



Etude des altérations de la polarité et de l'adhésion cellulaire dans les cancers du sein

Nadège Gruel

► To cite this version:

Nadège Gruel. Etude des altérations de la polarité et de l'adhésion cellulaire dans les cancers du sein. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T033 . tel-01171509

HAL Id: tel-01171509

<https://theses.hal.science/tel-01171509>

Submitted on 4 Jul 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD
Ecole Doctorale de Cancérologie
Laboratoire de Génétique et Biologie des Cancers – Unité INSERM U830

Spécialités : **Génétique et Cancérologie**

Thèse de Doctorat sur Travaux

Soutenue le 3 juillet 2013

Par

Nadège GRUEL

Etude des altérations de la polarité et de l'adhésion cellulaire dans les cancers du sein

Directeur de thèse

Dr Olivier Delattre, Institut Curie, Paris

Composition du jury

Président du jury

Pr Fabrice ANDRE, Institut Gustave Roussy, Villejuif

Rapporteurs

Dr Daniel BIRNBAUM, CRCM, Marseille

Dr Anthony GONCALVES, Institut Paoli-Calmettes, Marseille

Examineurs

Dr Gaëtan Mac GROGAN, Institut Bergonié, Bordeaux

Dr Anne VINCENT-SALOMON, Institut Curie, Paris

Résumé

La polarité apico-basale des cellules épithéliales est maintenue au niveau cellulaire par l'implication de plusieurs complexes protéiques, PAR, SCRIBBLE et CRUMBS, et par l'intégrité des jonctions serrées et adhérentes. Le maintien de la polarité apico-basale régule les processus de division, d'apoptose et de migration cellulaire, et de nombreuses études montrent que les perturbations de la polarité interviennent dans la progression tumorale. Notre travail a porté sur la recherche d'anomalies biologiques perturbant la polarité apico-basale et l'adhésion cellulaire dans les carcinomes mammaires. Nous avons choisi d'étudier deux formes rares de carcinomes mammaires, dont la morphologie suggère des altérations spécifiques de ces processus biologiques: les carcinomes infiltrants de type lobulaire (ILC) et de type micropapillaire (IMPC). Ces études ont été menées par des analyses combinées phénotypiques, transcriptomiques et génomiques comparatives, par rapport à un groupe de carcinomes mammaires sans autre spécificité (IC-NST).

Les carcinomes lobulaires sont caractérisés par les altérations du complexe E-cadhérine/ β -caténine et leur capacité de dissémination métastatique. Nous avons montré qu'ils présentent également une sous-expression de la protéine du complexe PAR, PAR-3, associée à des altérations des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (*ADAM12*, *LOXL2*), l'interaction cellule-matrice extracellulaire (*MMP11*, *COL11A1*) et l'invasion (*ACTR2*, *PAK1*). Des défauts quantitatifs des constituants de la matrice extracellulaire ont également été mis en évidence. Nous avons, ainsi, pu établir une signature transcriptomique spécifique de cette entité tumorale, en accord avec les observations phénotypiques.

Les carcinomes micropapillaires présentent une polarité anormale: marqueurs apicaux positionnés vers la matrice extracellulaire ou absents, perte de l'orientation de la protéine golgienne GM130, anomalies des jonctions serrées (occludine) et des protéines du complexe PAR (CDC42 et aPKC ζ). Au niveau génomique, nous avons mis en évidence des mutations somatiques de gènes impliqués dans la régulation de la polarité (*DNAH9*, *FOXO3*) et de la ciliogenèse (*BBS9*, *BBS12*, *SEC63*), l'organisation du cytosquelette (*HSP90B1*, *UBR4*, *ZFYVE26*) ou la motilité (*FMN2*). Au niveau transcriptomique, une nette perturbation des gènes impliqués dans l'adhésion cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire et l'angiogenèse est observée. Les IMPC présentent également une surexpression spécifique d'une protéine du complexe CRUMBS, LIN7A. Nous avons établi un modèle *in vitro* et avons montré que LIN7A est un puissant perturbateur de la polarité. Sa surexpression dans la lignée MCF10A cultivée en 3D induit la formation d'acini multilobés, à forte capacité proliférative et sans lumière centrale. Cette absence de lumière centrale est due à une inhibition de l'apoptose. Les cellules MCF10A-LIN7A présentent également une capacité accrue de croissance en suspension, témoignant d'une résistance à l'anoïkis. Cette résistance est due, entre autre, à une diminution de la phosphorylation de la protéine P38 α .

Cette description approfondie des altérations biologiques de types spéciaux de carcinomes mammaires doit permettre à moyen terme de proposer une prise en charge plus spécifique des patientes, grâce à l'identification de nouvelles possibilités thérapeutiques ou à une stratégie de désescalade thérapeutique.

Abstract

Apicobasal polarity is maintained by the combined action of several protein complexes – PAR, SCRIBBLE and CRUMBS – together with the structural organisation of adherent and tight junctions. Apicobasal polarity is important for the regulation of cell division, apoptosis and cell migration, and several studies show that disruption of cell polarity is involved in tumour progression. Our work focused on the biological mechanisms responsible for the altered apicobasal polarity and cell adhesion observed in breast cancers. To do so, we studied two types of breast carcinomas – invasive lobular carcinoma (ILC) and invasive micropapillary carcinoma (IMPC) – whose morphology suggests specific alterations of these cell processes. Our approach combined genomic, transcriptomic and phenotypical comparative analyses, using a group of invasive carcinomas not special type (IC-NST) as control.

Lobular carcinomas are generally characterized by alterations of the E-cadherin/ β -catenin complex and their ability to disseminate. We have shown that they also present a downregulation of PAR-3, a protein of the PAR complex, associated with deregulation of genes involved in cell adhesion (*ADAM12*, *LOXL2*), cell-extracellular matrix interactions (*MMP11*, *COL11A1*, etc...) and invasion (*ACTR2*, *PAK1*). Quantitative defects in components of the extracellular matrix were also observed. We have thus been able to establish a transcriptomic signature for this tumour entity, in agreement with the phenotypical observations.

Micropapillary carcinomas show an abnormal polarity characterized by the absence of apical markers or their localization at the inverted apical pole, the loss of Golgi protein GM130 correct orientation and abnormal expression or localization of occludin (tight junctions), CDC42 and aPKC ζ (PAR complex proteins). At the genomic level, we have identified somatic mutations in genes involved in polarity (*DNAH9*, *FOXO3*) and ciliogenesis regulation (*BBS9*, *BBS12*, *SEC63*), cytoskeleton organisation (*HSP90B1*, *UBR4*, *ZFYVE26*) and motility (*FMN2*). At the transcriptomic level, we observed deregulation of genes involved in cell-cell, cell-extracellular matrix adhesion and angiogenesis. IMPC also demonstrate the specific overexpression of a protein of the CRUMBS complex, LIN7A. We established an *in vitro* model and showed that LIN7A is an efficiently modifier of MCF10A's polarity. Its overexpression in MCF10A cells cultured in 3-D conditions induces the formation of proliferating multi-lobar acini with no central lumen. This absence of a central lumen is due to an inhibition of apoptosis. MCF10A-LIN7A cells also show an increased ability to grow in suspension, indicating resistance to anoikis. This resistance seems to be linked to a decrease of p38 α protein's phosphorylation.

This detailed description of biological alterations in special types of breast carcinomas will contribute to more specific treatments provided to the patients, through the identification of new therapeutic targets or therapeutic strategies.

Remerciements

Je voudrais remercier très sincèrement **Olivier DELATTRE**, directeur du laboratoire et de ce travail de thèse. Par sa confiance témoignée, ses conseils et le regard exigeant qu'il a toujours porté sur mon travail, il m'a permis de m'épanouir scientifiquement. Je mesure la chance que j'ai, car peu de directeur de laboratoire permette à « *des profils atypiques* » de poursuivre leurs études. Olivier m'a accueillie dans son laboratoire il y a 12 ans et m'a permis de passer un master de génétique et de soutenir ma thèse. Qu'il trouve dans ces mots le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Ce travail n'existerait pas sans **Anne VINCENT-SALOMON**, qui a initié ce projet et qui m'a transmis avec passion et patience son savoir sur les cancers du sein. Anne, je te remercie vivement pour ton soutien et tes encouragements incessants, ta gentillesse et la relecture scrupuleuse de mon manuscrit. Merci aussi pour la confiance que tu m'as accordée et la liberté que tu m'as laissée. Quelle belle rencontre !

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de participer à ce travail: **Fabrice ANDRE** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury ; **Daniel BIRNBAUM** et **Anthony GONCALVES**, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail et que je remercie pour leur lecture et leurs suggestions et **Gaëtan MAC GROGAN**, examinateur de ce travail.

Merci à mes amies, **Odette MARIANI**, pour son soutien infailible, sa fidélité et son écoute et **Karine LAUD**, pour son aide inconditionnelle, ses encouragements répétés et le partage quotidien de la vie du laboratoire. Nos fous-rires, nos délires, nos discussions animées autour d'une tasse de thé ou d'un martini-cacahuètes, nos virées shopping, nos rallyes parisiens, les concerts de Marco, nos soirées d'anniversaire... voilà la douce réalité de notre amitié. Qu'elle dure encore longtemps !

La réussite de ce projet est également due à la précieuse contribution des étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer: **Rafaël GALUPA**, **Victoria WARGON** et **Manuel RODRIGUES**, ainsi qu'à l'agréable et fructueuse collaboration des membres du groupe sein: **Vanessa BENHAMO**, dont l'amitié et l'aide m'ont été si précieuses, **Virginie RAYNAL**, **Jaydutt BHALSHANKAR** et **Gaëlle PIERRON**. Merci à vous tous.

Ce travail a été réalisé dans des conditions conviviales, chaleureuses et stimulantes, grâce à la présence de tous les membres de l'Unité de Génétique et Biologie des Cancers, que je remercie vivement.

J'ai une pensée toute particulière pour **Julie CAPPO**, qui a amené un vent plein de fraîcheur dans ce coin du labo, pour **Caroline LOUIS**, avec qui j'ai souvent partagé de très longues discussions scientifiques, techniques, culturelles ou sociétales, pour **Lucille LOPEZ**, **Céline CHAUVIN** et **Marie-Ming AYNAUD**, la plus joyeuse des voisines de paillassse, pour **Franck TIRODE** et **Carlo LUCCHESI**, pour **Tatiana POPOVA**, pour **Stéphanie JOUANNET** et **Cécile PIERRE-EUGENE**, toujours prêtes pour une soirée entre filles, pour **Alex CAZES**, pour **Sandrine DARMIGNY**, à l'humeur toujours joyeuse et dont l'aide logistique est si précieuse, pour **Georges-Alain FRANZETTI**, si serviable (merci pour toutes tes gammes de BSA !), pour **Marc-Henri STERN**, pour **Sophie POSTEL-VINAY**, pour **Sylvain LEFORT**, **Virginie MIEULET**, **Marco BIONDINI**, **Nathalie BRANDON** et **Fatima MECHTA-GRIGORIOU**. Merci à tous pour vos conseils bienveillants, votre savoir-faire transmis et votre soutien amical.

Merci à **Aurélie CEDENOT** et **Laëtitia FURHMANN**, pour leur aide « immunohistochimique », à **Catalina LODILLINSKY** et **Philippe CHAVRIER**, pour l'intérêt manifesté à l'égard de mon travail, aux membres du CRB, **Michèle GALUT**, **Nassima MOUTERFI**, **Sophie DUMINIL** et **Aurore LOISTRON**, pour tous ces précieux échantillons biologiques extraits, dosés et aliquotés, et à **Franck ASSAYAG**, pour son aide au développement de notre modèle *in vivo*.

Enfin, je tiens à remercier ma famille: **mes parents** et **ma grand-mère**, pour leur soutien inconditionnel et leur amour, **Eric** et **Yoan**, mes compagnons de vie, mes compagnons d'amour, dont la patience et la confiance ont été décisifs pour l'accomplissement de ce travail. Cette thèse est aussi la vôtre.

Je dédie ce travail à **Muriel**, petit ange parti bien trop tôt.

La vie peut être faite de belles rencontres, même si elles sont parfois très courtes.

Table des matières

Introduction.....	1
1- La glande mammaire normale	2
1-1. Structure de la glande mammaire normale adulte	2
<i>a- Les cellules luminales</i>	<i>3</i>
<i>b- Les cellules myoépithéliales</i>	<i>3</i>
1-2. Développement de la glande mammaire	4
<i>a- La glande mammaire embryonnaire.....</i>	<i>4</i>
<i>b- Plasticité de la glande mammaire au cours de la vie génitale</i>	<i>4</i>
1-3. Conclusion.....	5
2- Les cancers du sein	6
2-1. Epidémiologie	6
2-2. Les facteurs de risque	7
<i>a- Les facteurs de risques génétiques.....</i>	<i>7</i>
<i>b- Le mode de vie</i>	<i>7</i>
<i>c- L'âge</i>	<i>8</i>
<i>d- Les anomalies des systèmes de réparation des dommages de l'ADN.....</i>	<i>8</i>
<i>e- L'imprégnation hormonale</i>	<i>8</i>
<i>f- L'exposition aux radiations ionisantes</i>	<i>8</i>
2-3. Conclusion.....	8
3- Hétérogénéité des cancers du sein.....	9
3-1. Classifications clinique, histologique et phénotypique	9
<i>a- La classification clinique.....</i>	<i>9</i>
<i>b- La classification histologique.....</i>	<i>9</i>
<i>c- La classification histopronostique</i>	<i>11</i>
<i>d- La classification selon le statut des récepteurs hormonaux</i>	<i>11</i>
3-2. La classification moléculaire	12
<i>a- Les tumeurs luminales.....</i>	<i>12</i>
<i>b- Les tumeurs ERBB2+</i>	<i>14</i>
<i>c- Les tumeurs « basal-like ».....</i>	<i>14</i>
<i>d- D'autres tumeurs non-luminales</i>	<i>14</i>
<i>e- Les tumeurs « normal-like »</i>	<i>15</i>
3-3. De la signature moléculaire à la clinique.....	15
3-4. Altérations de l'ADN	17
<i>a- Analyses génomiques par puces à ADN</i>	<i>17</i>
<i>b- Analyses génomiques par séquençage massif à haut débit</i>	<i>18</i>

3-5. Conclusion.....	21
4- La polarité apico-basale	21
4-1. Etablissement de la polarité apico-basale.....	21
<i>a- Le pôle apical.....</i>	22
<i>b- Le pôle basolatéral</i>	23
<i>c- Les jonctions adhérentes</i>	24
<i>d- Les jonctions serrées.....</i>	27
4-2. Les complexes protéiques CRUMBS, PAR et SCRIBBLE	29
<i>a- Le complexe CRUMBS.....</i>	29
<i>b- Le complexe PAR.....</i>	31
<i>c- Le complexe SCRIBBLE</i>	33
4-3. Conclusion.....	34
5- Polarité et cancer.....	36
5-1. Altérations des protéines de la polarité dans les carcinomes	36
<i>a- Modifications de l'expression suivant le type de cancer</i>	36
<i>b- Altérations de la localisation subcellulaire</i>	38
5-2. Les protéines de la polarité sont des régulateurs de la carcinogenèse.....	38
<i>a- La prolifération cellulaire</i>	38
<i>b- L'apoptose.....</i>	39
<i>c- La migration cellulaire.....</i>	40
<i>d- L'orientation du fuseau mitotique</i>	40
5-3. Conclusion.....	41
 <i>Objectifs de mon travail de thèse.....</i>	 42
1- Les carcinomes infiltrants de type lobulaire	43
2- Les carcinomes infiltrants de type micropapillaire	45
3- Choix du modèle <i>in vitro</i>	46
3-1. Les cellules MCF10A	46
3-2. Culture en 3 dimensions	47
4- Conclusion.....	48
 <i>Résultats et Discussion</i>	 49
1- Anomalies des gènes de l'adhésion cellulaire dans les carcinomes invasifs de type lobulaire.....	50
1-1. Analyse génomique	51
1-2. Profil transcriptomique	52
1-3. Conclusion.....	53

2- Altérations de la polarité apico-basale dans les carcinomes invasifs de type micropapillaire. 54

2-1. Cellules initiatrices de cancer et évaluation du pronostic	56
<i>a- Analyse phénotypique des cellules progénitrices de cancer</i>	56
<i>b- Pronostic des IMPC</i>	58
<i>c- Conclusion</i>	58
2-2. Etude phénotypique détaillée de la polarité cellulaire des IMPC	60
<i>a- Altérations de la polarité apico-basale</i>	60
<i>b- Présence d'un stroma réactif et d'une lumière externe</i>	62
<i>c- Surexpression de la protéine de la polarité LIN7A</i>	63
2-3. Etablissement d'un modèle <i>in vitro</i>	65
<i>a- La surexpression de LIN7A altère la polarité apico-basale</i>	66
<i>b- La surexpression de LIN7A inhibe la formation de la lumière centrale</i>	66
<i>c- La surexpression de LIN7A induit une résistance à l'anoïkis</i>	67
<i>d- Conclusion</i>	69
2-4. Altérations génomiques des IMPC	70
<i>a- Une entité, deux génomiques</i>	70
<i>b- Les IMPC présentent des mutations de gènes impliqués dans la polarité, la ciliogenèse et la morphologie cellulaire</i>	74
2-5. Conclusion	76

***Conclusion et Perspectives* 77**

1- Altérations de la polarité apico-basale et de l'adhésion dans les cancers du sein..... 78

2- Hétérogénéité moléculaire et évolution de la prise en charge des patientes. 84

3- Perspectives 85

***Autres publications au cours de ma thèse*..... 87**

***Références bibliographiques*..... 88**

Liste des figures

Figure 1:	Glande mammaire adulte humaine.....	2
Figure 2:	Organisation d'un <i>acinus</i> et profils phénotypiques des cellules épithéliales luminales et myoépithéliales basales.....	3
Figure 3:	Glande mammaire de souris	5
Figure 4:	Incidence du cancer du sein.....	6
Figure 5:	Tumeur du sein de type <i>in situ</i> ou infiltrant sans autre spécificité.....	10
Figure 6:	Hétérogénéité morphologique des carcinomes du sein infiltrants.....	10
Figure 7:	Taux de survie des patientes atteintes d'IC-NST, en fonction de leur grade tumoral.....	11
Figure 8:	Classification moléculaire des cancers du sein invasifs.....	13
Figure 9:	Survie globale en fonction de la classification moléculaire des tumeurs.....	15
Figure 10:	Résumé des caractéristiques phénotypiques, cliniques et thérapeutiques relatives à chaque sous-type moléculaire de cancer du sein.....	16
Figure 11:	Analyse génomique de 2000 cancers du sein.....	18
Figure 12:	Absence de parallélisme absolu entre les classifications histologique, immunohistochimique, moléculaire et issue du séquençage à haut débit.....	20
Figure 13:	Cellule épithéliale mammaire normale.....	22
Figure 14:	Formation de la lumière tissulaire.....	23
Figure 15:	Adhérence des cellules à la matrice extracellulaire	23
Figure 16:	Représentation schématisée des jonctions adhérentes.....	25
Figure 17:	Formation des jonctions adhérentes.....	25
Figure 18:	Représentation schématisée des composants structuraux des jonctions serrées.....	28
Figure 19:	Représentation schématisée des protéines du complexe CRUMBS.....	30
Figure 20:	Représentation schématisée du complexe protéique PAR au niveau des jonctions serrées	31
Figure 21:	Formation des jonctions serrées.....	32
Figure 22:	Représentation schématisée du complexe SCRIBBLE.....	34
Figure 23:	Caractérisation phénotypique des ILC.....	44
Figure 24:	Caractérisation phénotypique des IMPC.....	45
Figure 25:	Caractéristique génomique et phénotypique de la lignée cellulaire MCF10A, issue d'un épithélium mammaire normal.....	47
Figure 26:	Culture de la lignée MCF10 en 3-D dans du Matrigel™	48
Figure 27:	Altérations génomiques trouvées dans les ILC.....	51

Figure 28:	Expression différentielle entre les ILC et les IC-NST	52
Figure 29:	Plan d'étude des tumeurs de type micropapillaire.....	54
Figure 30:	Expression du marqueur CD24 dans les cellules épithéliales de glandes mammaires.....	57
Figure 31:	Expression du marqueur EZH2 dans les cellules de glandes mammaires.....	57
Figure 32:	Survie globale à 10 ans.....	58
Figure 33:	Désorganisation de la polarité apico-basale dans les tumeurs de type IMPC ou IC-NST	61
Figure 34:	Détection du pôle basolatéral dans les tumeurs mammaires de type IMPC.....	61
Figure 35:	Expression des marqueurs des jonctions intercellulaires dans les glandes mammaires normales et les tumeurs mammaires de type IMPC ou IC-NST	62
Figure 36:	Caractérisation du stroma et de l'espace clair de rétraction des IMPC.....	63
Figure 37:	Classification hiérarchique non supervisée entre les tumeurs mammaires de type IMPC et IC-NST	64
Figure 38:	Expression de LIN7A dans les IMPC.....	65
Figure 39:	Cellules MCF10A surexprimant LIN7A et cultivées pendant 11 jours dans du Matrigel™...	66
Figure 40:	La surexpression de LIN7A inhibe la formation de la lumière centrale.....	67
Figure 41:	LIN7A induit la résistance à l'anoïkis.....	68
Figure 42:	Profil génomique moyen des tumeurs de type micropapillaire.....	71
Figure 43:	Classification génomique des IMPC.....	73
Figure 44:	Ensemble des mutations trouvées dans les IMPC.....	75
Figure 45:	Modèle proposé.....	84

Liste des tables

Table 1: Effet de la dérégulation de l'expression des protéines de la polarité sur la polarité apico-basale de cellules issues de lignées épithéliales.....	35
Table 2: Conséquences de certains défauts d'expression des protéines de la polarité dans les cancers humains.....	37
Table 3: Caractéristiques cliniques et phénotypiques des ILC.....	50
Table 4: Caractéristiques cliniques et phénotypiques des IMPC.....	55
Table 5: Liste des 22 variants (20 gènes) trouvés dans les 4 IMPC séquencés par NGS.....	74

Abréviations

AML	Actine α musculaire lisse
AJ	<i>Adherens junction</i>
aPKC	<i>Atypical protein kinase C</i>
β -CAT	β -caténine
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
BrCICs	<i>Breast cancer-initiating cells</i>
CDC42	<i>Cell division control protein</i>
CK	Cytokératine
CRB	Crumbs
DLG	<i>Discs large</i>
E-CADH	E-cadhérine
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMA	<i>Epithelial membrane antigen</i>
ERE	<i>Estrogens responsive elements</i>
ERM	Complexe protéique Ezrine-Radixine-Moésine
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
GAP	<i>Genome alteration print</i>
IC-NST	<i>Invasive carcinoma no special type</i>
IHC	Immunohistochimie
ILC	<i>Invasive lobular carcinoma</i>
ILK	<i>Integrin-linked-kinase</i>
IMPC	<i>Invasive micropapillary carcinoma</i>
ITG	Intégrines
JAM	<i>Junction adhesion molecule</i>
LGL	<i>Lethal Giant Larvae</i>
MAGUK	<i>Membrane-associated-guanylate kinases</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MUC-1	Mucine-1
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
P120 CTN	p120 caténine
PALS1	<i>Protein associated with Lin-seven 1</i>
PAR	<i>Partitioning defective</i>
PAS	acide perodique-Schiff
PATJ	<i>PALS1-associated tight junction</i>
PDZ	<i>Post synaptic density-95/Dlg/ZO-1</i>
PP2A	Protéine phosphatase 2A
RA	Récepteur aux androgènes
RO	Récepteur aux oestrogènes

RP	Récepteur à la progestérone
SCRIB	<i>Scribble</i>
Sh	<i>Short hairpin</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SRC-3	<i>Steroid receptor co-activator 3</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
THS	Traitement hormonal substitutif
TJ	<i>Tight Junction</i>
UTDL	Unité terminale ducto-lobulaire
ZO-1	<i>Zona occludens-1</i>

Introduction

1- La glande mammaire normale

1-1. Structure de la glande mammaire normale adulte

Le sein est une glande exocrine qui se développe en deux temps au cours de la vie de la femme, pendant la vie embryonnaire, puis à l'adolescence. La glande mammaire est constituée de deux grands types tissulaires: le tissu mésenchymateux (adipocytes, fibroblastes, vaisseaux sanguins, cellules immunitaires) et le tissu épithélial, formé par un réseau de canaux (ou galactophores) et de lobules. La membrane basale, constituée de laminines, de collagène de type IV et de glycosaminoglycanes (Nelson CM et Bissell MJ, 2006), constitue une barrière entre le tissu épithélial et le tissu mésenchymateux.

L'arbre galactophorique est formé d'une quinzaine de canaux principaux qui s'abouchent au niveau du mamelon par les sinus galactophores. A l'extrémité de chaque canal se trouve l'unité fonctionnelle de la glande mammaire, l'UTDL (Unité Terminale Ducto-Lobulaire). L'UTDL est constituée de canaux terminaux et d'*acini* regroupés en lobules (**Figure 1**).

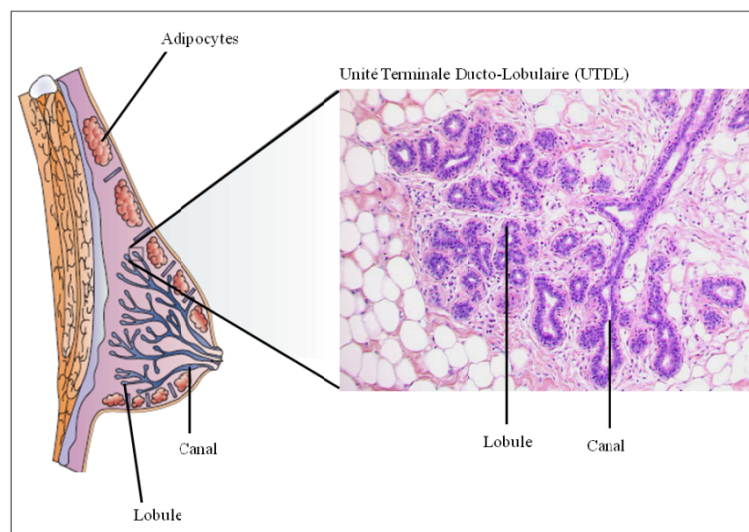


Figure 1 : Glande mammaire adulte humaine (d'après M Smalley et A Ashworth, 2003).

Un *acinus* est une glande sphérique polarisée entourant une lumière. Les lobules et les canaux sont constitués d'une couche interne de cellules épithéliales luminales, en contact avec la lumière des canaux, sous-tendue par une couche périphérique de cellules myoépithéliales, dont la face basale est en contact permanent avec la membrane basale, la matrice extracellulaire et le stroma du tissu mammaire. Cette organisation suggère que les cellules myoépithéliales pourraient participer

activement à la morphogenèse mammaire et être les médiateurs de la signalisation du stroma vers les cellules luminales.

Les cellules myoépithéliales sont attachées aux cellules épithéliales par des desmosomes et à la membrane basale par des hémidesmosomes (Glukhova M *et al*, 1995). Les cellules épithéliales et myoépithéliales expriment des marqueurs différents (Deugnier MA *et al*, 2002 ; Jones C *et al*, 2004 ; Adriance MC *et al*, 2005) (**Figure 2**).

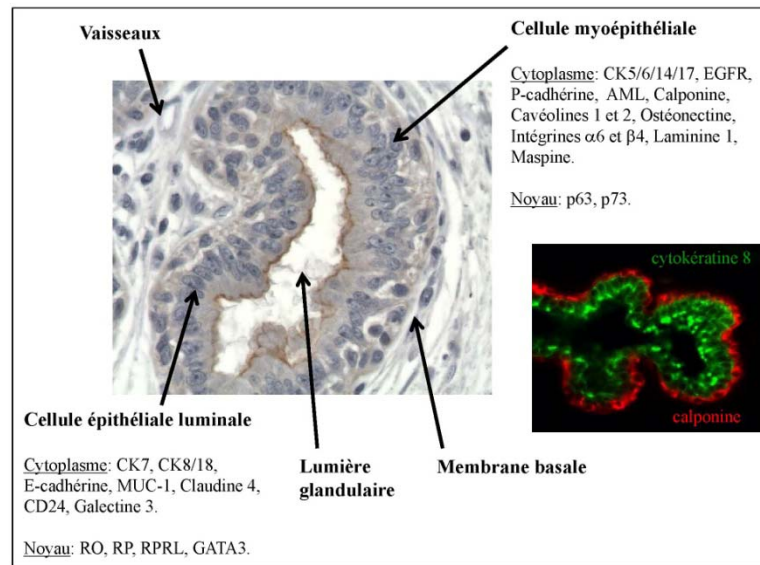


Figure 2: Organisation d'un acinus et profils phénotypiques des cellules épithéliales luminales et myoépithéliales basales. Immuno-marquage des cellules épithéliales (cytokératine 8, vert) et myoépithéliales (calponine, rouge) (photo M Glukhova).

a- Les cellules luminales

Les cellules luminales produisent et sécrètent le lait après la grossesse. Elles expriment le facteur de transcription GATA-3, les récepteurs aux oestrogènes (RO), à la progestérone (RP) et à la prolactine, ainsi que les cytokératines (CK) 7, 8 et 18, les protéines d'adhérence intercellulaire E-cadhérine (E-CADH) et claudine 4, la mucine 1 (MUC-1), CD24 et la galectine 3 (Jones C *et al*, 2004 ; Asselin-Labat M-L *et al*, 2007).

b- Les cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales ont plusieurs fonctions. Grâce à leurs propriétés contractiles, elles participent à l'excrétion du lait pendant l'allaitement. A partir de collagène IV, laminine 1, laminine 5 et fibronectine (Gudjonsson T *et al*, 2002), les cellules myoépithéliales produisent la membrane basale, expriment ses récepteurs (intégrines $\beta 4$ et $\alpha 1$) (Adriance MC *et al*, 2005) et sécrètent les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MMP19 par exemple): elles permettent ainsi la croissance

de la glande mammaire pendant la puberté et son remodelage en phase d'involution (Djonov V *et al*, 2001 ; Deugnier M-A *et al*, 2002). De part l'expression de laminine 1 (Gudjonsson T *et al*, 2005), desmocolline 3 et desmoglénine 3 (Runswick SK *et al*, 2001 ; Garrod DR *et al*, 2002), les cellules myoépithéliales jouent également un rôle direct dans l'établissement et le maintien de la polarisation des cellules épithéliales normales.

Ces cellules expriment l'actine α musculaire lisse (AML), les cytokératines 5, 6, 14 et 17 (CK5/6, CK14, CK17), le récepteur à l'EGF (EGFR, *Epithelial Growth Factor Receptor*), la P-cadhérine, les cavéolines 1 et 2, l'ostéonectine, la calponine, les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 4$ et les gènes suppresseurs de tumeur P63, P73 et maspine (Adrianne MC *et al*, 2005).

1-2. Développement de la glande mammaire

a- La glande mammaire embryonnaire

Le développement de la glande mammaire est bien connu chez la souris et de nombreux points communs existent avec le développement de la glande mammaire humaine. Le bourgeon mammaire se développe à partir de l'ectoderme, pendant la vie embryonnaire, à la moitié de la gestation. De nombreux gènes comme *TBX3*, *GLI3*, *IGF1R*, *FGFR2* ou *GATA-3* assurent l'emplacement exact de l'organe en formation le long d'une ligne de lait (« milk line ») et contrôlent la différenciation fonctionnelle de la glande (Robinson GW, 2007). Le nombre de bourgeons varie selon les espèces. Cette étape est indépendante des hormones (oestrogènes et progestérone) (Howard B et Ashworth A, 2006).

b- Plasticité de la glande mammaire au cours de la vie génitale

Au cours de la vie génitale, la glande mammaire devient un organe doté de plasticité. Avant la puberté, la glande mammaire est limitée à un réseau primaire de canaux. A la puberté, sous le contrôle des oestrogènes et de la progestérone, l'arbre galactophorique se développe à partir des bourgeons terminaux à l'extrémité des canaux (UTDL). Ces bourgeons terminaux infiltrent le tissu adipeux mammaire, les canaux s'allongent et des branchements secondaires se développent (Briskin C, 2002 ; Hinck L *et al*, 2005; Sternlicht MD, 2006) (**Figure 3**).

Le développement de la glande mammaire est lié à l'expression des récepteurs aux oestrogènes, qui, une fois liés à leur ligand, sont des facteurs de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le développement mammaire (*EGF*, *IGF1*, *GH*, *ERBB2*, *MMP14*, *MMP2*, *MMP3*) (Howard B et Ashworth A, 2006 ; Sternlicht MD, 2006). Le gène *ERBB2* joue un rôle essentiel dans l'accroissement de la taille et la capacité d'invasion du parenchyme mammaire des canaux en formation (Jackson-Fisher AJ *et al*, 2004).

Le facteur de transcription GATA-3 est exprimé par les cellules des bourgeons terminaux et joue un rôle clé dans la détermination et le maintien de la différenciation des cellules luminales épithéliales mammaires (Kouros-Mehr H *et al*, 2006).

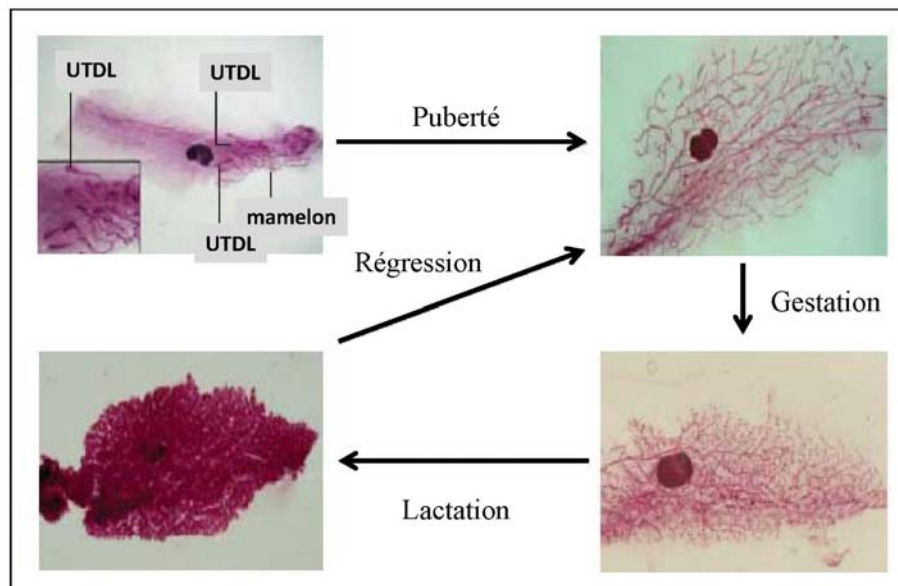


Figure 3: Glande mammaire de souris. (Coloration au carmin - adapté de M Smalley et A Ashworth, 2003). A la puberté, l'arbre galactophorique se développe et les UTDL infiltrent le tissu adipeux mammaire. Durant la gestation, les branchements secondaires apparaissent et le nombre d'*acini* augmente. Pendant la lactation, la glande mammaire est constituée d'alvéoles sécrétoires. Après la naissance des souriceaux, l'épithélium est éliminé par apoptose, et la glande régresse.

1-3. Conclusion

L'architecture de la glande mammaire se construit tout au long de la vie, du stade foetal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (oestrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance. Une coopération permanente s'établit entre les deux compartiments cellulaires, épithélial et myoépithélial. Comme la glande mammaire est en évolution constante au cours de la vie de la femme, le nombre de ses cellules en différenciation et en croissance est plus important que dans tout autre organe, ce qui la rend plus sensible aux processus de cancérisation.

2- Les cancers du sein

2-1. Epidémiologie

Le cancer du sein, ou adénocarcinome mammaire, est une préoccupation majeure de santé publique. C'est, dans la plupart des pays occidentaux, l'un des cancers le plus fréquent chez la femme (Siegel R *et al*, 2012). Chaque année dans le monde, plus d'un million de nouveaux cas apparaissent (Baselga J et Norton L, 2002), avec une incidence supérieure dans les pays occidentalisés (**Figure 4A**). Les taux d'incidence les plus élevés sont observés aux Etats-Unis et au Canada, avec 110 cas pour 100000. A l'inverse, au Japon, ils atteignent à peine 16 cas pour 100000.

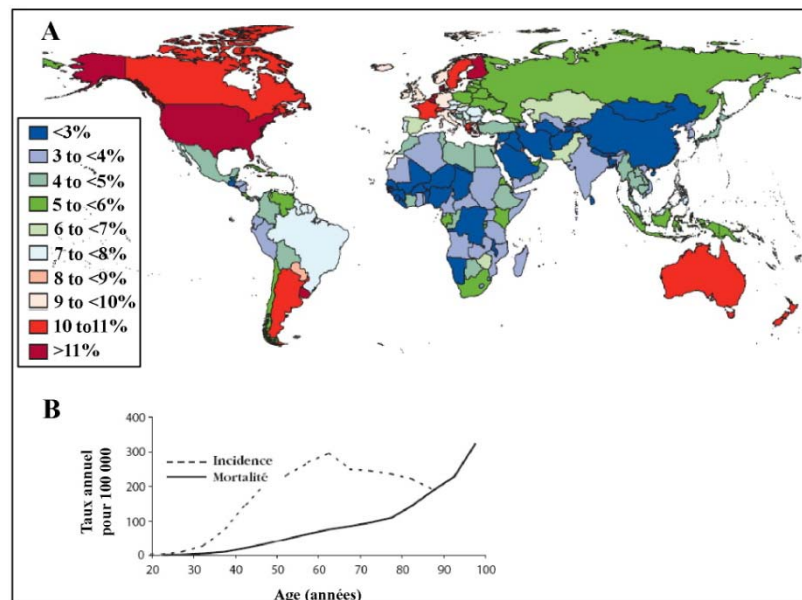


Figure 4: Incidence du cancer du sein. (A) Incidence du cancer du sein dans le monde, en 2010, chez des femmes âgées de 15 à 79 ans (MH Fourouzanfar *et al*, 2011). (B) Incidence (trait pointillé) et mortalité (trait plein) par cancer du sein, en fonction de l'âge, en France, en 1995 (C Hill, 2003).

Ce cancer est rare avant l'âge de 30 ans, mais extrêmement fréquent entre 60 et 65 ans. C'est la première cause de mortalité par cancer chez la femme, avec 425000 décès annuels en 2010 (Fourouzanfar MH *et al*, 2011) dans le monde, dont plus de 120000 rien qu'aux Etats-Unis et en Europe (Jemal A *et al*, 2009 ; La Vecchia *et al*, 2010).

L'incidence des cancers du sein invasifs en France a doublé depuis 30 ans (1980: 641000 cas, 2010: 1643000 cas) (Forouzanfar MH *et al*, 2011) et le taux annuel d'augmentation est estimé à 3,1%. On considère qu'environ une femme sur huit développera un cancer du sein au cours de sa vie. Avec 52000 nouveaux cas

diagnostiqués en France en 2009 (Guérin S and Hill C, 2010), le cancer du sein se situe au 2^{ème} rang de tous les cancers. C'est le premier cancer féminin en termes de fréquence et de mortalité (11000 décès par an). Cependant, cette mortalité décroît d'environ 1% par an depuis 1994, notamment chez les femmes de 55 ans et plus, du fait des progrès thérapeutiques, du dépistage et de la diminution massive de l'utilisation des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause (THS) (Séradour B *et al*, 2009 ; Narod SA, 2011) (Figure 4B).

2-2. Les facteurs de risque

Par rapport à d'autres cancers pour lesquels les facteurs étiologiques principaux sont identifiés (virus, tabac, alcool, amiante, etc...), l'étiologie des cancers du sein n'est pas élucidée, mais est probablement multiple. On sait aujourd'hui que la susceptibilité génétique, l'exposition à des facteurs environnementaux et à des facteurs liés au style de vie jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie.

a- Les facteurs de risques génétiques

Les antécédents individuels et familiaux de cancer du sein constituent un risque majeur dans le développement d'un cancer du sein. Le risque relatif pour toute forme de parenté est d'environ 1,9. Le risque supérieur de développer un cancer du sein chez des jumelles monozygotes plutôt que dizygotes ou dans des fratries suggère un mode de transmission génétique, plutôt que des facteurs de risques environnementaux ou liés au mode de vie.

Par ailleurs, certaines mutations génétiques sont susceptibles d'augmenter le risque de cancer du sein. Les exemples les plus connus sont les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, responsables d'environ 15% des cancers du sein héréditaires.

b- Le mode de vie

Pour la grande majorité des cancers du sein dits sporadiques, les causes sont principalement exogènes, environnementales, probablement multiples mais très certainement liées au mode de vie de type occidental (sédentarité, alimentation riche, obésité, etc...), comme le montrent des études de populations de femmes migrantes asiatiques ou africaines (venant de régions à faible taux de cancer du sein, <20 cas/100000) émigrant aux Etats-Unis (zone à taux élevé, >100 cas/100000). On peut observer une augmentation de l'incidence des cancers du sein dans ces populations entre les premières, deuxièmes et troisièmes générations, incidence se rapprochant de celle du pays d'accueil (Kaur JS, 2000 ; Key TJ *et al*, 2001 ; Youlten DR *et al*, 2012).

c- L'âge

L'âge constitue un facteur de risque important. En effet, le cancer du sein est rare chez les femmes de moins de 30 ans (< 0.4% de risque) et son risque augmente entre 50 ans (2.7% de risque) et 75 ans (7.7% de risque) (Key TJ *et al*, 2001 ; Hill C, 2003).

d- Les anomalies des systèmes de réparation des dommages de l'ADN

Les anomalies des systèmes de réparation des dommages de l'ADN jouent un rôle clé dans le développement des cancers du sein. Ceci est particulièrement bien étudié dans le contexte des tumeurs héréditaires, avec l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et gardiens de l'intégrité du génome *TP53*, *BRCA1* et *BRCA2* (Foulkes WD, 2007). L'hypothèse que le développement des tumeurs du sein, dans un contexte sporadique, nécessite également une inactivation des systèmes de réparation de l'ADN est en partie soutenue par l'observation de l'inactivation de *BRCA1* (Esteller M *et al*, 2000 ; Turner NC *et al*, 2007 ; Popova T *et al*, 2012), généralement par méthylation, ou de *TP53* (de Cremoux P *et al*, 1999 ; Petitjean A *et al*, 2007 ; Manié E *et al*, 2009) dans de nombreux carcinomes infiltrants sporadiques de type basal-like. L'ensemble des gènes participant aux mécanismes de reconnaissance des cassures double-brin de l'ADN peuvent donc être impliqués dans les mécanismes de carcinogenèse précoce, que ce soit dans un contexte héréditaire ou dans un contexte sporadique.

e- L'imprégnation hormonale

Les hormones stéroïdes ovariennes jouent très certainement un effet initiateur de tumeur (Platet N *et al*, 2004). En effet, des études épidémiologiques ont montré que l'augmentation du temps d'exposition aux hormones ovariennes (puberté précoce, ménopause tardive, traitements hormonaux substitutifs) augmentait le risque de cancer du sein (Séradour B *et al*, 2009, Narod SA, 2011).

f- L'exposition aux radiations ionisantes

Des études sur plusieurs groupes de population ont montré que le sein est l'un des organes les plus sensibles aux effets des radiations ionisantes (Key TJ *et al*, 2001). Il a été montré que l'effet des radiations ionisantes chez des femmes exposées avant l'âge de 40 ans, comme les femmes antérieurement traitées par un lymphome de Hodgkin, est associé à un très haut risque de cancer du sein, du même ordre qu'une femme mutée pour le gène *BRCA1*. Ce facteur de risque avéré est lié à la dose reçue.

2-3. Conclusion

Si la détection des tumeurs du sein à un stade précoce s'est considérablement améliorée, la compréhension des facteurs impliqués dans la progression tumorale reste encore modeste.

L'initiation des tumeurs du sein est certainement due à des événements génétiques survenant dans une cellule mammaire normale. La progression tumorale est ensuite liée à d'autres événements génétiques, combinés à une expansion clonale de cellules anormales sélectionnées, oeuvrant dans un micro-environnement tumoral favorable à leur progression (Polyak K et Kalluri R, 2010). Une meilleure classification des cancers du sein permettra une meilleure compréhension de ces mécanismes d'oncogenèse et une meilleure prise en charge thérapeutique.

3- Hétérogénéité des cancers du sein

3-1. Classifications clinique, histologique et phénotypique

La classification des carcinomes mammaires doit permettre la définition du pronostic des tumeurs du sein de la façon la plus exacte possible. Elle repose actuellement sur des critères morphologiques, cliniques et phénotypiques.

La meilleure connaissance du développement de la glande mammaire et de la carcinogenèse mammaire permet progressivement d'intégrer les données moléculaires à la classification des tumeurs du sein. Cette classification tend à devenir plus exacte d'un point de vue biologique et plus fine, pour prédire le pronostic. Idéalement, des thérapeutiques ajustées à chaque entité, même rare, devraient se développer.

a- La classification clinique

Les carcinomes mammaires sont classés selon la nomenclature clinique TNM. Cette nomenclature prend en compte la taille de la tumeur primitive (T), la présence d'adénopathies régionales (N) et la présence de métastases à distance (M).

b- La classification histologique

Cette classification prend en compte le stade de développement tumoral dans l'arbre galactophorique. On distingue ainsi les tumeurs *in situ*, dont les cellules carcinomateuses restent dans la lumière des canaux et respectent la membrane basale, des tumeurs infiltrantes, où la membrane basale est détruite par les cellules qui infiltrent la glande. (Figure 5).

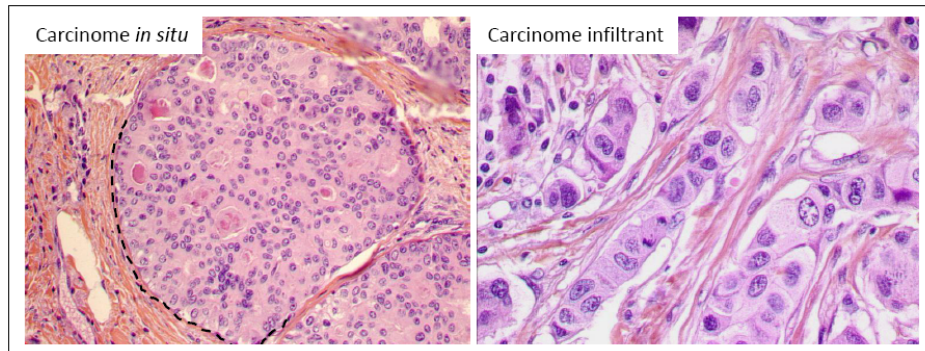


Figure 5: Tumeur du sein de type *in situ* ou infiltrant sans autre spécificité. Dans le cas d'une tumeur *in situ*, les cellules carcinomateuses sont délimitées par la membrane basale (ligne pointillée) et les cellules myoépithéliales. Les cellules carcinomateuses d'une tumeur infiltrante ont détruit la membrane basale et les cellules myoépithéliales.

L'Organisation Mondiale de la Santé individualise une vingtaine de types différents de tumeurs infiltrantes du sein (Lakhani SR *et al*, 2012). Le type le plus fréquent est le carcinome infiltrant sans autre spécificité (IC-NST), qui représente 70% des cas. D'autres types existent, plus rares. Ils sont souvent moins bien caractérisés sur le plan biologique et de pronostic différent (**Figure 6**). Nous nous sommes intéressés à deux entités particulières, les carcinomes infiltrant de type lobulaire et micropapillaire. Ces deux types sont détaillés plus loin dans le manuscrit (*Objectifs de mon travail de thèse*).

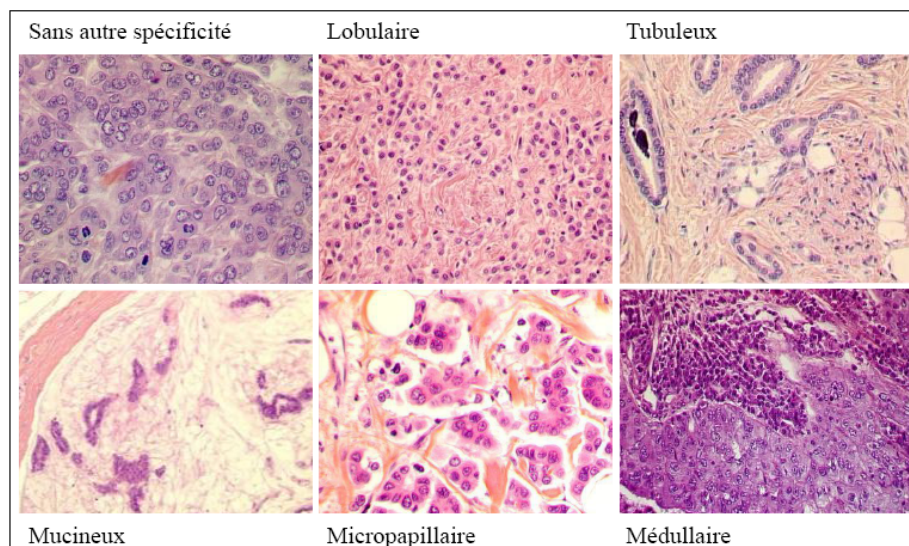


Figure 6: Hétérogénéité morphologique des carcinomes du sein infiltrants. Le sous-type le plus fréquent est le carcinome infiltrant sans autre spécificité (70%). Les carcinomes infiltrants de type lobulaire (10-15% des cas), tubuleux, mucineux, micropapillaire ou médullaire (< 5% des cas) sont beaucoup plus rares.

c- La classification histopronostique

Le grade histopronostique d'Elston et Ellis prend en compte trois paramètres morphologiques de la tumeur: la différenciation (formation des glandes), le pléiomorphisme nucléaire (hétérogénéité de la taille des noyaux, du contour nucléaire, de la taille et du nombre de nucléoles) et le nombre de mitoses. A chacun de ces paramètres est attribué un score entre 1 et 3, dont la somme constitue le grade histopronostique (grade I: score 3 à 5 ; grade II: score 6 à 7 ; grade III: score 8 à 9) (Elston C et Ellis I, 1991). La valeur pronostique du grade a largement été confirmée par les travaux de l'équipe d'Elston et Ellis: à 20 ans, les tumeurs de grade I ont une survie de plus de 90%, de grade II, de 80% et de grade III, d'environ 70% (**Figure 7**).

