Yoshihara, S., Hakamada, K., Sasaki, M., and Kijima, H. (2007). Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 20, 139–143.
 108. Szasz, A.M., Tokes, A.M., Micsinai, M., Krenacs, T., Jakab, C., Lukacs, L., Nemeth, Z., Baranyai, Z., Dede, K., Madaras, L., et al. (2011). Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regionallymph node metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 55– 63.
 109. Ma, F., Ding, X., Fan, Y., Ying, J., Zheng, S., Lu, N., and Xu, B. (2014). A CLDN1-negative phenotype predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *PLoS ONE* 9, e112765.
 110. Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:1531–6.
 111. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 2004;164:1627–33.