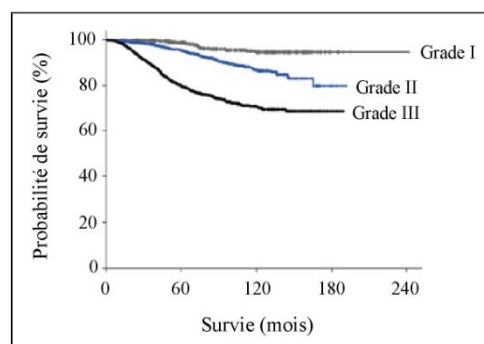


Figure 7: Taux de survie des patientes atteintes d'IC-NST, en fonction de leur grade tumoral (d'après EA Rakha, 2010). Courbe grise, grade I ; courbe bleue, grade II, courbe noire, grade III.

La taille de la tumeur et le statut ganglionnaire axillaire sont également pris en compte pour l'évaluation du pronostic. La somme de la taille de la tumeur (en cm), du statut ganglionnaire (1 : absence de ganglion atteint ; 2: 1 à 3 ganglions atteints ; 3: plus de 3 ganglions atteints) et du grade histopronostique représente l'index pronostique de Nottingham (ou NPI pour *Nottingham Prognostic Index*) (Blamey RW *et al*, 2007 ; Rakha EA *et al*, 2010).

d- La classification selon le statut des récepteurs hormonaux

La détermination du statut des récepteurs aux oestrogènes (RO) et à la progestérone (RP) est un des éléments clé de la description des carcinomes mammaires infiltrants, puisqu'elle détermine l'hormono-dépendance de la tumeur, c'est à dire sa capacité à répondre ou non à une thérapeutique anti-oestrogénique (Rakha AE *et al*, 2007).

Les récepteurs aux oestrogènes sont des facteurs de transcription nucléaire impliqués dans le développement de la glande mammaire, sa croissance et sa différenciation. Ils participent aussi à la tumorigénèse mammaire. Ils se fixent sur

leurs ligands, les ERE (*estrogens responsive elements*), puis se transloquent dans le noyau pour activer la transcription de nombreux gènes cibles.

3-2. La classification moléculaire

Au cours de la dernière décennie, la classification morphologique a été enrichie des données issues des analyses moléculaires. En effet, les nouvelles techniques d'analyse de plusieurs milliers de gènes et de leur expression en ARN messagers a permis de proposer une classification moléculaire des cancers du sein (Perou CM *et al*, 2000 ; Sorlie T *et al*, 2001 ; Sorlie T *et al*, 2003 ; Sotiriou C *et al*, 2003 ; Hu Z *et al*, 2006 ; Parker JS *et al*, 2009). Cette nouvelle classification a été validée dans les carcinomes *in situ* (Allred DC *et al*, 2008 ; Vincent-Salomon A *et al*, 2008). Ces études ont contribué à la compréhension de l'hétérogénéité moléculaire, de l'initiation, la progression et la récurrence des cancers du sein et ont permis de proposer cinq sous-classes moléculaires de cancers du sein infiltrants: luminal A (RO⁺⁺RP⁺⁺), luminal B (RO⁺RP⁺), ERBB2 (ERBB2⁺RO⁻), « basal-like » (RO⁻RP⁻ERBB2⁻) et « normal-like ». Plus récemment, au sein des tumeurs non lumineales (comprenant donc les classes ERBB2⁺ et basal-like), deux sous-groupes supplémentaires ont été décrits: les tumeurs moléculaires apocrines et les tumeurs « claudin-low ». Chacun de ces sous-groupes tumoraux est caractérisé par un profil d'expression qui lui est propre (Figure 8).

a- Les tumeurs lumineales

Ces tumeurs, qui représentent environ 70% des carcinomes mammaires invasifs, expriment les gènes codant pour les récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone (RO⁺RP⁺), et les gènes associés l'activation de RO, tels que *LIV-1*, *TFF3*, *c-myb*, *CCND1*, *CK8*, *FOXA1* et *XPB1* (Altucci L *et al*, 1996 ; Perou CM *et al*, 2000 ; Carrol JS *et al*, 2005), ainsi que les nombreux gènes des cellules lumineales de l'épithélium mammaire normal, comme les cytokératines 8, 18, 19 ou le CD24. Ces tumeurs expriment également GATA-3 (Bertucci F *et al*, 2002 ; Sorlie T *et al*, 2003 ; Sotiriou C *et al*, 2003), protéine impliquée dans le développement des canaux (Kouros-Mehr H *et al*, 2006 ; Asselin-Labat ML *et al*, 2007) et dont l'expression à un niveau élevé dans les tumeurs est plutôt associée à un pronostic favorable (Mehra R *et al*, 2005). Ces tumeurs lumineales sont divisées en deux sous-groupes, A et B, selon leur niveau d'expression de RO et des gènes de prolifération (Hu Z *et al*, 2006 ; Reyat F *et al*, 2008).

Les tumeurs lumineales A expriment fortement les gènes des récepteurs aux oestrogènes et les gènes impliqués dans leur voie de signalisation tels *GATA-3*, *FOXA1*, *XPB1*, *LIV-1* (Sorlie T *et al*, 2001 ; Sorlie T *et al*, 2004). D'un point de vue fonctionnel, ces tumeurs expriment principalement des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et la voie de signalisation des récepteurs aux oestrogènes (Sørle T *et al*, 2006). Les tumeurs lumineales B sont plus rares. Elles peuvent exprimer la protéine ERBB2 (3⁺) et sont surtout caractérisées par une prolifération plus élevée (expression des gènes *MKI67*, *PCNA*, *STK6*, *TOPO2A*, *FANCA*, *CCNB1*, *MYBL2*) que les tumeurs

luminales A (Cheang MCU *et al*, 2009). De plus, elles présentent une moindre expression de RP (Prat A *et al*, 2013) et une expression plus forte des gènes *GGH*, *NSEP1*, *LAPTMB4* et *CCNE1* (Sorlie T, 2004).

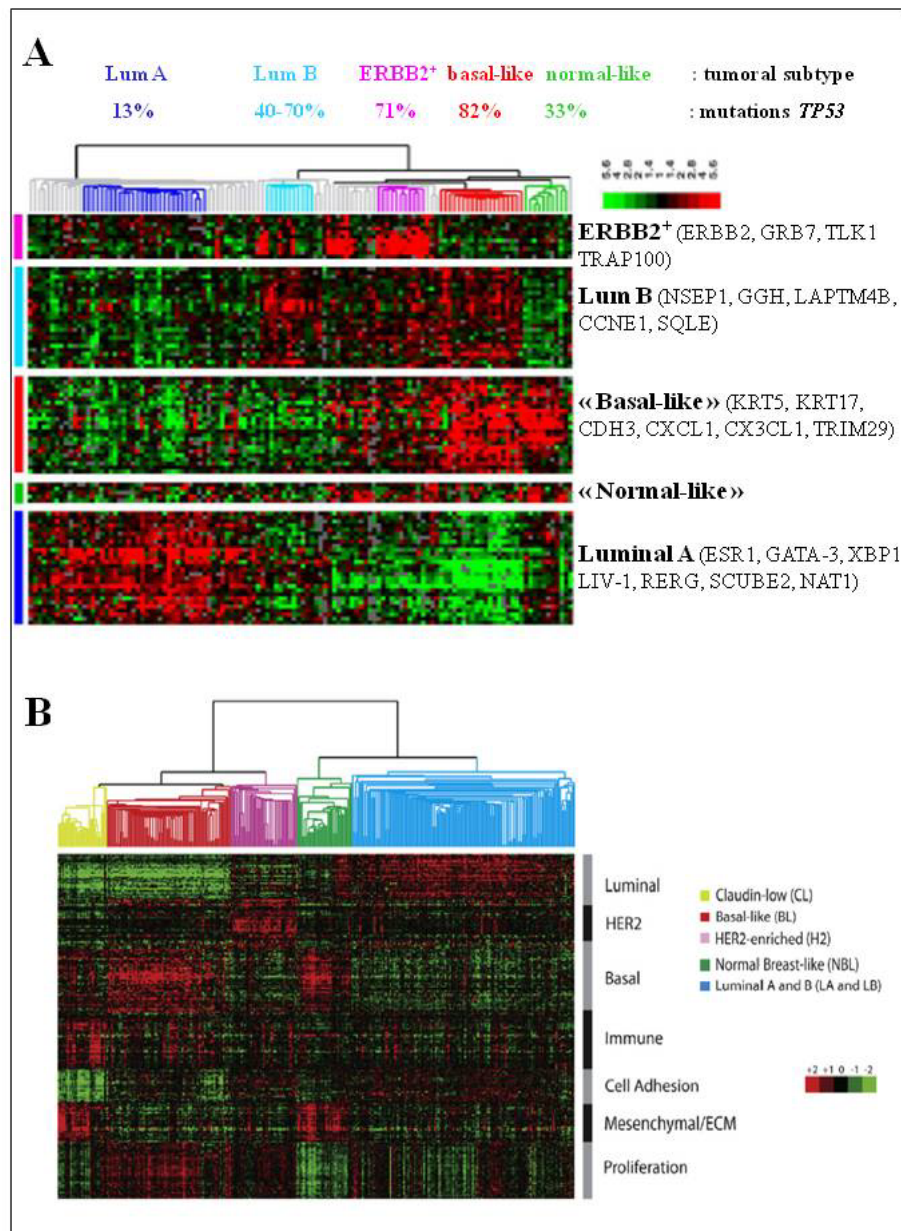


Figure 8: Classification moléculaire des cancers du sein invasifs [adapté de T Sorlie T *et al*, 2001 (A) et A Prat et CM Perou, 2011 (B)]. A chaque groupe correspond un profil d'expression qui lui est propre.

b- Les tumeurs ERBB2⁺

Elles représentent environ 15% des tumeurs (Carey LA *et al*, 2006). Selon la classification moléculaire, les tumeurs ERBB2⁺ se distinguent des tumeurs de type luminal B par leur absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes (ERBB2⁺RO⁻). Ces tumeurs expriment très fortement la protéine ERBB2 (expression quantifiée 3⁺ en immunohistochimie), sont très prolifératives et sont caractérisées par une forte expression des gènes co-amplifiés avec *ERBB2*, comme *GRB7*, *STARD3*, *PERLD1* et *TRAP100* (Kao J et Pollack JR, 2006).

c- Les tumeurs « basal-like »

Ces tumeurs appartiennent au groupe des tumeurs triple négatives. En effet, elles n'expriment ni les récepteurs aux œstrogènes, ni le récepteur à la progestérone, ni ERBB2 (RO⁻RP⁻ERBB2⁻). Elles sont aussi caractérisées par l'expression de protéines communément associées aux cellules myoépithéliales de la glande mammaire normale, comme CK5/6, CK14 ou CK17, EGFR, P-CADH, CAV1 et CAV2, C-KIT et FOXC1 (Hu Z *et al*, 2006). D'autres marqueurs non associés aux cellules basales de la glande mammaire normale ont été rapportés surexprimés, comme FABP7, la laminine C2 (Sorlie T *et al*, 2001), la chémokine CX3CL1, l'annexine 8, TRIM29 (Sorlie T *et al*, 2004), l'oncoprotéine de la superfamille RAS, MRAS, la cible directe de l'oncogène MYC, CDCA7 (Sorlie T *et al*, 2006) et la vimentine (Rodríguez-Pinilla SM *et al*, 2007).

d- D'autres tumeurs non-luminales

Un autre sous-groupe de tumeurs triple négatives a ensuite été identifié par l'équipe de BT Hennessy en 2009: les tumeurs « claudin-low » (Hennessy BT *et al*, 2009 ; Prat A *et al*, 2010 ; Prat A et Perou CM, 2011). Ces tumeurs sont caractérisées par l'absence d'expression des gènes de la signature luminaire (*RO*, *GATA-3*) et de *ERBB2*, une faible expression des gènes impliqués dans les jonctions serrées et dans l'adhésion cellule/cellule (*CLDN3*, *CLDN4*, *CLDN7*, *OCLN*, *CDH1*) et par la forte expression de gènes impliqués dans la différenciation mésenchymateuse (*MMP2*, *VIM*, *Snail1*, *Snail2*, *Twist1*, *Twist2*, *ZEB1* et *ZEB2*) (**Figure 8B**). De plus, elles présentent un phénotype proche de celui des cellules souches et certaines caractéristiques des « cellules initiatrices de tumeur » (ou BrCICs pour *Breast cancer-initiating cells*): CD49^{high}, EpCAM⁻, ALDH1^{high}, CD44⁺/CD24⁻, CD29⁺/CD24⁻ (Creighton CJ *et al*, 2009).

Un autre groupe d'adénocarcinomes n'exprimant ni RO, ni RP, mais exprimant le récepteur aux androgènes RA a aussi été individualisé comme différent des tumeurs « basal-like ». Ce groupe moléculaire, appelé apocrine, représente environ 15% des carcinomes invasifs. Il présente une activation de la voie de signalisation de RA (surexpression des gènes *RA*, *FOXA1*, *XBP1*, *CYB5*, *SPDEF*), des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides ainsi qu'une amplification exclusive de *ERBB2* (alors associée

à la surexpression des gènes *ERBB2*, *GRB7*, *PERLD1*, *STARD3*) ou de *EGFR* (Farmer P *et al*, 2005 ; Guedj M *et al*, 2012 ; données U830 Virginie Raynal).

e- Les tumeurs « normal-like »

Les tumeurs de type « normal-like » sont caractérisées par une forte expression des gènes exprimés dans le tissu adipeux et dans les cellules non épithéliales. L'existence de ce groupe moléculaire est controversée: plusieurs groupes ont suggéré que cette classe de tumeur était artificiellement créée par la contamination des cellules tumorales par le stroma des échantillons tumoraux analysés (Prat A *et al*, 2010 ; Mackay A *et al*, 2011).

Les technologies de plus en plus précises permettent d'identifier de nouveaux sous-types tumoraux. Le cancer du sein n'est donc pas une seule maladie, mais un groupe de maladies, qui requièrent chacune, dans l'idéal, un traitement adapté.

3-3. De la signature moléculaire à la clinique

Les sous-types moléculaires identifiés par T Sorlie et CM Perou ont une signification clinique, car ils sont associés à des pronostics différents et à des réponses au traitement différentes (**Figure 9**) (Sorlie T *et al*, 2001 ; Sorlie T *et al*, 2003 ; Rouzier R *et al*, 2005 ; Kennecke H *et al*, 2010 ; Voduc KD *et al*, 2010).

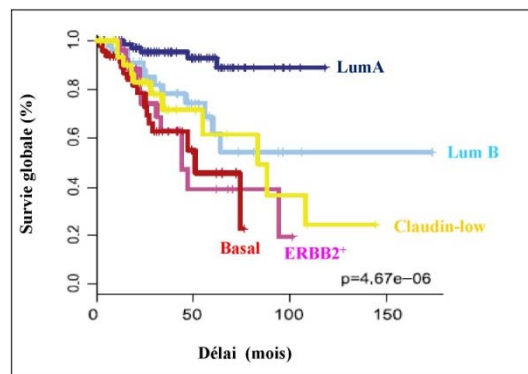


Figure 9: Survie globale en fonction de la classification moléculaire des tumeurs (adapté de A Prat et CM Perou, 2011).

Les tumeurs lumineuses A sont généralement de bas grade (I ou II associé à un index mitotique bas) et de bon pronostic (90% de survie à 10 ans), ces deux propriétés intrinsèques étant en partie liées à leur une bonne sensibilité à l'hormonothérapie. Cependant, certaines patientes peuvent récidiver après 10 ans. Le sous-groupe

luminal B se distingue du sous-groupe luminal A par le grade (grade II associé à un index mitotique fort ou grade III), l'indice de prolifération et l'expression de ERBB2. Sa survie globale est plus courte (60% à 10 ans).

Les tumeurs ERBB2⁺, RO⁻ sont souvent de haut grade (75%) et de mauvais pronostic (20% à 8 ans). Cependant, ce pronostic a été amélioré par le traitement anti-ERBB2 (Herceptine®), anticorps humanisé qui bloque le domaine extracellulaire de ERBB2.

Les patientes atteintes de tumeurs RO⁻RP⁻ ont fait l'objet de nombreuses analyses cliniques et moléculaires car elles étaient considérées comme de mauvais pronostic et ne pouvaient bénéficier d'un traitement ciblé spécifique. Les premières courbes de survie globale des tumeurs analysées par puces montraient des taux de survie très faible: 30% à 10 ans pour les tumeurs de type « Claudin-low » (Prat A et Perou CM, 2011) et moléculaire apocrine (Farmer P *et al*, 2005 ; Banneau G *et al*, 2010 ; Guedj M *et al*, 2012) et 20% à 6 ans pour les patientes atteintes de tumeurs « basal-like ». Néanmoins, ces données concernaient un petit nombre de patientes. Des analyses plus larges, la prise en considération de l'hétérogénéité des tumeurs de ce groupe et les premiers essais thérapeutiques menés avec les inhibiteurs de PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*) tempèrent désormais la description initiale des tumeurs triples négatives.

Les caractéristiques phénotypiques et cliniques majeures de chacun des sous-groupes moléculaires sont résumées ci-dessous (Figure 10).

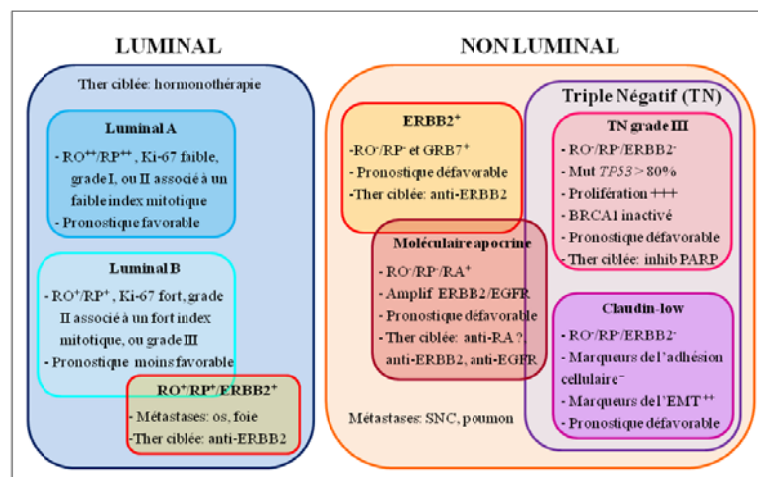


Figure 10: Résumé des caractéristiques phénotypiques, cliniques et thérapeutiques relatives à chaque sous-type moléculaire de cancer du sein. RO: récepteur aux oestrogènes ; RP: récepteur à la progestérone ; RA: récepteur aux androgènes ; EMT: transition épithélio-mésenchymateuse ; Ther: thérapie ; SNC : système nerveux central.

3-4. Altérations de l'ADN

La combinaison des paramètres cliniques (âge, taille tumorale, grade histologique, envahissement ganglionnaire) et pathologiques (RO, RP, ERBB2) est utilisée de façon conventionnelle pour prédire le pronostic et sélectionner un traitement. Les sous-groupes moléculaires (luminal A, luminal B, ERBB2⁺, « basal-like », « claudin-low », moléculaire apocrine), définis sur l'expression des gènes, montrent de réelles différences en terme d'incidence de chaque sous-groupe (Carey LA *et al*, 2006 ; Millikan RC *et al*, 2008), de survie (Perou CM *et al*, 2000 ; Sorlie T *et al*, 2001 ; Hu Z *et al*, 2006 ; Cheang MC *et al*, 2009) et de réponse thérapeutique (Rouzier R *et al*, 2005 ; Carey LA *et al*, 2007 ; Hugh J *et al*, 2009 ; Parker JS *et al*, 2009 ; Nielsen TO *et al*, 2010 ; Prat A *et al*, 2010). Cette stratification a certes permis de donner des informations supplémentaires et complémentaires à celles données par les marqueurs pathologiques et cliniques usuels (Parker JS *et al*, 2009). Cependant, près de 30% des tumeurs échappent encore à toute classification et il n'existe pas de parallélisme absolu entre les classements définis par les pathologistes et les classements moléculaires.

Les progrès technologiques d'analyses génomiques (puces à ADN, séquençage massif à haut débit) (**Figures 11 et 12**) (Bergamaschi A *et al*, 2006 ; Chin K *et al*, 2006 ; Chin SF *et al*, 2007a et b ; Curtis C *et al*, 2012 ; Stephens PJ *et al*, 2012) ont permis de caractériser de plus en plus finement les altérations génomiques spécifiques de chaque sous-type moléculaire. Ces approches devraient permettre de comprendre l'incroyable complexité de ces maladies, en complétant les données actuelles, pour, à terme, améliorer l'efficacité des nouvelles thérapies et par conséquent le pronostic des patientes.

a- Analyses génomiques par puces à ADN

Ces analyses, calquées sur la signature moléculaire, ont permis de mettre en évidence des différences génomiques qualitatives et quantitatives, selon le sous-type considéré. Elles ont montré que les tumeurs de type luminal sont les moins remaniées. Elles sont caractérisées par un gain du bras long du chromosome 1q associé à une perte du chromosome 16q et des amplifications des régions 8p12 (*FGFR1*, *PPAPDC1B*, *WHSC1L1*) (Ray ME *et al*, 2004 ; Chin SF *et al*, 2007 ; Bernard-Pierrot *et al*, 2008 ; Cancer Genome Atlas network, 2012) et 11q13-q14 (*CCND1*, *PAK1*, *FGF4*, *EMS1*) (Chin SF *et al*, 2007). Ces altérations peuvent être associées au gain du chromosome 8q dans le cas de tumeurs de type luminal A (profil de type « simplex »), ou à une combinaison d'autres altérations (1p-, 8p-, 8q+, 9p-, 13q-, 17p-, 17q+, 20q+, 22q-, amplification de *MYC*) pour les tumeurs de type luminal B (profil complexe en dents de scie ou « sawtooth ») (Chin K *et al*, 2006 ; Guedj M *et al*, 2012 et données U830, Vanessa Benhamo).

Les tumeurs ERBB2⁺ et « basal-like » présentent des profils génomiques complexes, caractérisés principalement par des amplifications du gène *ERBB2* seul ou associé aux gènes *STARD3*, *PERLD1* et *GRB7* pour les tumeurs ERBB2⁺ ou par de nombreuses anomalies interstitielles (gains des chromosomes 1q, 8q, 10p et pertes des bras longs

des chromosomes 4 et 5) (Chin K *et al*, 2006, Bergamaschi A *et al*, 2006) et quelques amplifications, peu récurrentes, situées dans les régions 8q24 (*MYC*), Xp11.22 (*SSX1*, *SSX2*) et Xq28 (*MTCP1*, *TKL1*) (Vincent-Salomon A *et al*, 2007 ; Guedj M *et al*, 2012) pour les tumeurs de type « basal-like ».

Les tumeurs de type « Normal-like » présentent très peu de réarrangements chromosomiques. Elles sont caractérisées par la perte du bras chromosomique 16q (70% des cas), associée aux gains des régions 9q33, 8p23 et 16p13 (Guedj M *et al*, 2012).

Récemment, une étude combinant une analyse génomique et transcriptomique a été menée sur 2000 cas de cancers du sein (Curtis C *et al*, 2012). L'analyse des altérations génomiques et leur influence sur l'expression des gènes affectés (*cis*) ou non affectés (*trans*) a permis de mettre en évidence 10 groupes, dont la fréquence est peu élevée (< 15%) (Figure 11). Ces résultats confirment l'hétérogénéité des cancers du sein et traduisent leur très grande instabilité génique (Figure 12).

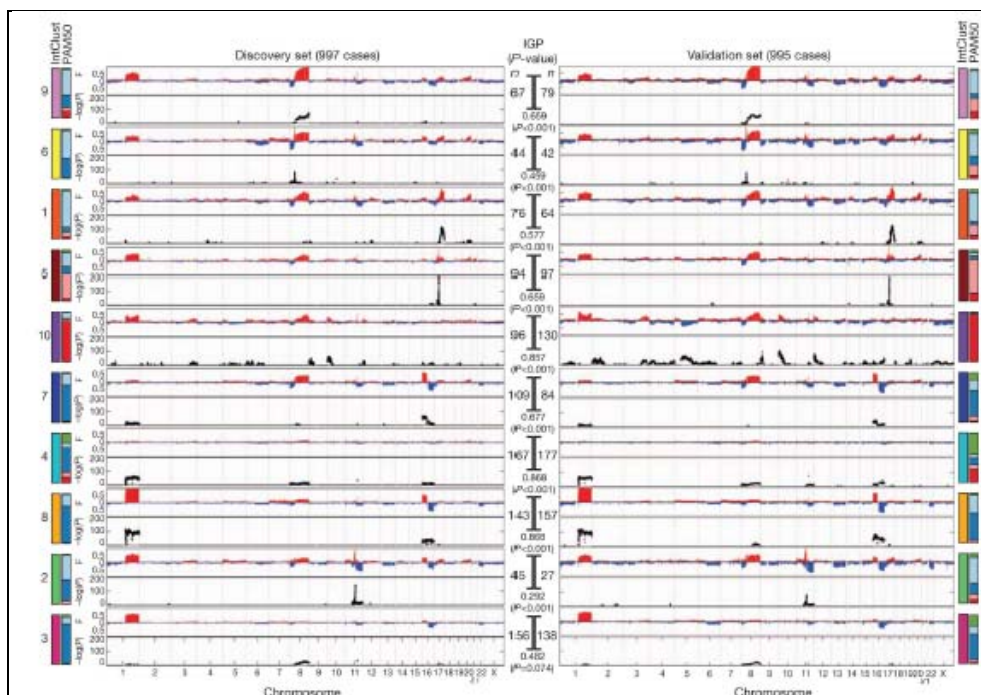


Figure 11: Analyse génomique de 2000 cancers du sein (d'après Curtis C *et al*, 2012).

b- Analyses génomiques par séquençage massif à haut débit

Récemment, des études ont été réalisées par séquençage massif à haut débit, majoritairement sur des tumeurs de type infiltrant sans autre spécificité. Ces études ont montré l'importance et la complexité des modifications chromosomiques trouvées: plus de 2000 réarrangements pour les 24 tumeurs analysées (Stephens PJ *et al*,

2009), des duplications en tandem, des micro-homologies, des translocations, des délétions ou des amplifications (Vollan HKM et Caldas C, 2011 ; Robinson DR *et al*, 2012 ; Natrajan R *et al*, 2012), avec une nette majorité de réarrangements intrachromosomiques (Stephens PJ *et al*, 2009).

La fréquence et la nature de ces altérations peuvent varier selon le sous-type moléculaire considéré (Figure 12). En effet, alors que les carcinomes mammaires de type luminal A présentent en moyenne 30 réarrangements par échantillon (Shah SP *et al*, 2009), on peut en observer plus de 200 par échantillon de type « basal-like » (RO-RP-ERBB2⁻) ou ERBB2⁺ (RO-RP-ERBB2⁺). Les translocations interchromosomiques associées à des altérations du nombre de copie de larges fragments d'ADN ou de bras entiers de chromosomes sont présentes dans les carcinomes mammaires de type luminal A, alors que les translocations interchromosomiques complexes affectant des petites régions d'amplification sont plutôt observées dans les tumeurs mammaires de type luminal B ou ERBB2⁺. Les tumeurs de type « basal-like » sont caractérisées par de nombreuses altérations segmentaires, courtes et intrachromosomiques (duplications, délétions, inversions) (Stephens PJ *et al*, 2009 ; Ding L *et al*, 2010 ; Russnes HG *et al*, 2010 ; Rusness HG *et al*, 2011 ; Banerji S *et al*, 2012).

L'analyse des mutations par les techniques de séquençage massif montre que seuls les gènes *TP53* et *PIK3CA* sont mutés de façon très récurrente (> 30% des cas), alors que la plupart des gènes nouvellement identifiés sont mutés dans moins de 10% des cas. Le spectre mutationnel est différent selon le sous-type moléculaire considéré. Les tumeurs de type luminal, en plus des mutations *PIK3CA* (29 à 45%) et *TP53* (12 à 29%), sont associées à une constellation de gènes mutés, à faible fréquence: *GATA3* (15%), *MAP3K1* (5-13%), *CDH1*, *MAP2K4*, *MLL3*, *PTEN*, *AKT1*, *RUNX1*, *CBFB*, *FOXA1*, etc... (< 10%). Certaines de ces mutations sont mutuellement exclusives, comme celles affectant les gènes *GATA3* et *FOXA1* (Cancer Genome Atlas network, 2012) ou *AKT1* et *PIK3CA* (Banerji S *et al*, 2012). Les tumeurs de type « basal-like » et ERBB2⁺ présentent une forte fréquence de mutation, sur un nombre de gènes affectés beaucoup plus restreint. Ainsi, 80% des tumeurs « basal-like » et 72% des tumeurs ERBB2⁺ présentent des mutations du gène *TP53* (Banerji S *et al*, 2012 ; Cancer Genome Atlas network, 2012 ; Cizkova M *et al*, 2012 ; Guedj M *et al*, 2012).

L'ensemble de ces données a également permis de mettre en évidence une large diversité génétique au sein des tumeurs mammaires, et ce à différents niveaux: pour un même gène altéré, le codon muté peut être différent d'une tumeur à une autre, ce qui pourrait suggérer la présence d'un spectre de mutations privées, spécifiques de son propre génome (Banerji S *et al*, 2012). D'autre part, différentes possibilités de combinaison mutationnelle peuvent affecter un même type de tumeurs. Ainsi, sur 100 cas analysés, 73 combinaisons différentes de gènes mutés ont pu être identifiées (Stephens PJ *et al*, 2012), ce qui suggère, encore une fois, une forte hétérogénéité tumorale. Cependant, l'ensemble des gènes mutés peuvent altérer une même voie de signalisation (Stephens PJ *et al*, 2012 ; Shah S *et al*, 2012). Ceci suggère que bien que les tumeurs

soient génétiquement différentes, elles peuvent être phénotypiquement proches, grâce à l'altération de gènes impliqués dans une même voie de signalisation.

Peu de données portant sur le séquençage des ARN sont disponibles. Quelques gènes de fusion ont été mis en évidence, comme la fusion *MAGI3-AKT3* dans les tumeurs de type « basal-like », (Banerji S *et al*, 2012) ou la fusion *ETV6-ITPR2* dans les tumeurs de type luminal B (Stephens PJ *et al*, 2009). D'autres fusions impliquant MAST, une sérine-thréonine-kinase associée aux microtubules, (*GPBP1L1-MAST2*, *ZNF700-MAST1*, *NFIX-MAST1*, *TADA2A-MAST1*) ou un gène de la famille NOTCH (*SEC16A-NOTCH1*) ont également été identifiées dans les tumeurs mammaires RO⁻ (Robinson DR *et al*, 2012).

Ces instabilité et complexité géniques ne sont pas encore prises en considération par les traitements actuellement proposés. Une définition encore plus précise des anomalies génétiques rencontrées, et ce dans chaque groupe histologique, même les plus rares, pourrait permettre de préciser le pronostic et améliorer les thérapeutiques en découvrant d'autres stratégies de traitement.

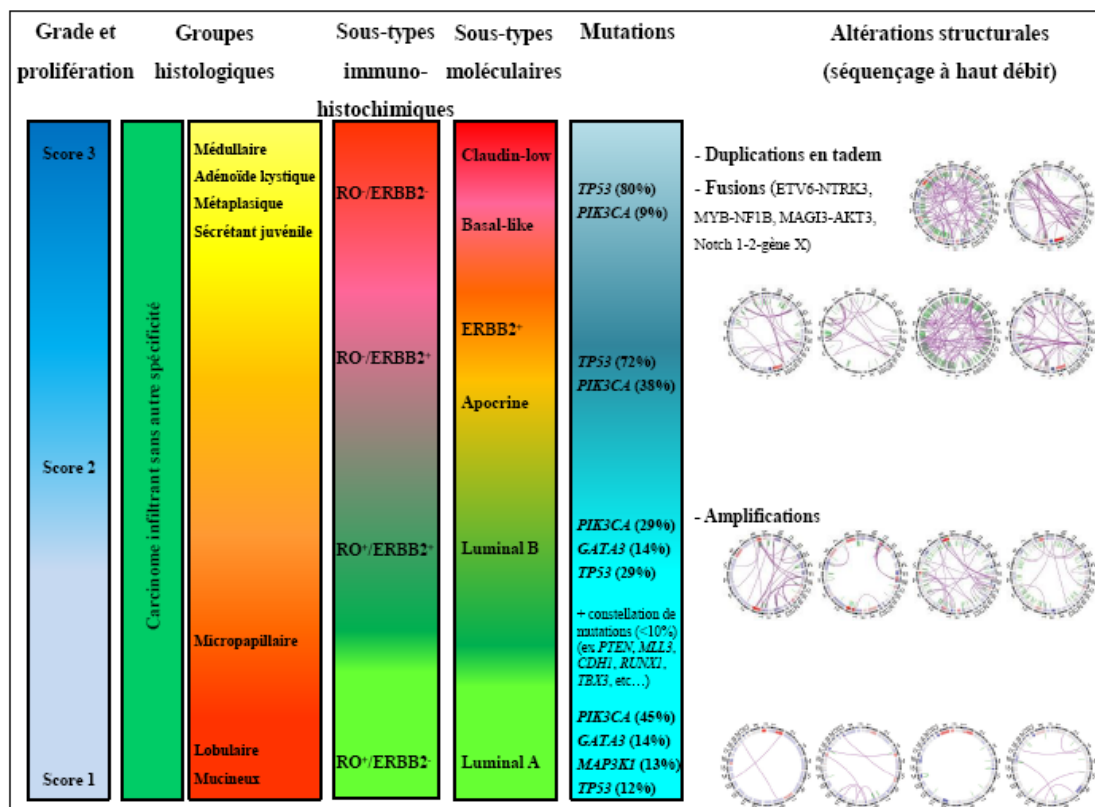


Figure 12: Absence de parallélisme absolu entre les classifications histologique, immunohistochimique, moléculaire et issue du séquençage à haut débit (adapté de HG Russnes *et al*, 2011 ; S Banerji *et al*, 2012 ; The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

3-5. Conclusion

Une des caractéristiques biologiques majeures des carcinomes mammaires est l'accumulation d'altérations génomiques provoquant la dérégulation de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur. Ces anomalies moléculaires multiples entraînent une prolifération cellulaire anarchique et des modifications de l'organisation des cellules, avec, entre autre, la perte d'asymétrie cellulaire. Cette perte de polarité est corrélée au caractère invasif et agressif des tumeurs. En effet, à l'exception d'un type rare et indolent, le carcinome tubuleux, une des marques des cellules carcinomateuses est la perte progressive de leur polarité et l'acquisition de leurs propriétés pro-migratrices conduisant à l'émergence de métastases. La compréhension des mécanismes qui aboutissent à la perte de la polarité cellulaire ainsi qu'à leurs conséquences, en particulier ceux liés au processus de migration, apparaît donc fondamentale.

4- La polarité apico-basale

4-1. Etablissement de la polarité apico-basale

La polarité cellulaire se définit comme une asymétrie morphologique et fonctionnelle de la cellule. Au niveau des cellules épithéliales, elle s'organise selon deux axes: un axe apico-basal, où la face basale des cellules est en contact avec la membrane basale, la matrice extracellulaire (MEC) et le stroma, alors que la face opposée apicale est en contact avec la lumière: on parle de polarité apico-basale. Un second axe d'asymétrie cellulaire, perpendiculaire au premier axe, est impliqué dans l'organisation et la coordination des cellules dans le plan de l'épithélium ou, étape ultime, dans le positionnement et l'orientation du cil primaire. C'est la polarité planaire cellulaire. La co-existence de ces 2 axes de polarité au sein des *épithélia* rend leurs fonctions et leur maintien dépendant l'une de l'autre et est nécessaire à la formation d'un tissu épithélial fonctionnel.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai choisi de m'intéresser à la polarité apico-basale. Les cellules épithéliales polarisées forment des barrières de perméabilité réduite entre deux compartiments d'un organe et établissent des transferts d'ions et de molécules entre ces deux compartiments. Ces fonctions nécessitent une organisation structurale et fonctionnelle de la cellule, qui aboutit à la création de deux domaines membranaires structurellement et fonctionnellement distincts, le pôle apical et le pôle basolatéral, dont la composition en protéines est différente. Ces deux pôles sont séparés par des jonctions serrées (TJ, *Tight Junctions*) et des jonctions adhérentes (AJ, *Adherens Junctions*) (**Figure 13**). Ces jonctions intercellulaires jouent un rôle crucial dans la formation et le maintien de l'architecture épithéliale.

a- Le pôle apical

Le domaine apical présente des caractéristiques de différenciation importante en permettant la sécrétion du lait dans la lumière pendant la période de lactation. C'est la membrane plasmique du domaine apical des cellules épithéliales, très enrichie en phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PIP2) (Martin-Belmonte F et Mostov K, 2007), qui est en contact avec la lumière glandulaire (Figure 13A, B).

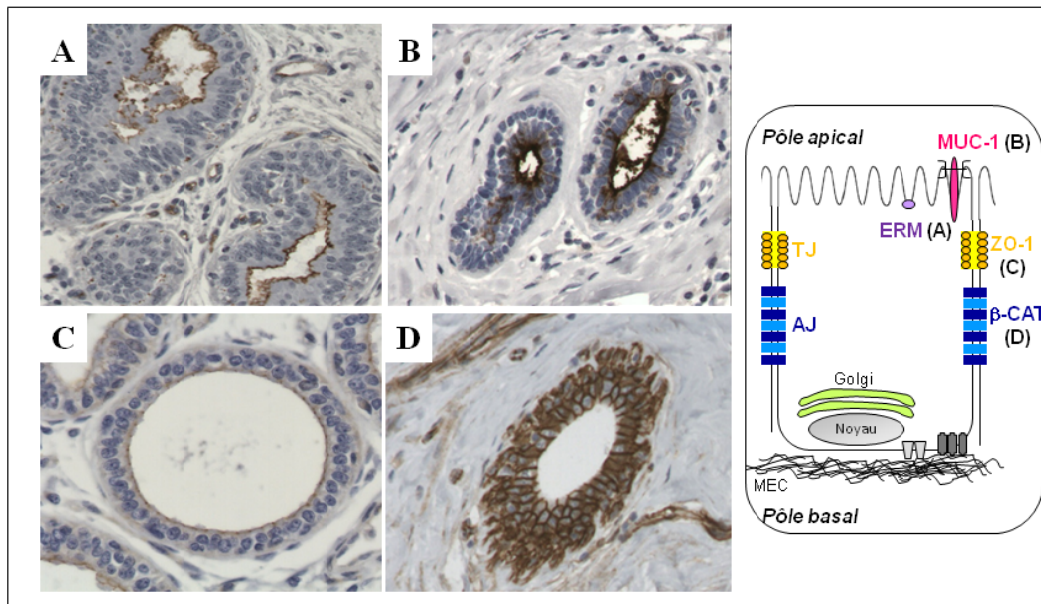


Figure 13: Cellule épithéliale mammaire normale. Identification du pôle apical : (A) ERM⁺ et (B) MUC-1⁺, des jonctions serrées : (C) ZO-1⁺, et adhérentes : (D) β-CAT⁺. MUC-1: mucine-1 ; ERM: Ezrine-Radixine-Moésine ; ZO-1: Zonula occludens-1 ; β-CAT : β-caténine ; AJ: jonction adhérente ; TJ: jonction serrée.

La formation de la lumière est un évènement clé dans le processus de polarisation épithéliale. Elle se forme grâce à l'apoptose des cellules épithéliales qui ne sont pas en contact avec la matrice extracellulaire et qui expriment les protéines pro-apoptotiques BCL-2 et BIM (Mailleux AA *et al*, 2007 ; Martin-Belmonte F *et al*, 2008) (Figure 14). Cet évènement peut être inhibé par l'expression de certains oncogènes, comme ERBB2, HPV16 E7 ou la cycline D1 (Debnath J *et al*, 2002 ; Aranda V *et al*, 2006 ; Ebnet K, 2008).

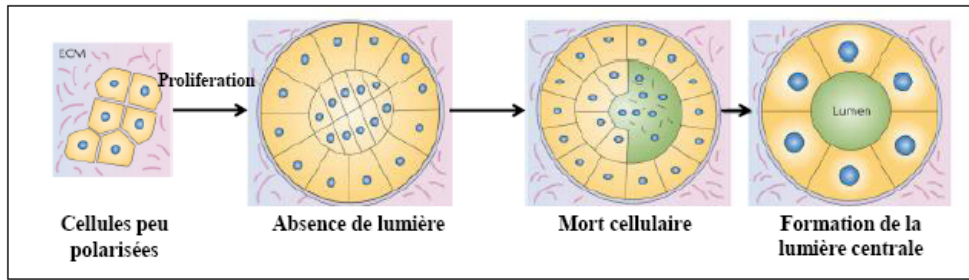


Figure 14: Formation de la lumière tissulaire. D'après DM Bryant et KE Mostov, 2008.

b- Le pôle basolatéral

La membrane du domaine basolatéral est constituée de jonctions intercellulaires, de desmosomes et de sites d'attachement à la MEC ou hémidesmosomes. Ces interactions sont nécessaires à l'établissement et au maintien de la polarisation de la cellule (**Figure 15**).

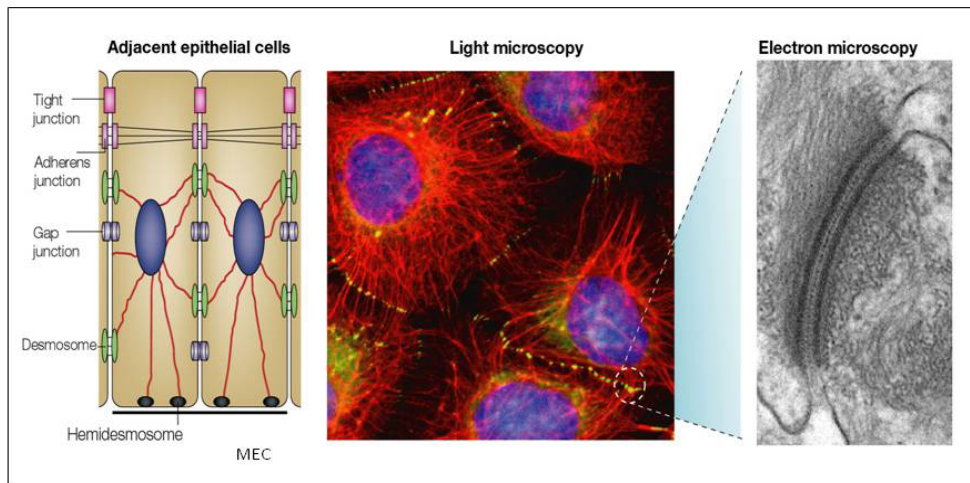


Figure 15: Adhrence des cellules à la matrice extracellulaire.

La lame basale, sous-jacente aux cellules, est constituée des protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène IV, les laminines, les fibronectines, les nidogènes, le perlécan et l'agrane. Les hétérotrimères de laminine (chaînes α , β et γ) sont nécessaires à son assemblage, tandis que les nidogènes, en se liant aux laminines et au collagène IV, permettent sa stabilisation. Cette liaison, qui permet l'attachement du pôle basolatéral de la cellule à la lame basale constitue un point focal d'adhérence, et initie l'axe de la polarité apico-basale.

Les molécules principalement impliquées sont les intégrines. D'une part, ses sous-unités α et β s'hétérodimérisent et forment des récepteurs d'adhésion pour les

divers constituants de la matrice extracellulaire, et d'autre part, grâce à un complexe de molécules de liaison (taline, vinculine et α -actinine), elles se lient au cytosquelette d'actine. Des premiers travaux réalisés sur un modèle de cellules rénales de chien (MDCK, *Madin-Darby Canine Kidney*), ont montré que les intégrines $\beta 1$ induisent l'activation de RAC1, puis l'assemblage du réseau de laminine nécessaire à l'orientation apicobasale de la cellule (Yu W *et al*, 2005). L'absence de ce signal provoque une inversion de la polarité apicobasale des cellules MDCK (O'Brien LE *et al*, 2001). Des travaux plus récents, réalisés sur des cellules primaires murines, ont montré que c'est plutôt l'interaction intégrines $\beta 1$ -ILK (*integrin-linked-kinase*) (et non RAC1) et le réseau de microtubules qui régule l'orientation de la polarité cellulaire et la formation de la lumière (Akhtar N et Streuli CH, 2013). On imagine ainsi aisément qu'une modulation d'expression des intégrines, d'une part, ou de leurs ligands - les constituants de la MEC-, d'autre part, peut avoir des conséquences dramatiques sur la polarisation épithéliale.

L'intégrité des signaux initiés par l'interaction intégrines/MEC permet également, dans des conditions physiologiques, de contrôler la survie des cellules. En effet, une interruption de ces interactions ou une interaction inappropriée entre la cellule et la matrice et/ou les autres cellules environnantes conduit à une forme de mort cellulaire programmée (apoptose), appelée *anoïkis* (Frisch SM et Screaton RA, 2001 ; Gilmore AP *et al*, 2005). On sait d'ailleurs que la cellule tumorale, qui a acquis un potentiel métastatique, développe un mécanisme de résistance à l'anoïkis pour survivre après son détachement du foyer primaire (Simpson CD *et al*, 2008).

Au cours de la progression tumorale, des signaux spécifiques des intégrines vont permettre aux cellules cancéreuses de se détacher des cellules voisines, de ré-orienter leur polarité, de proliférer et de survivre dans un autre environnement.

c- Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont essentielles au maintien de la structure épithéliale. Elles permettent l'attachement mécanique des cellules entre elles. Ce sont des structures ubiquitaires impliquées dans le maintien de la polarité, l'intégrité de l'architecture tissulaire, la limitation de la mobilité et la prolifération cellulaire. De par leur interaction avec le cytosquelette d'actine, elles remplissent également un rôle de barrière de diffusion pour les protéines entre le domaine apical et le domaine basolatéral (Shin K *et al*, 2006). Elles sont situées dans une région particulière, la *zonula adherens*, localisée juste au-dessous des jonctions serrées, vers le pôle basal. Ces jonctions sont sensibles au calcium et sont formées principalement par les protéines E-cadhérine et β -caténine (**Figure 16**).

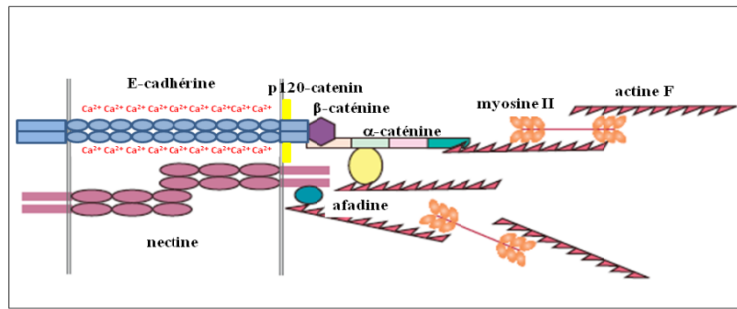


Figure 16: Représentation schématisée des jonctions adhérentes. Ces jonctions, sensibles au calcium, sont principalement formées par les protéines E-cadhérine et β-caténine.

L'assemblage des jonctions adhérentes débute dans le réticulum endoplasmique par la formation du complexe E-cadhérine-β-caténine. L'interaction avec les autres constituants des jonctions ne se fait qu'une fois le complexe ancré à la membrane plasmique est engagé dans une interaction homophile avec un complexe de la cellule adjacente (**Figure 17**).

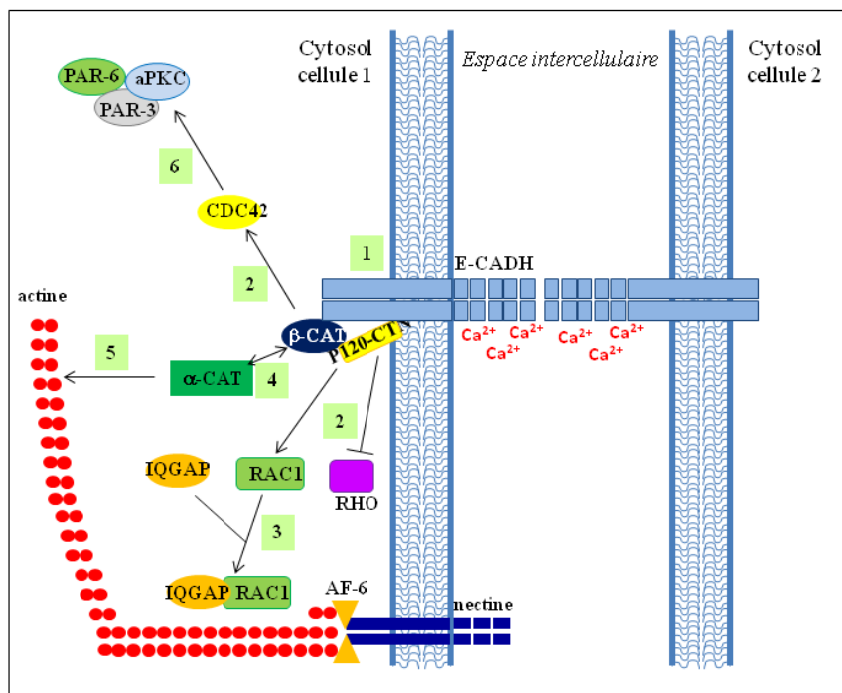


Figure 17: Formation des jonctions adhérentes. Le complexe E-CADH-β-CAT est engagé dans la membrane (1). La p120 caténine active RAC1, CDC42 et inhibe RHO (2). Rac 1 s'associe à IQGAP1 (3) et permet l'association β-CAT-α-CAT (4). L'α-caténine se lie au cytosquelette d'actine (5). CDC42 activé recrute le complexe PAR-3-PAR-6-aPKC au niveau des jonctions intercellulaires (6). Le complexe nectine-afadine se lie au cytosquelette d'actine, et interagit avec l'α-caténine.

La **E-cadhérine** (E pour épithéliale, E-CADH) appartient à une famille composée d'environ vingt membres, qui présentent chacun une expression tissulaire spécifique. Le domaine extracellulaire de la E-cadhérine est divisé en cinq sous-domaines identiques qui contiennent des séquences de liaison au calcium et permettent des interactions homophiliques avec ceux des cellules voisines. En présence d'ions Ca^{2+} , le domaine extracellulaire se dimérise (on parle alors d'interaction *cis*), puis interagit avec les deux autres domaines extracellulaires présents sur la cellule voisine (interaction *trans*) (Zhang Y *et al*, 2009). Le calcium est donc indispensable à la fonction d'adhésion des cadhérines. Il assure également une conformation optimale du domaine extracellulaire et participe à sa rigidification.

La portion juxta-membranaire du domaine intracellulaire de la E-cadhérine interagit avec la p120-caténine (P120CTN) qui la stabilise, tandis que sa portion C-terminale se lie à la β -caténine ou à la γ -caténine (plakoglobine). La p120-caténine inhibe RHO et active les protéines RAC1 et CDC42 (*Cell division control protein*). RAC1 ainsi activé se fixe à IQGAP1, un effecteur de RAC1 et de CDC42 qui lie indirectement les microtubules, permettant l'association β -caténine- α -caténine. L' α -caténine se lie alors aux protéines du cytosquelette (Yonemura S, 2011). L'activation de CDC42 stimule le complexe PAR-3-PAR-6-aPKC, qui, une fois activé, permet la formation des jonctions serrées.

De par ses fonctions dans les jonctions intercellulaires, la E-cadhérine joue un rôle important dans le maintien de la cohésion cellulaire et l'architecture tissulaire normale, et s'oppose ainsi à la mobilité cellulaire, à l'invasion et à la métastase. Elle joue également un rôle primordial dans l'établissement de la polarité apico-basale, comme le montrent des expériences réalisées *in vitro* sur les cellules MDCK cultivées en présence d'un anticorps anti-E-cadhérine. Ces cellules traitées n'ont alors plus de jonctions serrées et présentent des microvillosités également sur leur domaine latéral (Imhof BA *et al*, 1983).

Associé aux complexes impliquant la E-cadhérine, se trouve un autre type de complexe, composé des **nectines** et de l'**afadine** (AF-6) (Figures 16, 17).

Les nectines sont composées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique qui contient un domaine PDZ (*Post synaptic density-95/Dlg/ZO-1*).

Les domaines PDZ sont composés de 80 à 90 acides aminés qui se lient à un motif particulier de trois acides aminés (Ser/Thr-X-Val/Ile) situé en position carboxy-terminale des protéines membranaires (Matter K et Balda MS, 2003). Ces domaines, très conservés au cours de l'évolution, jouent souvent un rôle dans les voies de signalisation et dans la construction d'échafaudages moléculaires (Nourry C *et al*, 2003). C'est par ce motif PDZ que les nectines vont se lier à l'afadine.

Il existe une association physique coopérative et dynamique entre les deux complexes protéiques nectine/afadine et E-cadhérine/ β -caténine dans la formation des jonctions adhérentes. L'afadine se lie au cytosquelette d'actine, et interagit avec

l' α -caténine (Sawyer JK *et al*, 2009). Elle joue un rôle primordial dans la formation des jonctions adhérentes, comme le montrent des expériences *in vivo*: en effet, l'inactivation de l'afadine engendre une létalité embryonnaire précoce, due à la malformation des jonctions intercellulaires et des perturbations de la polarité apico-basale. De telles expériences réalisées sur chacune des nectines ne montrent pas d'effet au cours de l'embryogenèse (Ikeda W, 1999).

d- Les jonctions serrées

Les jonctions serrées constituent la structure la plus apicale de la cellule épithéliale. Elles déterminent la frontière entre le pôle apical et le domaine basolatéral et forment une barrière sélective dans une région appelée *zonula occludens*, limitant la diffusion latérale des constituants membranaires, et assurent l'étanchéité cellulaire en formant une structure continue tout autour de la cellule. Elles permettent également la ségrégation des composants apicaux et basolatéraux: en effet, elles empêchent les protéines et les lipides de la membrane apicale de diffuser dans la membrane basolatérale, et inversement, et contribuent ainsi au maintien de la polarité cellulaire. Des études récentes ont mis en évidence la complexité des jonctions serrées qui forment un échafaudage macromoléculaire composé de protéines membranaires et cytoplasmiques, essentielles au maintien de l'adhérence cellule-cellule et au contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la polarité cellulaires (Brennan K *et al*, 2009 ; Farkas AE *et al*, 2012).

Les jonctions serrées sont formées par les protéines occludine, claudines, JAM (*Junction Adhesion Molecule*) et ZO-1-3 (*Zona occludens 1-3*), associée à des protéines cytosoliques, servant de lien avec le cytosquelette (Shin K *et al*, 2006) (**Figure 18**). Cette interaction avec le cytosquelette détermine la localisation de la jonction au domaine apical de la cellule.

L'occludine et les claudines possèdent quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires, via lesquels elles interagissent avec ceux de la cellule voisine pour établir le contact cellule-cellule.

L'**occludine** a un rôle dans la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales, c'est-à-dire qu'elle bloque totalement la circulation des fluides entre les cellules et assure ainsi l'étanchéité entre les deux compartiments cellulaires. Elle existe sous forme phosphorylée, phosphorylation régulée par différentes enzymes, telles que aPKC, CK2 ou C-Yes (Brennan K *et al*, 2009). Des défauts de phosphorylation peuvent affecter sa localisation, et donc la formation des jonctions serrées.

Les **claudines** sont capables de se polymériser et de former des pores (canaux ioniques) qui permettent une diffusion sélective des ions et des petites molécules à travers l'espace paracellulaire. Leur domaine cytoplasmique se lie au domaine PDZ d'autres protéines, telles les protéines cytosoliques ZO-1, ZO-2, ZO-3. Des expériences *in vivo* ont montré que les claudines 1 et 2 sont les composants majeurs des jonctions

serrées, responsables à la fois de leur mise en place et du recrutement de l'occludine, qui joue juste un rôle régulateur dans leur assemblage et leur fonctionnalité (Dörfel MJ et Huber O, 2011).

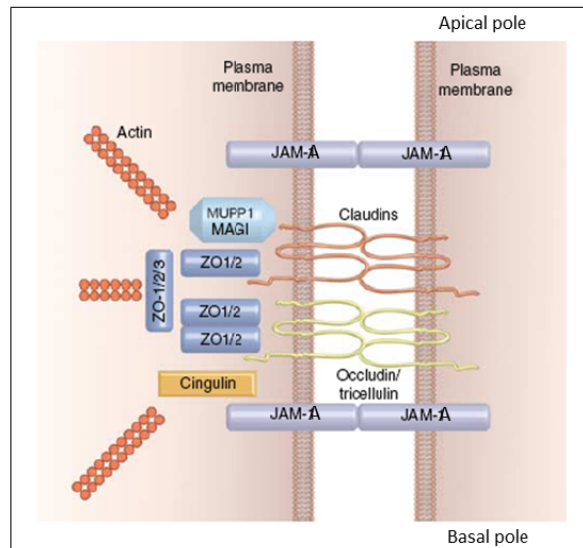


Figure 18: Représentation schématique des composants structuraux des jonctions serrées. D'après CM Niessen, 2007. Les majeurs composants des TJ sont l'occludine, les claudines, les protéines JAM-A et ZO-1-3.

Les protéines JAM appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et sont constituées d'une région extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine intracytoplasmique contenant un domaine PDZ, qui permet son interaction avec les protéines PAR-3, CASK ou ZO-1 au niveau intracellulaire. La sous-expression des protéines JAMs a été corrélée au caractère invasif et au potentiel métastatique des cellules cancéreuses, ainsi qu'à leur transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Naik MU *et al*, 2008a, 2008b). L'expression d'une protéine JAM-A mutée dans les cellules MDCK (Rehder D *et al*, 2006) conduit à la perte de la polarité apico-basale de ces cellules, suggérant que les protéines des jonctions cellulaires, sont certes nécessaires à leur formation, mais aussi indispensables au maintien de la polarité cellulaire.

Les protéines **ZO-1-3** sont des protéines adaptatrices, qui se lient aux claudines et à l'occludine grâce à leur domaine PDZ et interagissent directement avec le cytosquelette d'actine ou des protéines régulatrices. Elles appartiennent à la famille MAGUK (*Membrane-Associated-GUanylate Kinases*).

L'assemblage des jonctions serrées est facilité par la formation des jonctions adhérentes. En effet, de nombreuses interactions existent entre les composants de

chacune de ces jonctions intercellulaires, comme ZO-1 et l' α -caténine ou ZO-1 et l'afadine. De plus, une mauvaise adhésion de la E-cadhérine provoque une malformation des jonctions serrées (Tungall JA *et al*, 2005), alors que l'absence ou la mauvaise localisation de ZO-1 ou ZO-2 n'a aucun effet sur l'intégrité des jonctions adhérentes (Umeda K *et al*, 2006). C'est donc après l'établissement des jonctions adhérentes par le biais de la E-cadhérine, que l'on observe la mise en place du complexe jonctionnel serré. D'autres protéines de la polarité, appartenant aux complexes CRUMBS, PAR et SCRIBBLE interviennent également dans la mise en place et la maturation des jonctions serrées.

Le désassemblage des jonctions serrées, causé par une dérégulation des composants jonctionnels est fréquemment associé à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire, synonyme de perte de fonction pour l'épithélium. Ceci se manifeste par un déplacement de ZO-1 et de l'occludine des jonctions serrées. ZO-1 co-localise alors avec la E-cadhérine et l'occludine et les JAM sont dégradées. En parallèle, on observe une redistribution de la E-cadhérine et de la β -caténine des jonctions adhérentes vers le cytosol (Feigin et Muthuswamy, 2009).

La polarité des cellules épithéliales se traduit donc par la subdivision de la membrane plasmique en un domaine apical et un domaine basolatéral, distribués de part et d'autres des complexes d'adhérence intercellulaire matures. La machinerie protéique qui est à l'origine de l'architecture polarisée des cellules épithéliales est conservée tout au long de l'évolution, témoignant de son caractère indispensable. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires orchestrant la polarité épithéliale, et assurant l'intégrité de l'épithélium.

4-2. Les complexes protéiques CRUMBS, PAR et SCRIBBLE

Les principaux acteurs de la polarité sont les trois complexes protéiques, CRUMBS, PAR et SCRIBBLE.

Durant l'établissement de la polarisation épithéliale, ces trois complexes protéiques interagissent entre eux. L'efficacité et l'harmonie de cette interaction reposent sur la balance stoechiométrique et la bonne localisation de chacune des protéines des complexes. Ces complexes actifs permettront la mise en place et le maintien des domaines apical et basolatéral et des jonctions intercellulaires.

Les complexes CRUMBS et PAR agissent en tant que déterminants du domaine apical et des jonctions serrées, tandis que le complexe SCRIBBLE est impliqué dans le maintien de la membrane basolatérale par exclusion des protéines du complexe PAR.

a- Le complexe CRUMBS

Le complexe CRUMBS est constitué de 4 protéines principales: CRUMBS (CRB), PALS1 (*Protein associated with Lin seven 1* ou MPP5), PATJ (*PALS1-associated tight junction* ou INADL), LIN-7 et de multiples autres protéines associées (Bazellieres E *et al*, 2009 ;

Bulgakova NA et Knust E, 2009). Ce complexe, localisé au niveau du domaine apical de la cellule épithéliale, est impliqué dans la formation et/ou la maturation des jonctions intercellulaires serrées (TJ). Il permet également le recrutement de molécules régulatrices du cytosquelette d'actine, comme la moésine et la spectrine β H (Medina E *et al*, 2002).

La formation du complexe CRUMBS est assurée par l'interaction physique entre les différents acteurs du complexe (Figure 19) et c'est la protéine intracellulaire **PALS1** qui occupe un rôle central. En effet, elle interagit à la fois avec la protéine transmembranaire CRB, via son domaine PDZ, et les protéines PATJ1 et LIN-7, via ses domaines L27, jouant ainsi le rôle de pivot au sein du complexe. Sa perte induit la délocalisation ou la dégradation des autres protéines du complexe (Li Z *et al*, 2008 ; Horne-Badovinac S et Bilder D, 2008), des défauts de formation des jonctions serrées, ainsi qu'une mauvaise localisation de la E-cadhérine (Wang Q *et al*, 2007).

La protéine **LIN-7**, par son domaine L27, stabilise PALS1. Des travaux menés sur des souris *knock-out* LIN-7^{-/-} ont montré que LIN-7 n'avait pas de rôle direct sur la morphogenèse épithéliale (Olsen O *et al*, 2005). Cependant, des travaux d'invalidation de LIN-7 par shRNA dans les cellules MDCK (Straight SW *et al*, 2006) ont montré que la perte de LIN-7 provoquait la perte d'expression de PALS1 et de PATJ, ainsi qu'un retard dans la formation des jonctions serrées. Ces travaux et ceux plus anciens de C Perego (Perego C *et al*, 2002) suggèrent que LIN-7 est plus nécessaire à la maturation qu'à la formation des jonctions intercellulaires.

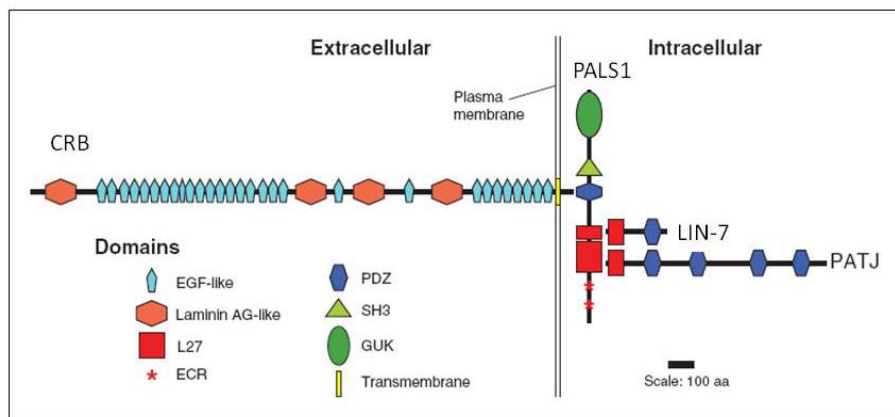


Figure 19: Représentation schématique des protéines du complexe CRUMBS. D'après NA Bulgakova *et al*, 2009. La queue cytoplasmique de la protéine transmembranaire CRB interagit directement avec le domaine PDZ de PALS1. L'interaction entre PALS1 et PATJ et LIN-7 se fait via les domaines L27.

La protéine **CRB3** est directement impliquée dans la formation des jonctions serrées. Sa perte d'expression induit la perte des jonctions serrées (Schluter MA *et al*, 2009), et sa

surexpression, une augmentation de la surface apicale associée à la réduction de la membrane basolatérale (Fogg VC *et al*, 2005). CRB3 participe à la régulation de la formation des jonctions serrées en interagissant avec le complexe PAR-3-PAR-6-aPKC via sa liaison à PAR-6.

Les protéines du complexe CRUMBS interagissent aussi avec d'autres protéines, comme par exemple, les protéines des jonctions intercellulaires ZO-3 et claudine 1 (PATJ) (Hurd TW *et al*, 2003), les protéines de la famille ERM (CRB3) ou les constituants du complexe PAR (PALS1): en interagissant avec le complexe PAR-3-PAR-6-aPKC via PAR-6, le complexe CRUMBS intervient également dans la formation des jonctions serrées.

b- Le complexe PAR

Les gènes *par* (*partitioning defective*) ont été identifiés chez *C. elegans* comme codant pour des protéines nécessaires à la division asymétrique durant les étapes précoces de l'embryogenèse. Les produits de ces gènes présentent diverses fonctions biologiques: PAR-1 et PAR-4 (ou LKB1/STK11) sont des sérine/thréonine kinases, PAR-3 et PAR-6 sont des protéines à domaine PDZ. Dans les *épithélia* mammaires, PAR-3 et PAR-6 forment le complexe Par avec la kinase sérine/thréonine aPKC. Ce complexe est associé à des petites protéines G, telle que CDC42 (*Cell-division control protein*), RAC1 ou RHOA (Macara IG, 2004) (**Figure 20**).

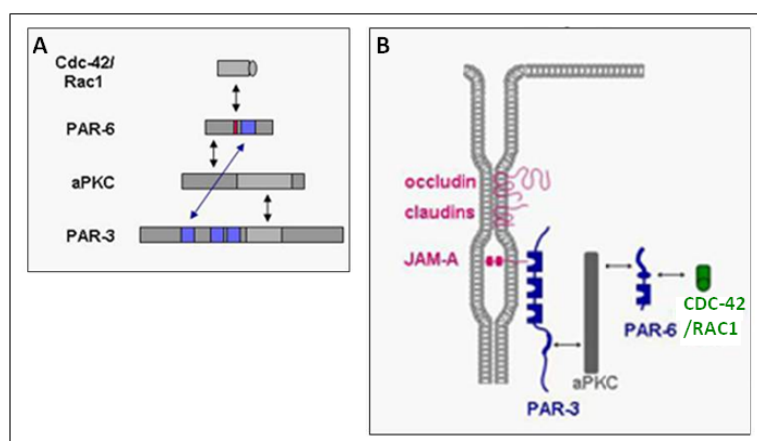


Figure 20: Représentation schématique du complexe protéique PAR au niveau des jonctions serrées. (A) PAR-3, aPKC et PAR-6 forment un complexe ternaire. L'activité d'aPKC est régulée par la liaison de CDC42 ou de RAC1 à PAR-6. **(B)** Le complexe PAR est associé à la membrane via l'interaction PAR-3-JAM-A, qui régule la formation des jonctions serrées. D'après K Ebnet, *Histochem Cell Biol*, 2008.

Le complexe PAR, comme le complexe CRUMBS, est localisé au niveau du domaine apical de la cellule et participe à l'établissement et au maintien des jonctions

intercellulaires serrées. C'est la protéine **PAR-3** qui est nécessaire à la bonne localisation des autres membres du complexe. JAM-A lui sert de point d'ancrage, puis elle interagit avec le complexe **PAR-6-aPKC**, ce qui permet la localisation du complexe PAR-3-PAR-6-aPKC au niveau des jonctions serrées. Ce recrutement se fait par l'intermédiaire de la petite protéine G **CDC42** activée (Horikoshi Y *et al*, 2009), sa forme CDC42-GTP se liant au complexe PAR-6-aPKC-LGL via PAR-6. PAR-6 participe à l'activation de la protéine aPKC, qui phosphoryle alors LGL, la dissociant du complexe. LGL est exclu vers le domaine basolatéral, tandis que le complexe GTP-CDC42-PAR-6-aPKC s'associe à PAR-3, recruté par JAM-A. La protéine aPKC phosphoryle alors PAR-3 (Morais-de-Sa E *et al*, 2010) et rend ainsi le complexe fonctionnel (**Figure 21**).

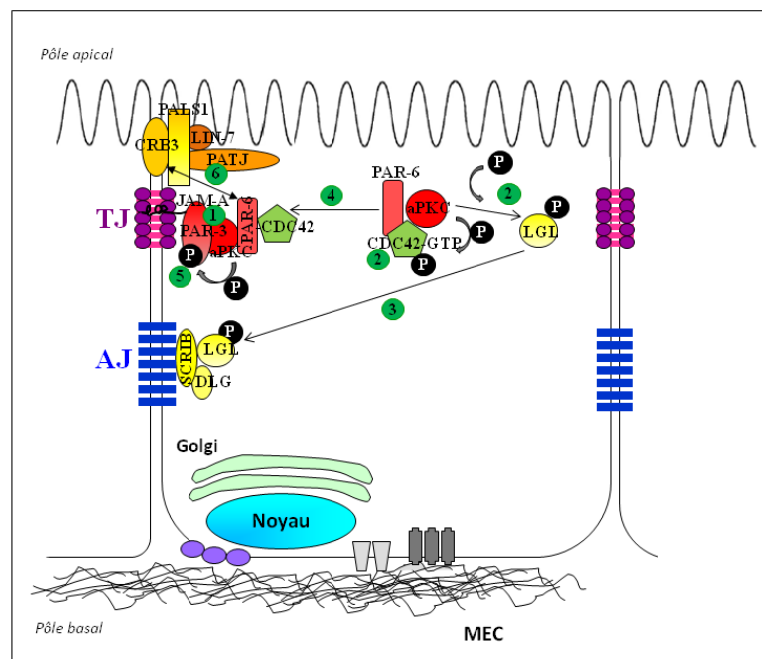


Figure 21: Formation des jonctions serrées. (1) La protéine PAR-3 est ancrée au niveau de la jonction intercellulaire grâce à sa liaison à la protéine JAM-A. (2) La forme active de CDC42 se lie au complexe PAR-6-aPKC-LGL. PAR-6 participe à l'activation de aPKC, qui phosphoryle LGL et la dissocie du complexe. (3) LGL est exclue vers le domaine basolatéral, tandis que le complexe GTP-CDC42-PAR-6-aPKC s'associe à PAR-3 (4). La protéine aPKC phosphoryle alors PAR-3, rendant le complexe fonctionnel. (5) Le complexe CRUMBS-PALS1-PATJ interagit avec le complexe PAR-3-PAR-6-aPKC via PAR-6. Adapté de SK Muthuswamy et B Xue, 2012.

La présence et la fonctionnalité de chacun des membres du complexe est nécessaire à la bonne formation des jonctions serrées. Des travaux ont montré qu'une simple surexpression de PAR-6 dans les cellules épithéliales MDCK, délocalise la protéine PAR-3 et altère les jonctions serrées, comme le montre la mauvaise localisation de ZO-1 (Ebnet K *et al*, 2001). Plus récemment, l'équipe de J Whyte a montré que l'absence de

la protéine fonctionnelle aPKC ζ inhibait la formation de la lumière centrale et altérait la polarité apico-basale (Whyte J *et al*, 2010). La protéine aPKC est régulée négativement par la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui la déphosphoryle. L'expression de la sous-unité catalytique de PP2A dans les cellules MDCK provoque la déphosphorylation des protéines des jonctions serrées ZO-1, occludine et claudine 1, et inhibe l'assemblage des jonctions serrées. Inversement, l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque stimule la phosphorylation et le recrutement des protéines ZO-1, occludine et claudine 1 aux jonctions serrées (Nunbhakdi-Craig V *et al*, 2002). Ces résultats mettent en évidence le rôle des épisodes de phosphorylation/déphosphorylation dans l'assemblage et le désassemblage des jonctions serrées.

Les petites protéines RhoGTPases, comme CDC42, RAC1 ou RHOA, en passant de leur forme active GTP à leur forme inactive GDP, contrôlent les changements de conformation du cytosquelette de la cellule. Elles interagissent également avec les protéines du complexe PAR, et participent ainsi à la régulation des jonctions serrées. Ainsi, la protéine RAC1, son activateur TIAM1, permet la bonne localisation des protéines ZO-1, claudine 1 et occludine (Mertens AE *et al*, 2005), CDC42 facilite l'interaction entre aPKC et PAR-6 (Joberty G *et al*, 2000 ; Nishimura T *et al*, 2005) et la protéine effectrice de RhoA, la kinase RHO, inhibe l'activité du complexe PAR en phosphorylant PAR-3 (Nakayama M *et al*, 2008). Un défaut de signalisation des protéines GTPases, tout comme une mauvaise localisation ou un défaut d'expression ou de phosphorylation des protéines du complexe PAR, peut donc contribuer à des défauts dans l'assemblage et le désassemblage des jonctions serrées (Traweger A *et al*, 2008) et par conséquent, à une déficience de la polarité apico-basale.

c- Le complexe SCRIBBLE

Le complexe protéique SCRIBBLE est le gardien de l'intégrité du domaine basolatéral et est nécessaire à l'établissement des jonctions intercellulaires. Ce complexe est constitué des 3 protéines SCRIBBLE (SCRIB), DLG (*Discs large*) et LGL (*Lethal giant larvae*).

Contrairement aux complexes CRUMBS et PAR, ce complexe ne forme pas de trimère via des interactions directes entre chaque membre. Seules les protéines **SCRIB** et **DLG** sont liées via leur domaine PDZ. La localisation de **LGL** dépend de sa phosphorylation. Pendant l'établissement du contact cellule-cellule, LGL forme de façon transitoire un complexe avec les protéines aPKC et PAR-6 (Plant PJ *et al*, 2003 ; Yamanaka T *et al*, 2003). Puis, aPKC phosphoryle LGL (Humbert PO *et al*, 2008), qui devient alors inactive (Yamanaka T et Ohno S, 2008), la maintenant au niveau latéral de la cellule. Ceci permet la formation d'un complexe aPKC/PAR6/PAR3 actif (**Figure 22**).

Des travaux menés chez la Drosophile ont montré que les cellules mutées pour le gène *Scrib* présentaient une mauvaise distribution des protéines de la membrane apicale, dont CRUMBS, qui se retrouve alors distribué au niveau des domaines apical et basolatéral (Bilder D et Perrinon N, 2000a). Les cellules ont alors une prolifération

cellulaire défectueuse et s'empilent les unes sur les autres. SCRIB permettrait ainsi, à la fois l'exclusion des protéines appartenant au domaine apical, dont CRUMBS, et la bonne localisation des protéines basales, par exclusion du complexe PAR (St Johnston D et Sanson B, 2011). D'autres travaux ont montré l'implication des protéines du complexe SCRIBBLE dans la formation et le maintien de l'intégrité des jonctions intercellulaires de type serrées (TJ) pour la protéine SCRIB (Qin Y *et al*, 2005 ; Stucke VM *et al*, 2007), ou de type adhérentes (AJ) pour la protéine DLG (Laprise P *et al*, 2004).

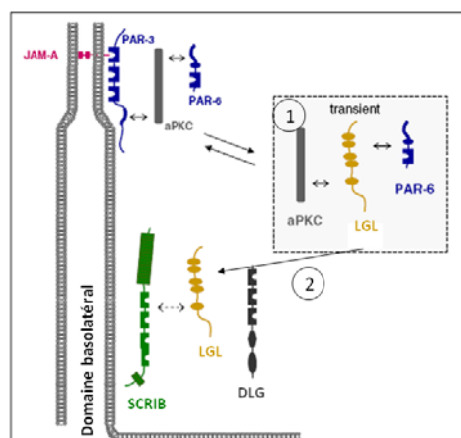


Figure 22: Représentation schématique du complexe SCRIBBLE. LGL forme un complexe transitoire avec les protéines aPKC et PAR-6 (1) et aPKC, en phosphorylant LGL, dissocie le complexe. LGL s'associe à SCRIB au niveau du domaine basolatéral (2), tandis que PAR-3 s'associe à PAR-6-aPKC pour participer à la formation des jonctions serrées. D'après K Ebnet, 2008.

Scrib, *Dlg* et *Lgl* ont été identifiés comme gènes suppresseurs de tumeurs chez *Drosophila melanogaster*, et leur implication dans la carcinogenèse chez l'Homme commence à être démontrée: leur perte ou leur mauvaise localisation a été observée dans les cancers du poumon, de la prostate, du colon ou du sein, et ce, dès le stade *in situ* (Zhan L *et al*, 2008 ; Vaira V *et al*, 2011). Des expériences *in vitro* ont montré que l'absence d'expression de SCRIB altérait la polarité cellulaire et la morphogenèse et induisait la transformation des cellules, *in vitro* et *in vivo*, par coopération avec des oncogènes, tels MYC (Zhan L *et al*, 2008 ; Huang L et Muthuswamy SK, 2010).

4-3. Conclusion

La mise en place de la polarité apico-basale épithéliale est un processus complexe, dynamique se déroulant en plusieurs étapes, qui fait intervenir les protéines de la matrice extracellulaire, des complexes de la polarité apico-basale et du cytosquelette. Tout d'abord, les interactions cellule-matrice, par l'intermédiaire des intégrines,

déterminent l'orientation de l'axe apico-basal. Cette étape fait intervenir les protéines du cytosquelette. Le réarrangement du cytosquelette est capital puisqu'il participe au renforcement de l'axe apico-basal en maintenant la morphologie asymétrique de la cellule et en assurant un transport intracellulaire orienté. Les interactions cellule-cellule se mettent ensuite en place: les jonctions adhérentes qui assurent la cohésion de l'épithélium, puis les jonctions serrées, responsables du maintien et de la distribution des protéines et des constituants membranaires au niveau apical et basal. L'ensemble est constamment régulé afin de maintenir une homéostasie épithéliale. Des dérégulations d'une seule de ces protéines peuvent entraîner des bouleversements cellulaires dramatiques (**Table 1**).

Protéine	Défaut	Lignée cellulaire	Phénotype observé	Référence
Complexe Crumbs				
CRB	Sous-expression	MDCK	Absence de TJ	Schluter MA, 2009
	Sous-expression	MDCK	Absence de formation de lumière	Karp CM, 2008
	Surexpression	MCF10A	Augmentation de la surface apicale et réduction de la membrane basolatérale	Fogg VC, 2005
PALS1	Sous-expression	MDCK	Défauts de formation des TJ (aPKC non recruté) et des AJ (E-cadhérine mal localisée) et absence de lumière	Straight W, 2004 Wang Q, 2007
PATJ	Sous-expression	MDCK	Défauts de formation des TJ et absence de lumière	Shin K, 2006
LIN7A	Sous-expression	MDCK	Défauts de formation des TJ. Perte d'expression de PALS1 et PATJ	Straight SW, 2006
Complexe Par				
PAR-6	Surexpression	MDCK	Défauts de formation des TJ: PAR-3 non recruté et ZO-1 mal localisé	Joberty G, 2000 Ebnet K, 2001
PAR-3	Perte d'expression	MDCK	Absence de TJ	Chen X, 2005
aPKC ζ	Sous-expression	MCF10A	Défauts de polarité apico-basale et absence de lumière	Whyte J, 2010
	Sous-expression	MDCK	Défauts de formation des TJ: PAR-3 et ZO-1 mal localisés	Suzuki A, 2001
Complexe Scrib				
SCRIB	Sous-expression	MDCK	Défauts de formation des AJ	Quin Y, 2005
	Sous-expression	MCF10A	Absence de lumière	Zhan L, 2008
DLG	Sous-expression	Caco-2	Absence de E-cadhérine au niveau des AJ	Laprise P, 2004
	Sous-expression	Caco-2	Absence de formation des TJ	Stucke VM, 2007
LGL	Surexpression	HEK-293	Augmentation de l'adhésion cellulaire	Schimanski CC, 2005

Table 1: Effet de la dérégulation de l'expression des protéines de la polarité sur la polarité apico-basale de cellules issues de lignées épithéliales. MDCK: lignée épithéliale normale de rein. MCF10A: lignée humaine issue d'un épithélium mammaire normal. Caco2: lignée de carcinome colorectal humain. HEK-293: lignée épithéliale humaine normale de rein. AJ: jonction adhérente. TJ: jonction serrée.

5- Polarité et cancer

Dans les tissus normaux, et pour assurer leur fonction, les cellules épithéliales doivent adhérer de façon cohésive entre elles et se coordonner avec les cellules voisines. L'établissement et le maintien de la polarité apico-basale est le pré-requis pour la formation d'un tissu épithélial fonctionnel. Cependant, la dérégulation d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs induisent une prolifération cellulaire anarchique avec une altération de l'organisation tissulaire. Dans la carcinogenèse de bas grade (hyperplasie canalaire atypique et carcinome canalaire *in situ* de bas grade), la polarité et l'architecture tissulaires sont plutôt bien conservées. En revanche, dans les lésions carcinomateuses de haut grade, ou dans la carcinogenèse des types histologiques spéciaux (lobulaire, mucineux), la perte de la polarité cellulaire et/ou de contact avec la matrice extracellulaire sont des éléments clés de la progression tumorale. Il faut noter que l'agressivité tumorale est due, entre autre, à une augmentation des propriétés d'invasion via la transition épithélio-mésenchymateuse (Shin K *et al*, 2006) et la résistance à l'anoïkis (Kim Y-N *et al*, 2012 ; Singh AB *et al*, 2012 ; Frisch SM *et al*, 2013). La compréhension des mécanismes qui aboutissent à la perte de polarité cellulaire ainsi qu'à leurs conséquences apparaît donc fondamentale.

5-1. Altérations des protéines de la polarité dans les carcinomes

Même si quelques types rares de cancers du sein sont caractérisés par le maintien d'une polarité cellulaire (carcinomes tubuleux, carcinomes cribriformes), généralement, la transformation du tissu dans les cancers est associée à la perte de la polarité apico-basale. Les mécanismes qui aboutissent à cet événement sont encore mal connus. Toutefois, dans de nombreux cancers, on peut observer une altération de l'expression (l'exemple le plus connu étant la perte d'expression de la E-cadhérine dans les cancers du sein de type lobulaire) et/ou de la localisation subcellulaire des protéines de la polarité (**Table 2**).

a- Modifications de l'expression suivant le type de cancer

Les membres des complexes impliqués dans la polarité apico-basale sont souvent dérégulés dans les cancers (**Table 2**). Cette dérégulation peut être tissu-dépendante, comme le montre par exemple l'expression des claudines 1 et 4, ou spécifique d'une isoforme donnée (cas de la protéine aPKC). La claudine 1 est fortement exprimée dans les cancers colorectaux (Miwa N *et al*, 2001), alors qu'elle est sous-exprimée dans des formes agressives de cancers du sein (Morohashi S *et al*, 2007). Une forte expression de la claudine 4 est observée dans les cancers ovariens (Rangel LB *et al*, 2003) et mammaires (Lanigan F *et al*, 2008), tandis qu'elle est très peu exprimée dans les tumeurs de l'estomac

Protéine	Défauts	Tissus tumoral	Phénotype observé	Références
Jonctions adhérentes				
E-CADH	Perte d'expression	Sein (lobulaire) Estomac	Absence de jonctions adhérentes Absence de jonctions adhérentes	Jeanes A, 2008 Oda T, 1994 ; Becker KF, 1994
β-CAT	Sous-expression/ mauvaise localisation	Estomac	Perte d'adhésion cellulaire	Huiping C, 2001
α-CAT	Absence d'expression	Peau	Hyperprolifération et mauvaise orientation du fuseau mitotique	Visvader JE, 2011
Jonctions serrées				
Claudine 1	Surexpression	Colon	Défauts de cytocinèse	Miwa N, 2001
	Sous-expression	Sein (« Claudin-low »)	Perte d'adhésion cellulaire	Morohashi S, 2007
Claudine 2	Sous-expression	Sein	Agressivité	Kim TH, 2008
Claudine 7	Sous-expression	Sein	Agressivité	Kominsky SL, 2003
Claudine 4	Surexpression	Sein , ovaire		Lanigan F, 2007 ; Rangel LB, 2003
	Sous-expression	Estomac		Ohtani S, 2009
Complexe Par				
PAR-3	Absence d'expression/ sous-expression	Œsophage Sein	Altération des jonctions intercellulaires Inhibition de la cohésion cellulaire et invasion, métastases	Zen K, 2009 Xue B, 2012
PAR-6	Surexpression	Sein (luminal)	Hyperprolifération	Nolan ME, 2008
	Surexpression/ phosphorylation	Sein (BRCA1 ^{-/-})	Absence de lumière, altérations des jonctions cellulaires, métastases	Viloriati-Petit AM, 2009
aPKCζ	Surexpression	Foie, voies digestives supérieures Voies urinaires, pancréas	Hyperprolifération Invasion et métastases	Tsai JH, 2000 Langzam L, 2001
	Sous-expression	Sein	Mauvais pronostic	Whyte J, 2010
aPKCλ/ι	Surexpression et mauvaise localisation	Ovaire	Agressivité	Grifoni D, 2007
	Surexpression et phosphorylation	Foie	Invasion et métastases	Du GS, 2009
	Surexpression	Sein Poumon non à petites cellules Pancréas	Invasion et métastases Agressivité Angiogenèse et métastases	Kojima Y, 2008 Regala RP, 2005 Zen K, 2009
Complexe SCRIB				
SCRIB	Sous-expression/ mauvaise localisation	Col de l'utérus Colon Sein	Invasion Perte de l'architecture tissulaire Perte de la polarité apico-basale et	Nakagawa S, 2004 Gardioli D, 2006 Zhan L, 2008
		Endomètre, prostate	inhibition de l'apoptose	Ouyang Z, 2010 ; Pearson HB, 2011
DLG	Sous-expression/ mauvaise localisation	Col de l'utérus, colon, rein	Perte de l'architecture et défauts de cytocinèse	Cavatorta AL, 2004
LGL	Sous-expression/ mauvaise localisation	Sein , prostate, poumon, ovaire	Altération de la polarité et hyperprolifération	Grifoni D, 2004
	Sous-expression	Estomac, peau Colon	Altération architecture tissulaire Invasion et métastases	Lisovsky M, 2009 ; Kuphal S, 2006 Schimanski CC, 2005

Table 2: Conséquences des défauts d'expression des protéines de la polarité dans les cancers humains. Adapté de L Huang et SK Muthuswamy, 2010 ; SIJ Ellenbroek *et al*, 2012 ; F Martin-Belmonte et M Perez-Moreno, 2011.

(Ohtani S *et al*, 2009). Dans les deux cas, son niveau d'expression est associé à un mauvais pronostic.

L'isoforme λ/ι de aPKC est surexprimée dans les cancers du foie (Du GS *et al*, 2009), des ovaires (Eder AM *et al*, 2005 ; Grifoni D *et al*, 2007) et du sein, où sa délocalisation du pôle apical est corrélée avec le caractère invasif de la maladie (Kojima Y *et al*, 2008). aPKC ζ est sous-exprimée dans les cancers de la prostate (Powell CT *et al*, 1994) et est surexprimée dans cancers du foie (Tsai JH *et al*, 2000), des voies digestives supérieures, des voies urinaires (Langzam L *et al*, 2001) et des formes peu agressives du cancer du pancréas, où l'on observe par contre une surexpression de l'isoforme ι .

Une même protéine peut donc avoir un rôle ambivalent, pro- ou anti-oncogénique, selon le contexte tissulaire. Plus que son expression seule, on peut plutôt supposer que c'est sa localisation subcellulaire ou sa bonne association avec les autres membres des complexes moléculaires impliqués dans la polarisation qui joue un rôle déterminant.

b- Altérations de la localisation subcellulaire

La protéine SCRIB est surexprimée dans environ un tiers des cancers du sein, sous-exprimée dans la moitié des cas, et mal localisée dans 50% des lésions *in situ* du sein, (Zhan L *et al*, 2008), les cancers de l'endomètre (Ouyang Z *et al*, 2010) ou de la prostate (Pearson HB *et al*, 2011). Des travaux réalisés sur la lignée épithéliale MCF10A issue d'un épithélium mammaire normal cultivée en 3-D dans du matrigel ont montré que seule une mauvaise localisation de SCRIB suffisait à induire une hyperprolifération des cellules épithéliales et désorganisait la morphologie des *acini* obtenus, en inhibant la formation de la lumière centrale. Des expériences complémentaires *in vitro* et *in vivo* ont montré que SCRIB coopère avec l'oncogène *c-Myc* pour transformer les cellules, en activant la voie de signalisation RAC-JNK-JUN (Zhan L *et al*, 2008).

5-2. Les protéines de la polarité sont des régulateurs de la carcinogenèse

L'altération quantitative ou qualitative des protéines de la polarité peut agir sur de multiples processus biologiques, comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration, la transition épithélio-mésenchymateuse ou encore l'orientation du fuseau mitotique, conduisant ainsi à l'initiation ou à la progression tumorale.

a- La prolifération cellulaire

Certaines protéines impliquées dans l'établissement et/ou le maintien de la polarité apico-basale agissent comme régulateur du cycle cellulaire. Des travaux ont montré que la surexpression de PAR-6, qui permet l'interaction entre CDC-42 et aPKC ζ , induit la prolifération cellulaire de la lignée épithéliale mammaire MCF10A en activant la

voie de signalisation MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), et ce, indépendamment de la présence de facteurs de croissance (Nolan ME *et al*, 2008). Des travaux complémentaires menés sur la lignée tumorale mammaire MCF7 ont montré que la sous-expression de PAR-6 inhibe la prolifération de la lignée, ce qui indique que le complexe PAR-6-aPKC est un important régulateur de la prolifération cellulaire, à la fois dans des modèles de lignées épithéliales mammaires normales et tumorales.

D'autres travaux ont montré que la protéine aPKC ζ peut également réguler la prolifération cellulaire, via son interaction avec le récepteur aux stéroïdes SRC-3 (Yi P *et al*, 2008) qu'elle stabilise (inhibition de sa dégradation par le protéasome) en le phosphorylant.

Des études réalisées sur la drosophile ont montré que les gènes *lgl*, *dlg* et *scrib* régulent négativement la prolifération cellulaire (Bilder D *et al*, 2000b) et que leur invalidation induit la surexpression du gène prolifératif CycE et augmente le nombre d'entrée en phase S du cycle cellulaire (Brumby A *et al*, 2004).

Le rôle des protéines du complexes SCRIBBLE dans la régulation de la prolifération cellulaire des cellules de mammifères est moins bien caractérisé. Cependant, une diminution du niveau protéique de la protéine SCRIB a été observé dans les cellules infectées par le papillomavirus humain de type 16 (HPV-16), impliqué dans la majorité des cancers du col de l'utérus: ces cellules tumorales, ayant perdu leur polarité cellulaire, migrent plus vite (Thomas M *et al*, 2008). Des expériences *in vitro* de surexpression ou d'invalidation de la protéine par des approches d'interférence à l'ARN ont confirmé ces résultats (Nagasaka K *et al*, 2006).

b- L'apoptose

Les travaux de Zhan et collaborateurs (Zhan L *et al*, 2008) ont montré que SCRIB pouvait agir comme régulateur d'apoptose dans les cellules épithéliales mammaires. La mise en culture en 3D de la lignée issue d'un épithélium mammaire normal, MCF10A, permet de reconstituer des structures glandulaires avec une seule couche de cellules polarisées centrées sur une lumière. L'absence d'expression de SCRIB ou sa mauvaise localisation aboutit à la formation de glandes constituées de plusieurs couches cellulaires, sans lumière centrale: l'absence d'expression de SCRIB inhibe donc l'apoptose centrale. Ces travaux démontrent que la correcte localisation de la protéine SCRIB au niveau des jonctions intercellulaires du domaine latéral est primordiale pour établir une morphologie mammaire normale et résister à une transformation induite par l'oncogène *c-Myc*.

La protéine aPKC peut également réguler l'apoptose des cellules épithéliales. Dans le modèle de lignée épithéliale mammaire MCF10A surexprimant l'oncogène ERBB2, Aranda et collaborateurs ont montré que l'activation de ERBB2 permet son interaction avec le complexe PAR-6-aPKC, ce qui entraîne une mauvaise localisation des protéines ZO-1 et PAR-6, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité des

jonctions serrées (Aranda V *et al*, 2006). La protéine PAR-3 se dissocie alors du complexe PAR-6-aPKC et l'apoptose centrale régulée normalement par aPKC (Whyte J *et al*, 2010) est inhibée.

c- La migration cellulaire

Les protéines PAR-3, PAR-6, aPKC, SCRIB, DLG et LGL sont re-localisées au pôle avant (front de migration) des cellules dans les mécanismes de motilité cellulaire. Elles jouent un rôle important dans le choix du sens migratoire, en participant au positionnement du centrosome (Schmoranz J *et al*, 2009) ou au recrutement des protéines Rac1 et CDC-42 au front de migration (Etienne-Manneville S, 2008). On peut imaginer aisément qu'une simple délocalisation subcellulaire ou un défaut d'expression d'une protéine de la polarité puisse perturber l'orientation et la migration de la cellule. Osmani et collaborateurs ont d'ailleurs montré que la dérégulation de l'expression de la protéine SCRIB altérerait la migration des astrocytes (Osmani N *et al*, 2006).

La modification des caractéristiques du phénotype épithélial est souvent associée à la progression métastatique. La migration et le caractère invasif des cellules sont alors liés à de profondes modifications architecturales intracellulaires, ce qui suggère l'implication des protéines de la polarité dans ces mécanismes. Un criblage génétique chez la Drosophile a montré que des mutations des gènes de la polarité *Scrib*, *Dlg*, *Lgl*, *Baz/Par3* et *Cdc42*, dans un contexte *Ras* muté, pouvaient induire la dégradation de la matrice extracellulaire, la perte de l'expression de la E-cadhérine, la migration et l'invasion cellulaires ainsi que la formation de métastases (Pagliarini RA *et al*, 2003). Les protéines PAR jouent également un rôle déterminant durant la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGFβ. Par exemple, des travaux ont montré que l'expression de la protéine PAR-3 est régulée négativement par le TGFβ (Wang X *et al*, 2008), qui induit alors la dissociation du complexe PAR-6-aPKC et la redistribution de PAR-6 des jonctions serrées vers le cytoplasme. La protéine PAR-6 libre est alors phosphorylée et se lie à SMURF1, induisant la dégradation de la protéine RHOA GTPase et la dissociation des jonctions serrées (Viloria-Petit AM *et al*, 2009). Les équipes de Aigner et Spaderna ont montré que, dans les cancers du sein et du colon, le facteur de transcription ZEB1 inhibe l'expression des protéines Crumbs, LGL-2 et PATJ et induit une EMT (Aigner K *et al*, 2007). La ré-expression de LGL-2 dans ces cellules restaure leur phénotype épithélial et bloque l'invasion cellulaire (Spaderna S *et al*, 2008).

d- L'orientation du fuseau mitotique

L'orientation de la division cellulaire peut influencer sur le positionnement des cellules filles, et donc sur la taille et l'organisation d'une structure en 3 dimensions en cours de développement. Suite à des travaux récents, émerge l'idée que les protéines de la polarité jouent également un rôle dans l'orientation du fuseau mitotique. La formation de la lumière intestinale dans la lignée épithéliale Caco-2 nécessite que le

fuseau mitotique soit orienté de façon perpendiculaire par rapport au centre du kyste. Une altération quantitative ou qualitative des protéines CDC42 ou PAR-6 orientent de façon aléatoire le fuseau mitotique, créant ainsi des kystes avec de nombreuses lumières, mais formés de cellules à la polarité apico-basale pourtant normale (Jaffe AB *et al*, 2008 ; Durgan J *et al*, 2011). Des expériences *in vitro* effectuées sur la lignée MDCK ont confirmé l'intervention de la protéine CDC42 dans l'orientation du fuseau mitotique et la formation de la lumière centrale (Rodriguez-Fraticelli A *et al*, 2010). On peut imaginer que les altérations des protéines de la polarité, en agissant sur l'orientation du fuseau mitotique ou les microtubules, puissent provoquer des défauts de cytokinèse et de ploïdie.

5-3. Conclusion

La rupture de la polarité cellulaire et de l'organisation tissulaire est un événement important dans l'initiation et la progression de la tumorigenèse, et c'est pourquoi l'altération des complexes de la polarité, de façon intrinsèque ou induite par des oncogènes, peut potentiellement avoir une action cruciale sur le développement des tumeurs dans des tissus normaux organisés *in vivo*.

Différents travaux ont montré que la dérégulation des protéines appartenant aux trois complexes majeurs impliqués dans la régulation de la polarité contribue à différentes étapes de transformation ou de progression tumorales. En effet, ces protéines peuvent agir à la fois comme gènes suppresseurs de tumeurs (SCRIB, DLG, LGL, PAR-3), dont l'absence d'expression peut induire la formation de tumeurs, ou au contraire comme oncogènes (protéines aPKC et PAR-6), dont la surexpression est directement liée à la formation de métastases (Kojima Y *et al*, 2008). Leur mauvaise localisation subcellulaire est également un facteur clé de la carcinogenèse. D'autres travaux ont montré qu'elles étaient en plus de réels régulateurs de nombreux processus biologiques, comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire ou encore l'orientation du fuseau mitotique. Ces observations fonctionnelles ont été établies *in vitro* sur des lignées cellulaires.

Une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent les interactions coopératives ou antagonistes engagées par les différentes protéines de la polarité pour établir et/ou maintenir la polarisation cellulaire, et les voies de signalisation qu'elles régulent, est nécessaire pour élucider comment les cellules modulent la plasticité tissulaire. Ceci peut nous aider à exploiter de nouvelles voies thérapeutiques anti-cancéreuses, telle la restauration de la polarité ou la différenciation des carcinomes.

Objectifs de mon travail de thèse

Ce travail s'inscrit dans le cadre général du projet co-dirigé par le Dr Olivier Delattre et le Dr Anne Vincent-Salomon sur l'étude de l'hétérogénéité phénotypique et moléculaire des carcinomes du sein.

La carcinogenèse mammaire est induite par l'accumulation d'altérations génomiques pouvant modifier l'organisation cellulaire, conduisant à la perte de l'asymétrie des cellules. Cette perte de polarité cellulaire est souvent corrélée au caractère invasif et agressif des tumeurs. L'objectif de nos recherches est d'élucider les conséquences des modifications des mécanismes moléculaires qui régulent la polarité cellulaire dans les cellules épithéliales mammaires, normales et carcinomateuses.

Nous nous sommes intéressés à deux types de carcinomes mammaires infiltrants, les carcinomes lobulaires (ILC) et les carcinomes micropapillaires (IMPC). Ces deux types tumoraux présentent des défauts de polarisation et d'adhésion à la matrice extracellulaire, et représentent donc, du fait du côté systématique de leurs défauts, de bons modèles d'étude de la perturbation de la polarité dans la carcinogenèse mammaire.

Notre démarche a été la suivante:

- Etablir une cohorte conséquente et représentative de ces tumeurs rares.
- Caractériser ces tumeurs, de façon la plus exhaustive possible, au niveau phénotypique, génomique et transcriptomique.
- Identifier des altérations communes au sous-type tumoral étudié, potentiellement responsables des anomalies de la polarité et/ou de l'adhésion à la matrice extracellulaire.
- Etablir un modèle *in vitro* afin de mieux caractériser le(s) gène(s) candidat(s).

1- Les carcinomes infiltrants de type lobulaire

Les cancers du sein infiltrant de type lobulaire représentent le deuxième type de cancer du sein infiltrant en terme de fréquence (10-15%). Son incidence est en constante augmentation (Li CI *et al*, 2003) depuis 30 ans, surtout chez des femmes de plus de 50 ans. Ces tumeurs expriment les récepteurs aux oestrogènes (RO⁺ dans 80 à 95% des cas) et à la progestérone (RP⁺ dans 60 à 70% des cas). Elles sont souvent de bas grade (I/II) et ne surexpriment pas ERBB2 (Arpino G *et al*, 2004 ; Viale G *et al*, 2009 ; Weigelt B *et al*, 2010).

Sur le plan histologique, ces tumeurs sont caractérisées par une prolifération de cellules rondes, régulières, non cohésives entre elles (**Figure 23**) et sont associées à du carcinome lobulaire *in situ* dans 80 à 90% des cas.

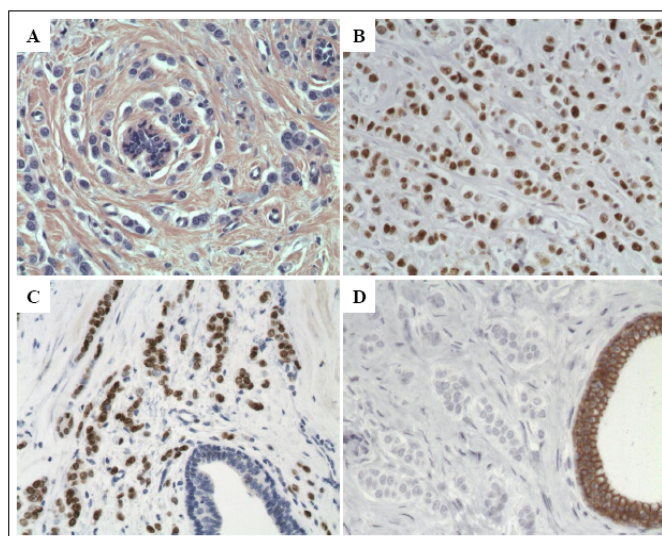


Figure 23: Caractérisation phénotypique des ILC. Les cellules carcinomateuses sont des cellules dyscohésives (A), exprimant les récepteurs aux oestrogènes (B) et à la progestérone (C), mais ayant perdu l'expression de la E-cadhérine (D).

Même si le pronostic des patientes atteintes d'ILC n'est pas très différent de celui des patientes atteintes d'IC-NST (Sastre-Garau X *et al*, 1996 ; Arpino G *et al*, 2004 ; Viale G *et al*, 2009), il a été montré que ces tumeurs étaient peu sensibles à la chimiothérapie (Tubiana-Hulin M *et al*, 2006 ; Katz A *et al*, 2007) et présentaient souvent des métastases dans plusieurs sites atypiques, tels que les os, l'estomac, l'intestin, le péritoine et les ovaires (Lamovec J et Bracko M, 1991 ; Sastre-Garau X *et al*, 1996 ; Ferlicot S *et al*, 2004 ; Vargas AC *et al*, 2009).

Ces tumeurs ont une particularité biologique: leurs jonctions adhérentes sont altérées. En effet, elles n'expriment plus les molécules d'adhérence intercellulaire E-cadhérine et β -caténine, et présentent une mauvaise localisation de la P120-caténine (localisations cytoplasmique et nucléaire), et ce, du stade de lésion pré-tumorale au stade métastatique (Sarrio D *et al*, 2003 ; Daabs DJ *et al*, 2007).

Des profils génomiques réalisés sur ces tumeurs ont montré la récurrence de la perte du bras long du chromosome 16, associée au gain des chromosomes 1q et 16p (Nishizaki T *et al*, 1997 ; Ezzell JE *et al*, 2001 ; Loo LW *et al*, 2004 ; Simpson PT *et al*, 2008). D'autres altérations, moins fréquentes ont également été mises en évidence, telles que le gain du bras chromosomique 8q, les amplifications des régions 8p12-p11.2 et 11q13 ou les pertes des régions 8p23-p21, 11q14.1-q25 et 13q (Simpson PT *et al*, 2008).

A l'heure actuelle, la seule altération génique directement mise en cause dans ces tumeurs est l'inactivation du gène *CDH1*, localisé dans la région 16q22.1, qui code pour la E-cadhérine (Vos CB *et al*, 1997). Différents mécanismes d'inactivation de ce gène aboutissent à la perte d'expression de la protéine: la méthylation du promoteur du gène, les mutations inactivatrices somatiques du gène ou la perte du bras long du chromosome 16 ou plus particulièrement de la région 16q22.1 (Berx G *et al*, 1995 ; Droufakou S *et al*, 2001 ; Sarrio D *et al*, 2003 ; Loo LW *et al*, 2004).

Parallèlement, des études transcriptomiques ont montré une dérégulation de certains gènes impliqués dans l'adhésion cellule-matrice extracellulaire ou la constitution de la matrice extracellulaire (Bertucci F *et al*, 2008 ; Weigelt *et al*, 2010 ; Castellane B *et al*, 2012).

2- Les carcinomes infiltrants de type micropapillaire

Les cancers du sein de type micropapillaire sont des tumeurs rares qui représentent moins de 2% des cancers du sein de type infiltrant. Ces tumeurs présentent un aspect morphologique très particulier et différent des autres carcinomes. En effet, les cellules carcinomateuses s'organisent en massifs de cellules cohésives entre elles, détachées de la matrice extracellulaire par un espace clair de rétraction et présentent une polarité dite inversée: le pôle apical MUC-1⁺ est orienté vers l'espace clair de rétraction (**Figure 24**) (Peterse JL, 1993 ; Nassar H *et al*, 2004 ; Pettinato G *et al*, 2004 ; Li YS *et al*, 2006).

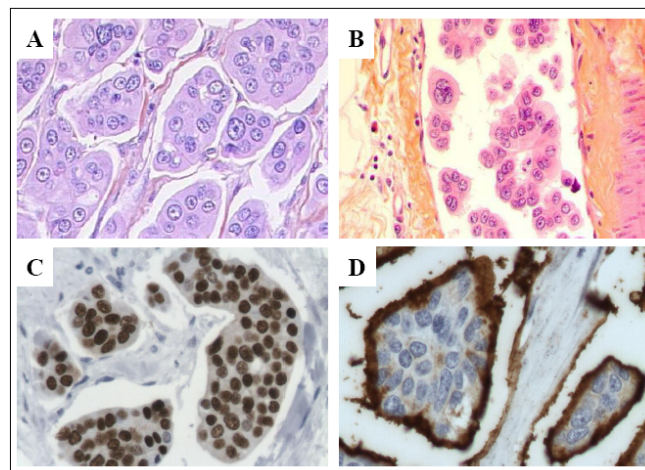


Figure 24: Caractérisation phénotypique des IMPC. Les cellules carcinomateuses sont organisées en massifs de cellules cohésives détachées de la matrice extracellulaire par un espace clair de rétraction (A). Les IMPC présentent de nombreux emboles néoplasiques (B). Ces tumeurs sont caractérisées par une forte expression du récepteur α aux oestrogènes (C) et une polarité apico-basale dite inversée: le pôle apical MUC-1⁺ est orienté vers l'espace clair de rétraction (D).

Les IMPC sont des tumeurs majoritairement positives pour l'expression de RO (60 à 100% des cas) et RP (45 à 80% des cas), plutôt de haut grade et associées à une atteinte axillaire métastatique fréquente, et ce, indépendamment de leur grade: 65% contre 20% pour les IC-NST (Pettinato G *et al*, 2004). L'amplification du gène *ERBB2*,

associée à la surexpression de la protéine (mesurée 3+ en immunohistochimie) a été observée dans 10 à 35% des cas (Kuroda H *et al*, 2004 ; Marchio C *et al*, 2008).

Le pronostic de ces tumeurs a été décrit comme défavorable (Paterakos M *et al*, 1999 ; Walsh MM *et al*, 2001 ; Li YS *et al*, 2006), mais reste controversé: seules des petites séries ont été étudiées, et lorsqu'on les compare à des IC-NST présentant le même envahissement ganglionnaire, leur pronostic est le même (Nassar H *et al*, 2001).

Au point de vue génétique, ces tumeurs peuvent présenter des altérations génomiques communes aux IC-NST (8q+, 17q+, 20q+), mais en fréquence différente, associées à des pertes spécifiques des bras chromosomiques 6q et 13q (Thor AD *et al*, 2002 ; Marchio C *et al*, 2008). Des études menées sur des petites séries ont également rapportés des amplifications des gènes *MYC*, *CCND1* et *FGFR1* (Marchio C *et al*, 2008).

Les profils transcriptomiques réalisés sur ce type tumoral ont montré que ces tumeurs étaient classées avec les tumeurs de type luminal A (grade I ou II avec un faible index mitotique) ou luminal B (grade II avec un fort index mitotique ou III).

3- Choix du modèle *in vitro*

3-1. Les cellules MCF10A

Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur les cellules MCF10A. Ces cellules épithéliales, immortalisées spontanément mais non transformées, sont issues d'un épithélium mammaire humain normal.

Le caractère normal de ces cellules réside dans le fait qu'elles 1) présentent un caryotype quasi-diploïde avec quelques réarrangement interstitiels (**Figure 25A**), 2) sont dépendantes de facteurs de croissance exogènes pour pouvoir pousser *in vitro* (insuline, EGF, etc ...), 3) ne forment pas de tumeurs lorsqu'elles sont injectées chez la souris Nude et 4) n'ont pas de pouvoir transformant (Soule HD *et al*, 1990).

Néanmoins, les cellules MCF10A sont des cellules qui présentent des caractéristiques basales. En effet, l'analyse non supervisée des données transcriptomiques issues de lignées cellulaires cultivées en mono couche montre que les cellules MCF10A sont classées avec d'autres lignées tumorales basales, telles MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-54.9 (**Figure 25B**). Des expériences d'immuno-histochimie réalisées sur ces cellules montrent qu'elles n'expriment pas les récepteurs hormonaux RO et RP (marqueurs luminaux), mais les marqueurs de type basal, comme CK14 et P63 (**Figure 25C**).

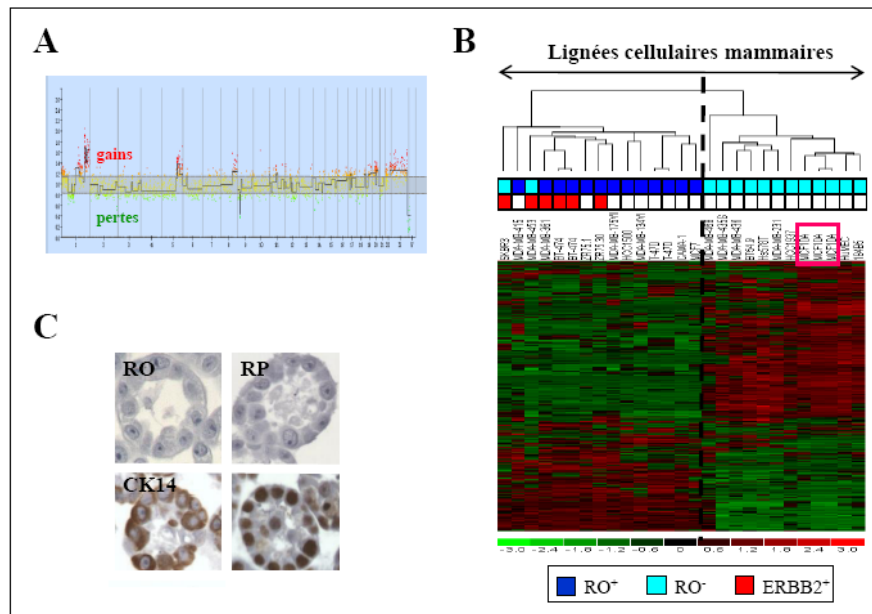


Figure 25: Caractéristique génomique et phénotypique de la lignée cellulaire MCF10A, issue d'un épithélium mammaire normal. (A) Profil génomique obtenue sur puce à ADN (résolution de 1,2 Mb). (B) Clustering hiérarchique non supervisé de 23 lignées mammaires humaines. (C) Absence d'expression des marqueurs luminaux RO et RP et expression des marqueurs basaux CK14 et P63 par les cellules MCF10A cultivées en 3-D pendant 11jours.

3-2. Culture en 3 dimensions

En raison de la complexité de la situation *in vivo*, les systèmes de culture en trois dimensions (3-D) semblent plus appropriés, afin de mieux reproduire et comprendre les détails mécanistiques des différentes interactions cellules-cellules et/ou cellules-matrice. Des études ont déjà montré l'insuffisance de la culture en mono couche. En revanche, il a été montré que l'environnement 3-D induisait une polarité proche de la situation *in vivo* des cellules épithéliales, ainsi que leur différenciation (Kenny PA *et al*, 2007).

Les cellules MCF10A représentent un excellent modèle d'étude de la polarité cellulaire. En effet, lorsqu'elles sont cultivées en 3-D dans du Matrigel™ (*Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced*), elles forment des lobules glandulaires constitués majoritairement de cellules bien polarisées, en une seule couche cellulaire, avec une lumière centrale nette (**Figure 26**), mimant parfaitement la structure glandulaire mammaire *in vivo* (Muthuswamy SK *et al*, 2001 ; Debnath J *et al*, 2003).

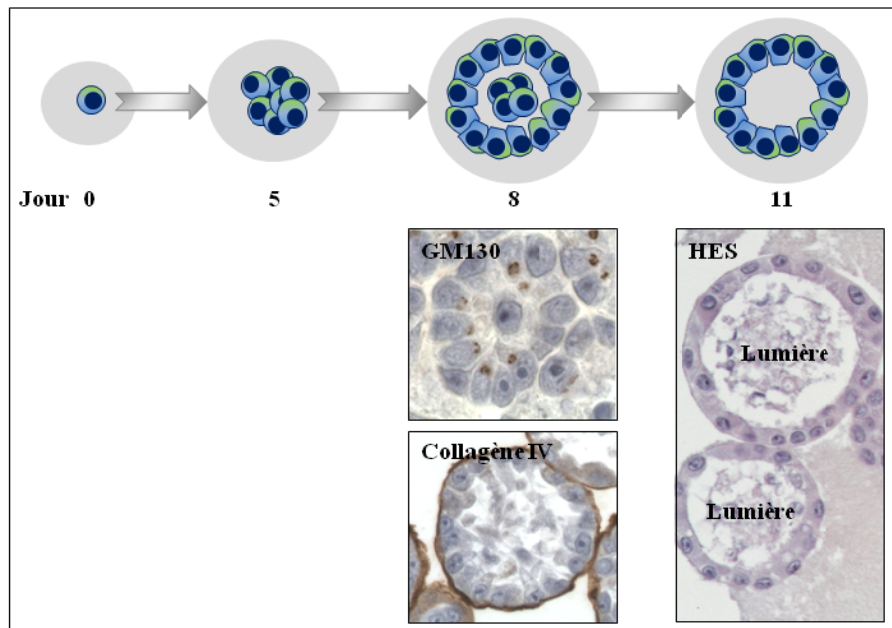


Figure 26: Culture de la lignée MCF10A en 3-D dans du Matrigel™. Après 11 jours de culture en Matrigel™, les cellules s'organisent en lobules glandulaires constitués de cellules bien polarisées, disposées en une seule couche cellulaire, avec une lumière centrale nette.

4- Conclusion

L'étude de gènes candidats, par une approche de surexpression ou d'inactivation (sh ou siRNA) nous permettra donc d'étudier les conséquences des dérégulations de ces gènes sur la polarité apico-basale des cellules épithéliales mammaires.

Progresser dans la compréhension de ces mécanismes de dérégulation de la polarité et de l'adhésion pourrait nous permettre à terme, 1) de mieux comprendre certains mécanismes liés à la progression tumorale, 2) d'identifier de nouveaux marqueurs d'intérêt potentiel pour le diagnostic et, à terme, 3) d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Résultats et Discussion

1- Anomalies des gènes de l'adhésion cellulaire dans les carcinomes invasifs de type lobulaire.

Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma.

Gruel N, Lucchesi C, Raynal V, Rodrigues MJ, Pierron G, Goudefroye R, Cottu P, Reyat F, Sastre-Garau X, Fourquet A, Delattre O, Vincent-Salomon A.

***Eur J Cancer*, 2010, 46: 2399-2407.**

Les cellules tumorales des ILC sont des cellules rondes, régulières et non cohésives entre elles, ce qui en fait un bon modèle d'étude des défauts de polarisation et d'adhésion à la matrice extracellulaire dans la carcinogenèse mammaire. A l'heure actuelle, un défaut majeur de la polarité a été largement décrit et documenté dans ces tumeurs: l'absence de jonctions adhérentes, dû à la perte d'expression de la E-cadhérine (Acs G *et al*, 2001 ; Wahed A *et al*, 2002) et ce, dès le stade *in situ* (Vos CB *et al*, 1997).

Afin d'identifier d'autres altérations de la polarité cellulaire ou les défauts d'adhésion cellule-matrice, qui pourraient expliquer la forte fréquence de métastases viscérales associées à ces tumeurs, nous avons réalisé une étude combinée génome/transcriptome sur une série de 21 carcinomes lobulaires purs, comparée à 41 IC-NST RO⁺ et de même grade (Table 3).

Paramètres		ILC (n=21) n (%)
Age médian au diag (années):		59
RO :	positif	21 (100)
RP:	positif	17 (81)
Grade:	I	12 (57)
	II	3 (38)
	III	1 (5)
Statut gg:	neg	14 (70)
	1 to 3	2 (10)
	>3	4 (20)
E-CADH:	pos	1 (5)
Génomique:	del 16q22.1	16 (86)
	CCND1 ^{AMP*}	5 (24)

Table 3: Caractéristiques cliniques et phénotypiques des ILC. Statut gg: statut ganglionnaire. RO: Récepteur aux oestrogènes. RP: Récepteur à la progestérone. E-CADH : E-cadhérine. pos: positif. Del: délétion. *: le gène est amplifié si le rapport du signal tumeur/normal ≥ 2 à son locus (technique de CGH-array).

1-1. Analyse génomique

Les ILC sont caractérisés par des profils génomiques complexes, avec un grand nombre d'anomalies interstitielles et de rares amplifications.

Comme cela a déjà été montré dans une série un peu moins conséquente (Bertucci F *et al*, 2008), nous confirmons que les ILC présentent des altérations génomiques récurrentes (trouvées dans plus de 40% des cas) et communes avec les IC-NST RO⁺ de même grade, comme les gains des chromosomes 1q12-q44 (73% des ILC) et 16pter-p11.2 (45% des ILC) et les pertes des régions 16q11.2-q24.2 (84% des ILC) et 17pter-p12 (50% des ILC). Ces altérations communes, retrouvées dans la majorité des tumeurs (de 45 à 84% des ILC) pourraient suggérer un précurseur commun entre ces deux entités tumorales, hypothèse validée par la co-existence de lésions *in situ* canalaire et lobulaires dans plus de 60% des cas (Abdel-Fatah TM *et al*, 2007).

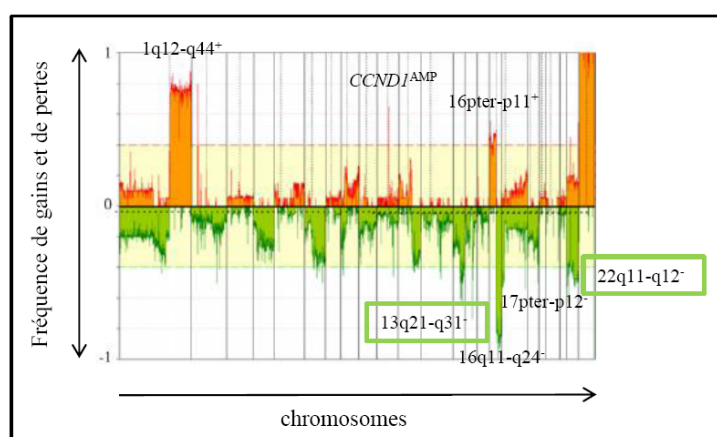


Figure 27: Altérations génomiques trouvées dans les ILC. Les gains sont indiqués en orange et les pertes en vert. Les altérations spécifiques de ce sous-type tumoral sont encadrées.

D'autres altérations génomiques distinguent spécifiquement les ILC des IC-NST. Parmi elles, nous avons mis en évidence l'amplification de la région 11q13.2-q13.4 dans 24% des cas analysés. Cette amplification est associée à la surexpression de la cycline D1 ($p\text{-val}=5\times 10^{-4}$). Nous avons également observé deux régions de perte spécifiques des ILC, jamais décrites aussi précisément dans les études précédentes : les régions 13q21-q31 et 22q11-q12, perdues respectivement dans 46% et 50% des cas. Ces régions contiennent notamment les gènes *KLF5* (13q22.1), dont la perte d'expression est corrélée à un mauvais pronostic (Kwak MK *et al*, 2008) et *CYSTA* (22q11.23), qui joue un rôle dans la stabilisation du cytosquelette d'actine et des microtubules, et dont la perte peut également induire des altérations de l'adhésion cellulaire.

1-2. Profil transcriptomique

L'analyse transcriptomique que nous avons réalisée montre que les ILC représentent une entité à part parmi les carcinomes infiltrants de type luminal (**Figure 28**). Nous avons confirmé que cette entité présentait une sous-expression de la E-cadhérine, associée à une dérégulation des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (*ADAM12*, *LOXL2*, *CEACAM5*, *CEACAM6*, *THBS4*, *SORBS1*). La protéine LOXL2 peut influencer qualitativement et quantitativement sur certaines protéines de la polarité. En effet, elle coopère avec SNAIL pour réprimer l'expression de la E-cadhérine (Peinado H *et al*, 2005). De plus, elle régule négativement l'expression et/ou altère la localisation subcellulaire des protéines PAR-3, Claudine 1 et LGL-2 (Moreno-Bueno G *et al*, 2011). Sa surexpression est associée à un mauvais pronostic (Peinado H *et al*, 2008 ; Barker *et al*, 2011). La série de tumeurs étudiées présente également une sous-expression de la protéine PAR-3. L'absence de jonctions adhérentes (absence d'expression de E-cadhérine) et serrées (sous-expression de PAR-3) pourrait ainsi expliquer le phénotype morphologique caractéristique des cellules tumorales de type lobulaire (*ie* petites cellules rondes).

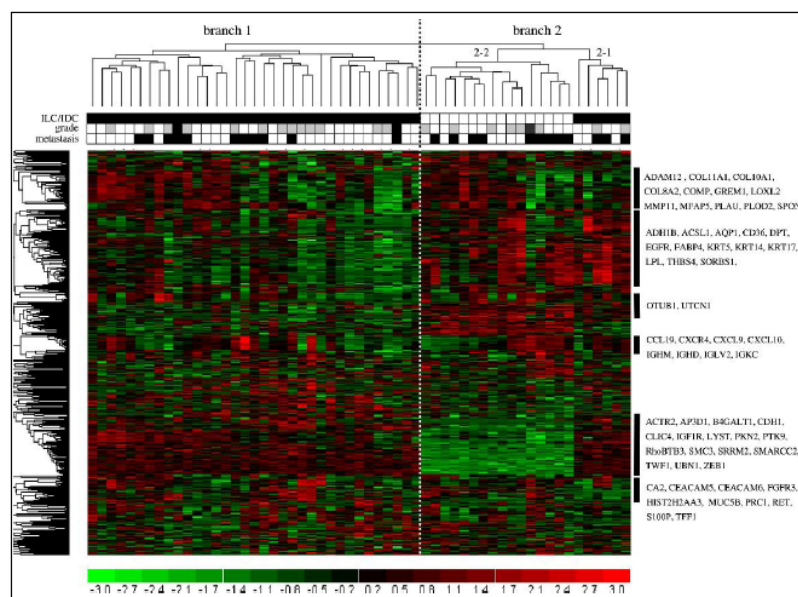


Figure 28: Expression différentielle entre les ILC et les IC-NST. Clustering hiérarchique non supervisé: chaque colonne représente une tumeur, chaque ligne, un gène. Statut histologique: ILC, blanc ; IC-NST, noir. Grade: I, blanc ; II, gris ; III, noir. Evènements (présence de métastases ou autres cancers), noir.

D'autres gènes impliqués dans l'adhésion à la matrice (*MMP11*, *ITGA2B*, *ITGA6*, *ITGB1*, *ITGB3*) et l'invasion (*TWF1*, *ACTR2*, *AQP1*, *PAK1*) sont également spécifiquement dérégulés dans les ILC. Cette dérégulation, associée à des défauts des constituants de

la matrice extracellulaire (sous-expression des collagènes 11 α 1, 1 α 1, 6 α 1, de la fibronectine et de la spondine, surexpression des laminines α 2, α 5, β 1, β 2 et β 3), pourrait expliquer la forte proportion de métastases observées chez ces patientes .

1-3. Conclusion

Les tumeurs de type lobulaire présentent un défaut majeur d'adhésion à la matrice extracellulaire (modulation d'expression des intégrines et de leurs ligands), accompagné d'une altération de la polarité apico-basale. En effet, les cellules carcinomateuses n'ont pas de jonctions adhérentes (absence d'expression de E-cadhérine), présentent des défauts des jonctions serrées (sous-expression de la protéine PAR-3) et surexpriment la protéine LOXL2, qui pourrait moduler l'expression ou la localisation subcellulaire de protéines de la polarité, telles LGL-2 et claudine 1, et, initier la formation de métastases, comme cela a déjà été montré dans les cancers du sein de type basal-like ou les carcinomes épidermoïdes. Cibler ces protéines pourrait représenter des pistes de thérapie de choix, visant à limiter la diffusion métastatique, surtout que l'on sait, qu'à l'heure actuelle, outre l'hormonothérapie, aucun traitement ciblé n'existe pour les carcinomes mammaires de type lobulaire.

Une analyse plus fine des altérations moléculaires retrouvées dans ces tumeurs nous a permis d'identifier d'autres cibles thérapeutiques et pourrait permettre, à terme, de proposer de nouveaux traitements. En effet, nous avons observé des amplifications du gène *CCND1* dans environ un quart des tumeurs analysées (24% des cas), conduisant à la surexpression de la cycline D1. Une thérapie ciblée par les inhibiteurs de l'hydrolase EglN2 pourrait donc être envisagée. En effet, des expériences *in vitro* réalisées sur la lignée RO⁺ T47D ont montré que l'hydrolase EglN2 contrôlait la carcinogénèse mammaire (prolifération cellulaire, effet transformant), via son interaction avec la cycline D1 (Zhang Q *et al*, 2009).

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.ejconline.com

Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma

Nadège Gruel ^{a,b}, Carlo Lucchesi ^b, Virginie Raynal ^b, Manuel J. Rodrigues ^b,
Gaëlle Pierron ^c, Rémi Goudefroye ^d, Paul Cottu ^e, Fabien Reyat ^f, Xavier Sastre-Garau ^d,
Alain Fourquet ^g, Olivier Delattre ^b, Anne Vincent-Salomon ^{b,d,*}

^a Institut Curie, Translational Research Department, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

^b Institut Curie, INSERM Unit 830, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

^c Institut Curie, Unité de Génétique Somatic, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

^d Institut Curie, Department of Tumour Biology, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

^e Institut Curie, Department of Medical Oncology, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

^f Institut Curie, Department of Surgery, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

^g Institut Curie, Department of Radiation Therapy, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2010

Received in revised form 1 April 2010

Accepted 7 May 2010

Available online 21 June 2010

Keywords:

Breast cancer

Invasive lobular carcinoma

Luminal carcinomas

Array-CGH

Gene expression profiling

ABSTRACT

In order to get insight into the molecular alterations of invasive lobular carcinoma (ILC), comparative genomic hybridisation array and transcriptomic analyses of a series of 62 oestrogens-positive (ER) invasive tumours [21 ILC and 41 invasive ductal carcinomas (IDC)] were performed. ILC and IDC shared highly recurrent regions of gains (1q12–q44⁺ in more than 60% of the cases, 16pter–p11.2⁺ in 45% and 63% of ILC and IDC, respectively) and losses (16q11.2–q24.2[−] in 84% of ILC and 67.5% of IDC and 17pter–p12[−] in 50% of ILC and IDC). However, ILC genomic signature was characterised by significantly more frequent losses of 13q21.33–q31.3 region (46.5%) and 22q11.23–q12.1 region (50%) whereas IDC showed significantly more frequent losses of 11q23.1–q23.2 region (in 44% of IDC). Nine different regions of high level amplifications were found in 38% of ILC (8/21 cases). Localised on chromosome 11 (11q13.2 region), the most frequent region of amplification encompassing the CCND1 and FGF3 genes was observed in five different ILC. Unsupervised hierarchical clustering of transcriptomic data showed that ILC and IDC clustered apart. Genes involved in cell adhesion, cell communication and trafficking, extra cellular matrix-interaction pathways or cell mobility contributed to this clustering. Despite these differences, the overall clinical outcome of ILC was identical to that of IDC. This molecular study highlights that lobular and oestrogens-positive ductal invasive carcinomas share common genomic alterations but that ILC present some specific molecular alterations. These molecular specificities should help with the identification of new therapeutic targets for ILC patients.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Institut Curie, Department of Tumour Biology, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France. Tel.: +33 1 44 32 42 15; fax: +33 1 53 10 40 10.

E-mail address: anne.salomon@curie.net (A. Vincent-Salomon).
0959-8049/\$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ejca.2010.05.013

1. Introduction

Invasive lobular carcinomas (ILCs) of the breast represent 15% of invasive breast carcinomas.^{1,2} ILCs are characterised by a proliferation of non-cohesive cells with a lower histological grade, a higher rate of hormone receptors positivity^{1,2} and a lower rate of ERBB2 overexpression³ than invasive ductal carcinomas (IDCs). Moreover, ILCs present a higher rate of multiple metastases⁴ with a distinct and uncommon pattern of visceral metastatic involvement^{2,5} and a high incidence of contralateral disease⁶ when compared with IDC. Despite the biological differences between ILC and IDC, the overall outcome of ILC is not different from that of IDC and is accurately determined by histological grade.^{2,3,7} In addition, ILCs are less responsive to chemotherapy in relation to their biological characteristics (i.e. low proliferation with high oestrogens and progesterone receptors expression)^{8–11} and are rarely candidate for anti-HER2-targeted therapy.³ Therefore, there is a real need for new therapeutic options in this disease.

The molecular mechanisms underlying the differences between ILC and IDC have not entirely been elucidated. Nonetheless, it has been demonstrated that the inactivation of the E-cadherin/catenin adhesion complex and related molecules, observed at the earliest stage of the lobular carcinogenesis,¹² could account for the non-cohesive pattern of the epithelial tumour-cells. Some previous ILC CGH and array-CGH analysis^{13,14} have reported recurrent chromosomal aberrations, such as chromosomes 1q and 8q gains, losses of chromosomes 16q, 17q and 22. Meanwhile *HER2* amplification is reported to be infrequent in ILC,¹⁵ and *CCND1* amplification is frequently found in ILC.^{16,17} More recently, it has been proposed that *FGFR1* could be the chromosome 8p12 driver amplicon, observed in 15% of the 13 analysed ILC cases.¹⁴

It has recently been shown that the lobular and low grade ductal carcinoma *in situ* lesions, the well-known precursors of ILC and IDC, respectively, are frequently associated. This observation raised the hypothesis of a common initiating precursor cell for these entities.¹⁸ However it remains unclear which molecular alterations, in addition to E-cadherin inactivation, might be involved in the distinct development of oestrogens receptor-positive (ER⁺) IDC and ILC.

In that context, we perform a comprehensive comparison of 21 ILCs and 41 ER-positive (i.e. luminal) IDC in order to provide a detailed assessment of the biological phenotype and clinical behaviour of ILC.

We showed that ILC and IDC harboured common highly recurrent regions of gain and loss but with distinct genomic regions specifically associated with each group. Furthermore, a specific ILC transcriptomic signature was identified that provided a biological insight into the ILC specificities that could play a role in their metastatic pattern.

2. Material and methods

2.1. Tumour material

Twenty one classical ILCs and 41 luminal IDCs of the breast were retrospectively selected. These IDCs were defined as

luminal according to their oestrogen receptor nuclear expression by immunohistochemistry and their transcriptomic characteristics (data not shown, available upon request). The selection was based on the availability of both a paraffin-embedded and a frozen sample among all the available frozen breast cancers samples, at the time of the study design and for which clinical follow-up was available. As gene expression and genomic profiles are different according to tumour grade, IDC and ILC samples were matched on grade. Surgery was the first step of treatment for all selected cases. All cases were reviewed according to the World Health Organization (WHO) classification criteria by two experienced breast pathologists (XSG and AVS). Experiments were performed in agreement with the Bioethic Law No. 2004-800 and the Ethic Charter from the National Institute of Cancer (INCa).

2.2. DNA and RNA extractions

All tumour samples contained more than 50% of cancer cells, as assessed by haematoxylin and eosin staining of histological sections adjacent to the samples used for the nucleic acids extraction. In this work, to avoid potential artefacts, which may due to DNA or RNA amplification of microdissected samples, we privileged the investigation of samples large enough to extract good quality nucleic acids without need for pre-amplification steps. DNAs and RNAs were extracted from frozen tumour samples by the caesium chloride protocol. The concentration and integrity/purity of each RNA sample were measured using RNA 6000 LabChip kit with the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

2.3. Immunohistochemistry

Immunostaining was performed on 4 µm tissue sections prepared from a representative sample of the tumour. After rehydration and antigenic retrieval in citrate buffer (10 mM, pH 6.1), the tissue sections were stained for oestrogen receptor (ER, clone 6F11, Novocastra, 1/200), progesterone receptor (PR, clone 1A6, Novocastra, 1/200) and E-cadherin (E-cadh, clone HECD1, Zymed Laboratories Inc., 1/50). Revelation of staining was performed using the Vectastain Elite ABC peroxidase mouse IgG kit (Vector Burlingame, CA) and diaminobenzidine (Dako A/S, Glostrup, Denmark) as chromogen. Positive and negative controls were included in each slide run. Cases were considered positive for ER and PR according to standardised guidelines using ≥10% of positive nuclei per carcinomatous duct. Cases were considered negative for E-cadherin when no tumour cell presented any strong membrane staining in the presence of accurate external/internal positive controls (surrounding normal glands).

2.4. Array-CGH

The BAC-array (one 250 kb clone per megabase on average) together with experimental procedures used for hybridisation and washing was as previously published.¹⁹ All BACs and PACs were verified by end sequencing before spotting.

2.5. Analysis of array-CGH data

Data analysis was performed following the procedures previously published by our group. A region of gain or loss was considered as recurrent when it was observed in at least 40% of tumours. The comparison of altered regions between two groups was based on an odd ratio test. The hypothesis of no difference between the two groups was rejected when the Benjamini–Hochberg False Discovery Rate (FDR), calculated over the 3264 BAC loci analysed, was less than or equal to 0.05. A region was considered to be significantly different between the two groups when more than half of the loci of the region presented adjusted *p*-values less than 0.05. Amplicons were defined as BAC loci exhibiting a Cy5/Cy3 ratio greater than or equal to 2.

BACs known to harbour copy number variation in public databases (Data-base of Genomic variants, <http://projects.tcag.ca/variation/cgi-bin/gbrowse>) were excluded from the analysis.

2.6. Survival analysis

Statistical analyses were carried out using MedCalc software. The cumulative overall survival was calculated using the Kaplan–Meier method, and the log-rank test was used to analyse differences in the survival times. A *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

2.7. Gene expression profile analysis

The DNA microarrays used in this study were the Human Genome U133A, containing almost 23,000 probe sets and B (Affymetrix, Santa Clara, CA). Microarray data were analysed as previously published.²⁰ Gene expression analysis for ILC and IDC was performed on the same Affymetrix platform but using two different scanners. In order to detect a possible scanner bias on gene expression levels, we performed an unsupervised clustering of ILC and IDC using the common 100 probesets present on both the U133A and U133B and corresponding to control genes whose expression was not associated to the tumour groups. The Fisher test, performed to evaluate the enrichment of top level groups by scanner type, was not significant (*p* = 0.7) demonstrating that the unsupervised clustering did not detect a scanner-dependent classification. We therefore concluded that the branches in the unsupervised clustering with ILC and IDC corresponded to true biological differences in gene expression levels.

Genomic/transcriptomic correlations were performed for each probeset in the IDC and the ILC groups following previously published procedures.²⁰ The correlation with Cy5/Cy3 ratios of the corresponding BAC clone was calculated using Pearson correlation tests. Then, we determined which genomic/transcriptomic correlations were observed in both lobular and ductal carcinomas and those specific for each group.

2.8. Quantitative real-time reverse transcription-PCR

Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA and 50 units of MultiScribe™ reverse transcriptase (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems).

The analysed genes are listed in Fig. 3 and have been chosen among the group of downregulated genes in the unsupervised clustering and according to the importance of their biological putative role in carcinogenesis.

Assays-on-Demand for assessing expression level of the CCND1 and other genes as well as the control TATA-binding protein (TBP) genes were obtained from Applied Biosystems. PCR was carried out in an ABI PRISM 7500 real-time thermal cycler using the Taqman master mix (Applied Biosystems).

3. Results

3.1. Patient and tumour characteristics (Table 1)

The clinico-pathological characteristics and the most recurrent genomic alterations (16q22.1 loss and CCND1 amplification) of the 21 ILCs and 41 IDC cases are described in Table 1. Besides E-cadherin expression, none of the clinico-pathological parameters was significantly different between the two groups. For 7 IDC, E-cadherin staining was not assessed because tumour tissue was not available anymore on the representative paraffin-embedded block.

3.2. Genomic analysis (Tables 1–3 and Fig. 1)

We investigated genomic profiles of ILC and compared them to that of the IDC. In the ILC group, all but 1 sample exhibited altered profiles, indicating that the amount of stromal or other normal cells in the samples was not sufficient to mask copy number changes.

We found 9 different amplicons in 8 ILCs (38%, 8/21 cases) and 12 amplicons in 11 IDC (27%, 11/41 cases). One amplification, located on chromosome on 11q13.2–q13.4 region encompassing Cyclin D1 and FGF3 genes, was observed in both groups (24%, 5/21 ILC cases; 12%, 5/41 IDC cases; Fisher test *p* = ns). One ILC harboured an amplification of the 8p12 FGFR1 region (5%, 1/21 cases). In IDC, three other recurrent regions of amplifications, found in at least 2 tumours, are located on chromosomes 8p12–p11.21, 11q13.4–q14.1 and 13q14.12–q14.2 (Table 2).

The most frequent gains observed in both ILC and IDC were on chromosomes 1q12–q44 (72.4% of ILC and 60% of IDC) and 16pter–p11.2 (45% of ILC and 62.7% of IDC) whereas the most frequent losses were on chromosomes 16q11.2–q24.2 (observed in 84.4% of ILC and 67.5% of IDC) and 17pter–p12 (50.1% of ILC and 48.8% of IDC).

Genomic alterations that significantly distinguished ILC from IDC were losses of 13q21.33–q31.3 region, observed in 46.5% of ILC and 22.2% of IDC and losses of 22q11.23–q12.1 region (50% of ILC and 27.1% of IDC). Losses of 11q23.1–q23.2 region distinguished IDC from ILC and were observed in 33.5% of ILC and 44.4% of IDC (*p*-value ≤ 0.05) (Fig. 1 and Table 3).

The majority of ILC cases (14/21 cases, 67%) presented a complex genomic pattern encompassing 16q loss (86%, 18/21 cases) associated with 1q gain and others alterations in 15 cases out of 18 (83%).

More than 71% of ILC (15/21 cases) presented more than five chromosomal alterations (control IDC: 80%, 33/41 cases, *p* = ns). Moreover, ILC presented significantly fewer whole

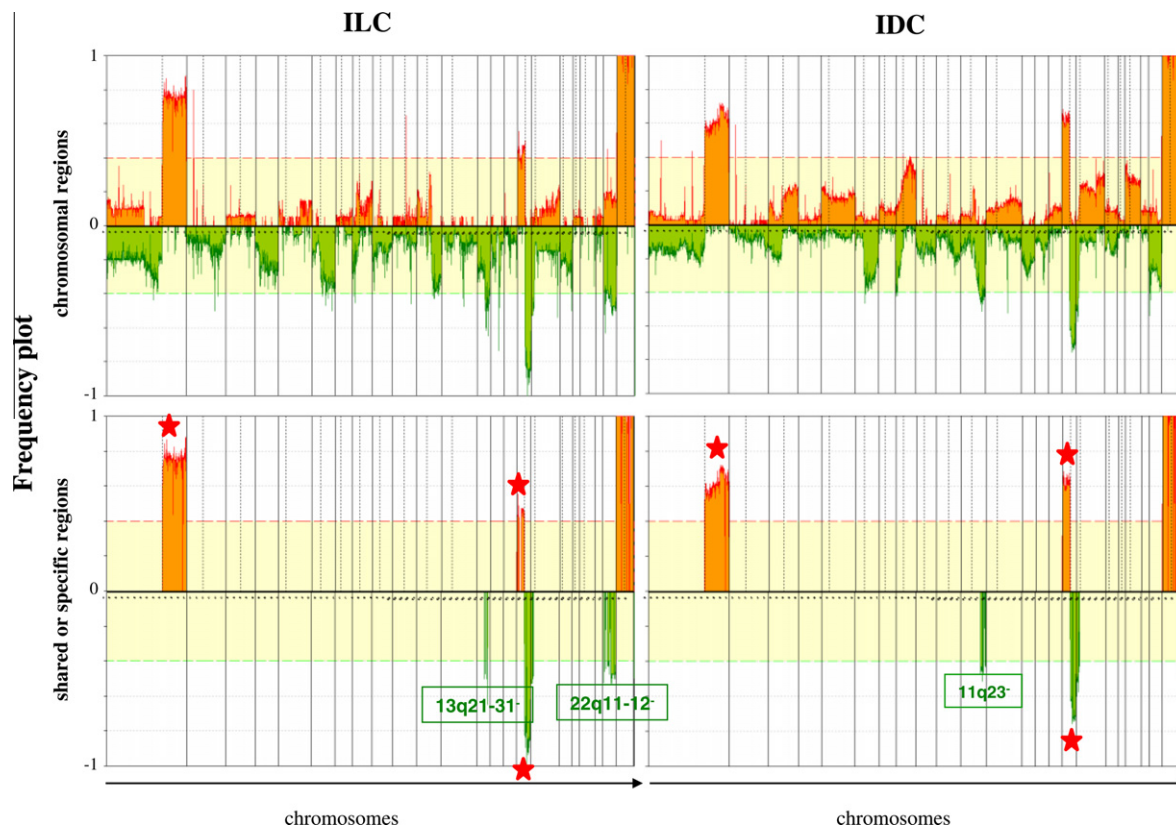


Fig. 1 – Frequency plot of gains and losses of ILC and IDC (top panels) and of regions shared (indicated by a star) by the ILC and the IDC or specific from ILC or IDC (indicated by their genomic localisation in green) (lower panels). The two top panels show the frequency of gains and losses in 21 ILC (upper left panel) and in 41 ER⁺ IDC (upper right panel). Gains are indicated by orange bars ranging from 0 to 1 and losses, by green bars ranging from 0 to –1, from chromosome 1pter on the left to chromosome Xq on the right. Vertical lines indicate chromosome boundaries, and vertical hemi-dashed lines indicate centromere locations. The lower panels display shared or specific regions observed in two groups.

chromosomal arm gains than control IDC (47 and 150 gains observed in ILC and in IDC, respectively, $p = 0.0013$).

3.3. Gene expression analysis (Figs. 2 and 3)

We then investigated transcriptomic differences between ILC and ER⁺ IDC. A subset of 57 samples (16 ILC and 41 IDC) for which good quality RNAs were available, was analysed on Affymetrix U133A (Fig. 2). A total of 445 probesets exhibited an interquartile range (IQR) greater than or equal to 2. These genes discriminated two major clusters of tumours. Cluster 1 was composed of IDC (35/41 cases). Cluster 2 encompassed two sub-branches (2-1 and 2-2, Fig. 2) according to their histological type. Cluster 2-1 was composed of 16/16 ILC and cluster 2-2 of 6/41 IDC cases.

As expected in ILC, CDH1 gene was downregulated. Genes of the IGFR1 pathway, some genes involved in chromatin maintenance such as SMARCC2 and UBN1 were also downregulated. Other genes participating in cell adhesion (ADAM12 and LOXL2), cell communication and trafficking (CLIC4, LYST and AP3D1), receptor or extra cellular matrix-interaction pathways (MMP11, COL11A1, COL10A1, PLA1 and RHOBTB3),

cell shape and motility (TWF1 and ACTR2) also contributed to this clustering.

The most of these genes under-expressions observed with the Affymetrix analysis were further confirmed by RT-qPCR (Fig. 3).

To assess if differences existed within ILC according to grade, we performed an unsupervised clustering with the 445 probesets with an IQR ≥ 2 among the 16 ILC and did not show any clear group according to grade (Supplementary Fig. 1).

3.4. Genomic and transcriptomic correlations (Supplementary Table 1 and Fig. 4)

In order to determine the impact of genomic changes on gene expression levels, we combined the analyses of transcriptomic (Affymetrix signals) and genomic data (array-CGH ratios) for the 16 ILCs and the 41 IDCs analysed with both approaches. We observed that the expression level of 78 genes was significantly correlated with the ratio of their corresponding BAC locus in the ILC group (Supplementary Table 1). Correlations corresponding to amplifications were located on chromosomes 8p12, from 36.8 to 38.4 Mb

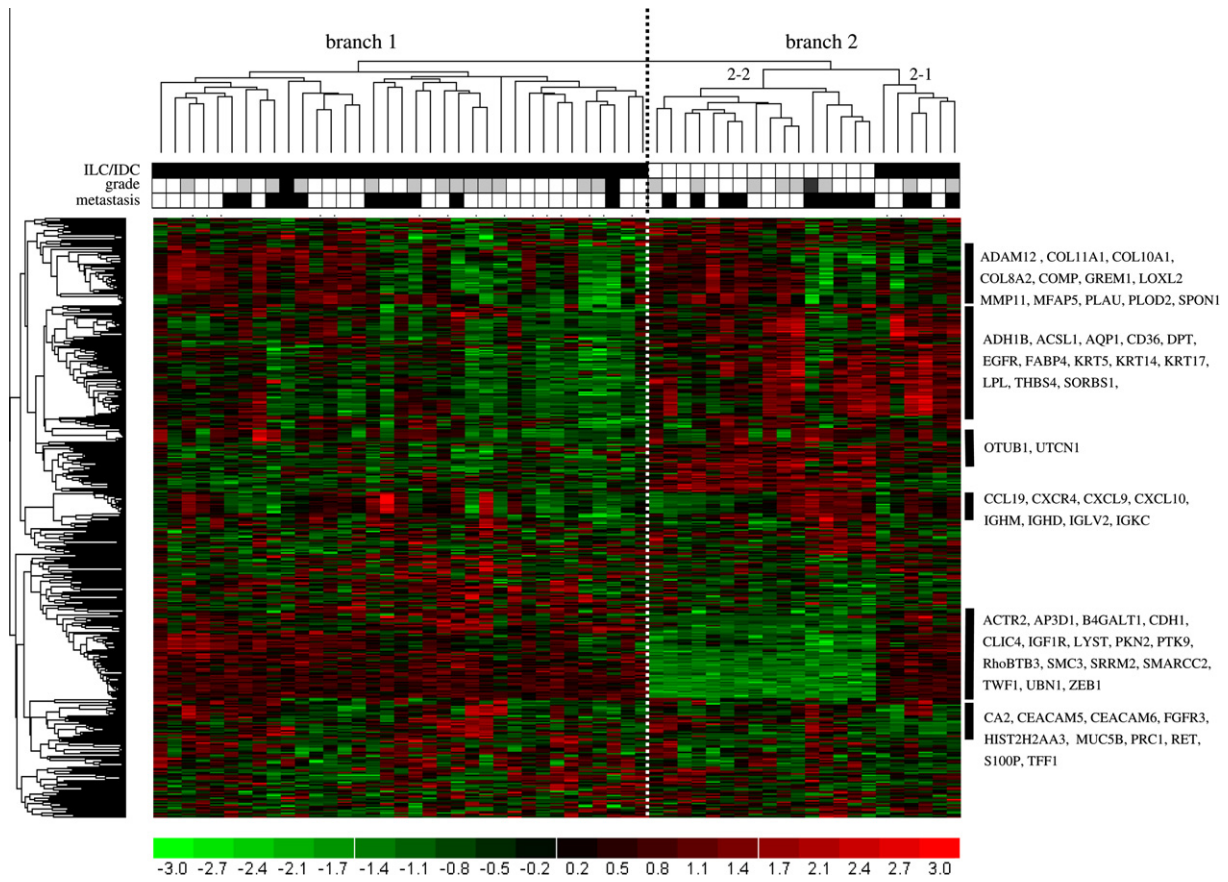


Fig. 2 – Unsupervised hierarchical clustering of 16 ILC and 41 ER⁺ IDC tumours. We have used intrinsically variable gene expression of 445 probesets (interquartile range ≥ 2). Each column represents a different tumour, and each row represents one of 445 genes used for this unsupervised clustering. Histological status (ILC: white; IDC: black), grade (grade I: white; grade II: grey; grade III: black) and the presence of metastasis/other cancers (black) are indicated.

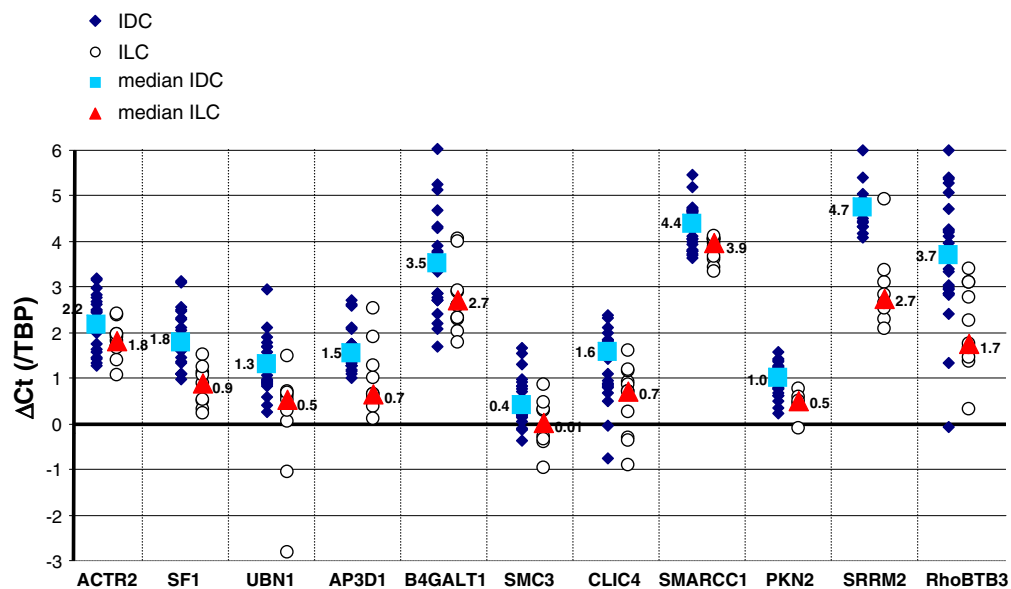


Fig. 3 – Quantitative PCR analysis of under-expressed genes compared to the TATA-binding protein (TBP) gene. Results are indicated as ΔC_t values. The values for IDC are represented by a dark blue full diamond, for ILC by a dark blue empty circle. The median values for each group are indicated by a clear blue square (IDC) and a red full triangle for ILC.

Table 1 – Clinico-pathological characteristics and summary of the main genomic alterations found in the 21 ILC and 41 IDC cases.

Parameters	ILC (n = 21) n (%)	IDC (n = 41) n (%)	p-Value
Age (median; years)	59	56	ns ^b
Grade			
I	12 (57)	24 (58)	ns ^c
II	8 (38)	15 (36.5)	
III	1 (5)	2 (5)	
Node status			
–	14 (70)	25 (61)	ns ^c
+			
1–3	2 (10)	0	
>3	4 (20)	16 (39)	
ND	1	–	
ER			
+	21 (100)	41 (100)	ns ^c
–	0 (0)	0	
PR			
+	17 (81)	41 (100)	ns ^c
–	4 (19)	0	
E-cadherin			
+	1 (5)	33 (97)	4.7×10^{-14}
–	20 (95)	1 (3)	
ND	–	7	
Genomic data			
16q22.1 loss	18 (86)	30 (73)	ns ^b
CCND1 amplifier ^a	5 (24)	5 (12)	ns ^b

Cases were considered positive for ER and PR using $\geq 10\%$ of positive nuclei per carcinomatous duct. Cases were considered positive for E-cadherin when a membrane staining was observed in $>10\%$ of tumour-cells with an internal positive control (normal glands).

ER: oestrogen receptor; PR: progesterone receptor; E-cadherin; ND: not determined.

^a Cy5/Cy3 ratio greater or equal than 2.

^b Wilcoxon test.

^c Fisher exact test.

(WHSC1L1), and 11q13.1–q14.1, from 65.3 to 78.4 Mb (CCND1, which overexpression was further confirmed by RT-qPCR, Fig. 4).

The main correlations due to low copy number gains or losses were observed on chromosomes 1q21.2–q43 (in the region of gain located from 149.2 to 234.7 Mb), 16p13.3 (gain, from 3.3 to 3.6 Mb), 16q12.1–q22.1 (loss, from 46 to 67.1 Mb) and 17p13.3–p13.2 (loss, from 0.8 to 5.8 Mb). Some other genes located in the region of gain 11q13, below the CCND1 amplicon, were found to be correlated to their expression status, including genes such as FADD and PAK1.

In the IDC group (Supplementary Table 1), the level of expression of 173 genes was significantly correlated with the ratio of their corresponding BAC locus, either in regions of amplifications on the chromosomes 6q25.3, from 155.6 to 155.7 Mb (encompassing the TFB1M gene), 11q13–q14 (encompassing the CCND1, PAK1 and ALG8 genes) or in regions of gains (chromosomes 1q, 8q) and losses on chromosomes 8p

encompassing MTUS1 and CNOT7 and on chromosome 16q. We next compared the correlations that were common to ILC and IDC and found eight genes located on chromosomes 1, 8 and 11 in common regions of gains and amplifications.

3.5. Association with outcome (Fig. 5)

Despite genomic and transcriptomic differences between ILC and IDC, patients with ILC tumours harboured at 10 years, the same overall survival than patients with luminal IDC tumours (76% for lobular versus 73% for ductal, $p = ns$; median follow-up of 142 [95–171] and 131 [18–167] months for ILC and IDC, respectively) and the same recurrence-free survival (49% for lobular versus 65% for ductal, $p = ns$; median follow-up of 120 [95–171] and 131 [55–167] months for ILC and IDC, respectively).

4. Discussion

In this analysis, we show that ILCs are a distinct molecular entity from luminal ductal carcinomas.

The majority of ILC and IDC from this series presented complex genomic profiles with copy-number alterations with no simple profile (i.e. tumours harbouring 1q gains associated with 16q losses as unique alterations) and rare recurrent amplification. Notably, highly recurrent regions of gains and losses were shared by two groups such as 1q and 16p gains, 16q and 17p losses. These alterations have been frequently observed in previous studies comparing ductal and ILC^{14,21} and give biological credit to the hypothesis of a common precursor initiating cancer cell, a hypothesis based on morphological data showing the co-existence of ductal and lobular *in situ* lesions in more than 60% of the cases.¹⁸ The different regions of losses and gains observed between ILC and IDC not only refined the genomic analysis reported previously^{13,14,21,22} but also showed new regions of interest in ILC. Indeed, ILCs were characterised by 13q21.33–q31.3 and 22q11.23–q12.1 losses that were significantly less often observed in IDC. Interestingly, some genes located in the lost regions, in the 13q region KLF5 that promotes cell proliferation and in the 22q region ADORA 2A and CYTSA, two genes involved in cell cycle or cytokinesis may contribute, when lost, to the low proliferation rate that characterises ILC.

In the present series, only one case harboured an amplification of the 8p12 region (1/21, 5%). This observation contrasts with the 46% (6/13 cases) rate of amplification observed in a previous published series.¹⁴ In our series, the genes that demonstrated an overexpression within this region of amplification were rather WHSC1L1 than FGFR1 although it is rather impossible to draw any definite conclusion with only one case harbouring the region of amplification. Nevertheless, this observation is in agreement with our recently published data regarding the putative 8p12 amplicon driver in ductal carcinomas.²³ The role of FGFR1 in ILC should be further confirmed in other series.

The most recurrent amplification observed in this study, in the two groups, encompassed the CCND1 region on the 11q13.2 chromosome. It has recently been shown that CCND1 amplification was observed in 29% of a series of 93 ER-positive

Table 2 – List of amplifications found in the ILC and IDC groups.

Chr	Start (Mb)	End (Mb)	Cytoband	Genes	Max ratio	ILC (n = 21)	IDC (n = 41)
5	162.8	164.8	5q34		2.2	0	1
6	154.2	157.7	6q25.2–6q25.3	TFB1M	2.5	0	1
8	36.8	40	8p12–8p11.21	WHSC1L1, PPAPDC1B, FGFR1	3.9	1	2
10	76.5	85.2	10q22.2–q23.1		3.9	1	0
11	58.8	61.5	11q12.1–q12.3		2.5	0	1
11	68.6	71.2	11q13.2–q13.4	CCND1, FGF3	4.5	5	5
11	71.5	75.5	11q13.4–q13.5	OSBP, STX3, MRPL16, TCN1, MS4A6A, MS4A12, CCDC86, PRPF19, TMEM109, TMEM132A, VPS37C, DDB1, DAK, C11orf10, FEN1, FADS1, FADS2, FADS3	2.7	1	0
11	74.6	80	11q13.4–q14.1	SLCO2B1, ARRB1, RPS3, WNT11, LRRC32, OMP, MYO7A, RSF1, C11orf67, NDUFC2, ALG8, GAB2	4.2	1	4
13	44.8	46.2	13q14.12–q14.2	NUFIP1, GTF2F2, TPT1, SLC25A30, CPB2, LCP1, C13orf18, LRCH1	2.4	0	2
14	74.9	75	14q24.3	BATF	2.9	0	1
15	94.9	100	15q26.2–26.3	IGF1R, DMN, MEF2A, CHSY1, SNRPA1, PCSK6, TM2D3	4.6	0	1
20	22.8	29.7	20p11.21–q11.21	THBD, CD93, NXT1, CST3, CST4, C20orf39, ENTPD6, PYGB, GINS1, ZNF337	2.6	0	1
20	47.3	48.6	20q13.13		4.3	1	0
20	49	51.6	20q13.13–q13.2	ATP9	3	1	1
20	54.5	57.4	20q13.31–13.32		2.4	1	0
X	150.9	152.8	Xq28	MAGEA6, MAGEA3, NSDHL, BGN, PLXNB3, SRPK3, IDH3G	2.7	1	1

Table 3 – List of representative regions found in ILC and control IDC groups.

Chr	Cytoband	Alteration	Start (Mb)	End (Mb)	ILC (%)	IDC (%)	Signif.
<i>Shared regions</i>							
1	q12–q44	Gain	128.20	244.25	72.4	60.0	
16	pter–p11.2	Gain	0.00	33.54	45.0	62.7	
16	q11.2–q24.2	Loss	45.06	87.35	84.4	67.5	
17	pter–p12	Loss	0.00	15.85	50.1	48.8	
<i>Regions found more specifically in ILC</i>							
13	q21.33–q31.3	Loss	71.30	90.92	46.5	22.2	*
22	q11.23–q12.1	Loss	23.00	24.37	50.0	27.1	*
<i>Region found more specifically in IDC</i>							
11	q23.1–q23.2	Loss	112.07	132.48	33.5	44.4	*

tumours.²⁴ Here we show that it is also recurrent among ILC and that CCND1 amplification drives its overexpression. This recurrent amplification may open perspectives of targeted therapies using EglN2 hydroxylase inhibitors, as it has been recently shown that EglN2 hydroxylase could control breast carcinogenesis through CCND1 interactions.²⁵

Gene expression unsupervised analysis in our study clearly demonstrated that ILC and IDC clustered apart. One cluster was entirely composed of IDC and the second formed by two sub-clusters, one being composed by all ILC cases. Previous transcriptomic analyses comparing ILC with IDC^{26–29} have found genes differentially expressed between the two entities and, as expected, the *E-cadherin* gene

was found under-expressed in all studies despite technical or sample selection differences such as grade of the tumour samples, or platforms and statistical analysis used. Specific downregulation of *E-cadherin* gene expression with small interference RNA experiments in an *E-cadherin*-positive cell-line would be helpful to assess the consequences of *E-cadherin* mutation/downregulation in gene expression modification and its oncogenic properties. Interestingly enough, even the *E-cadherin*-positive ILC case did not cluster with the IDC. This observation suggests that beside *E-cadherin* downregulation in ILC, the specific biology of these carcinomas relies on a larger spectrum of molecular alterations.

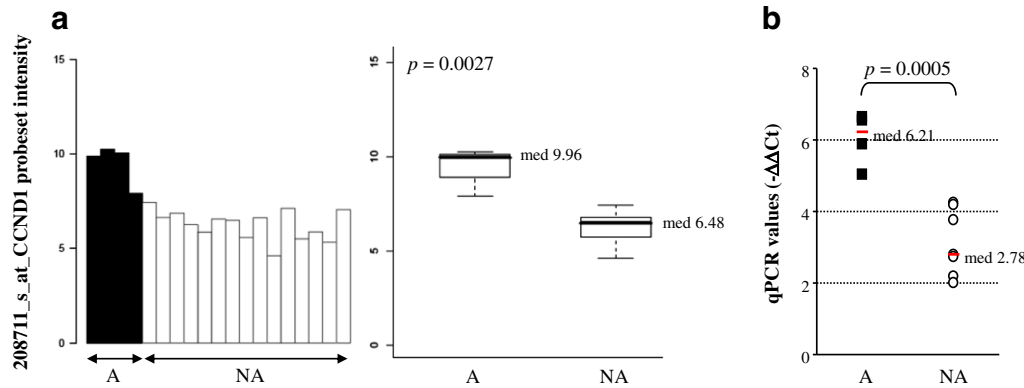


Fig. 4 – Correlation of amplification and overexpression of CCND1 in ILC tumours. Bar-plot and box-plot (a) of Affymetrix log 2 ratios of the 208711_s_at probelet (CCND1 gene) in amplified (A) and non-amplified (NA) ILC. Quantitative PCR analysis (b) of CCND1 gene compared to the TATA-binding protein (TBP) gene. The results are indicated as $-\Delta\Delta C_t$ values. This analysis was performed on a subset of 19 tumours (4 CCND1-amplified and 15 CCND1-non-amplified ILC). Median signal (med) is indicated.

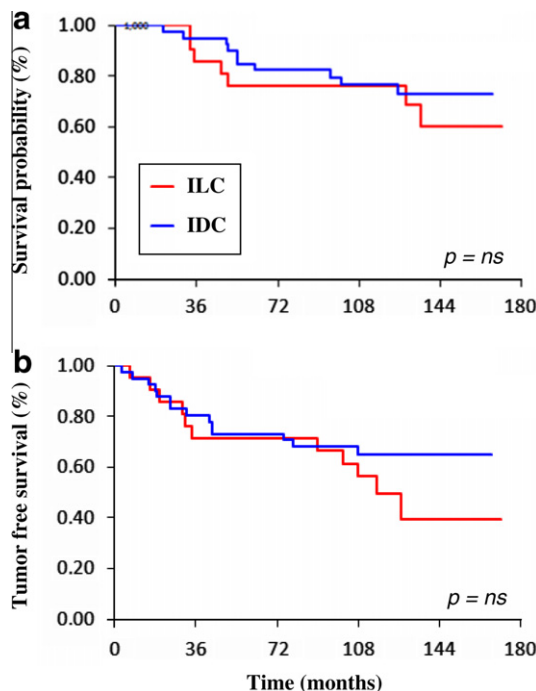


Fig. 5 – Survival curves for ILC and IDC. Upper panel (a) represents the overall survival. Lower panel (b) represents the disease-free survival curve.

In our analysis, genes belonging to the IGF1R pathway are also downregulated. The Gene Ontology analysis showed that genes differentially expressed between ILC and IDC are involved in cell adhesion such as ADAM 12, cell communication and trafficking (LYST, CLIC4, AP3D1), extra cellular matrix-interaction pathways or cell mobility (Rho GTPases, ACTR2). Some genes involved in chromatin maintenance or RNA metabolism (SMARCC2, SMC3, UBN1, SRRM2) were also downregulated in ILC and confirmed by RT-qPCR. A recent study highlighted also that actin cytoskeleton remodelling genes involved in cell motility and cell adhesion genes were also modified in ILC compared to IDC.²⁹ Altogether, these transcriptomic data could in part explain the ILC wide metastatic

spreading through the modification of the expression of genes involved in extracellular matrix interactions, cell motility⁴ and the ILC low proliferation rate and genes involved in chromatin maintenance and RNA metabolism.

As previously shown by Weigelt et al.,²⁹ we did not observe any clustering within the ILC tumours according to grade, demonstrating that ILC tumours, whatever may be their grade, share common transcriptomic profiles.

Genomic/transcriptomic correlations highlighted candidate genes in regions of gains and amplification. CCND1 and FADD were the candidate genes in the 11q13 regions of amplification, and PAK1 in the region of gain on the same chromosome arm. FADD gene encodes for a protein that mediates apoptotic signals. PAK1 protein regulates cell motility and morphology. This protein family links RhoGTPases to cytoskeleton re-organisation and nuclear signalling. Though, when FADD and PAK1 are over-expressed through amplification/gains, these two gene products could participate to the low proliferation level of ILC via the apoptosis activation and the specific motility of ILC cells.

In conclusion, we demonstrated that ILC represents a genomic and a transcriptomic distinct entity from luminal (ER⁺ grade I and II) IDC and therefore ILC should not be considered as luminal carcinoma. To identify lobular tumours as a specific entity should help to identify specific therapeutic strategies in the future.

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

Author's contributions

All authors have read and approved the final manuscript.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

We thank Ingrid Lebigot and her team from the Institut Curie's tumour bank.

This work was supported by grants from the INSERM, the Institut Curie (Programme Incitatif et Coopératif). Construction of the BAC-array was supported by grants from the 'Carte d'Identité des Tumeurs' (CIT) program of the Ligue Nationale Contre le Cancer. Affymetrix analyses were supported by grants from AstraZeneca. Dr. Anne Vincent-Salomon was supported by an 'Interface INSERM' grant. Dr. Manuel J Rodrigues was supported by a Fondation Pour la Recherche Médicale grant.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ejca.2010.05.013](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.05.013).

REFERENCES

1. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004;6(3):R149–56.
2. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 1996;77:113–20.
3. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, et al. Lack of prognostic significance of "classic" lobular breast carcinoma: a matched, single institution series. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117(1):211–4.
4. Ferlicot S, Vincent-Salomon A, Medioni J, et al. Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 2004;40(3):336–41.
5. du Toit RS, Locker AP, Ellis IO, et al. An evaluation of differences in prognosis, recurrence patterns and receptor status between invasive lobular and other invasive carcinomas of the breast. *Eur J Surg Oncol* 1991;17:251–7.
6. Horn PL, Thompson WD. Risk of contralateral breast cancer. Associations with histologic, clinical, and therapeutic factors. *Cancer* 1988;62:412–24.
7. Peiro G, Bornstein B, Connolly J, et al. The influence of infiltrating lobular carcinoma on the outcome of patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59:49–54.
8. Bollet MA, Savignoni A, Pierga JY, et al. High rates of breast conservation for large ductal and lobular invasive carcinomas combining multimodality strategies. *Br J Cancer* 2008;98(4):734–41.
9. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol* 2005;23(1):41–8. [doi:10.1200/JCO.2005.03.111](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.111).
10. Mathieu MC, Rouzier R, Llombart-Cussac A, et al. The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile. *Eur J Cancer* 2004;40(3):342–51.
11. Tubiana-Hulin M, Stevens D, Lasry S, et al. Response to neoadjuvant chemotherapy in lobular and ductal breast carcinomas: a retrospective study on 860 patients from one institution. *Ann Oncol* 2006;17(8):1228–33. [doi:10.1093/annonc/mdl114](https://doi.org/10.1093/annonc/mdl114).
12. Vos CB, Cleton-Jansen AM, Berx G, et al. E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1997;76(9):1131–3.
13. Günther K, Merkelbach-Bruse S, Amo-Takyi BK, et al. Differences in genetic alterations between primary lobular and ductal breast cancers detected by comparative genomic hybridization. *J Pathol* 2001;193:40–7.
14. Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC, et al. FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12(22):6652–62.
15. Hoff E, Tubbs R, Myles J, Procop G. HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade. *Am J Clin Pathol* 2002;117:916–21.
16. Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, et al. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res* 1997;57(19):4360–7.
17. Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K, Arnold A, Koerner F. Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1998;58:2876–80.
18. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, et al. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007;31(3):417–26.
19. Vincent-Salomon A, Raynal V, Lucchesi C, Gruel N, Delattre O. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet* 2008;40(7):809 [author reply 810–2].
20. Vincent-Salomon A, Lucchesi C, Gruel N, et al. Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 2008;14(7):1956–65.
21. Nishizaki T, Chew K, Chu L, et al. Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 1997;74:513–7.
22. Loo LWM, Grove DI, Williams EM, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. *Cancer Res* 2004;64(23):8541–9.
23. Bernard-Pierrot I, Gruel N, Stransky N, et al. Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68(17):7165–75.
24. Roy PG, Pratt N, Purdie CA, et al. *Int J Cancer* 2009.
25. Zhang Q, Gu J, Li L, et al. Control of cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2009;16(5):413–24.
26. Bertucci F, Orsetti B, Negre V, et al. *Oncogene* 2008.
27. Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, et al. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res* 2003;63(21):7167–75.
28. Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, et al. *BMC Cancer* 2007;7:55.
29. Weigelt B, Geyer FC, Natrajan R, et al. The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type. *J Pathol* 2010;220(1):45–57.

2- Altérations de la polarité apico-basale dans les carcinomes invasifs de type micropapillaire.

Notre second modèle d'étude est le carcinome mammaire infiltrant de type micropapillaire (IMPC). Les IMPC représentent un sous-type rare et très particulier des carcinomes infiltrants du sein. En effet, ces tumeurs présentent deux caractéristiques morphologiques majeures:

- 1) les cellules sont organisées en massifs cohésifs, détachés de la matrice extracellulaire par un espace clair de rétraction, ce qui suggère un défaut d'adhésion cellule/matrice.
- 2) Lorsque la polarité apico-basale est analysée avec les anticorps anti-MUC-1 ou anti-EMA, le pôle apical des cellules tumorales est orienté vers l'espace clair de rétraction: la polarité apparaît inversée, phénotype requis pour porter le diagnostic de carcinome invasif de type micropapillaire.

Afin d'identifier les altérations moléculaires pouvant rendre compte de ce phénotype particulier, et établir le lien avec des altérations biologiques, des études phénotypiques, transcriptomiques et génomiques ont été réalisées, en fonction de la disponibilité du matériel tumoral (blocs de tissu fixé, acides nucléiques), des données cliniques et de la possibilité d'obtenir le consentement des patientes (**Figure 29**).

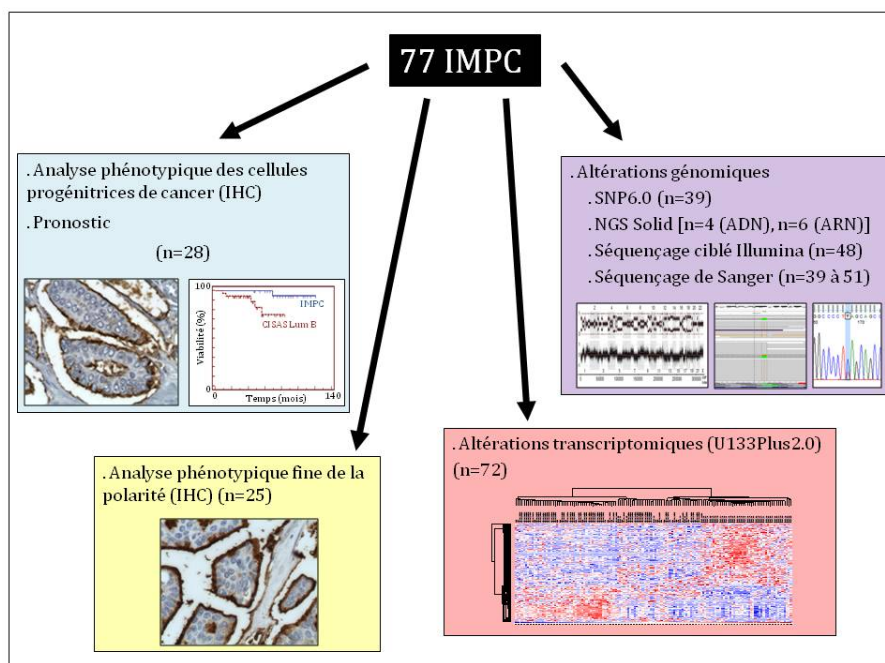


Figure 29: Plan d'étude des tumeurs de type micropapillaire. IMPC: carcinome mammaire de type micropapillaire. IHC: Immunohistochimie. NGS: *Next Generation Sequencing*.

Nous avons réalisé :

- 1) Une étude phénotypique par immunohistochimie, afin d'analyser finement les altérations de la polarité des IMPC. Les marqueurs utilisés, caractéristiques des domaines apical et basolatéral, des jonctions serrées et adhérentes, sont les mêmes que ceux utilisés classiquement en biologie cellulaire pour étudier la polarité cellulaire.
- 2) Une étude transcriptomique et génomique à haut débit afin d'identifier les gènes dérégulés et pouvant contribuer au profil morphologique particulier observé dans les IMPC (polarité inversée, espace clair de rétraction).
- 3) Une étude fonctionnelle *in vitro* par invalidation ou surexpression des gènes d'intérêt dans la lignée épithéliale mammaire normale MCF10A.

Nous avons pu constituer une cohorte de 77 cas d'IMPC. Dans cette série, les tumeurs expriment très majoritairement les récepteurs hormonaux: RO⁺ dans 95% et RP⁺ dans 83%, surexpriment la protéine ERBB2 dans 23% des cas, sont plutôt de grade élevé (49% de grade 2 et 43% de grade 3) et sont fréquemment associées à des embolies vasculaires (79% des cas) et des métastases axillaires (61%), et ce, indépendamment de leur grade (**Table 4**).

		IMPC (n=77)
		n (%)
suivi médian (années) :		11 [1-42]
âge médian au diag (années) :		61 [34-84]
	< 50 ans	
	≥ 50 ans	
RO :	positif	73 (95)
RP :	positif	64 (83)
ERBB2 :	surexpression	14 (19)
	amplification	10 (14)
métastases axillaires :		46 (61)
métastases viscérales :		7 (9)
embolies vasculaires :		59 (79)
Grade :	1	6 (8)
	2	36 (49)
	3	32 (43)
Traitement :	chirurgie conservatrice	53 (69)
	chirurgie non conservatrice	24 (31)
	hormonothérapie	62 (81)
	chimiothérapie	40 (52)
	radiothérapie	61 (80)
Survie à 10 ans :	en vie	70 (91)
	décédée	5 (6)
	perdue de vue	2 (2)

Table 4: Caractéristiques cliniques et phénotypiques des IMPC. Diag: diagnostic.

2-1. Cellules initiatrices de cancer et évaluation du pronostic

La majorité des IMPC présentent des embolies lympho-vasculaires très nombreux (79%), ainsi qu'une forte infiltration métastatique axillaire (61%). Ces caractéristiques, ainsi que les données de suivi clinique publiées à partir de petites séries, font considérer les tumeurs de type micropapillaire comme une entité tumorale associée à un mauvais pronostic (Zekioglu O *et al*, 2004).

Une des hypothèses avancées pour expliquer une évolution clinique péjorative d'une tumeur est l'existence de « cellules initiatrices de cancers du sein » (ou BrCICs, *breast cancer-initiating cells*). En effet, ces cellules participent à la croissance tumorale et au développement des métastases (Charafe-Jauffret E *et al*, 2010 ; Polyak K *et al*, 2006). Elles ont été identifiées par de nombreux marqueurs, dont CD44⁺CD24⁻, ALDH1⁺, EZH2⁺, largement analysés en immunohistochimie (Al-Hajj M *et al*, 2003 ; Kleer CG *et al*, 2003 ; Zeidler M *et al*, 2006 ; Ginestier C *et al*, 2007 ; Ho L et Crabtree GR, 2008). L'expression de ces marqueurs peut varier en fonction du stade tumoral et du sous-type moléculaire considéré.

Nous avons analysé l'expression des marqueurs CD24, CD44, ALDH1 et EZH2 dans les IMPC (n=28), expression associée plutôt à un phénotype épithélial luminal différencié (CD24) ou à la présence de « cellules initiatrices de cancers du sein » (CD44, ALDH1, EZH2). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour 61 IC-NST de type luminal A (n=27, ER⁺PR⁺ERBB2⁻, de grade I ou II avec un index mitotique faible) ou luminal B (n=34, ER⁺, de grade II avec un fort index mitotique ou III, pouvant exprimer la protéine ERBB2³⁺) (Haibe-Kains B *et al*, 2012).

Inverted apical CD24 and weak EZH2 expressions are phenotypic characteristics of pure invasive micropapillary carcinoma of the breast.

Gruel N, Cedenot A, Richardson M, Fréneaux P, Bhalshankar J, Dubois T, Sastre-Garau X, Delattre O, Vincent-Salomon A.

Open J Pathol, 2013, 3 (2): in press.

a- Analyse phénotypique des cellules progénitrices de cancer

Le marqueur CD24 est exprimé dans la majorité des tumeurs étudiées: 96% des IMPC, 74% des IC-NST luminal A et 88% des IC-NST luminal B. Néanmoins, de façon très significative, une large majorité des IMPC (85%) expriment la protéine CD24 exclusivement au pôle apical externe de la cellule carcinomateuse (**Figure 30**). Ce profil d'expression a déjà été rapporté par d'autres groupes (Simonetti S *et al*, 2012 ; Li W *et al*, 2010).

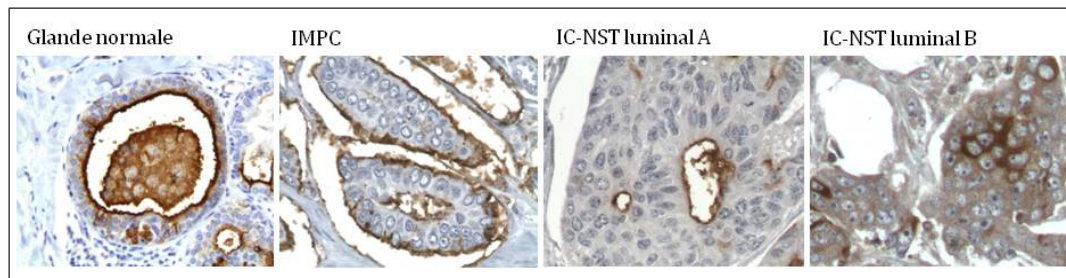


Figure 30: Expression du marqueur CD24 dans les cellules épithéliales de glandes mammaires. Deux profils d'expression de CD24 existent: une expression exclusivement apicale (glande normale et IC-NST luminal A: interne ; IMPC: externe) ou membrano-cytoplasmique (IC-NST luminal B).

Aucune différence majeure en termes de positivité ou d'intensité de marquage n'a été observée pour le marqueur CD44. Cependant, sa localisation subcellulaire peut varier: membranaire pour les IMPC, cytoplasmique pour les IC-NST luminal B et membrano-cytoplasmique pour les IC-NST de type luminal A.

Dans des modèles *in vitro* (Takahashi M *et al*, 2012), la présence de cellules CD44⁺CD24⁻ est associée à une augmentation de la capacité d'invasion des cellules. Dans notre étude, et bien qu'ils présentent un taux d'infiltration lymphovasculaire et axillaire élevé, les IMPC expriment très largement le marqueur CD24, avec un taux de cellules CD44⁺CD24⁺ de 75% contre seulement 4% de cellules CD44⁺CD24⁻. Ceci suggère que les capacités d'invasion des IMPC relèvent d'autres processus biologiques.

L'expression de la protéine nucléaire EZH2 a été rapportée comme associée à un pronostic défavorable. Dans notre étude, elle n'est pas exprimée dans les carcinomes de type luminal A, et son expression est peu fréquente dans les IMPC (1 cas). Cette tumeur est de grade II et surexprime la protéine ERBB2. La fréquence d'expression de EZH2 est significativement plus élevée dans les carcinomes de type luminal B (35% des cas), qui sont d'ailleurs connus pour leur pronostic plus défavorable (Figure 31).

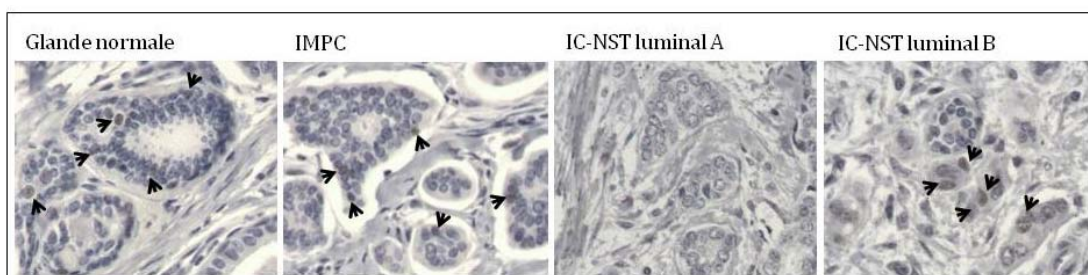


Figure 31: Expression du marqueur EZH2 dans les cellules de glande mammaire. EZH2 est très rarement exprimé dans les cellules de glande normale. Son expression est d'une grande variabilité dans les sous-types tumoraux étudiés: négative pour les IC-NST luminal A, peu fréquente dans les IMPC (4% des cas) ou fréquente dans les IC-NST luminal B (35% des cas).

Cette étude a démontré que, même s'ils partagent de grandes similitudes phénotypiques et génomiques (Marchio C *et al*, 2008) avec les IC-NST de type luminal B, les IMPC représentent une entité tumorale particulière, avec des spécificités d'expression des marqueurs des cellules initiateuses de cancer, à la fois qualitative (CD24, CD44) et quantitative (EZH2).

b- Pronostic des IMPC

La survie des patientes atteintes d'IMPC reste mal connue. Nous avons donc comparé la survie globale des patientes dans chacun des 3 groupes tumoraux étudiés (IMPC, IC-NST luminal A, IC-NST luminal B) (Figure 32). Le groupe IMPC présente un taux de survie identique à celui des carcinomes luminaux A ($p\text{-val}=ns$), mais bien meilleur que celui des IC-NST luminaux B ($p\text{-val}=2.8 \times 10^{-2}$).

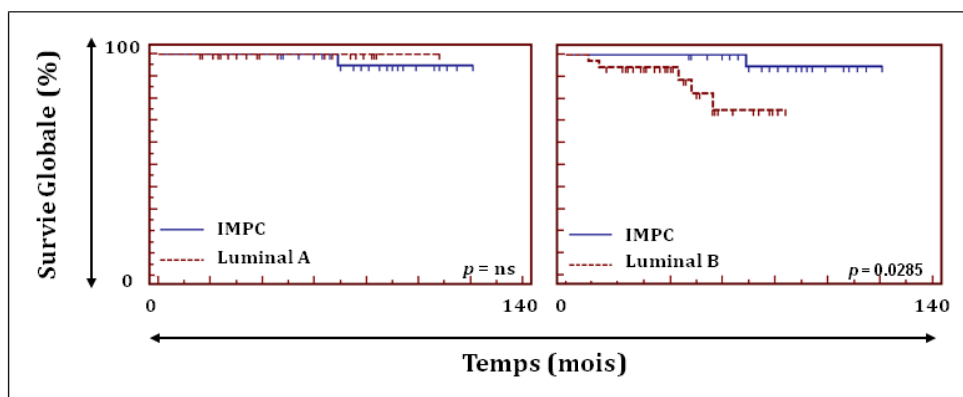


Figure 32: Survie globale à 10 ans chez des patientes atteintes de carcinome infiltrant de type micropapillaire (IMPC, courbe bleue) ou de carcinome infiltrant sans autre spécificité (IC-NST, courbe rouge) luminal A (gauche) ou luminal B (droite).

Une étude épidémiologique rétrospective récente portant sur 624 cas (Chen AC *et al*, 2012) a également montré que les patientes atteintes d'IMPC, même avec plusieurs métastases axillaires au diagnostic, présentent un pronostic identique à celui des patientes atteintes d'IC-NST de mêmes stade et grade. Comme la grande majorité de ces patientes ont été traitées par chimiothérapie, ceci suggère la chimiosensibilité de ces tumeurs.

c- Conclusion

Cette analyse nous a permis de confirmer que, même s'ils partagent des similitudes moléculaires avec les IC-NST de type luminal B, les IMPC présentent des spécificités biologiques. D'après notre analyse phénotypique, les IMPC sont caractérisés par une forte expression de CD24 au pôle apical externe, 2) associée à une rare expression des

marqueurs EZH2, ALDH1 et CD44⁺CD24⁻ et 3) sont de bon pronostic (survie globale de 85% à 10 ans). Ce pronostic pourrait être en partie dû à la faible proportion des cellules progénitrices de cancer du sein, ou à la chimiosensibilité de ces tumeurs.

Inverted Apical CD24 and Weak EZH2 Expressions Are Phenotypic Characteristics of Pure Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast

Nadège Gruel^{1,2}, Aurélie Cédénat³, Marion Richardson³, Paul Fréneaux³, Jaydutt Bhalshankar², Thierry Dubois¹, Xavier Sastre-Garau³, Olivier Delattre², Anne Vincent-Salomon^{2,3*}

¹Translational Research Department, Institut Curie, Paris, France; ²INSERM Unit 830, Institut Curie, Paris, France; ³Department of Tumor Biology, Institut Curie, Paris, France.

Email: *anne.salomon@curie.net

Received ***** 2013

Copyright © 2013 Nadège Gruel *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Invasive micropapillary carcinomas (IMPC) of the breast account for less than 2% of all breast cancers and have been recently described as luminal B carcinomas. CD24, CD44, ALDH1 and EZH2 are commonly used as stem-cell markers that display differential expression as a function of stage and molecular type, but their pattern of expression according to this rare histological type remains poorly defined and unknown for EZH2. We assessed expression of these markers in a series of 28 micropapillary breast carcinomas and compared the results with those obtained in a series of luminal A (27 cases) and B (34 cases) invasive carcinomas not otherwise specified (ICsNOS). CD24 and CD44 were expressed in most cases. However, CD24 was expressed at the inverted apical membrane in 85% of invasive micropapillary carcinoma and at the apical pole of gland-forming cells in 45% of luminal A ($p\text{-val} = 6.8 \times 10^{-4}$) and 13% of luminal B cases ($p\text{-val} = 1.1 \times 10^{-7}$). ALDH1 was expressed in the stroma in most tumors, but in only 25%, 11% and 15% in epithelial cells of IMPC, luminal A and BICsNOS, respectively. Nuclear expression of EZH2 was not observed in luminal A tumors, and was detected in 35% (12/34) of luminal B carcinomas ($p\text{-val} = 6.1 \times 10^{-3}$) and only 4% (1/28) of invasive micropapillary carcinomas. This series shows that invasive micropapillary carcinomas harbor a CD24-positive inverted apical pole associated with weak EZH2 expression, phenotypical characteristics that distinguish this entity from other luminal carcinomas.

Keywords: CD44; CD24; ALDH1; EZH2; Invasive Micropapillary Breast Carcinoma

1. Introduction

Breast carcinoma comprises many different entities characterized by specific molecular alterations. Tumor gene expression analyses have identified major molecular subtypes: luminal A, luminal B, HER2⁺, basal-like and normal breast-like groups [1,2] and, more recently, the apocrine and claudin-low groups [3,4].

Breast cancer-initiating cells have been defined as cells with properties responsible for tumor initiation, potentially driving tumor growth and metastasis, although these statements are still a subject of debate [5,6]. Xenotransplant assays in non-obese diabetic severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice [7] have identified lin⁻/CD44⁺/CD24⁻ cells as candidate breast cancer-initiating cells (BrCICs). Additional markers, such as ALDH1

[8] alone or in conjunction with the CD44⁺/CD24⁻ phenotype, have also been proposed as putative markers of BrCICs.

EZH2 belongs to the Polycomb group of proteins, which are involved in chromatin-modifying complexes, and stem cell self-renewal, a property of BrCICs, and are deregulated in cancer [9,10]. Although rarely chosen as a stem cell marker, EZH2 expression is poorly known in specific histological subtypes and is therefore assessed.

The identification in clinical practice of these BrCICs should help to understand chemo-radiotherapy resistance as stem cells and BrCICs have been shown to be more resistant to treatment than more differentiated cells [11]. In that context, the expression of CD44, CD24, and ALDH1 have been accurately assessed on tissue sections, by immunohistochemistry. The expression patterns of these

*Corresponding author.

markers CD44⁺/CD24⁻ and ALDH1 differed between tumor molecular subtypes and stages. Basal-like carcinomas were recently shown to be enriched in CD44⁺/CD24⁻ cells, whereas HER2⁺ tumors have a predominantly CD24⁺ phenotype [12,13]. CD44 expression is weaker in invasive tumors than in *in situ* tumors, such as those of the luminal A subtype, in particular [14]. ALDH1⁺ cells seem to be more frequent in basal-like and HER2⁺ tumors than in luminal tumors. CD44⁺/CD24⁻/ALDH1⁺ cells are associated with axillary lymph node-positive status and correlated with a poorer patient outcome [15]. EZH2 expression has been associated with poorly differentiated tumors and poor prognosis [16]. Histological types have a clinical impact in treatment decisions, some being associated with good, others with aggressive outcomes [17]. Furthermore, the knowledge of their specificities contributes to their better characterisation.

Few studies have yet addressed the specific pattern of this combination of four markers expression in histological subtypes [18]. Invasive micropapillary carcinoma (IMPC) is a histological type of tumor accounting for less than 2% of all breast cancers. IMPC consists of tumor cells organized into nests presenting an inside-out pattern of MUC-1 labelling, separated from the extracellular matrix by a clear space. More than 60% of IMPC display lympho-vascular invasion and axillary lymph node metastasis and therefore are assumed to constitute an aggressive entity [19]. This histological type has been recognized as part of the luminal spectrum of breast carcinomas [20].

Though, we investigated the expression of CD44, CD24, ALDH1 and EZH2 in a series of 28 IMPC from a single institution. As IMPC have recently been proposed to belong to the group of luminal carcinomas [20] and more specifically to luminal B carcinomas [21], we compared the expression of these markers with that observed in a consecutive series of 27 luminal A and 34 luminal B carcinomas.

Most of the IMPC harbored a specific pattern of CD24 expression different from that of the other luminal tumors analyzed and demonstrated a rare nuclear expression of EZH2.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Tumors

We retrospectively selected 89 cases of invasive breast cancer—28 IMPC, 27 luminal A and 34 luminal B invasive carcinomas not otherwise specified (ICsNOS)—on the basis of the availability of clinical data, paraffin blocks and clinical follow-up information from our tumor bank. Initial treatment was surgery in all selected cases.

These cases were reviewed by two experienced breast pathologists (AVS and PF), according to the World Health Organization (WHO) classification criteria. IMPC cases were recognized on the basis of inside-out MUC-1 staining at the inverted apical pole. ICsNOS were defined as luminal A if grade I or II and ER⁺/PR⁺/ERBB2⁻, and as luminal B if ER⁺ and grade III or ERBB2 (3+) [22]. Experiments were performed in accordance with Bioethics Law No. 2004-800 and the Ethics Charter of the French National Institute of Cancer (INCa) and after approval of the ethics committee of our institution.

2.2. Immunohistochemical Analyses

Tissue microarrays (TMA) were constructed with three representative cores (1 mm in diameter) of each tumor and one core of normal surrounding breast tissue for each case. Four µm thick sections were obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for TMAs. These sections were cut, dried, deparaffinised and rehydrated according to standard procedures. All sections were subjected to heat-induced antigen retrieval in citrate buffer (pH 6.1). Estrogen receptor (ER, clone 6F11, 1:200, Novocastra), progesterone receptor (PR, clone 1A6, 1:200, Novocastra), ERBB2 (clone CB11, 1:1,000, Novocastra), CD44 (Thermo Scientific, clone 156/3C11, 1:100), CD24 (Thermo Scientific, clone SN3b, 1:100), ALDH1 (BD Transduction Laboratories, clone 44/ALDH, 1:200) and EZH2 (Novocastra, clone 6A10, 1:100) expressions were then evaluated. Internal and external positive and negative controls were included for each antibody. Staining was detected with the Vectastain Elite ABC peroxidase mouse IgG kit (Vector Burlingame, CA), with diaminobenzidine (Dako A/S, Glostrup, Denmark) as chromogen. Cases were considered positive for ER and PR when 10% of cells were positive for these markers [23], and the ASCO cut-off was used to determine whether cases were positive for ERBB2 [24].

2.3. Immunohistochemical Scoring for CD44, CD24, ALDH1 and EZH2

For CD24 and CD44 the most frequently used cut-off of 10% of positive cells was chosen [14,25,26]. For ALDH1, the reported cut-offs in literature ranged from one positive cell to 10% of positive cells [14,15,27]. One positive cell cut-off was chosen. For EZH2, we determined our interpretation method according to Kleer *et al.* [16]: a case was considered as negative when no staining was observed and positive when any cell was stained with any intensity of staining. Cellular and subcellular localization in normal breast tissue and in carcinomatous cells was taken into account.

2.4. Survival Analyses

The homogeneity between groups of different tumor types was evaluated by the Pearson Chi-square test. Statistical analyses of survival were carried out with MedCalc® software. Cumulative overall survival was calculated by the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used to analyse differences in survival times. A p -value ≤ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Patient and Tumor Characteristics

A set of 28 IMPC, 27 luminal A and 34 luminal B ICs-NOS was analyzed. The median age of the patients, not statistically different among the three groups (**Table 1**), was 57.5 years (range, 33 - 81 years) for IMPC, 51.9 years (range, 34 - 66 years) for luminal A tumors and 54.7 years (range, 28 - 80 years) for luminal B tumors. All patients were treated according to stage, prognostic and predictive parameters and established protocols: mastectomy (23/89 patients, 26% of cases) or conservative surgery (66/89 patients, 74% of cases) followed by radiation therapy (79/83 patients, 95% of cases). Adjuvant therapies included chemotherapy for 14 of the 28 IMPC (50%), 10 of the 27 luminal A tumors (37%) and 28 of the 34 luminal B tumors (82%), and endocrine therapy for 23 of the 28 IMPC (82%), 24 of the 27 luminal A tumors (89%) and 30 of the 34 (88%) luminal B tumors. Patients with tumors displaying ERBB2 amplification received trastuzumab in an adjuvant setting, in line with protocols established after December 2005, for 2 of the 9 IMPC (22%) and 15 of the 33 luminal B tumor (45%) patients concerned. The clinical and pathological characteristics of the tumor and the mode of treatment are indicated in **Table 1**. Most of the IMPC were grade II and III, ER⁺ (26/28 patients, 93% of cases) and PR⁺ (23/28 patients, 82% of cases), and 32% of cases (9/28 patients) were ERBB2 3+. The proportion of tumors with positive nodal status was significantly higher for IMPC (73% of cases) than for luminal A tumors (37%; p -val = 1.8×10^{-2}), but no significant difference was observed between IMPC and luminal B tumors (61%; p -val = ns). The proportion of cases presenting lympho-vascular invasion was significantly higher for IMPC than for either luminal A or luminal B tumors (86%; 37% p -val = 5.8×10^{-4} and 47%, p -val = 3.7×10^{-3}).

3.2. CD44, CD24, ALDH1 and EZH2 Expression

The expression of the CD44, CD24, ALDH1 and EZH2 markers was analyzed, as these markers have been shown to be associated with either more differentiated luminal epithelial (CD24) or stem cell-like (CD44, ALDH1, EZH2) characteristics (**Figure 1**). As reported by Park

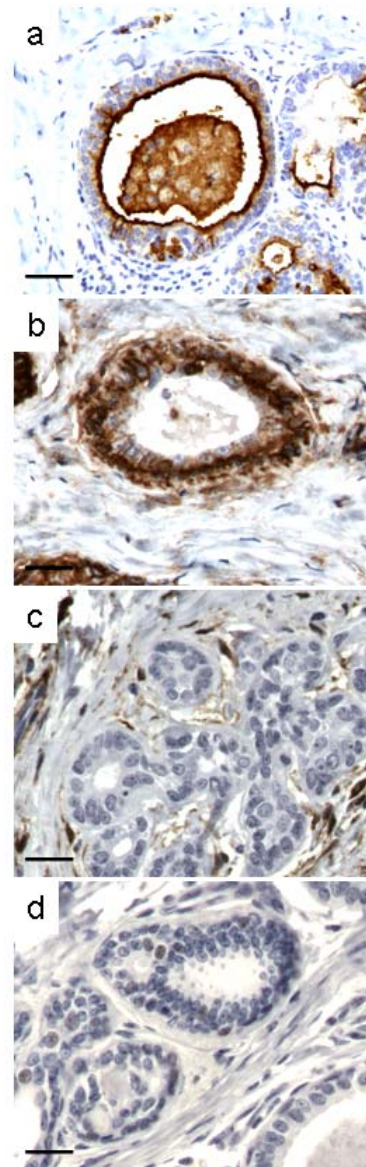


Figure 1. Examples of immunohistochemical analysis of CD24, CD44, ALDH1 and EZH2 expression in normal lobules. (a) CD24; (b) CD44; (c) ALDH1; (d) EZH2. Scale: 20 μ m.

and co-workers [14] for normal breast tissue surrounding tumors, CD24 expression was observed on the apical membrane of luminal cells (**Figure 1(a)**) and CD44 was localized at the cell membrane of myoepithelial cells and some luminal epithelial cells in lobules (**Figure 1(b)**). No ALDH1 expression was detected in normal duct epithelium (**Figure 1(c)**), but staining was observed in the connective tissue surrounding normal acini. Nuclear expression of EZH2 was rarely observed in normal acini (**Figure 1(d)**).

The expression of these markers was further investigated in tumor cells (**Figure 2** and **Table 2**). CD24 label-

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the 28 IMPC and 61 luminal A and B ICsNOS cases. Legends: 1) *p*-val: IMPC vs luminal A NOS ; 2) *p*-val IMPC vs luminal B NOS; 3) *p*-val luminal A NOS vs luminal B NOS.

	IMPC	Lum A	Lum B	1	2	3
	n (%)			<i>p</i> -value		
Number of patients	28	27	34			
Median follow-up, yrs [range]	6.9 [3.9 - 10]	3.2 [0.1 - 8.9]	3.7 [0.8 - 6.9]			
Median age, years	57.5	51.9	54.7			
<50	9 (32)	11 (41)	12 (35)	ns	ns	ns
≥50	19 (68)	16 (59)	22 (65)			
Tumor size, cm						
<2	17 (60)	20 (74)	11 (32)			
2 to 5	10 (36)	7 (26)	19 (56)	ns	ns	3.1×10^{-3}
>5	1 (4)	0 (0)	4 (12)			
Grade						
I	1 (4)	26 (96)	0 (0)			
II	16 (57)	1 (4)	0 (0)	5.1×10^{-11}	6.7×10^{-7}	5.6×10^{-14}
III	11 (39)	0 (0)	34 (100)			
Nodal status						
Positive	19 (73)	10 (37)	20 (61)	1.8×10^{-2}	ns	ns
Negative	7 (27)	17 (63)	13 (39)			
Not specified	2	0	1			
Lympho-vascular invasion						
Positive	24 (86)	10 (37)	16 (47)	5.8×10^{-4}	3.7×10^{-3}	ns
Negative	4 (14)	17 (63)	18 (53)			
Conservative surgery	17 (61)	26 (96)	23 (67)	4.1×10^{-3}	ns	1.3×10^{-2}
Adjuvant therapies						
Cytotoxic chemotherapy	14 (50)	10 (27)	28 (82)	ns	1.4×10^{-2}	7.7×10^{-4}
Endocrine therapy	23 (82)	24 (89)	30 (88)	ns	ns	ns
ER						
Positive	26 (93)	27 (100)	34 (100)	ns	ns	ns
Negative	2 (7)	0 (0)	0 (0)			
PR						
Positive	23 (82)	27 (100)	15 (45)	ns	7.3×10^{-3}	1.6×10^{-5}
Negative	5 (18)	0 (0)	18 (55)			
Not specified	0	0	1			
ERBB2						
Positive	9 (32)	0 (0)	33 (97)	4.2×10^{-3}	2.3×10^{-7}	2.9×10^{-13}
Negative	19 (68)	27 (100)	1 (3)			

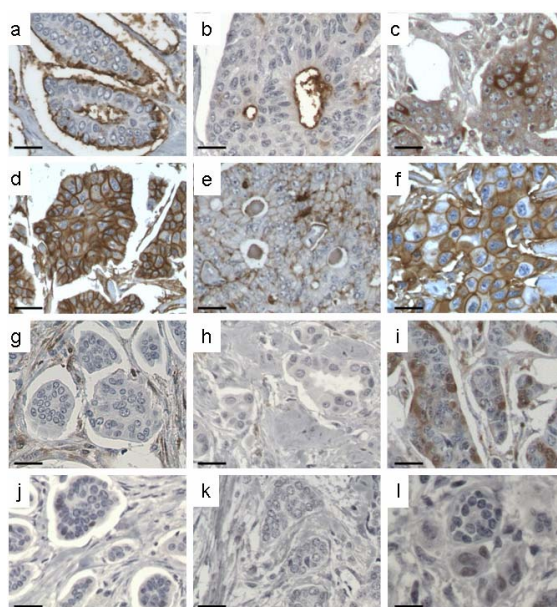


Figure 2: Examples of immunohistochemical staining for CD24, CD44, ALDH1 and EZH2 in breast carcinomas. Left panel: IMPC (a, d, g, j), middle panel: luminal A (b, e, h, k) and right panel: luminal B (c, f, i, l) ICsNOS. Scale: 20 μ m.

Table 2: CD24, CD44, ALDH1 and EZH2 expression patterns, based on immunohistochemical analyses, as a function of tumor subtype. 1) *p*-val IMPC vs luminal A ICsNOS ; 2) *p*-val IMPC vs luminal B ICsNOS; 3) *p*-val luminal A ICsNOS vs luminal B ICsNOS.

	IMPC	Lum A	Lum B	1	2	3
		n (%)			<i>p</i> -value	
Number of patients	28	27	34			
CD44						
Positive	22 (79)	24 (89)	24 (70)			
membranous	10 (36)	3 (11)	6 (18)			
membranocytoplasmic	8 (29)	18 (67)	8 (23)	2.1×10^{-2}	ns	1.3×10^{-2}
cytoplasmic	4 (14)	3 (11)	10 (29)			
Not specified	1 (4)	0 (0)	0 (0)			
CD24						
Positive	27 (96)	20 (74)	30 (88)			
apical membranous	23 (85)	9 (45)	4 (13)	6.8×10^{-4}	1.1×10^{-7}	ns
circumferential	4 (15)	11 (55)	26 (87)	5.7×10^{-2}	3.8×10^{-6}	1.0×10^{-2}
membranocytoplasmic	1 (4)	7 (26)	3 (9)			
CD44 ⁺ /CD24 ⁺	21 (75)	18 (67)	21 (62)			
CD44 ⁺ /CD24 ⁺	5 (17)	0 (0)	1 (3)	8.3×10^{-3}	7.3×10^{-3}	ns
CD44 ⁻ /CD24 ⁻	0 (0)	2 (7)	9 (26)			
Not specified	1 (4)	0 (0)	0 (0)			
ALDH1						
Epithelial cells	7 (25)	3 (11)	5 (15)	ns	ns	ns
Stroma	25 (89)	14 (52)	27 (79)	5.8×10^{-3}	ns	4.5×10^{-2}
EZH2						
Positive	1 (4)	0 (0)	12 (35)	ns	6.1×10^{-3}	6.1×10^{-3}

ling was positive in 96% of IMPC (27/28 patients), 74% of luminal A (20/27 patients) and 88% of luminal B ICsNOS cases (30/34 patients). Two different patterns of CD24 staining were observed, with labelling either only localized at the apical membrane or at the cytoplasmic membrane (circumferential staining). In most IMPC cases, CD24 staining was observed at the apical membrane (**Figure 2(a)**) [85% versus 45% of luminal A tumors (**Figure 2(b)**) ($p\text{-val} = 6.8 \times 10^{-4}$) or 13% of luminal B tumors (**Figure 2(c)**) ($p\text{-val} = 1.1 \times 10^{-7}$)].

CD44 staining was detected in most tumors of all three types [79% of IMPC (22/28 patients) (**Figure 2(d)**), 89% of luminal A tumors (**Figure 2(e)**) (24/27 patients), and 70% of luminal B tumors (**Figure 2(f)**) (24/34 patients)]. However, the localization of this staining differed: both membranous and cytoplasmic in luminal A tumors, membranous in IMPC (36% of cases) and cytoplasmic in luminal B tumors (29% of cases).

The coexistence of cells expressing CD44 and cells expressing CD24 within the same tumor was then analyzed. CD44⁺ and CD24⁺ cells were observed in most cases of the three subtypes studied (75% of IMPC, 67% of luminal A tumors and 62% of luminal B tumors). However, the luminal A subgroup comprised the highest percentage of cases with CD44⁺/CD24⁻ cells: 26%, versus only 4% for IMPC cases. No significant difference was observed between luminal B tumors and IMPC in terms of the proportion of cases with CD44⁺/CD24⁻ cells (9% versus 4%; $p\text{-val} = \text{ns}$).

ALDH1 has been recognized as a putative marker of BrCICs. ALDH1 expression was therefore assessed in this series of cases. ALDH1 was expressed in only 25% of IMPC and 11% of luminal A and 15% of luminal B tumor cells per case. The proportion of ALDH1⁺ cells was 90% in only one IMPC case, which was negative for both ER and PR. All but three IMPC cases presented ALDH1⁺ stromal cells. ALDH1 was clearly expressed in the stroma in most cases of all three tumor types, but more frequently in IMPC (25/28, 89%) and luminal B (27/34, 79%) than in luminal A ICsNOS (14/27, 52%) (**Table 2; Figures 2(g)-(i)**).

EZH2 has been identified as a marker of BrCICs and of breast carcinomas with poor prognosis. EZH2 expression was therefore evaluated in this series of IMPC and luminal A and B tumor controls. One of the 28 IMPC (4%) displayed nuclear EZH2 expression, whereas no EZH2 expression was detected in any of the luminal A tumors (100% negative). Twelve of the 34 cases of luminal B tumors displayed nuclear EZH2 expression (35% cases), with 1% to 25% of cells positive for this marker in each case. EZH2 was more frequently expressed in luminal B tumors than in the other tumor types (luminal B versus IMPC, $p\text{-val} = 6.1 \times 10^{-3}$; luminal B versus

luminal A, $p\text{-val} = 6.1 \times 10^{-3}$) (**Figures 2(j)-(l)**). Notably, the EZH2 positive IMPC case was grade 2 whereas all grade 3 IMPC cases were EZH2 negative.

3.3. Association with Outcome

The definition of IMPC patients outcome remains controversial. Clinical data were available for all patients. We tried to assess the outcome of the three groups (IMPC, luminal A and B ICsNOS) knowing the putative weaknesses of this evaluation (the retrospective nature of the study, the different periods of patient's clinical management, the different clinico-pathological characteristics among the groups). In addition, within the IMPC group, tumors were further classified as "luminal A IMPC" or "luminal B IMPC". This sub-classification allowed us to compare the specific outcome of these two groups of IMPC together and to that of luminal A and B ICNOS respectively.

At 10 years, IMPC patients had overall survival rates similar to those for patients with luminal A IDC tumors (**Figure 3**, upper left panel) ($p\text{-val} = \text{ns}$; median follow-up of 84 [47 - 121] and 39 [2 - 108] months for IMPC and luminal A IDC, respectively) but significantly higher

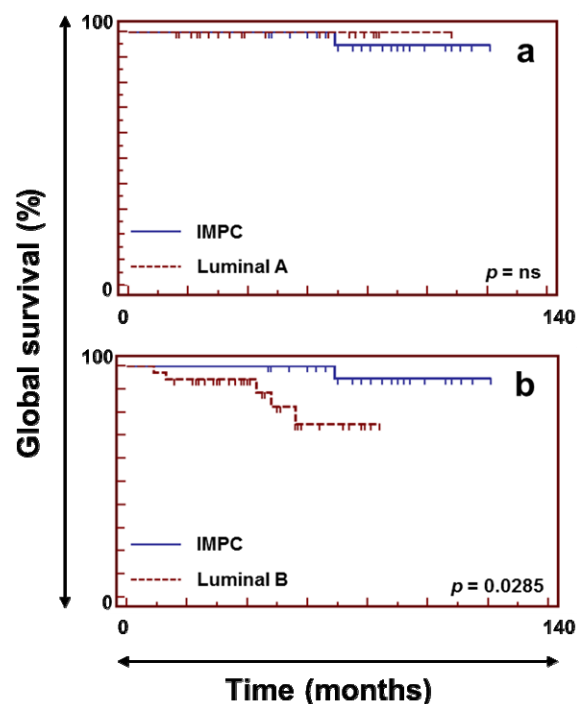


Figure 3. Survival curves for IMPC and luminal A and B invasive carcinomas not otherwise specified. The upper left panel (a) shows a comparison of overall survival between IMPC (solid line) and luminal A ICsNOS (dashed line). The lower left panel (b) shows a comparison of overall survival between IMPC (solid line) and luminal B ICsNOS (dashed line).

overall survival rates than patients with luminal B IDC tumors (**Figure 3**, lower left panel) ($p\text{-val} = 2.8 \times 10^{-2}$; median follow-up of 42 [9 - 84] months for luminal B IDC). IMPC patients had recurrence-free survival rates similar to those of patients with luminal A or luminal B IDC ($p\text{-val} = ns$ —data not shown).

We then compared the outcome according to the molecular subgroups defined as described in material and methods. Luminal A and B ICsNOS showed statistically significant different outcome ($p\text{-val} = 1.2 \times 10^{-2}$ (DFS); $p\text{-val} = 3.7 \times 10^{-2}$ (OS)). Luminal A and B IMPC experienced the same overall survival and disease-free survival ($p\text{-val} = ns$). Luminal A IMPC and luminal A ICsNOS also experienced the same outcome (OS and DFS, $p\text{-val} = ns$). Identically, luminal B IMPC and luminal B ICsNOS had also same overall and disease-free survival (**Supplementary Figure 1**).

4. Discussion

The various molecular subtypes of breast carcinomas and ductal carcinoma *in situ* (DCIS) have been shown to present patterns of so called “stem-cell related” marker expression different from those of ICsNOS. Basal-like tumors have more CD44⁺/CD24⁻ cells than luminal (A and B) and ERBB2 tumors [14]. EZH2 expression in breast carcinomas has been linked to poor prognosis [16]. We assessed the cellular pattern of expression of these markers (CD44, CD24, ALDH1 and EZH2) in IMPC and compared this pattern to that observed in luminal A and B ICsNOS.

IMPC is a rare and unusual histological type, characterized by a very high rate of vascular and axillary lymph node invasion (about 60% to 70% of cases) and features of local and regional aggressiveness. IMPC have recently been shown to share phenotypic and genomic characteristics with luminal B carcinomas [21]. According to the proposed translation of molecular definitions of groups for clinical practice [28,29], we classified the majority of IMPC cases as luminal B tumors, because most cases were positive for oestrogen receptors and had an Elston and Ellis histo-prognostic grade of II or III [30].

This study demonstrated that 1) IMPC differ from luminal B carcinomas by presenting a high level of membranous inverted apical CD24 expression; 2) EZH2 was much less frequently expressed in IMPC than in luminal B carcinomas; 3) IMPC patients had a favourable overall survival (85% at 10 years).

Different patterns of CD44 and CD24 expression have been reported for different tumor stages and molecular subtypes [14]. We observed quantitative differences in CD44 expression, which was weaker in IMPC than in luminal A tumors, and a qualitative difference in CD24 expression, which was detected at the inverted external

apical pole of IMPC tumor cells and the apical pole of gland-forming cells in 45% of luminal A and 13% of luminal B tumors.

CD44 expression is associated with basal-like stem cells [14]. CD44 is more strongly expressed in DCIS than in invasive carcinomas, suggesting that the number of CD44⁺ cells may decrease with tumor progression. In our study, intense CD44 labelling was observed in all three tumor types studied. However, the distribution of this labelling differed between the tumor types: membranous and cytoplasmic in luminal A tumors, membranous in most IMPC and cytoplasmic in most luminal B tumors.

A shift in CD24 staining from the apical membrane to a membranous/cytoplasmic distribution during progression from DCIS to ICsNOS has been reported [14]. We observed intense CD24 staining at the apical inverted poles of IMPC cells. This pattern has also been recently reported by other groups [31,32]. Although, the CD24 antibody used in our study, SN3b, and in these other studies, may recognize an unknown epitope different from the core CD24 protein, it has been proposed that CD24-positive cells might characterize epithelial cells differentiated into the luminal lineage [33]. IMPC should therefore be considered to be differentiated luminal tumors, in which the tumor cells are abnormally polarized, but in which polarization is still present. Conversely, in ICsNOS, polarization is more frequently missing unless glandular differentiation is present. Recently, CD24 expression has been described as higher in cell lines derived from another tumor, well differentiated gastric carcinoma. Its expression at the apical membrane is a feature specific to IMPC that could therefore reflect the well differentiated nature of IMPC [34].

No staining for EZH2 was observed in the luminal A group and EZH2 expression levels were very low in IMPC (4% positive). The only IMPC case displaying EZH2 expression overexpressed ERBB2. In contrast, the frequency of EZH2 expression was significantly higher in luminal B tumors, which are known to have a poor prognosis.

IMPC tumors are associated with a high frequency of vascular and axillary lymph node invasion. Interestingly, in this series, even though the large majority of the IMPC cases was luminal, a small majority (54% of the cases) were luminal B (ER⁺ and grade III or HER2 3+) but demonstrated an outcome identical to that of luminal A IMPC. These observations suggest that despite the high rates of axillary lymph node metastasis and vascular invasion, this outcome could be related either to the small tumors size being mostly T1 and T2 in this series or to IMPC histological type *per se* and its biological properties without excluding also the possibility of a high sen-

sitivity to treatments. The ERBB2 overexpression pattern of IMPC has been reported to be unusual in that it is confined to three sides of the cells, excluding the apical inverted pole [35]. We and other authors [36] have reported low rates of HER2 amplification/overexpression in small T1 a, b tumors ranging around 9% of the cases. In contrast, in this series of T1 and small T2 IMPC, a higher rate of HER2 overexpression is observed.

Paradoxically, CD44⁺/CD24⁻ cells have been reported to be associated with greater invasiveness in an *in vitro* model [37]. However, IMPC tumors, which had vascular and axillary lymph node invasion rates of 70% in this series, displayed intense CD24 labelling of the apical inverted pole in most cases. Interestingly, CD24 is also a glycoprotein known to have a role in cell proliferation and that has been shown to be expressed in gastric carcinomas associated with lymph node metastasis and vascular invasion [34].

The percentage of ALDH1-positive tumors in the present study was lower than reported in other studies (7% to 30% ALDH1⁺ tumors) [8,15]. However, ALDH1 staining within the stroma was observed in most cases in this study, even in the absence of epithelial staining. This observation challenges the use of ALDH1 as an epithelial stem cell-related marker, at least in this rare histological subtype. In luminal A and B ICSNOS, ALDH1 staining patterns were consistent with the low frequency of cells positive for stem cell-related markers on immunohistochemistry. In previous studies based on cell sorting approaches, basal-like carcinomas were identified as the molecular group enriched in tumor-initiating cells/stem cells [33].

In conclusion, IMPC should be considered to be different from other luminal carcinomas, as CD24 is expressed at the inverted apical cellular pole associated with small numbers of EZH2⁺ and ALDH1⁺ epithelial cells.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM and the Institut Curie (Programme Incitatif et Coopératif "Polarité et mitose"). Dr. Anne Vincent-Salomon was supported by an "Interface INSERM" grant.

REFERENCES

- [1] C. M. Perou, T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein, "Molecular Portraits of Human Breast Tumours," *Nature*, Vol. 406, No. 6797, 2000, pp. 747-752. [doi:10.1038/35021093](https://doi.org/10.1038/35021093)
- [2] T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lonning, P. O. Brown, A.-L. Borresen-Dale and D. Botstein, "Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in Independent Gene Expression Data Sets," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 100, No. 14, 2003, pp. 8418-8423. [doi:10.1073/pnas.0932692100](https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100)
- [3] P. Farmer, H. Bonnefoi, V. Bécette, M. Tubiana-Hulin, P. Fumoleau, D. Larsimont, G. Macgrogan, J. Bergh, D. Cameron, D. Goldstein, S. Duss, A. L. Nicoulaz, C. Brisken, M. Fiche, M. Delorenzi and R. Iggo, "Identification of Molecular Apocrine Breast Tumours by Microarray Analysis," *Oncogene*, Vol. 24, No. 29, 2005, pp. 4660-4671. [doi:10.1038/sj.onc.1208561](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208561)
- [4] B. T. Hennessy, A. M. Gonzalez-Angulo, K. Stemke-Hale, M. Z. Gilcrease, S. Krishnamurthy, J. S. Lee, J. Fridlyand, A. Sahin, R. Agarwal, C. Joy, W. Liu, D. Stivers, K. Baggerly, M. Carey, A. Lluch, C. Monteagudo, X. He, V. Weigman, C. Fan, J. Palazzo, G. N. Hortobagyi, L. K. Nolden, N. J. Wang, V. Valero, J. W. Gray, C. M. Perou and G. B. Mills, "Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics," *Cancer Research*, Vol. 69, No. 10, 2009, pp. 4116-4124. [doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3441](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3441)
- [5] E. Charafe-Jauffret, C. Ginestier, F. Iovino, C. Tarpin, M. Diebel, B. Esterni, G. Houvenaeghel, J. M. Extra, F. Bertucci, J. Jacquemier, L. Xerri, G. Dontu, G. Stassi, Y. Xiao, S. H. Barsky, D. Birnbaum, P. Viens and M. S. Wicha, "Aldehyde Dehydrogenase 1-Positive Cancer Stem Cells Mediate Metastasis and Poor Clinical Outcome in Inflammatory Breast Cancer," *Clinical Cancer Research*, Vol. 16, No. 1, 2009, pp. 45-55. [doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1630](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1630)
- [6] K. Polyak and W. C. Hahn, "Roots and Stems: Stem Cells in Cancer," *Nature Medicine*, Vol. 12, No. 3, 2006, pp. 296-300. [doi:10.1038/nm1379](https://doi.org/10.1038/nm1379)
- [7] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke, "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Vol. 100, No. 7, 2003, pp. 3983-3988. [doi:10.1073/pnas.0530291100](https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100)
- [8] C. Ginestier, M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha and G. Dontu, "ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome," *Cell Stem Cell*, Vol. 1, No. 5, 2007, pp. 555-567. [doi:10.1016/j.stem.2007.08.014](https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014)
- [9] L. Ho and G. R. Crabtree, "An EZ Mark to Miss," *Cell Stem Cell*, Vol. 3, No. 6, 2008, pp. 577-578. [doi:10.1016/j.stem.2008.11.007](https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.007)
- [10] M. Zeidler and C. G. Kleer, "The Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste 2: Its Links to DNA Repair and Breast Cancer," *Journal of Molecular Histology*, Vol. 37, No. 5-7, 2006, pp. 219-223. [doi:10.1007/s10735-006-9042-9](https://doi.org/10.1007/s10735-006-9042-9)
- [11] T. Tanei, K. Morimoto, K. Shimazu, S. J. Kim, Y. Tanji, T. Taguchi, Y. Tamaki and S. Noguchi, "Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehy-

- drogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers,” *Clinical Cancer Research*, Vol. 15, No. 12, 2009, pp. 4234-4241.
[doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1479](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1479)
- [12] M. H. Wright, A. M. Calcagno, C. D. Salcido, M. D. Carlson, S. V. Ambudkar and L. Varticovski, “Brcal Breast Tumors Contain Distinct CD44+/CD24- and CD133+ Cells with Cancer Stem Cell Characteristics,” *Breast Cancer Research*, Vol. 10, No. 1, 2008, p. R10.
[doi:10.1186/bcr1855](https://doi.org/10.1186/bcr1855)
- [13] G. Honeth, P. O. Bendahl, M. Ringner, L. H. Saal, S. K. Gruvberger-Saal, K. Lovgren, D. Grabau, M. Ferno, A. Borg and C. Hegardt, “The CD44+/CD24- Phenotype Is Enriched in Basal-Like Breast Tumors,” *Breast Cancer Research*, Vol. 10, No. 3, 2008, p. R53.
[doi:10.1186/bcr2108](https://doi.org/10.1186/bcr2108)
- [14] S. Y. Park, H. E. Lee, H. Li, M. Shipitsin, R. Gelman and K. Polyak, “Heterogeneity for Stem Cell-Related Markers According to Tumor Subtype and Histologic Stage in Breast Cancer,” *Clinical Cancer Research*, Vol. 16, No. 3, 2010, pp. 876-887. [doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1532](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1532)
- [15] V. Neumeister, S. Agarwal, J. Bordeaux, R. L. Camp and D. L. Rimm, “In Situ Identification of Putative Cancer Stem Cells by Multiplexing ALDH1, CD44, and Cytokeratin Identifies Breast Cancer Patients with Poor Prognosis,” *American Journal of Pathology*, Vol. 176, No. 5, 2010, pp. 2131-2138. [doi:10.2353/ajpath.2010.090712](https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090712)
- [16] C. G. Kleer, Q. Cao, S. Varambally, R. Shen, I. Ota, S. A. Tomlins, D. Ghosh, R. G. Sewalt, A. P. Otte, D. F. Hayes, M. S. Sabel, D. Livant, S. J. Weiss, M. A. Rubin and A. M. Chinnaiyan, “EZH2 Is a Marker of Aggressive Breast Cancer and Promotes Neoplastic Transformation of Breast Epithelial Cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Vol. 100, No. 20, 2003, pp. 11606-11611. [doi:10.1073/pnas.1933744100](https://doi.org/10.1073/pnas.1933744100)
- [17] B. Weigelt, F. C. Geyer and J. S. Reis-Filho, “Histological Types Of Breast Cancer: How Special Are They?” *Molecular Oncology*, Vol. 4, No. 3, 2010, pp. 192-208.
[doi:10.1016/j.molonc.2010.04.004](https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004)
- [18] F. F. de Beca, P. Caetano, R. Gerhard, C. A. Alvarenga, M. Gomes, J. Paredes and F. Schmitt, “Cancer Stem Cells Markers CD44, CD24 and ALDH1 in Breast Cancer Special Histological Types,” *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 66, No. 3, 2012, pp. 187-191.
- [19] O. Zekioglu, Y. Erhan, M. Ciris, H. Bayramoglu and N. Ozdemir, “Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: High Incidence of Lymph Node Metastasis with Extranodal Extension and Its Immunohistochemical Profile Compared with Invasive Ductal Carcinoma,” *Histopathology*, Vol. 44, No. 1, 2004, pp. 18-23.
[doi:10.1111/j.1365-2559.2004.01757.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01757.x)
- [20] B. Weigelt, H. M. Horlings, B. Kreike, M. M. Hayes, M. Hauptmann, L. F. Wessels, D. de Jong, M. J. Van de Vijver, L. J. Van’t Veer and J. L. Peterse, “Refinement of Breast Cancer Classification by Molecular Characterization of Histological Special Types,” *Journal of Pathology*, Vol. 216, No. 2, 2008, pp. 141-150.
[doi:10.1002/path.2407](https://doi.org/10.1002/path.2407)
- [21] C. Marchio, M. Iravani, R. Natrajan, M. B. Lambros, K. Savage, N. Tamber, K. Fenwick, A. Mackay, R. Senetta, S. Di Palma, F. C. Schmitt, G. Bussolati, L. O. Ellis, A. Ashworth, A. Sapino and J. S. Reis-Filho, “Genomic and Immunophenotypical Characterization of Pure Micropapillary Carcinomas of the Breast,” *Journal of Pathology*, Vol. 215, No. 4, 2008, pp. 398-410.
- [22] B. Haibe-Kains, C. Desmedt, S. Loi, A. C. Culhane, G. Bontempi, J. Quackenbush and C. Sotiriou, “A Three-Gene Model to Robustly Identify Breast Cancer Molecular Subtypes,” *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 104, No. 4, 2012, pp. 311-325.
[doi:10.1093/jnci/djr545](https://doi.org/10.1093/jnci/djr545)
- [23] B. Zafrani, M. H. Aubriot, E. Mouret, P. De Cremoux, Y. De Rycke, A. Nicolas, E. Boudou, A. Vincent-Salomon, H. Magdelenat and X. Sastre-Garau, “High Sensitivity and Specificity of Immunohistochemistry for the Detection of Hormone Receptors in Breast Carcinoma: Comparison with Biochemical Determination in a Prospective Study of 793 Cases,” *Histopathology*, Vol. 37, No. 6, 2000, pp. 536-545.
[doi:10.1046/j.1365-2559.2000.01006.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.01006.x)
- [24] A. C. Wolff, M. E. Hammond, J. N. Schwartz, K. L. Hagerty, D. C. Allred, R. J. Cote, M. Dowsett, P. L. Fitzgibbons, W. M. Hanna, A. Langer, L. M. McShane, S. Paik, M. D. Pegram, E. A. Perez, M. F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S. E. Taube, R. Tubbs, G. H. Vance, M. van de Vijver, T. M. Wheeler and D. F. Hayes, “American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer,” *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, Vol. 131, No. 1, 2007, p. 18.
- [25] S. Ricardo, A. F. Vieira, R. Gerhard, D. Leitao, R. Pinto, J. F. Cameselle-Teijeiro, F. Milanezi, F. Schmitt and J. Paredes, “Breast Cancer Stem Cell Markers CD44, CD24 and ALDH1: Expression Distribution within Intrinsic Molecular Subtype,” *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 64, No. 11, 2011, pp. 937-946.
[doi:10.1136/jcp.2011.090456](https://doi.org/10.1136/jcp.2011.090456)
- [26] R. Gerhard, S. Ricardo, A. Albergaria, M. Gomes, A. R. Silva, A. F. Logullo, J. F. Cameselle-Teijeiro, J. Paredes and F. Schmitt, “Immunohistochemical Features of Claudin-Low Intrinsic Subtype in Metaplastic Breast Carcinomas,” *Breast*, Vol. 21, No. 3, 2012, pp. 354-360.
[doi:10.1016/j.breast.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.03.001)
- [27] L. P. Kunju, C. Cookingham, K. A. Toy, W. Chen, M. S. Sabel and C. G. Kleer, “EZH2 and ALDH-1 Mark Breast Epithelium at Risk for Breast Cancer Development,” *Modern Pathology*, Vol. 24, No. 6, 2011, pp. 786-793.
[doi:10.1038/modpathol.2011.8](https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.8)
- [28] M. C. U. Cheang, D. Voduc, C. Bajdik, S. Leung, S. McKinney, S. K. Chia, C. M. Perou and T. O. Nielsen, “Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype,” *Clinical Cancer Research*, Vol. 14, No. 5, 2008, pp. 1368-1376. [doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1658](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658)
- [29] T. O. Nielsen, F. D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, C. Livasy, D. Cowan,

- L. Dressler, L. A. Akslen, J. Ragaz, A. M. Gown, C. B. Gilks, M. van de Rijn and C. M. Perou, "Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma," *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, No. 16, 2004, pp. 5367-5374.
[doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0220](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220)
- [30] J. S. Parker, M. Mullins, M. C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J. F. Quackenbush, I. J. Stijleman, J. Palazzo, J. S. Marron, A. B. Nobel, E. Mardis, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, C. M. Perou and P. S. Bernard, "Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes," *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 27, No. 8, 2009, pp. 1160-1167.
[doi:10.1200/JCO.2008.18.1370](https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370)
- [31] W. Li, F. Liu, T. Lei, X. Xu, B. Liu, L. Cui, J. Wei, X. Guo, R. Lang, Y. Fan, F. Gu, P. Tang, X. Zhang and L. Fu, "The Clinicopathological Significance of CD44⁺/CD24⁻ Low and CD24⁺ Tumor Cells in Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast," *Pathology: Research and Practice*, Vol. 206, No. 12, 2010, pp. 828-834.
[doi:10.1016/j.prp.2010.09.008](https://doi.org/10.1016/j.prp.2010.09.008)
- [32] S. Simonetti, L. Terracciano, I. Zlobec, E. Kilic, L. Stasio, M. Quarto, G. Pettinato and L. Insausti, "Immunophenotyping Analysis in Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: Role of CD24 and CD44 Isoforms Expression," *Breast*, Vol. 21, No. 2, 2012, pp. 165-170.
[doi:10.1016/j.breast.2011.09.004](https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.09.004)
- [33] M. Shipitsin, L. L. Campbell, P. Argani, S. Weremowicz, N. Bloushtain-Qimron, J. Yao, T. Nikolskaya, T. Serebryiskaya, R. Beroukhi, M. Hu, M. K. Halushka, S. Sukumar, L. M. Parker, K. S. Anderson, L. N. Harris, J. E. Garber, A. L. Richardson, S. J. Schnitt, Y. Nikolsky, R. S. Gelman and K. Polyak, "Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity," *Cancer Cell*, Vol. 11, No. 3, 2007, pp. 259-273. [doi:10.1016/j.ccr.2007.01.013](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.013)
- [34] M. Takahashi, M. Nakajima, H. Ogata, Y. Domeki, K. Ohtsuka, K. Ihara, E. Kurayama, S. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Miyachi and H. Kato, "CD24 Expression Is Associated with Progression of Gastric Cancer," *Hepatology*, Vol. 60, No. 124, 2012, in press.
- [35] A. Ranade, R. Batra, G. Sandhu, R. A. Chitale and J. Balderacchi, "Clinicopathological Evaluation of 100 Cases of Mucinous Carcinoma of Breast with Emphasis on Axillary Staging and Special Reference to a Micropapillary Pattern," *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 63, No. 12, 2010, pp. 1043-1047. [doi:10.1136/jcp.2010.082495](https://doi.org/10.1136/jcp.2010.082495)
- [36] M. J. Rodrigues, J. Wassermann, L. Albiges, E. Brain, S. Delaloge, D. Stevens, J. M. Guinebreiere, M. C. Mathieu, Y. Kirova, E. Guillot, A. Vincent-Salomon and P. H. Cottu, "Trastuzumab Treatment in T1ab, Node-Negative, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Breast Carcinomas," *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 28, No. 28, 2010, pp. e541-e542.
[doi:10.1200/JCO.2010.29.7952](https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.7952)
- [37] M. J. Meyer, J. M. Fleming, M. A. Ali, M. W. Pesesky, E. Ginsburg and B. K. Vonderhaar, "Dynamic Regulation of CD24 and the Invasive, CD44posCD24neg Phenotype in Breast Cancer Cell Lines," *Breast Cancer Research*, Vol. 11, No. 6, 2009, p. R82. [doi:10.1186/bcr2449](https://doi.org/10.1186/bcr2449)

Supplementary Figure

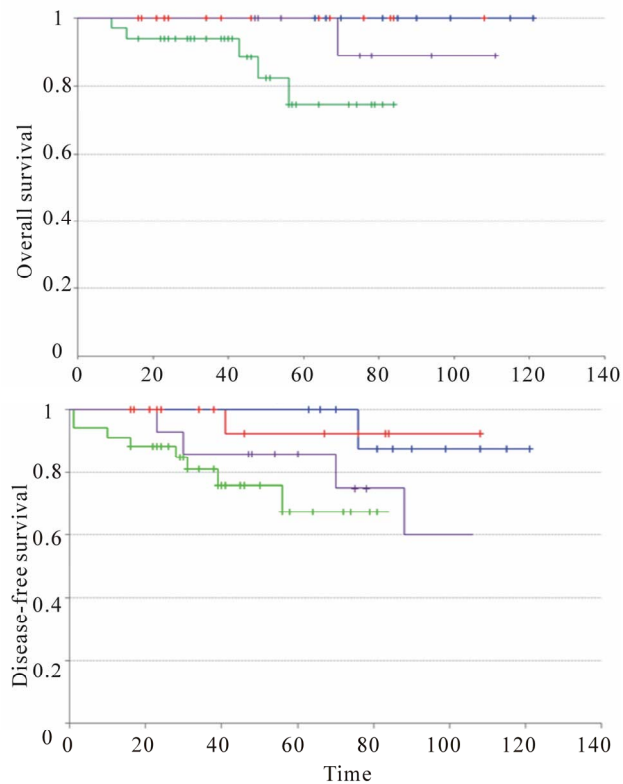


Figure 1. Overall and disease-free survival curves Luminal A and Luminal B IMPC and for luminal A and luminal B ICsNOS. The upper panel shows a comparison of overall survival between luminal A IMPC (blue line), luminal B IMPC (purple line), luminal A ICsNOS (red line) and luminal B ICsNOS (green line). The lower panel shows a comparison of disease free-survival between luminal A IMPC (blue line), luminal B IMPC (purple line), luminal A ICsNOS (red line) and luminal B ICsNOS (green line).

2-2. Etude phénotypique détaillée de la polarité cellulaire des IMPC

Une étude immunohistochimique à l'aide de marqueurs permettant d'identifier les domaines apicaux (MUC-1, Ezrine-Radixine-Moésine, aPKC ζ , CDC42) et basolatéraux (ERBB2, SCRIB), les jonctions adhérentes (E-cadhérine, β -caténine) ou serrées (ZO-1, occludine) a été réalisée. Notre objectif est de documenter et préciser les altérations de la polarité apico-basale des IMPC.

Vingt-cinq IMPC ont été comparés à une série de carcinomes sans autre spécificité, de même grade et exprimant le récepteur aux oestrogènes (IC-NST R0+).

Overexpression of the LIN7A polarity protein characterizes invasive micropapillary carcinomas of the breast, down-regulates aPKC ζ phosphorylation, enhances proliferation and anoikis resistance.

Gruel N, Fuhrmann L, Bhalshankar J, Cedenot A, Mariani O, Fréneaux P, Arnould L, Mac Grogan G, Sastre-Garau X, Delattre O, Vincent-Salomon A.

Manuscrit en préparation

a- Altérations de la polarité apico-basale

Nous avons montré que les IMPC présentent non pas une simple inversion du pôle apical, mais de nombreuses altérations de la polarité apico-basale.

En effet, ces cellules carcinomateuses sont regroupées en amas, sans lumière centrale et présentent un pôle apical altéré: outre l'expression du marqueur MUC-1 au pôle apical tourné vers la matrice extracellulaire dans plus de 90% des IMPC, 60% des tumeurs analysées montrent une absence d'expression des marqueurs apicaux Ezrine-Radixine-Moésine (ERM). Le défaut de polarité est encore plus nettement observé avec la présence, dans les cellules carcinomateuses, d'amas de la protéine golgienne GM130, orientés soit uniquement vers le pôle apical externe (38% des cas) ou, dans la majorité des cas (58%), placés à n'importe quelle position dans le cytoplasme. Les cellules tumorales des IC-NST ne présentent plus de pôle apical (absence d'expression des protéines ERM, expression cytoplasmique de MUC-1, expression ubiquitaire de GM130) (**Figure 33**).

Les protéines apicobasales SCRIB et ERBB2 sont exclusivement exprimées au domaine basolatéral interne des cellules des IMPC (**Figure 34**).

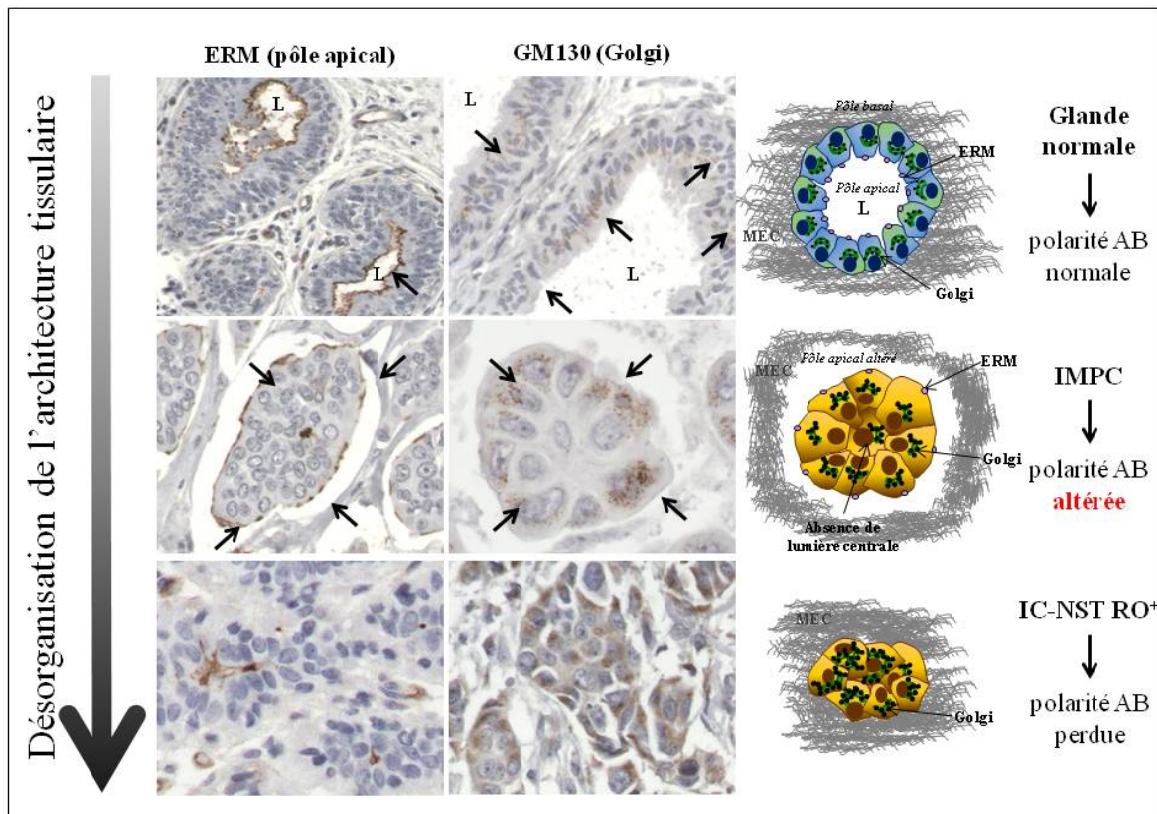


Figure 33: Désorganisation de la polarité apico-basale dans les tumeurs mammaires de type IMPC ou IC-NST. Exemple de 2 marqueurs étudiés, afin d'orienter le pôle apical: Ezrine-Moésine-Radixine (pôle apical) et GM130 (appareil de Golgi). AB: apico-basale. L: lumière.

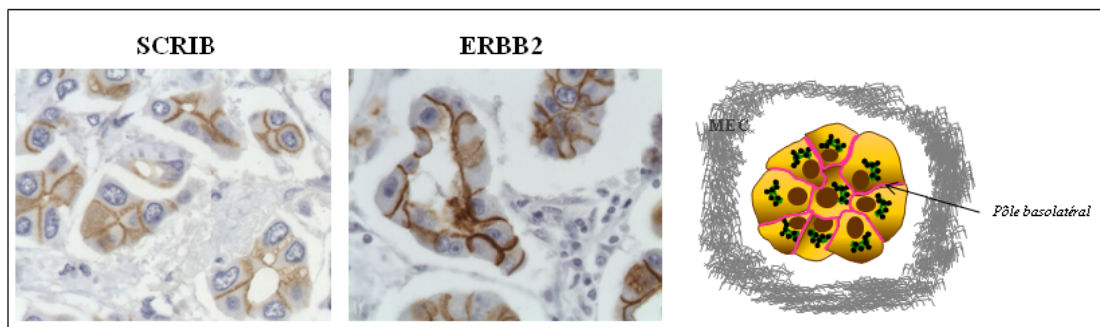


Figure 34: Détection du pôle basolatéral dans les tumeurs mammaires de type IMPC. Exemple de deux marqueurs étudiés: SCRIB et ERBB2.

L'expression de certains marqueurs participant à la formation et à la maturation des jonctions adhérentes (β -caténine) et serrées (ZO-1, occludine, CDC42, aPKC ζ) a également été analysée. De nombreuses altérations en termes de niveau d'expression et de localisation subcellulaire ont été observées: expression cytoplasmique de ZO-1 (16% des cas), absence d'expression (25% des cas) ou localisation cytoplasmique

(57% des cas) de l'occludine. L'expression des protéines du complexe PAR est également altérée : localisation cytoplasmique ou absence d'expression des protéines CDC42 (4% et 13% des cas) et aPKC ζ (37% et 4% des cas) (**Figure 35**).

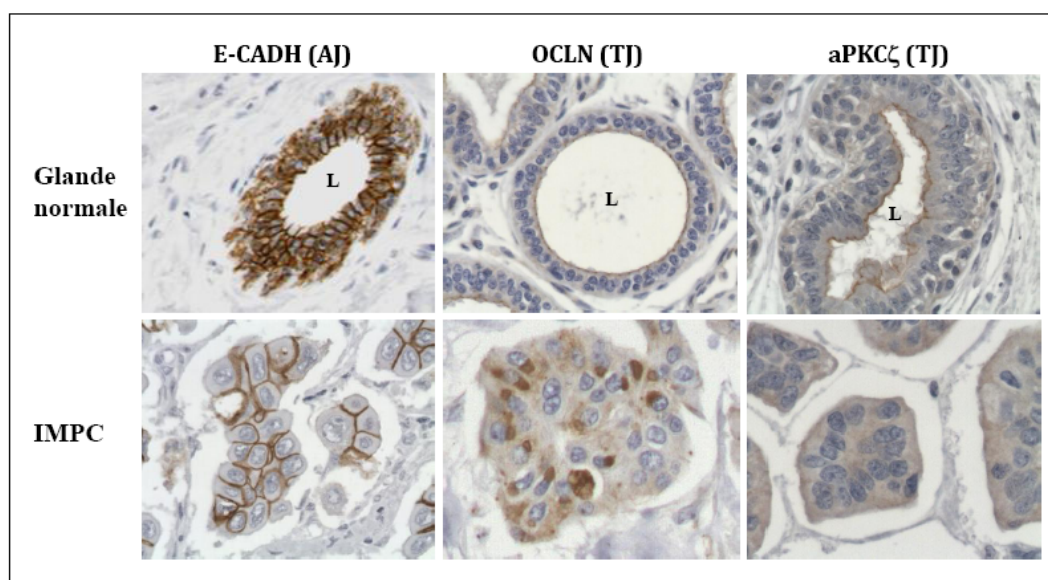


Figure 35: Expression des marqueurs des jonctions intercellulaires dans les glandes mammaires normales et les tumeurs mammaires de type IMPC. E-CADH: E-cadhérine ; OCLN: occludine ; AJ: jonctions adhérentes ; TJ: jonctions serrées.

b- Présence d'un stroma réactif et d'une lumière externe

Les tumeurs de type IMPC présentent un stroma peu abondant et composé de myofibroblastes, comme le montre l'expression de l'actine musculaire lisse α (**Figure 36A**). Les myofibroblastes, aux fortes capacités migratoires, peuvent participer à la dissémination des cellules carcinomateuses, et pourraient expliquer la forte fréquence de métastases axillaires observées dans les tumeurs de type IMPC.

Les IMPC ont également la particularité de présenter un espace clair de rétraction entre les cellules tumorales regroupées en amas et la matrice extracellulaire. Cet espace de rétraction n'est pas artéfactuel car il n'existe que très rarement dans les autres entités tumorales analysées (IC-NST, ILC), et ce, dans les mêmes conditions de fixation (AFA, Alcool-Formol-Acide acétique). Il est, d'autre part, observé sur des coupes de xénogreffes de tumeurs micropapillaires de sein réalisées chez la souris Nude (Collaboration Franck Assayag, Laboratoire d'Investigation Pré-clinique, Institut Curie) ou sur des coupes de tumeurs de poumon de type micropapillaire (Collaboration Dr A. Mansuet-Lupo, Hôpital Hôtel-Dieu, AP-HP), donnant du crédit à ce signe morphologique. Cet espace clair ne contient pas de mucines (coloration au

bleu Alcian) (**Figure 36B**) ni de polysaccharides (coloration à l'acide périodique – Schiff ou PAS) (**Figures 36C**).

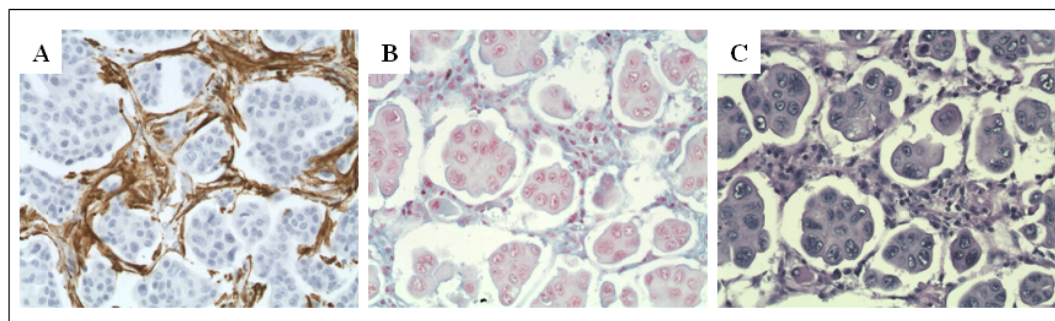


Figure 36: Caractérisation du stroma et de l'espace clair de rétraction des IMPC.
(A) Expression de l'actine α musculaire lisse. Coloration au Bleu Alcian (B) et au PAS (C).

Les cellules carcinomateuses micropapillaires du sein apparaissent donc comme des cellules très cohésives entre elles à la polarité apico-basale non seulement inversée mais également altérée, formant des amas de cellules sans lumière centrale et entourées d'une « lumière » externe, qui les isole d'un stroma dense et myofibroblastique, stroma pouvant favoriser la dissémination lymphatique.

c- Surexpression de la protéine de la polarité LIN7A

Afin d'identifier les gènes responsables des altérations de la polarité apico-basale et des défauts d'adhésion à la matrice extracellulaire, une analyse transcriptomique comparant l'expression de 54613 probesets (U133 Plus 2.0, Affymetrix™) dans 73 IMPC et 51 IC-NST RO⁺ de même grade a été réalisée. L'ensemble des tumeurs a été séparé en deux séries: une série initiale composée de 37 IMPC et 26 IC-NST RO⁺, et une série de validation, composée de 36 IMPC et 25 IC-NST RO⁺.

Un test de Welch corrigé (correction Benjamini Hodgberg, $p\text{-val} \leq 0,05$ et $FC \geq 1,5$), appliqué sur la série initiale et complété par une analyse « *Gene Ontology* » a mis en évidence une signature transcriptomique de 717 gènes, spécifique des tumeurs de type micropapillaire. La classification hiérarchique non supervisée de ces tumeurs à partir de l'expression des 717 gènes différentiels a été réalisée et a permis la bonne séparation des deux entités tumorales, avec une sensibilité de 76% (nombre d'IMPC bien classés) et une spécificité de 100% (nombre d'IC-NST bien classés) (aire sous la courbe (AUC) : 0,88) (**Figure 37A**). La robustesse de cette signature, appliquée sur le second jeu indépendant de tumeurs (36 IMPC et 25 IC-NST RO⁺) a été validée, montrant une sensibilité de 70% et une spécificité de 100% (aire sous la courbe : 0,85) (**Figure 37B**).

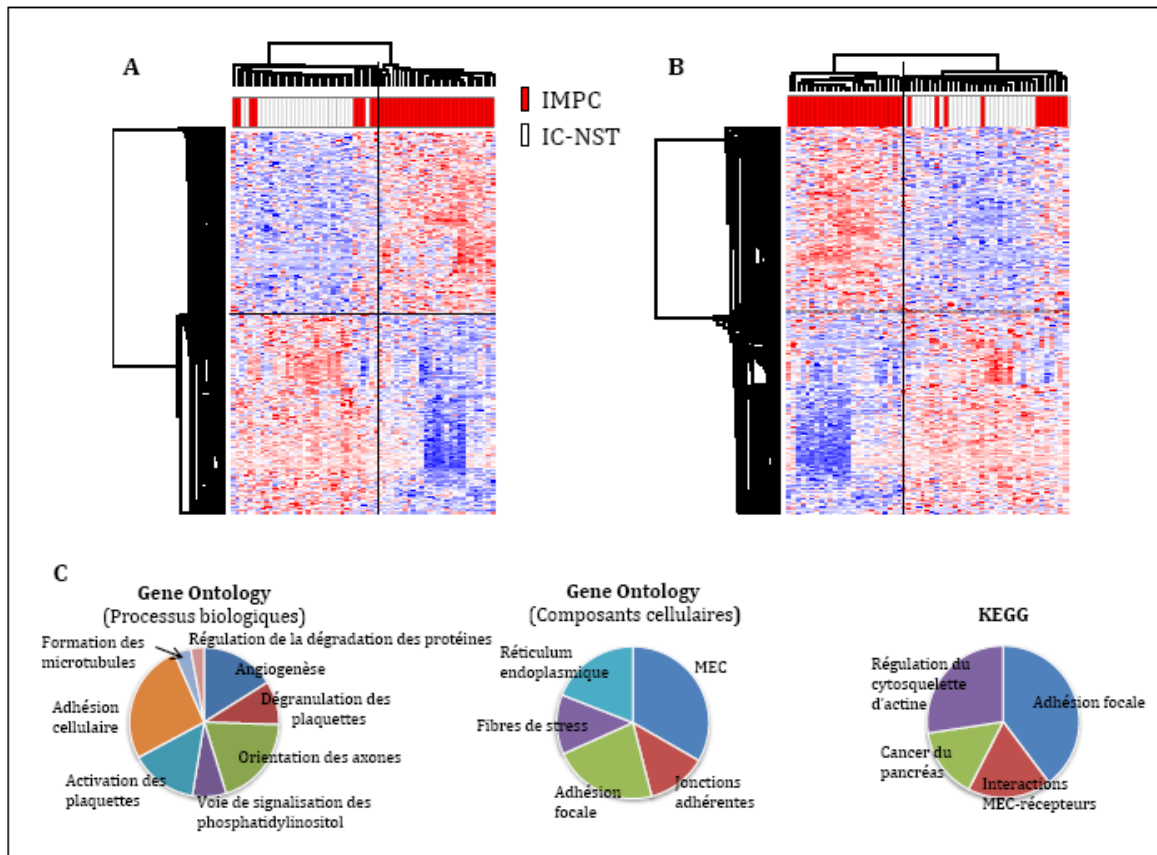


Figure 37: Classification hiérarchique non supervisée entre les tumeurs mammaires de type IMPC et IC-NST. Classification basée sur l'expression de 719 gènes différentiels (fold-change $\geq 1,5$ et $p\text{-val} \leq 0,05$). (A) série d'entraînement. (B) série de validation. (C) Analyse des voies de signalisation spécifiquement dérégulées dans les IMPC.

Cette analyse (Figure 37C) a permis d'identifier des altérations spécifiques de gènes impliqués dans :

- la polarité apico-basale: régulation positive de *LIN7A* (complexe Crumbs), *PARD6* (complexe PAR), *MPP7*, *CLDN23* (jonctions serrées), *CTNNB1* (jonctions adhérentes) et régulation négative de *CTNNA* (jonctions adhérentes), *FOXO3* et *LOXL2*
- l'adhésion cellules/matrice: régulation négative des gènes codant pour les intégrines (chaînes $\alpha11$, $\alpha5$, $\beta11$) et les constituants de la matrice extracellulaire (collagènes $4\alpha1$, $18\alpha1$, $4\alpha2$, $5\alpha1$, $5\alpha3$, $6\alpha2$, laminine $\beta1$, fibronectine, nidogène, etc...)
- le maintien du cytosquelette et des microtubules : défaut d'expression des gènes codant pour l'actine musculaire lisse $\alpha2$, l'actinine $\alpha4$, des ankyrines, la protéine 2 associée au cytosquelette (CKAP2L), la dynéine (chaîne légère), la fascine 1, l'ILK (*integrin-linked kinase*), les protéines associées aux microtubules (*MAP1B*, *MAP1S*, *MAP2*) et la tubuline β
- l'angiogenèse

Cette analyse confirme que le carcinome invasif de type micropapillaire est une maladie des altérations de la polarité, associée à un défaut d'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire. Ceci pourrait expliquer la présence d'un espace clair de rétraction entre les îlots de cellules micropapillaires et la MEC.

Parmi ces gènes dérégulés, un est spécifiquement surexprimé dans les IMPC, d'après les données de puces d'expression, confirmées par PCR quantitative: le gène *LIN7A* (Figure 38).

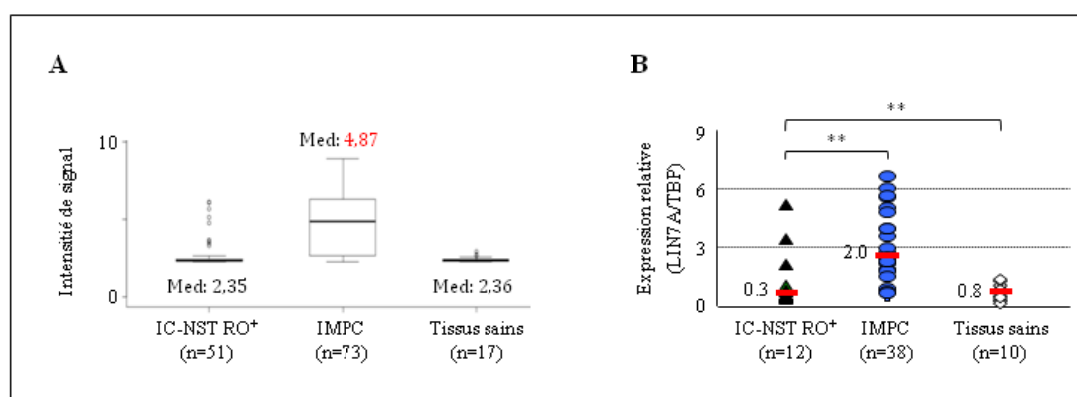


Figure 38: Expression de LIN7A dans les IMPC. (A) Box-plots des intensités de signaux obtenus par puces d'expression U133 Plus 2.0 (Affymetrix). Med: valeur médiane. (B) RT-PCR quantitative: l'expression de LIN7A est relative à l'expression du gène de ménage TBP.

Ce gène code pour une protéine qui appartient au complexe CRUMBS, impliquée dans la formation des jonctions serrées, qui, via son domaine PDZ, interagit directement avec les protéines β -caténine et E-cadhérine. Le complexe β -CAT-LIN7A interagit avec AQP1 (Monzani E *et al*, 2009), protéine impliquée dans la migration cellulaire et l'angiogénèse. La surexpression de LIN7A dans les IMPC pourrait expliquer les altérations de la polarité apico-basale observées dans ce type de tumeur (absence de lumière, pôle apical externe, déformations des AJ) et, de part son interaction avec AQP1 via la β -caténine, la forte fréquence d'emboles vasculaire observée dans ce sous-type de cancer du sein (70% environ contre 30% dans les autres sous-types).

2-3. Etablissement d'un modèle *in vitro*

La lignée mammaire dérivée d'un épithélium mammaire normal MCF10A a été infectée par un vecteur lentiviral contenant le cDNA du gène d'intérêt LIN7A.

a- La surexpression de LIN7A altère la polarité apico-basale

Après 11 jours de culture en Matrigel™, les cellules témoins (MCF10A-pCDH1) montrent, dans la majorité des cas, des lobules glandulaires constitués de cellules bien polarisées, en une seule couche cellulaire, avec une lumière centrale nette. Contrairement aux cellules témoins, les cellules MCF10A surexprimant LIN7A (MCF10A-LIN7A) présentent des altérations majeures de la polarité. En effet, les cellules forment des massifs déformés, constitués de plusieurs lobes hyperprolifératifs (expression du marqueur de prolifération KI-67 augmentée: 45% vs 10%) (**Figure 39A**) et sans lumière.

Cette hyperprolifération semble due à une activation des MAP kinases par LIN7A: la surexpression de LIN7A semble corrélée à l'activation des protéines kinases actives (forme phosphorylée) MEK1/2, ERK1/2 et AKT. Des expériences complémentaires sont actuellement en cours (**Figure 39B**).

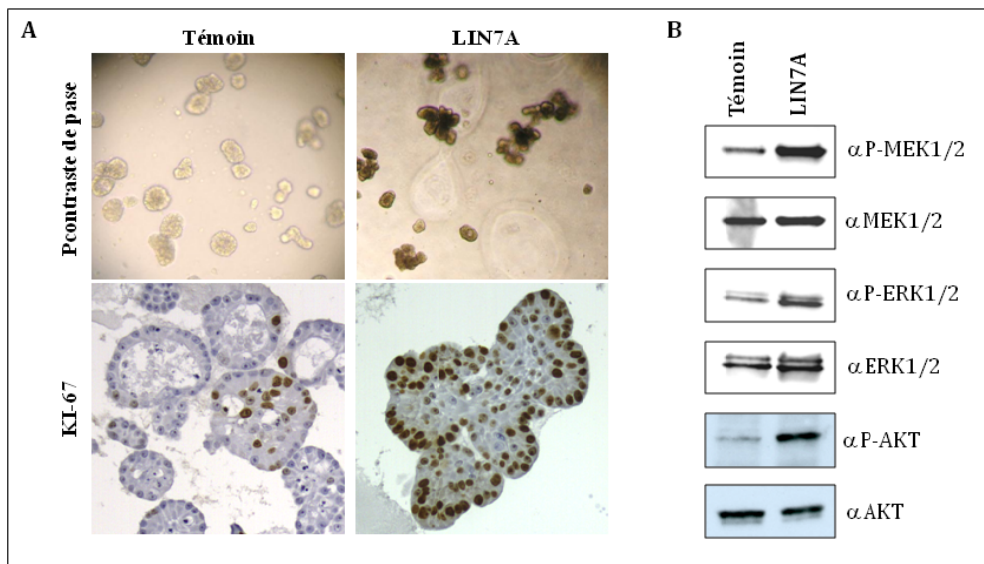


Figure 39: Cellules MCF10A surexprimant LIN7A et cultivées pendant 11 jours dans du Matrigel™. (A) On observe la formation de cystes polylobés, hyperprolifératifs et sans lumière centrale. **(B)** La surexpression de LIN7A est corrélée à une surexpression des formes actives phosphorylées des protéines MEK1/2, ERK1/2 et AKT.

b- La surexpression de LIN7A inhibe la formation de la lumière centrale

L'absence de lumière observée dans les cellules MCF10A-LIN7A (et la majorité des IMPC) est due à l'inhibition de l'apoptose centrale, comme le montre la diminution de l'expression du marqueur pro-apoptotique Caspase-3 activée (60% vs 10%) et la diminution du nombre de cystes avec lumière, observés dans les cellules MCF10A-LIN7A par rapport aux cellules témoin (**Figure 40A et 40B**).

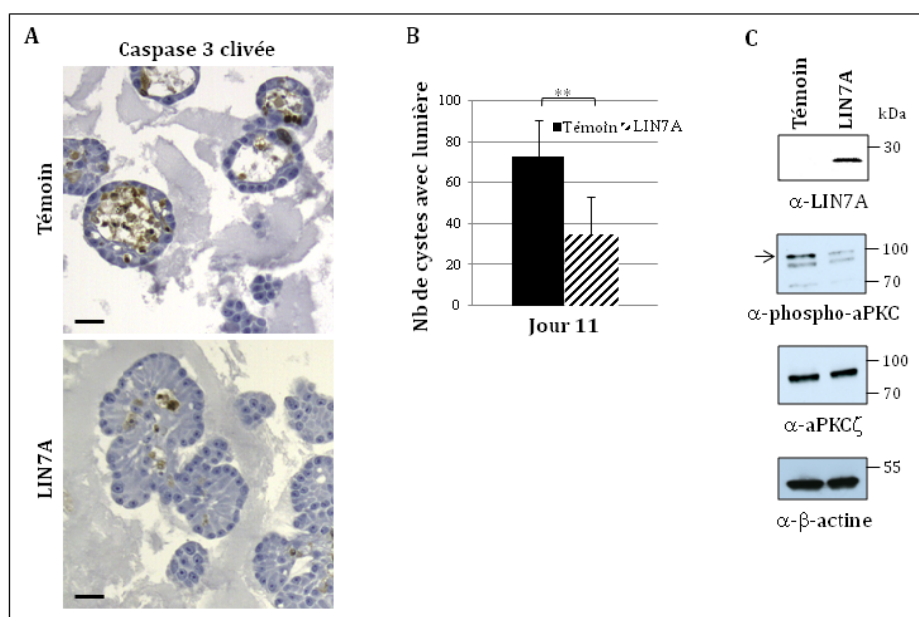


Figure 40: La surexpression de LIN7A inhibe la formation de la lumière centrale. (A) Expression de la caspase-3 activée dans les cellules MCF10A témoins ou surexprimant LIN7A. (B) Comptage du nombre de cystes présentant une lumière après 11 jours de culture 3-D dans du Matrigel™. (C) Détection de la protéine aPKC ζ (forme active phosphorylée ou forme totale) dans des extraits cellulaires de cellules MCF10A témoins ou surexprimant LIN7A cultivées en 3-D pendant 11 jours.

La forme active de la protéine aPKC ζ est directement impliquée dans la formation de la lumière centrale. Des travaux récents menés par J Whyte et collaborateurs (Whyte J *et al*, 2010) ont montré que l'activation d'aPKC ζ , via la phosphorylation de sa Thréonine 410, est nécessaire à la formation de la lumière. Cette activation a lieu très tôt dans le processus de formation des *acini*.

Nous avons observé que la surexpression de LIN7A était corrélée à l'inhibition de la phosphorylation de la protéine aPKC ζ dans les cellules MCF10A (Figure 40C). Les mécanismes moléculaires impliqués sont actuellement en cours d'étude.

c- La surexpression de LIN7A induit une résistance à l'anoïkis

La survie des cellules épithéliales dépend de leur adhésion aux cellules voisines et à la matrice extracellulaire, via leurs intégrines de surface. Tout détachement de leur point d'ancrage provoque normalement un phénomène d'apoptose appelé anoïkis. Les tumeurs de type IMPC présentent de réels défauts d'adhésion, comme le montre la sous-expression des intégrines (α 11, α 5, α 6, β 2, β 5 et β -like 1) et de leurs ligands (collagènes, laminines). La présence d'un espace clair de rétraction entre le stroma et les cellules carcinomateuses témoigne de ce défaut d'adhésion et de la résistance des cellules tumorales à l'anoïkis.

L'exploration de notre modèle *in vitro*, a montré que la surexpression de la protéine LIN7A est suffisante pour induire une résistance à l'anoïkis des cellules épithéliales MCF10A. En effet, en conditions de faible adhésion (plaque de polyHEMA), les cellules MCF10A-LIN7A, contrairement aux cellules témoins, survivent (comptage par exclusion au Bleu trypan) et sont capables de ré-adhérer au plastique, dans des conditions standards de culture (Figures 41A). Des expériences de cytométrie de flux montrent que la surexpression de LIN7A est corrélée avec la diminution des cellules apoptotiques Annexine V⁺-PI⁺ et l'augmentation des cellules vivantes Annexine V⁻-PI⁻ (Figure 41B).

Cette résistance à l'anoïkis des cellules surexprimant LIN7A est corrélée à l'inhibition de P38 α (Wen HC *et al*, 2011). Des expériences complémentaires sont actuellement en cours, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu (Figure 41C).

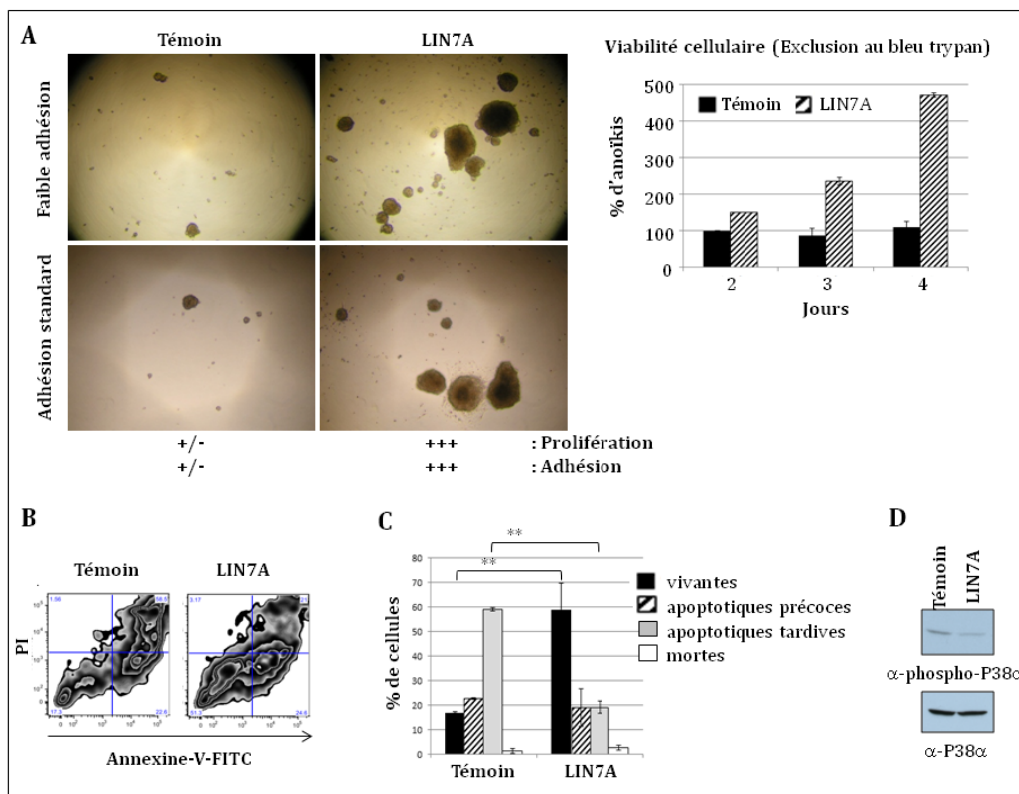


Figure 41: LIN7A induit une résistance à l'anoïkis. (A) : Les cellules MCF10A-LIN7A sont mises en culture dans des conditions de faible adhésion (plaque de polyHEMA) et la viabilité cellulaire est estimée par exclusion au bleu trypan à jours 2, 3 et 4. Les cellules résistantes sont remises en culture dans des conditions standards d'adhésion, afin d'évaluer leur potentiel de ré-adhésion et de prolifération. (B et C) : Evaluation par cytométrie de flux du taux de cellules vivantes, apoptotiques ou mortes après 30h de culture en conditions de faible adhésion. (D) : La surexpression de LIN7A est corrélée avec l'inhibition de la phosphorylation de P38 α .

d- Conclusion

Nous avons identifié une signature moléculaire spécifique des IMPC, et principalement caractérisée par une dérégulation des gènes impliqués dans la formation et le maintien de la polarité apico-basale, l'adhésion cellule-matrice extracellulaire et l'invasion.

Nous avons observé une régulation positive et spécifique du gène *LIN7A* dans les IMPC et avons montré que sa surexpression dans la lignée épithéliale mammaire MCF10A induisait i) la formation de massifs polylobés, hyperprolifératifs et ii) sans lumière centrale, ainsi iii) qu'une résistance à l'anoïkis. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont actuellement en cours d'étude.

Overexpression of LIN7A polarity protein characterizes invasive micropapillary carcinomas of the breast, down-regulates aPKC ζ phosphorylation, enhances proliferation and anoikis resistance.

Nadège Gruel^{1,2}, Laetitia Fuhrmann^{3,4}, Jaydutt Bhalshankar¹, Aurélie Cédenot⁴, Odette Mariani⁴, Paul Fréneaux⁴, Laurent Arnould⁵, Gaëtan Mac Grogan⁶, Xavier Sastre-Garau⁴, Olivier Delattre¹, Anne Vincent-Salomon^{1,4}.

1: INSERM U830, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cédex 05, France

2: Institut Curie, Department of Translational Research, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cédex 05, France

3: CNRS UMR144, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cédex 05, France

4: Institut Curie, Département of Tumor Biology, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cédex 05, France

5: Centre Georges François Leclerc, Département of Pathology and CRB Ferdinand Cabanne, 1 rue Professeur Marion BP 77 980, 21079 Dijon Cédex, France.

6 : Institut Bergonié, cours de l'Argonne, Bordeaux, France

Manuscrit en préparation

Running title:

Corresponding author: Anne Vincent-Salomon

INSERM U830 and Department of Pathology, Institut CURIE

26 rue d'ULM, 75248 PARIS Cédex 05, France.

e-mail: anne.salomon@curie.net

Phone: +33 1 44 32 42 15

FAX: +33 1 53 10 40 10

The authors declare no conflict of interest.

Word count: words; this manuscript includes 1 table and five figures.

Key words: Breast cancer, micropapillary carcinomas, cell polarity, LIN7A.

Introduction

Cell polarity is essential for normal glandular epithelium organization. Multiple protein complexes regulate the apico-basal cell polarity among which Crumbs and Par at the apical pole and Scribble at the apico-basal pole. Their respective roles in polarity maintenance are tightly inter-related and fine-tuned as a protein complex intra-cellular balance. It has been nicely shown that Par3/aPKC interaction is essential for mammary gland development and end bud remodeling (1) and that PAR6 regulates both polarity regulation and proliferation in mammary cell lines. Even though carcinomas generally retain part of their epithelial characteristics with adherent and tight junction's organization, there is growing evidence on the central role of polarity alterations in carcinogenesis (2). The Crumbs complex encompasses PATJ, PALS1, ERM proteins and LIN7A attached to PALS1. The LIN7A protein may regulate delivery and recycling of proteins to the correct membrane domains. LIN7A protein has a PDZ (*Post synaptic density-95/Dlg/ZO-1*) and a L27 (*Like LIN2 and LIN7*) domains. LIN7A is also linked to β -catenin and E-cadherin through its PDZ domain and this link is Ca^{++} dependent. Very little is known about LIN7A's role and deregulation but it is involved in establishing and maintaining the asymmetric distribution of receptors of polarized cells. The Par complex is one of the most obviously implicated so far in carcinogenesis and in particular in breast carcinogenesis. However, the molecular mechanisms associated with the alteration of polarity proteins in cancer development remain largely unknown. Defects in polarity regulation have numerous cellular consequences encompassing mitotic abnormalities and a higher proliferation. In 3D *in vitro* models, the loss of epithelial glandular formation has been shown to be a consequence of modification of polarity proteins and oncogenes expression like ERBB2 or MYC in MCF10A cells. However, the role for polarity genes in oncogenesis has been only established for few of them such as *PAR4 (LKB1)*, clearly recognized as a tumor-suppressor gene or *PAR3* involved in the metastatic process enhancement (3, 4) and breast carcinogenesis (3). Furthermore, the role of polarity genes played in carcinogenesis is likely to be context-dependent like it has been described for aPKC isoforms.

In breast carcinogenesis, polarity modifications are observed in pre-invasive lesions (5). Polarity loss is a hallmark of high grade tumors whereas it is maintained in low grade tumors of the breast. In addition, breast carcinomas are heterogeneous lesions encompassing distinct entities characterized by different degrees of differentiation, morphologies, phenotypes and molecular alterations (6, 7). Pure invasive micropapillary carcinoma (IMPC) of the breast is one of the special types of invasive breast carcinomas. IMPC is characterized by a proliferation of cells organized in clusters. These clusters harbour an abnormal polarity and are separated from the extracellular matrix by a clear space of retraction (8) (9). In a previous study, we deciphered the genomic alterations of this tumor type and observed that several genes involved in polarity or ciliogenesis were mutated (*FMN2*, *BBS9* and *BBS12*, *DNAH9*).

The aims of the present study were to gain insight into the phenotypic and transcriptomic alterations of a large series of IMPC, in order to identify the molecular alterations that could contribute to the polarity abnormalities and the specific pattern of IMPC.

In this study, we showed with a detailed analysis of polarity protein expression that more than an inverted polarity, IMPC presented polarity abnormalities. Furthermore, IMPC overexpressed specifically LIN7A gene encoding for a polarity protein, compared to grade and estrogen-matched invasive carcinomas. We subsequently demonstrated that LIN7A overexpression perturbed acini formation when overexpressed in MCF10-A mammary epithelial cell in 3D, associated with a high proliferation, an activation of ERK1/2 and MEK1/2, and induced anoikis resistance through a down regulation of p38 α .

Materials and Methods

Patients and tumors samples

We retrospectively selected 124 cases of invasive breast cancers – 73 pure IMPC and 51 invasive carcinomas of no special type (IC-NST) on the basis of the availability of paraffin blocks and frozen specimen from the tumor banks of Institut Curie (46 IMPC and 51 IC-NST), Centre Georges François Leclerc (20 IMPC) and Institut Bergonié (7 IMPC). The initial treatment was surgery in all selected cases. These cases were reviewed by experienced breast pathologists (AVS, LA and GMG) and classified according to the World Health Organization criteria. IMPC cases were confirmed on the basis of inside-out MUC-1 (clone MRQ-17, 1:100, pH6.1, Bio SB) staining at the inverted apical pole (10). IC-NST were selected as being estrogen receptor- and grade-matched with IMPC cases.

All experiments were performed in accordance with the French Bioethics Law 2004-800, the French National Institute of Cancer (INCa) Ethics Charter and after approval by the Institut Curie review board and the ethics committees of our institution (“Comité de Pilotage of the Groupe Sein”). In that legal context, patients gave their approval for the use of their surgical tumor specimens for research. Data were analysed anonymously.

Immunohistochemistry

The expression of proteins that contribute to polarity organization and maintenance in epithelial cells was investigated in our series of cases. All antibodies are listed in supplementary Table 1. E-cadherin and β -catenin were used to evaluate the adherent junction, Phospho-ERM and MUC-1 to analyze the apical pole orientation, GM130 to analyze the Golgi apparatus localization in order to determine the existence of a cellular polarization, CDC42 and aPKC ζ to analyze the PAR complex, ZO-1 to analyze tight junctions and SCRIB to analyze the Scribble complex. For each marker, protein localization (cytoplasm, apical, basolateral) was assessed and compared to their localization in normal cells. The phenotype ER, PR and ERBB2 of IMPC and IC-NST cases was determined using the following antibodies: anti-ER α (clone 6F11, 1:200, pH6.1, Novocastra), anti-RP (clone 1A6, 1:50, pH6.1, Novocastra), anti-ERBB2 (clone CB11, 1:1000, pH6.1, Novocastra) as previously published (11).

Briefly, four μ m thick sections were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues derived from 3D-culture blocks. These sections were cut, dried, deparaffinized and rehydrated according to standard procedures. Antibodies were incubated for 1 hour at room temperature. Staining was detected with the universal Vectastain Elite ABC peroxidase kit (Vector Burlingame, CA), with diaminobenzidine (Dako A/S) as chromogen. External controls were included for each antibody. Cases were considered positive for ER when 10% of cells were positive for these markers, and the ASCO cut-off ($\geq 30\%$ of complete and intense membranous staining) was used to determine whether cases were positive for ERBB2 (12).

Gene expression profile analysis to define an IMPC gene signature

In order to identify an IMPC intrinsic gene signature, the gene expression of IMPC was compared to that of IC-NST in a training set of 63 tumors (37 IMPC and 26 IC-NST). The gene signature was then tested in a validation set (36 IMPC and 25 IC-NST). The DNA microarrays used were the Human Genome U133 set (HG-U133 plus 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA), containing 54, 613 probe sets. Experimental procedures for GeneChip microarrays were performed according to the Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual using HG-U133-Plus2 arrays. All microarray data were simultaneously normalized using the GCRMA package version 2.22.0 in the R 2.12.0 environment to assess gene probesets level of expression. The genes considered to be significantly deregulated between the two groups (Welch t-test) had a p -value adjusted on Bonferroni-Hochberg ≤ 0.05 and a fold change equal to or greater than 1.5. To identify the most relevant deregulated pathways, Gene Ontology, Reactome analyses were performed and results were sorted by p -value ($p \leq 0.05$). The most significant genes identified with the Welch t-test were used to perform an unsupervised clustering first of the training set, and subsequently of the validation set of tumors (Standard Pearson correlation

as similarity measure and centroid as linkage criteria). Receiving operating curves (ROC curves) were calculated to determine the specificity and sensitivity of the IMPC gene signature.

Quantitative RT-PCR

To confirm the observed overexpression of LIN7A either from cell-lines or from tumor samples, qRT-PCR was performed. RNAs were extracted from frozen fifty breast tumor samples (38 IMPC, 12 IC-NST) and 10 normal breast tissues provided by the Institut Curie Biological Resource Center, using a standard phenol/chloroform procedure. RNA quality control was checked on Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Prior to RNA isolation, a tissue section of tumor fragments was performed and stained with hematoxylin and eosin to evaluate tumor cellularity. All tumors analyzed contained more than 70% of tumoral cells on the frozen tissue section after manual microdissection of the frozen specimen. Three-D culture of MCF-10A control or LIN7A overexpressing RNAs were obtained from trizol lysis (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer protocol. cDNA was generated using a reverse transcriptase kit (High Capacity RT kit, Abbiied Biosystems, CA). Assays-on-Demand for assessing expression level of *LIN7A* as well as the control *TATA-binding protein* (*TBP*) genes were obtained from Applied Biosystems. qPCR was carried out in an ABI PRISM 7500 real-time thermal cycler using the Taqman master mix (Applied Biosystems).

Cell culture and stable cell line generation

To determine the biological consequences of LIN7A overexpression on mammary cells in culture, we overexpressed LIN7A in MCF-10A normal cells. The cells were maintained as previously described [Debnath J, *Methods*, 2003]. To generate wild-type or LIN7A-expressing stable cells, lentivirus infection was performed by transfecting HEK-293T lentiviral packaging cells with empty vector or LIN7A-pCDH1-EF1 construct. Forty-eight hours after transfection, retroviral supernatant was filtered through a 0.45- μ m filter, supplemented with 5 μ g/mL polybrene and used to infect MCF10A cells (MOI=3). All cells lines were selected with 1 μ g/ml of puromycin in culture medium. The impact of LIN7A overexpression on proliferation was investigated with KI-67 labeling index (Clone MIB1, 1:100, Dako A/S).

Three-dimensional morphogenesis assay

Three-dimensional morphogenesis assay with MCF-10A stable cell lines (Vector and LIN7A) were used to determine the impact of LIN7A on acini formation and cell polarity organization. MCF-10A stable cell lines (Vector and LIN7A) were trypsinized and 2×10^4 cells/well resuspended in assay medium containing 5 ng/mL EGF (13) and 2% Matrigel™ were added in a Matrigel™-coated-6-wells plate (BD Matrigel™ basement membrane matrix growth factor reduced, Beckton Dickinson, MA). Media was changed every 3 days and acini were fixed on alcohol-formaldehyde-acetic acid containing phloxine (AFA-phloxine fixative) at day 11.

Anoikis-induced apoptosis

To understand the underlining biological mechanisms that are involved in the pattern of IMPC *in vivo*, we investigated the existence of anoikis of LIN7A overexpressing MCF10A cells: Anoikis was induced by plating 3×10^6 cells per well in an ultra-low attachment culture six-well plates (Corning, NY) maintained in standard culture medium. Twenty-four hours after plating, cells were either determined for their viability by trypan blue dye exclusion (from day 2 to day 4) or collected by gentle pipetting and then replated upon standard culture plates. Only healthy and surviving cells were expected to adhere. Twenty-four hours after re-replating, cells were rinsed with PBS to remove the dead, floating or loosely attached cells and then photographed. Apoptotic cell proportion was also determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis using PI and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Annexin V (BD Biosciences, San Diego, CA) staining.

Western blotting

To confirm the overexpression of LIN7A in the LIN7A overexpressing MCF-10A stable cell line and to identify the deregulated pathways upon LIN7A overexpression, western blots were performed. After 11 days of 3-D culture, matrigel was dissolved and the whole-cell extracts were prepared in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF) with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Samples were separated by gel electrophoresis (Biorad) and transferred to Whatman nitrocellulose membranes for western blot analysis.

The antibodies used to analyze LIN7A overexpression in LIN7A-MCF10A was the LIN7A clone Q-14 (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Antibodies used were anti-Erk1/2 (polyclonal, 1:1000, Millipore), anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (clone E10, 1:1000, Cell signaling), anti-MEK1/2 (clone 47E6, 1:2000, Cell signaling), anti-phospho-MEK1/2 (rabbit polyclonal, 1:1000, Cell signaling), anti-Akt (clone 11E7, 1:1000, Cell signaling), anti-phospho-Akt (mouse polyclonal, 1:1000, Cell signaling), anti-p38 α MAPK (polyclonal, 1:1000, Cell Signaling) and anti-phospho-p38 α MAPK (Thr180/Tyr182) (clone 12F8, 1:1000, Cell Signaling).

Results

The aim of this study was to gain insight into the molecular alterations underlining polarity abnormalities in breast carcinomas. To do so, a series of a special type of breast cancers, IMPC, morphologically characterized by polarity modifications were submitted to phenotypical and transcriptomic analyses. Functional *in vitro* analyses were secondarily performed to decipher the molecular mechanisms associated with a candidate gene up-regulation observed specifically in IMPC and encoding for a polarity protein, LIN7A. All patients and tumors characteristics are shown in Supplementary Table 2.

IMPC presents an abnormal apico-basal polarity

The expression and localization of proteins that contribute to cell polarity organization (apical and basolateral domains, Golgi apparatus, adherens and tight junctions) were investigated in a subset of IMPC (24 cases) (Figure 1 and Table 1). The expression of MUC1, pERM and CDC42 (92%, 42% and 75% of cases, respectively) were seen at the inverted apical pole. However, beside the inversion of the apical pole, some polarity markers showed abnormal localization, though demonstrating polarity disorganization in IMPC: GM130 staining was localized in cytoplasm without any orientation in 58% of the cases and aPKC ζ was expressed in the cytoplasm or not expressed in 41% of the cases. ZO-1 was expressed at the tight junction but close to the inverted apical pole in 84% of the IMPC cases. The basolateral domain was normal with E-cadherin, β -catenin and SCRIB protein expressed in 100%, 100 and 92% of the cases, respectively.

Genes involved in apicobasal polarity maintenance are specifically deregulated in IMPC

To determine if an IMPC gene signature could contribute to polarity abnormalities, we performed a gene profiling analysis in 124 cases for which good-quality RNA was available. The statistical analysis between the gene expression profiles of IMPC and IC-NST showed that 717 genes (371 down-regulated and 346 up-regulated genes) harbored highly significant different expression levels ($FC \geq 1.5$ and $p\text{-val} \leq 0.05$). Their GO pathway analyses demonstrated enrichment in pathways involved in cell adhesion, adherens junction, focal adhesion, extracellular matrix components, microtubules formation, phosphatidylinositol-mediated signaling and cell migration (axon guidance) and angiogenesis specifically deregulated in IMPC (Figure 2A). Indeed, several genes involved in polarity organization such as *LIN7A*, *PARD6B*, tight and adherens junctions formation and/or maintenance, such as *CTNNA1*, *MPP7* or *CLDN23*, or genes from phosphatidyl inositol metabolism or pathways were up-regulated in IMPC. Conversely, genes related to apico-basal polarity (*FOXO3*, *LOXL2*, *ZYX*), cell/cell and cell/extracellular matrix adhesion (*ITGA11*, *ITGB6*, *ITGA5*, *LAMB1*, *FN1*, *ANKRD46*, *ANKRD13B*, *ACTN4*, *CTNNA1*, etc...), extra-cellular matrix constitution (*SERPINB5*, *COL4A1*, *ADAM15*, *ADAMTS12*, *COL8A2*) or

microtubules and cytoskeleton organization (*NAV1*, *NAP1B*, *PAK4*, *CDC42BPB*, *RAC3*, etc...) were down-regulated in IMPC (Supplementary Table 2).

This IMPC gene list was used to perform an unsupervised clustering in a training set and then validated in a training set (Figure 2B) (63 cases in the training set encompassing 37 IMPC and 26 IC-NST and 61 cases in the validation set encompassing 36 IMPC and 25 IC-NST (Figure 2C). The evaluation of sensitivity and specificity was assessed with calculation of receiver operating curves. Area under the curves in the training set was 0.88 and 0.85 (Supplementary figure 3).

We further focused our attention on one of the up-regulated genes *LIN7A* (Figure 2D) that encodes for a polarity protein which directly interacts with a Crumbs protein complex belonging, PALS1, as IMPC presented abnormal apical poles. We confirmed by quantitative PCR that *LIN7A* was specifically up-regulated in IMPC (Figure 2E).

Overexpression of LIN7A disrupts three-dimensional acini morphogenesis and increases proliferation with an activation of MEK, ERK and AKT pathway

Although *LIN7A* is known to interact directly with the polarity protein PALS1, the role of *LIN7A* overexpression during transformation on breast epithelial cells is largely unknown. To assess if *LIN7A* overexpression affects polarization, morphogenesis of mammary epithelial cells and their ability to grow in three-dimensional culture, we expressed *LIN7A* in an EGF-dependent non transformed human mammary epithelial cell line, MCF-10A. When plated on Matrigel™ in presence of 5 ng/ml of EGF, MCF-10A cells formed three-dimensional acini-like structures with a single layer of polarized, non-proliferative epithelial cells surrounding a hollow central lumen. Overexpression of *LIN7A* in 3D cultured MCF10A formed large multi-acinar structures (Figure 3A, upper panel). Acini derived from *LIN7A*-MCF10A cells in 3D cultures showed a higher level of cell proliferation as compared to control MCF10A cells, as reflected by higher level of KI-67 staining (45%), compared to control cells (10%) (Figure 3 A, lower panel).

This higher proliferation was associated to an increased activity of the MEK/ERK1/2 and AKT pathway as shown with a higher level of p-MEK, p-ERK1/2 and p-AKT in Western blots (figure 3B).

From these experiments it appeared that overexpression of *LIN7A* affected morphogenesis of MCF-10A cells on Matrigel™, inducing multidimensional acini structures in association with an increased proliferation.

Overexpression of LIN7A in MCF10A cells inhibited lumen formation through decreased apoptosis associated with a decreased p-aPKCζ expression

At day 11, the acini developed from MCF10A-*LIN7A* cells did not show any lumen cell clearing (Figure 4A). In the multi-acinar structures, cleaved caspase 3 staining was lower than for the control cells (10% vs 60%) and the number of acini with lumen was lower (38% vs 71%, $p\text{-val}=1.3\times10^{-9}$) (Figure 4B).

To understand how *LIN7A* induced a decreased apoptosis in MCF10A in 3D Matrigel™ cultures, and as P-aPKCζ was known to be involved in lumen formation during mammary gland development (14) with a combined action on cell polarization, proliferation restriction and increased apoptosis (15), we investigated the phosphorylation status of aPKCζ at T410 in developing acini, using an anti-pan-PKC antibody (16). We observed that overexpression of *LIN7A* was correlated to inhibition of aPKCζ phosphorylation (74% of inhibition) without any effect on total aPKCζ expression level (Figures 4C and 4D).

From this experiment, we concluded that *LIN7A* decreased lumen formation by inhibiting apoptosis measured through a decreased cleaved-Caspase 3 and p-aPKCζ expression.

Overexpression of LIN7A increased resistance to anoikis via p-P38α decrease

Given that one of the characteristics of the morphological pattern of IMPC, i.e. tumor cells nests growth surrounded by a clear space, we hypothesized that IMPC cells had an increase resistance to anoikis. To test this hypothesis, we first assessed proliferation and cell survival rate following culture in polyHEMA-coated wells of MCF10A-*LIN7A* and MCF10A cells. As expected the proliferation rate was higher in MCF10A-*LIN7A* (50%) than in MCF10A-vector (10%) (Figure 5A, middle panel). As shown in Figure 5A, lower panel, numbers of cells

that remain attached were higher in MCF10A-LIN7A compared to MCF10A-vector. Cells were counted by trypan blue dye exclusion at days 3, 4 and 7 (Figure 5B). Results demonstrated progressively increased anoikis resistance with the time of culture on polyHEMA and it was significantly higher in MCF10A-LIN7A compared to MCF10A-vector after 3, 4 or 7 days of culture on polyHEMA-coated wells. To further examine the role of LIN7A in anoikis, we examine cellular apoptosis as determined by Annexin V-FITC/PI staining, followed by flow cytometric analysis. In accordance with the results shown in Figures 5A and 5B, the number of viable cells is higher in MCF10A-LIN7A than in control conditions ($p\text{-val}=3.1\times 10^{-2}$) and the number of late apoptotic cells is lower in MCF10A-LIN7A than in control conditions ($p\text{-val}=1.9\times 10^{-2}$).

As p-p38 α was shown to be activated in MCF10A cells after loss of their attachment, we thought to determine the level of expression of p-P38 α in MFC10A-LIN7A cells compared to MCF10A. As shown in figure 5D, p-p38 α was decreased in MCF10A LIN7A cells compared to MCF10A.

From all these experiments, we concluded that LIN7A overexpression in MCF10-A led to an increased resistance to anoikis.

Discussion

In this study, we identified the specific gene signature of IMPC of the breast, characterized principally by the de-regulation of numerous genes participating in polarity organization or maintenance, cell-cell or cell-matrix adhesion and cell migration. *LIN7A*, encoding for a protein of the CRUMBS complex, associated to PALS1, was found overexpressed specifically in IMPC compared to IC-NST. *LIN7A*, overexpressed *in vitro* in MCF10A cells in 3D-culture, disrupted normal acini formation, increased proliferation through an increased p-MEK1/2, p-ERK1/2 and p-AKT. Furthermore, lumen formation was perturbed in relation with a decrease of apoptosis and p-aPKC ζ decreased expression. Finally, *LIN7A* overexpression induced an increased cell resistance to anoikis based on a p-p38 α decrease. Thus, we identified LIN7A polarity protein as overexpressed in a special type of breast cancer, IMPC and as that deregulated several pathways and biological processes involved in acini formation. The modification of these processes, consequences of LIN7A overexpression together with deregulation of genes from IMPC signature could underline IMPC carcinogenesis.

Although IMPC were identified by pathologists as associated with an inverted polarity (8, 10), we demonstrated here that polarity proteins organization was abnormal in IMPC, as shown by the absence of the Golgi apparatus orientation and aPKC ζ and p-ERM abnormal expressions.

Polarity modifications are recognized as part of breast cancer progression (1, 17). Though, this special tumor type appeared to us as an interesting model to gain insight into polarity deregulation in breast oncogenesis.

Meanwhile IC-NST have been extensively studied at the transcriptomic level, few datas were available regarding each special types of breast carcinomas or were based on rather a few number of cases (7, 11, 18-20). Here, comparing IMPC to IC-NST, we were able to identify a specific gene signature in a training set robust enough to be validated in a validation set. Genes up or down regulated in IMPC GO analyses (cell-cell or cell-matrix adhesion, PI3K pathways) suggested their role in IMPC pattern with abnormal polarity, clusters of cells separated from the extracellular matrix by a clear space. Pathways involved in cell migration, platelet activation and angiogenesis suggested also their role in the high rate of lympho-vascular invasion associated with IMPC (21).

LIN7A overexpression as compared with IC-NST was highly interesting as this gene was the only one with such a high fold change that encoded for a polarity protein. The LIN7A role in oncogenesis was unknown. However, consequences of its *in vitro* overexpression provided clear evidence on its role in growth and proliferation, resistance to anoikis in mammary normal cell lines.

Perspectives : to test its role in animal models to demonstrate

Table 1: Analysis of polarity protein expression and subcellular localization in IMPC.

	Marker	Localization	n (%)
Apical domain	MUC-1	Positive	24 (100)
		External apical	22 (92)
		Cytoplasm	2 (8)
	p-ERM	Positive	10 (42)
		External apical	10 (42)
		Cytoplasm	0 (0)
Golgi apparatus	GM130	Positive	23 (96)
		External	9 (38)
		External + internal	14 (58)
Basolateral domain	SCRIB	Positive	22 (92)
		Basolateral	22 (92)
		Cytoplasm	0 (0)
Par complex	CDC42	Positive	21 (87)
		External apical	18 (75)
		Cytoplasm	1 (4)
		Cell/cell	2 (8)
	aPKCζ	Positive	23 (96)
		External apical	14 (58)
Tight Junction	ZO-1	Cytoplasm	9 (37)
		Positive	24 (100)
		External subapical	20 (84)
Adherens Junction	β-catenin	Cytoplasm	4 (16)
		Positive	24 (100)
	E-cadherin	Positive	24 (100)

Legend to figures

Figure 1: Polarity protein expression modifications and subcellular localization in IMPC compared to normal ducts. (A, B): MUC-1. (C, D): phospho-Ezrin-Radixin-Moesin. (E, F): GM130. (G, H): SCRIB. (I, J): E-cadherin. (K, L): ZO-1. Pictures were taken at Gx200 magnification on a Leica DMRB Microscope, with a 3CCD camera and Perfect Image software for image acquisition (Claravision, Verrière-le-Buisson, France). Bars, 20 μ m.

Figure 2: IMPC gene signature encompassed genes involved in regulation of cell polarity, adhesion and migration. (A): Pie charts of Gene Ontology analyses performed with the IMPC gene signature list, for Biological processes (on the left) and Cell components (on the right). (B, C): Heatmap and dendrogram of the unsupervised hierarchical clustering (Pearson correlation) with the differentially expressed 717 genes, in the training set (B) and the validation set (C). Each column represents a different tumor, and each row represents one of 717 genes used for this unsupervised clustering. IMPC: red bars ; IC-NST: white bars. (D): Boxplots of Affymetrix signal *LIN7A* gene expression levels in IC-NST, IMPC and normal breast tissues obtained from mammaplasties. (E): Validation of the expression levels of *LIN7A* by RT-qPCR. *LIN7A* gene expression levels are plotted on the *TBP* gene expression levels. *p*-value were calculated with a T-test and were indicated above the box-plot.

Figure 3: Overexpression of LIN7A disrupts three-dimensional acini morphogenesis and increases proliferation with an activation of MEK, ERK and AKT pathway. (A): Phase contrast (top) and immunohistochemistry sections of acini stained with KI-67 marker (bottom). Images of day 11 acini growth in Matrigel™. Bars, 20 μ m. (B): Immunoblotting of p-MEK1/2, MEK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2, p-AKT and AKT in MCF10A and MCF10A-LIN7A protein extracts after 11 days of 3-D culture.

Figure 4: Overexpression of LIN7A in MCF10A cells decreased lumen formation through decrease apoptosis associated with a decreased p-aPKC ζ expression. (A): Anti-clived-Caspase-3 staining of MCF10A (left panel) and MCF10A-LIN7A (right panel) cells, after 11 days of 3D-culture. (B): Quantification of lumen numbers after 11 days of 3D-culture of MCF10A and MCF10A-LIN7A cells, evaluated on all acinar structures visible in the dishes. *p*-values are indicated above. (C): Immunoblotting of MCF10A and MCF10-LIN7A cells 3-D culture extracts with anti-LIN7A, anti-p-aPKC and anti-aPKC ζ antibodies. Anti- β -actin blot was used as loading control. (D): Quantification of p-aPKC ζ on total aPKC ζ signal in MCF10A compared to MCF10A-LIN7A cells.

Figure 5: Overexpression of LIN7A increased resistance to anoikis via p-p38 α decrease. (A): Comparison of LIN7A-overexpressing and MCF10A cells proliferation and adhesion in low adhesion culture conditions (polyHema coated culture plates) (upper panel). Surviving cells were then replated in normal adhesion conditions (lower panel). (B): Quantification of cell survival fraction after Trypan blue dye exclusion. (C): Apoptotic cell proportion was determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of Annexin V and PI positive cells (left panel) and the respective quantification of cells in MCF10A and MCF10A-LIN7A conditions (right panel). (D): Immunoblotting anti-p-p38 α and anti-p38 α in MCF10A and MCF10A-LIN7A protein extracts.

References

1. McCaffrey LM, Macara IG. Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, **1** (2): a001370.
2. Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, *et al.* Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell*, 2008, **135** (5): 865-878.
3. McCaffrey LM, Montalbano J, Mihai C, Macara IG. Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Cell*, 2012, **22** (5): 601-614.
4. Xue B, Krishnamurthy K, Allred DC, Muthuswamy SK. Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat Cell Biol*, 2012, **15** (2): 189-200.
5. Nolan ME, Aranda V, Lee S, *et al.* The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res*, 2008, **68** (20): 8201-8209.
6. Curtis C, Shah SP, Chin SF, *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 2012, **486** (7403): 346-352.
7. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, *et al.* Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*, 2008, **216** (2): 141-150.
8. Nassar H, Wallis T, Andea A, Dey J, Adsay V, Visscher D. Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma. *Mod Pathol*, 2001, **14** (9): 836-541.
9. Pettinato G, Manivel CJ, Panico L, Sparano L, Petrella G. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. *Am J Clin Pathol*, 2004, **121** (6): 857-866.
10. Luna-More S, Gonzalez B, Acedo C, Rodrigo I, Luna C. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma. *Pathol Res Pract*, 1994, **190** (7): 668-674.
11. Gruel N, Lucchesi C, Raynal V, *et al.* Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *Eur J Cancer*, 2010, **46** (13): 2399-2407.
12. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, **131** (1): 18.
13. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, 2003, **30** (3): 256-268.
14. McCaffrey LM, Macara IG. The Par3/aPKC interaction is essential for end bud remodeling and progenitor differentiation during mammary gland morphogenesis. *Genes Dev*, 2009, **23** (12): 1450-1460.
15. Whyte J, Thornton L, McNally S, *et al.* PKC ζ regulates cell polarisation and proliferation restriction during mammary acinus formation. *J Cell Sci*, 2010, **123** (Pt 19): 3316-3328.
16. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*, 2001, **106** (4): 489-498.
17. Huang L, Muthuswamy SK. Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, **20** (1): 41-50.
18. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, *et al.* Gene Expression Profiling Shows Medullary Breast Cancer Is a Subgroup of Basal Breast Cancers. *Cancer Res*, 2006, **66** (9): 4636-4644.
19. Bertucci F, Orsetti B, Negre V, *et al.* Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. *Oncogene*, 2008, **27**: 5359-5372.
20. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, **117** (2): 273-280.
21. Suzuki S, Dobashi Y, Hatakeyama Y, *et al.* Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and vascular endothelial growth factor-A expression, PDGF receptor-beta phosphorylation, and microvessel density in gastric cancer. *BMC Cancer*, 2010, **10**: 659.

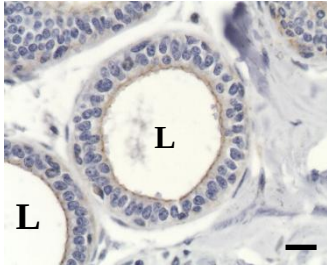
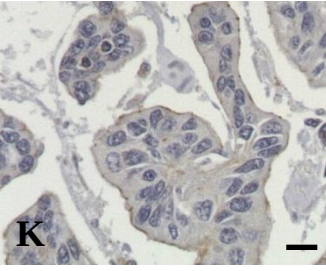
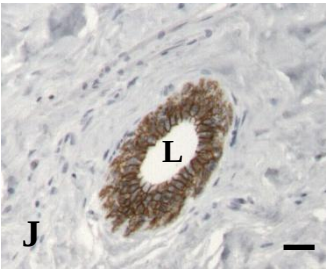
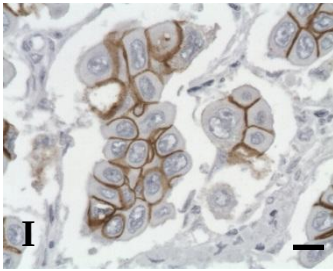
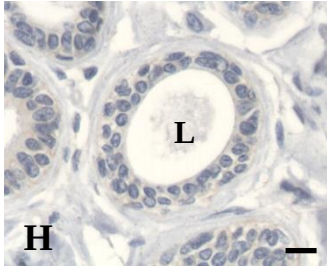
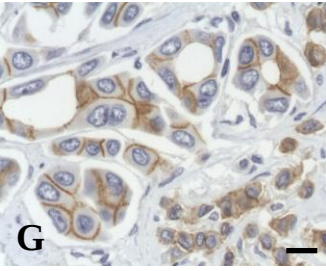
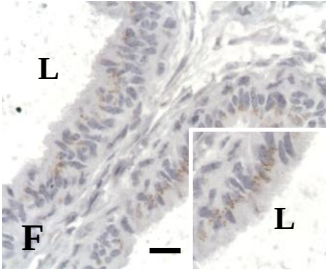
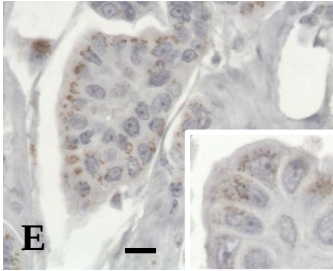
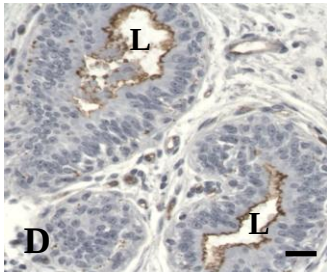
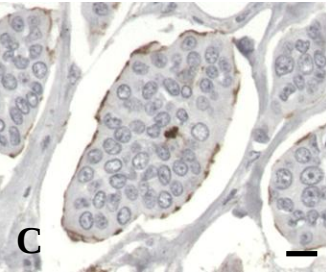
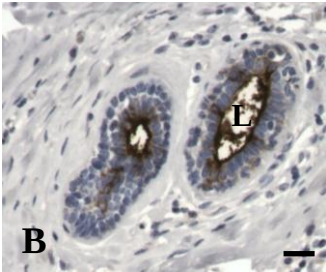
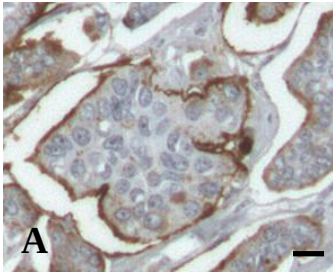
Figure 1

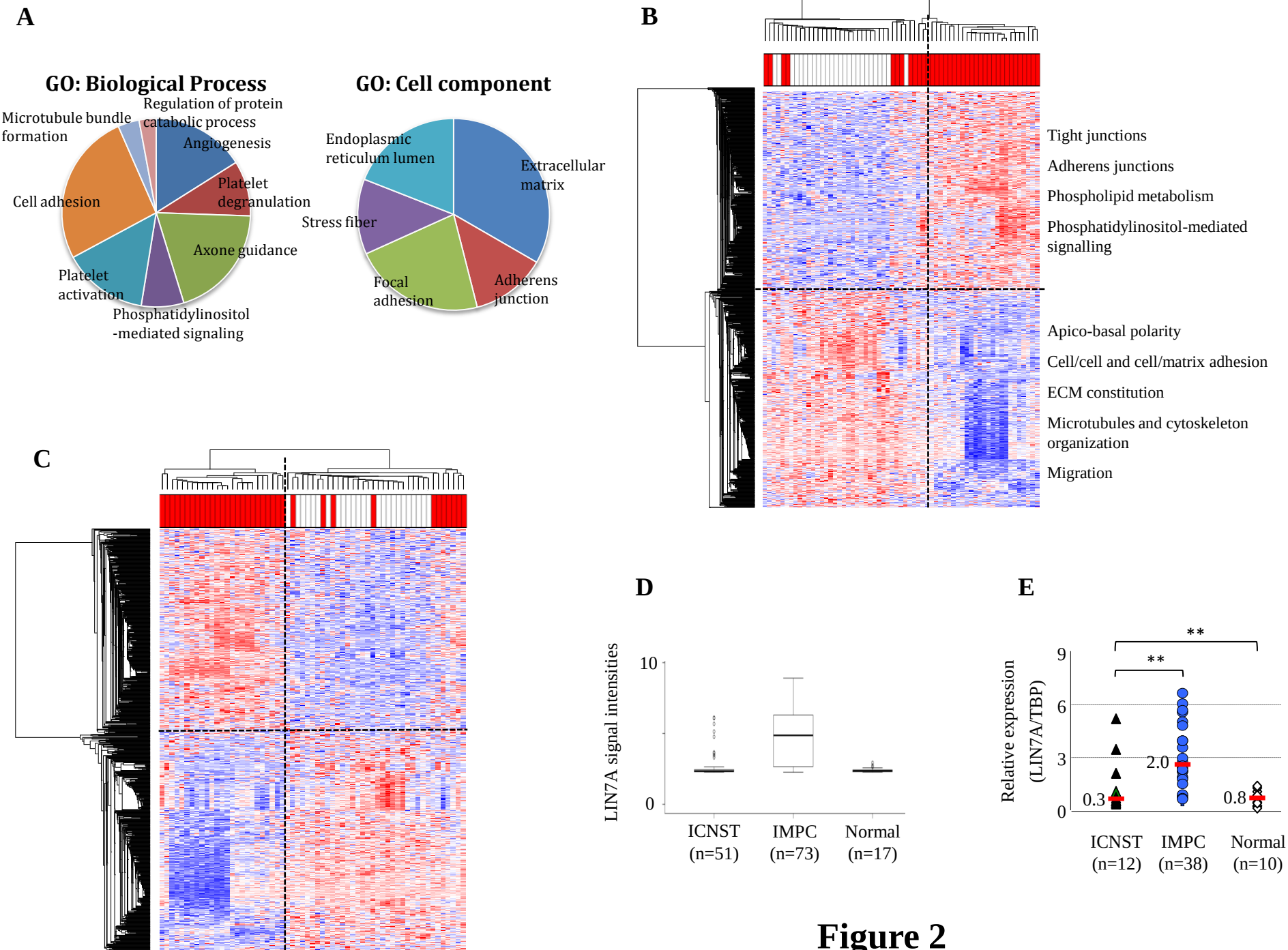
IMPC

normal duct

IMPC

normal duct





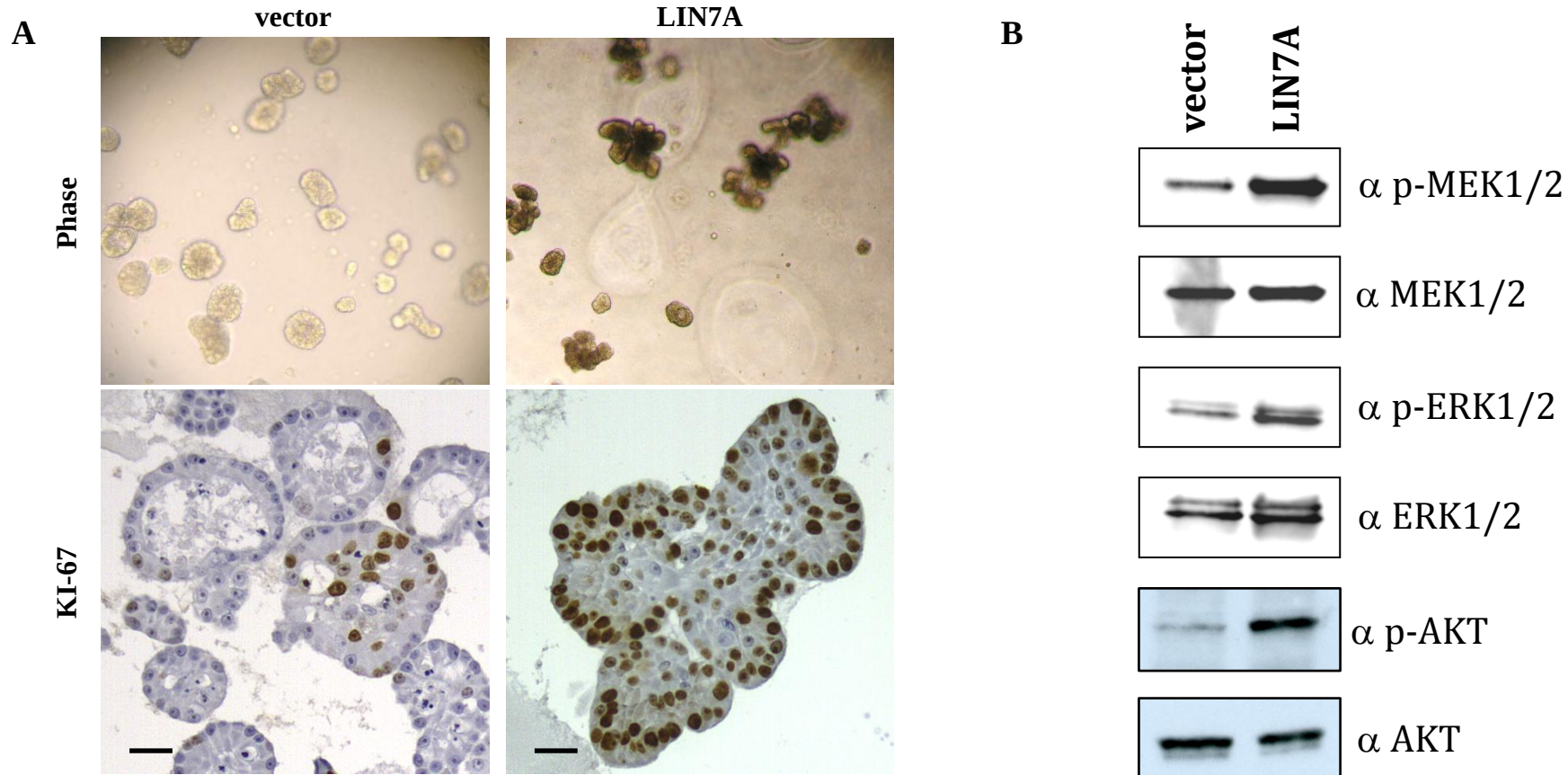


Figure 3

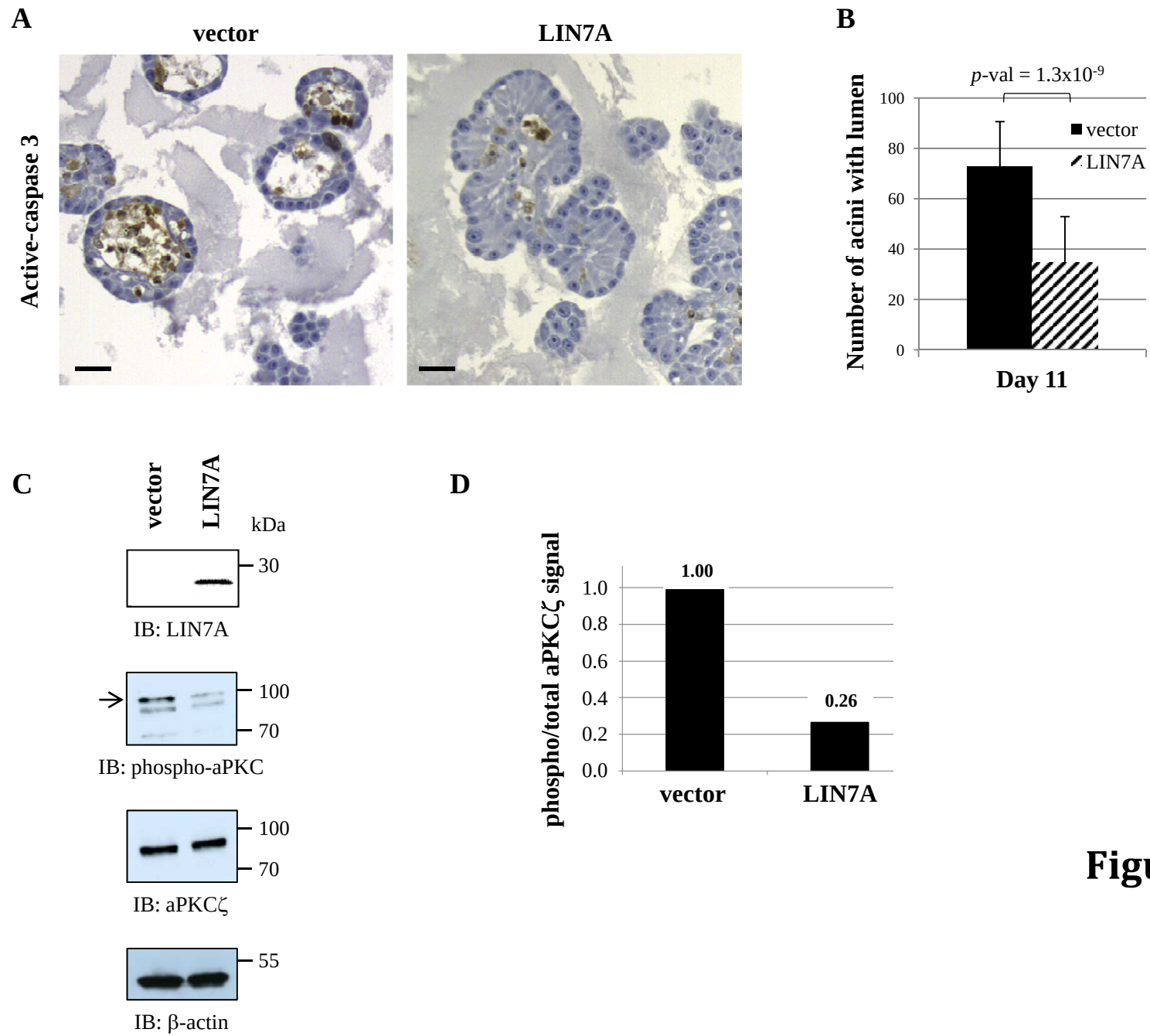


Figure 4

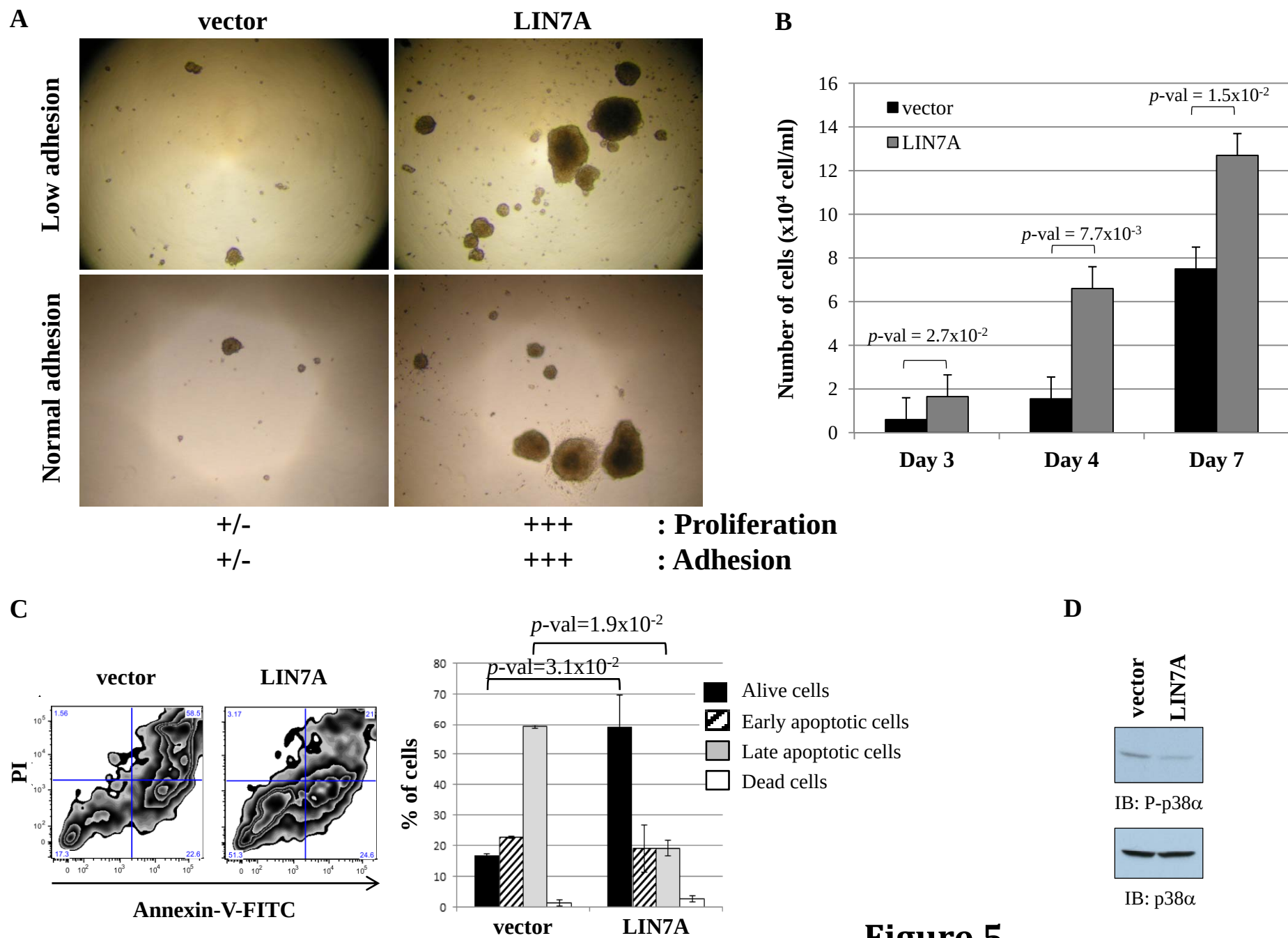


Figure 5

2-4. Altérations génomiques des IMPC

La surexpression de la protéine LIN7A, spécifique des cellules carcinomateuses des IMPC, explique en partie les altérations de la polarité observées dans ce type tumoral. Nous avons décidé de réaliser une analyse détaillée des altérations moléculaires d'une série de 39 IMPC, afin d'identifier des altérations génomiques récurrentes et spécifiques de gènes impliqués dans la régulation de la polarité cellulaire. Les résultats obtenus ont été comparés à une série de cancers infiltrants sans autre spécificité (IC-NST, n=27), de même grade, exprimant le récepteur aux oestrogènes et ayant perdu leur polarité apico-basale.

Polarity gene alterations in pure invasive micropapillary carcinomas of the breast.

Gruel N, Benhamo V, Bhalshankar J, Popova T, Fréneaux P, Arnould L, Mariani O, Raynal V, Sastre-Garau X, Rouzier R, Delattre O, Vincent-Salomon A.

Breast Cancer Research. En révision.

a- Une entité, deux génomiques

L'étude du génome des tumeurs a été réalisé sur des puces « SNP » (*Single Nucleotide Polymorphism*), qui fournissent, pour un échantillon donné, le nombre de copies et le statut allélique d'un grand nombre de marqueurs, en une expérience unique et au niveau pangénomique. Ces résultats ont été analysés grâce à l'algorithme GAP (*Genome Alteration Print*) (Popova T *et al*, 2009), qui segmente le génome en régions présentant les mêmes intensités et différences alléliques. Cette analyse permet de faire une corrélation entre le nombre de copie et la différence allélique. Nous avons également utilisés le logiciel Partek®, qui nous a permis de réaliser une classification des profils, basée sur la récurrence des altérations observées.

Nous avons montré que, dans cette série composée majoritairement de petites tumeurs (pT1), les IMPC présentent de nombreuses altérations génomiques. En effet, le nombre de points de cassure est identique à celui trouvé pour les IC-NST contrôles, dont la taille tumorale au diagnostic est plus grande (pT2) (IMPC, n=65 ; IC-NST, n=79).

Les IMPC présentent des régions d'amplifications récurrentes (retrouvées dans au moins 20% des cas), localisées sur les chromosomes 8q et 17q. La région la plus fréquemment amplifiée dans les IMPC est localisée en 17q22-q23.3 (gènes candidats: *BCAS3*, *TLK2*, *TBX2*, *TANC2*, *PPM1D* - 22% vs 7% des cas). Cette région, tout récemment décrite (METABRIC, *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International*

Consortium - integrative cluster 1) (Curtis C *et al*, 2012) contient de nouvelles cibles thérapeutiques, comme *TLK2*. Deux autres régions d'amplification sont localisées sur le chromosome 8q : régions 8q22.1 (gènes candidats: *RAD54B*, *CCNE2*, *TP53INP1* - 21% vs 5% des cas) et 8q23.3-q24.23 (gène candidat: *MYC* - 21% vs 14% des cas).

Les altérations les plus fréquentes (retrouvées dans plus de 40% des cas) sont, pour la plupart d'entre elles, communes à celles décrites dans les cancers du sein de type luminal B (Chin K *et al*, 2006 ; Guedj M *et al*, 2012): perte des chromosomes 8p, 16q, 17p et 22q et gain du bras long du chromosome 8. Cependant, cette analyse de haute résolution permet d'identifier des différences entre les 2 groupes: les IMPC présentent plus fréquemment des gains de la région 17q22-q24.3 (47% vs 25% des cas) et des pertes de la région 6q16.3-q22.31 (45% vs 20% des cas) (**Figure 42** et **Figure 43B**).

Ces tumeurs présentent également des points communs avec les nouveaux sous-groupes décrits par C Curtis (interclusters 1, 7 et 9) (Curtis C *et al*, 2012).

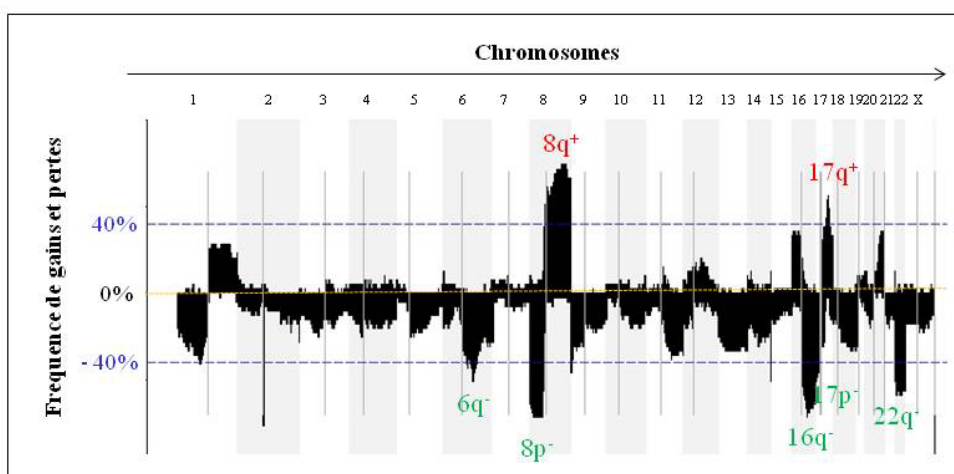


Figure 42: Profil génomique moyen des tumeurs de type micropapillaire. Les altérations les plus récurrentes (fréquence $\geq 40\%$) sont indiquées en rouge (gains) ou en vert (pertes).

Nous avons donc affiné la région spécifique de perte du bras long du chromosome 6 dans les IMPC, perte déjà observée par Marchio et collaborateurs (Marchio C *et al*, 2008). De plus, nous avons pu préciser qu'elle était associée à une perte d'hétérozygotie dans la majorité des cas (80% des tumeurs présentant une perte du bras long du chromosome 6). La région minimale de délétion (1,59 Mb) comprend 9 gènes. Parmi ces gènes, 2 *SEC63* et *FOXO3*, présentent une bonne corrélation entre le statut génomique et l'expression, et sont spécifiquement sous-exprimés dans les IMPC (test de Welch, $p\text{-val} \leq 0,05$ et $FC \geq 1,5$ et validation par PCR quantitative).

Ces deux gènes ont été séquencés. Sur 51 cas séquencés, une seule tumeur (IMPC_10, < 2% des cas) présente 3 mutations non silencieuses du gène *FOXO3*, dont une seule (G>A/p.Ala267Thr) semble délétère, selon son score Polyphen (score = 0,97). La mutation T>G/p.Leu528Val a également été trouvée dans un échantillon de micropapillaire de poumon. Une seule mutation non silencieuse du gène *SEC63* a été identifiée dans notre série (IMPC_31, 1/43 cas, 2% des cas, C>T/p.Arg217Cys). Cette mutation est considérée comme délétère selon son score Polyphen (score = 1).

Les protéines SEC63 et FOXO3 participent toutes les deux au contrôle de la polarité apico-basale et peuvent être associées au processus de tumorigenèse. Par exemple, FOXO3, le facteur de transcription suppresseur de tumeur régule l'expression de la protéine impliquée dans la polarité, LKB1 (Nakano A et Takashima S, 2012 ; Lützner N *et al*, 2012). Sa sous-expression a été récemment rapportée dans des cas de carcinomes séreux ovariens de haut grade et est associée à un pronostic défavorable (Fei M *et al*, 2009 ; Mc Millen BD *et al*, 2012).

La protéine SEC63 appartient au complexe SEC61-SEC62, et participe au transport protéique, du réticulum endoplasmique vers le cytosol (Lang S *et al*, 2012). Des mutations du gène sont directement responsables de la polykystose rénale ou hépatique (Davila S *et al*, 2004 ; Banales JM *et al*, 2013), maladie qui présente des anomalies du transport trans-épithélial, une localisation anormale du récepteur à l'EGF à la membrane apicale, des altérations de la polarité cellulaire planaire (défaut d'inclinaison du cil primaire) et apico-basale, une expression anormale des molécules d'adhésion et une surexpression des composants de la MEC (Bergmann C *et al*, 2011).

Des expériences *in vitro*, réalisées sur la lignée cellulaire MCF10A n'exprimant plus ces gènes (invalidation par *shRNA*) et cultivées en 3-D dans du Matrigel™ sont actuellement en cours, afin d'évaluer le rôle de ces protéines sur la polarité apico-basale.

Comme attendu, les gènes *TP53* et *PIK3CA* sont deux des trois gènes les plus fréquemment mutés de notre série. Le taux de mutations du gène *TP53* observé dans les IMPC (5/45 cas, 11% des cas) est tout à fait comparable à celui rapporté par Curtis et collaborateurs dans les carcinomes mammaires RO⁺. Par contre, le taux de mutations du gène *PK3CA* est moins fréquent dans les IMPC (2/39 cas, 5% des cas) que dans les autres sous-types histologiques luminaux (46% de mutations trouvées dans les tumeurs mammaires de type lobulaire, par exemple) (Buttitta F *et al*, 2006).

La classification non supervisée de ces tumeurs, basée sur la récurrence de leurs altérations génomiques a permis d'identifier 2 sous-groupes génomiques au sein de l'entité micropapillaire (**Figure 43A**): un premier sous-groupe « IMPC 8/16 », composé de 16 tumeurs (41% des cas) majoritairement diploïdes, présentent un gain du 16p associé à la combinaison d'altérations chromosomiques 8p⁻/8q⁺/16q⁻.

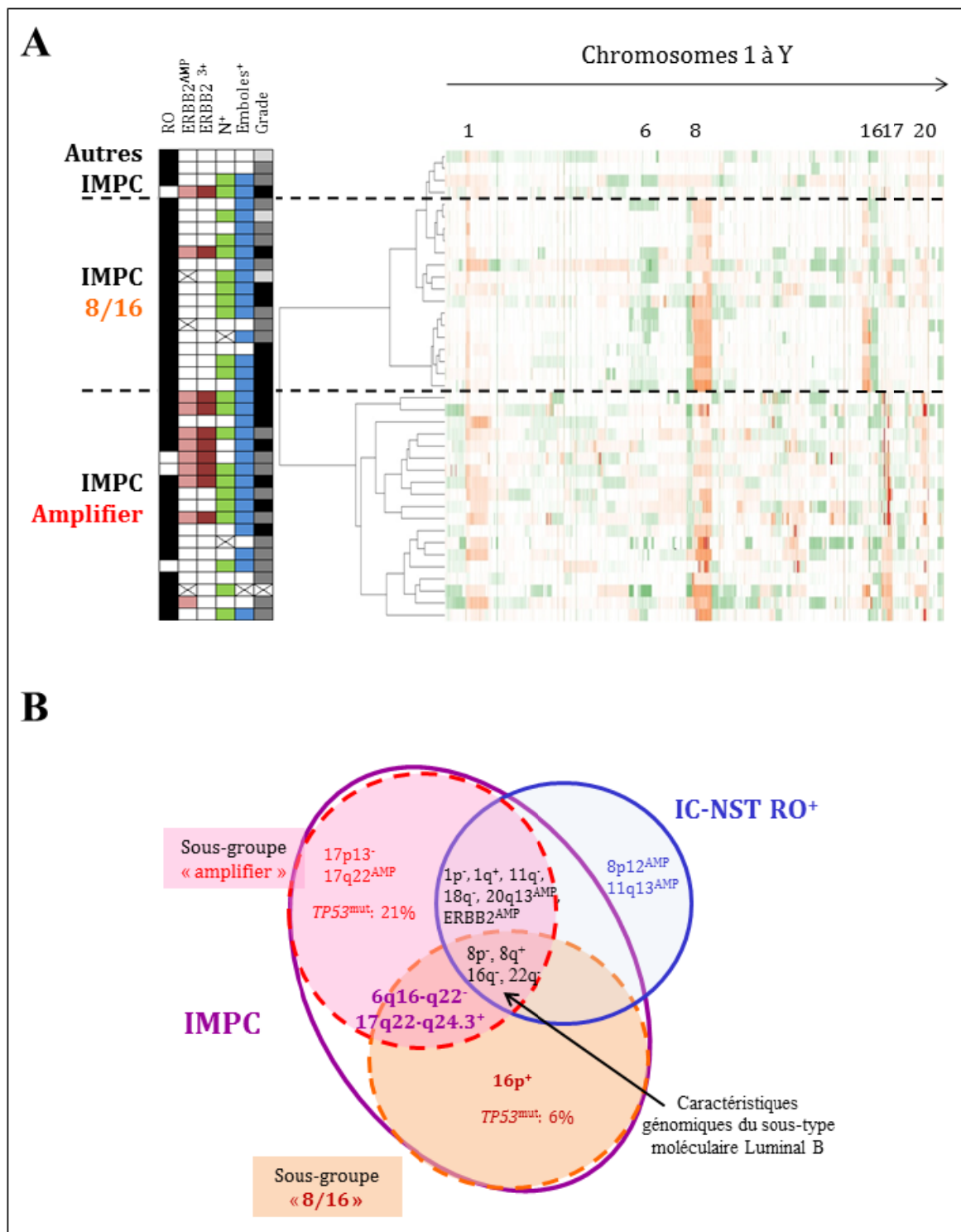


Figure 43: Classification génomique des IMPC. (A) Cette classification, basée sur la récurrence d'altérations communes, identifie 2 sous-groupes génomiques: IMPC « amplifier », présentant de nombreux amplicons sur les chromosomes 8, 17 et 20 et IMPC 8/16, présentant une combinaison d'altérations 8p-/8q+/16p+/16q-. Un sous-cluster composé de 4 tumeurs sans anomalie génomique particulière est noté (autre IMPC). (B) Résumé des altérations génomiques trouvées dans les 2 sous-groupes d'IMPC et partagées avec les IC-NST RO⁺.

Le second sous-groupe (« IMPC amplifier », 19 cas, 48% des cas), composé plutôt de tumeurs tétraploïdes présentent des amplifications en 8q, 17q et/ou 20q associée à une perte de la région 17p13-p11, des mutations du gène *TP53* et de nombreuses cellules binuclées. Aucune différence anatomoclinique (taille de la tumeur, grade, expression du récepteur à la progestérone, présence d'embolies, infiltration axillaire,) n'a été observée entre ces 2 groupes.

b- Les IMPC présentent des mutations de gènes impliqués dans la polarité, la ciliogenèse et la morphologie cellulaire

Afin de pouvoir établir une signature génomique exhaustive de cette entité rare, des expériences complémentaires de séquençage massif parallèle de l'ADN (*whole exome*) ont été réalisées.

Les données de séquençage de l'ADN réalisé sur 4 échantillons (1 cas « 8/16 » et 3 cas « amplifier ») ont permis l'identification de 927 variants, dont 29 sont spécifiques des tumeurs, non synonymes et non répertoriés dans les bases de données publiques. Soixante-seize pour cent de ces variants (n=22) ont été validés par séquençage manuel de Sanger (Table 5).

Gène	Chr	Position	Mutation	Type 1	Type 2	Echantillon	Ss-gpe	Score Polyphen
<i>BBS12</i>	4	123665067	CGC>TGC/p.R674C	missense	transition	IMPC_08	8/16	1,000
<i>DNAH9</i>	17	11687058	CGG>CAG/p.R2605Q	missense	transition	IMPC_08	8/16	0,998
<i>EIF2B5</i>	3	182859772	GCA>ACA/p.A406T	missense	transition	IMPC_08	8/16	0,049
<i>PTPN21</i>	14	88940067	CGA>CTA/p.R864L	missense	transversion	IMPC_08	8/16	1,000
<i>THSD4</i>	15	72020956	GAG>AAG/p.E476K	missense	transition	IMPC_08	8/16	1,000
<i>TP53</i>	17	7577082	GAA>CAA/p.E286Q	missense	transversion	IMPC_08	8/16	1,000
<i>FMN2</i>	1	240351551	GCT>CCT/p.A659P	missense	transversion	IMPC_13	amplifier	0,736
<i>HSP90B1</i>	12	104336333	ACG>ATG/p.T468M	missense	transition	IMPC_13	amplifier	0,981
<i>PCF11</i>	11	82874902	AAT>AGT/p.N167S	missense	transition	IMPC_13	amplifier	0,017
<i>SPTLC3</i>	20	13134786	G>A	splice	transition	IMPC_13	amplifier	-
<i>SYNRG</i>	17	35902132	ATG>ATA/p.M970I	missense	transition	IMPC_13	amplifier	0,447
<i>ZFYVE26</i>	14	68244895	CAA>CCA/p.Q1582P	missense	transition	IMPC_13	amplifier	0,002
<i>FBXO38</i>	5	147821541	TAT>TGT/p.Y1058C	missense	transition	IMPC_14	amplifier	1,000
<i>PLCL1</i>	2	198949078	AAG>AAT/p.K279N	missense	transversion	IMPC_14	amplifier	0,984
<i>ST7L</i>	1	113124616	GAT>GCT/p.D339A	missense	transversion	IMPC_14	amplifier	1,000
<i>TRMT5</i>	14	61442730	TTT>CTT/p.FAUX303L	missense	transition	IMPC_14	amplifier	0,043
<i>BBS9</i>	7	33192429	CCA>TCA/p.P77S	missense	transition	IMPC_16	amplifier	0,999
<i>CASP8AP2</i>	6	90577267	GAT>AAT/p.D1420N	missense	transition	IMPC_16	amplifier	0,996
<i>DNAH9</i>	17	11696818	A>G	splice	transition	IMPC_16	amplifier	-
<i>IKBKE</i>	1	206666632	GAC>TAC/p.D571Y	missense	transversion	IMPC_16	amplifier	0,681
<i>TP53</i>	17	7577544	ATG>ACG/p.M246T	missense	transition	IMPC_16	amplifier	1,000
<i>UBR4</i>	1	19446784	AAC>AAA/p.N3400K	missense	transversion	IMPC_16	amplifier	0,981

Table 5: Liste des 22 variants (20 gènes) trouvées dans les 4 IMPC séquencés par NGS. Ces variants sont spécifiques des téchantillons tumoraux et non répertoriés dans les bases de données publiques. Quinze de ces variants (68%) semblent délétères (score Polyphen élevé, surlignés en rouge).

Afin d'étudier la récurrence de ces mutations, le séquençage de ces gènes a été réalisé sur une série indépendante de 44 IMPC (séquençage ciblé, MiSeq 2000, Illumina, Integragen). Chaque variant non synonyme identifié a été validé par séquençage manuel de Sanger. Son absence sur l'ADN constitutionnel de la patiente a également été vérifiée.

Nous avons identifié des mutations récurrentes du gène *DNAH9* (4/48 cas, 8%). Des mutations des gènes codant pour cette famille de gènes (*DNAH5*, *DNAH11*, *DNAH2*, *DNAH3*, *DNAH9*) ont déjà été identifiées dans des cas de carcinomes mammaires triple négatifs, mais à une fréquence faible (3%) (Shah SP *et al*, 2012). Le gène *DNAH9* code pour la dynéine, protéine des microtubules, nécessaire, entre autre, à la bonne localisation des protéines de la polarité CRB (Li Z *et al*, 2008) et PAR-3 (Schmoranz J *et al*, 2009). Des mutations récurrentes du gène *DNAH9* (4/48 cas, 8% des cas) dans une entité tumorale associée à des défauts de polarité apico-basale suggère un lien de cause à effet entre ces mutations et le phénotype observé. D'autres gènes, impliqués dans la régulation de la polarité, la ciliogenèse ou la motilité (*FMN2*, *BBS9*, *BBS12*) (Ross AJ *et al*, 2005 ; Kitzing TM *et al*, 2010 ; Garcia-Gonzalo FR *et al*, 2012) ou dans l'organisation du cytosquelette (*HSP90B1*, *UBR4*, *ZFYVE26*) sont également mutés, mais de façon non récurrente dans notre série. L'ensemble des mutations est répertorié dans la **Figure 44**. Des mutations des gènes *FMN2*, *BBS9*, *HSP90B1*, *PTPN21*, *HSP90B1* et *ZFYVE26* ont déjà été identifiées dans moins de 1% des cancers du sein tout type confondu (< 1%) (Banerji S *et al*, 2012).

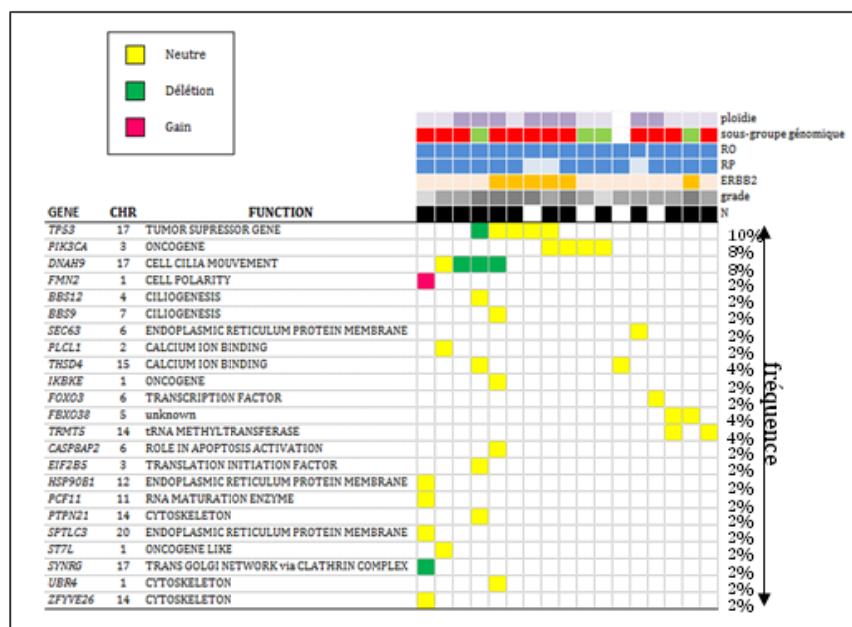


Figure 44: Ensemble des mutations trouvées dans les IMPC. Les données anatomo-cliniques des tumeurs sont indiqués, ainsi que la fonction du gène muté. Pour chaque mutation, le statut génomique de la région considérée est indiqué (délétion, vert ; normal, jaune ; gain, fushia).

Polarity gene alterations in pure invasive micropapillary carcinomas of the breast

Nadège Gruel^{1,2}, Vanessa Benhamo^{1,2}, Jaydutt Bhalshankar¹, Tatiana Popova¹, Paul Fréneaux³, Laurent Arnould⁴, Odette Mariani³, Virginie Raynal¹, Xavier Sastre-Garau³, Roman Rouzier⁵, Olivier Delattre¹, Anne Vincent-Salomon^{1,3}.

1: INSERM U830, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cédex 05, France.

2: Institut Curie, Department of Translational Research, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cédex 05, France.

3: Institut Curie, Département of Tumor Biology, 26 rue d'Ulm, 75248, Paris Cédex 05, France.

4: Centre Georges François Leclerc, Département of Pathology and CRB Ferdinand Cabanne, 1 rue Professeur Marion BP 77 980, 21079 Dijon Cédex France.

5: Institut Curie, Department of Surgery, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cédex 05, France

Breast Cancer Research – en révision

Abstract

Introduction: Pure invasive micropapillary carcinoma of the breast is a special type of breast carcinoma characterized by clusters of cells presenting polarity inversion, frequent lymphovascular invasion and axillary lymph node metastases. The biological alterations underlying this pattern remain unknown.

Methods: Integrated analyses of copy number analyses, genotyping (SNP6.0 Affymetrix), *TP53* and *PIK3CA* sequencing in a series of pure invasive micropapillary carcinoma were performed. A subset of cases was also analysed with whole-exome and RNA sequencing. SNP6.0 results were compared to those of estrogen-receptors and grade-matched invasive ductal carcinomas of no special type.

Results: Unsupervised analysis of genomic data distinguished two distinct invasive micropapillary carcinoma subsets: one subset (sawtooth/8/16) exhibited a significant increase in 16p gains and the other subset (firestorm/amplifier) was characterized by a high frequency of 8q, 17q and 20q amplifications and 17p loss. *TP53* mutations were more frequently identified in the amplifier subset, while *PIK3CA* mutations were detected in both subsets. When compared to invasive ductal carcinomas of no special type, invasive micropapillary carcinoma exhibited specific loss of the 6q16-q22 region, associated with downregulation of *FOXO3* and *SEC63* gene expression. *SEC63* and *FOXO3* missense mutations were each identified in one case, respectively. Whole-exome sequencing combined with RNA sequencing of invasive micropapillary carcinoma cases identified, in addition to the recurrent *TP53* mutation in 10% of the cases, somatic mutations in genes involved in polarity (*DNAH9*, *FMN2*) or ciliogenesis (*BBS12* and *BBS9*) or genes coding for endoplasmic reticulum protein (*HSP90B1*, *SPTLC3*) and cytoskeleton (*UBR4*, *PTPN21*), regardless of the genomic subset. The intracellular biological function of the mutated genes identified by gene ontology analysis suggests a driving role in the clinicopathological characteristics of invasive micropapillary carcinoma.

Conclusion: Our comprehensive genomic analysis of invasive micropapillary carcinoma of the breast identified a constellation of genomic alterations and somatic mutations. Strikingly, genes involved in cell polarity and shape harbored recurrent somatic mutations, suggesting that they could be driver events of the specific pattern of invasive micropapillary carcinoma.

Key words: Breast carcinomas, pure invasive micropapillary carcinomas, polarity, *TP53*, Whole-exome sequencing, pan-genomic analysis.

Introduction

Breast carcinomas encompass numerous morphologies, phenotypes and molecular alterations [1-3]. Recent comprehensive genomic studies have focused on the most common histological (i.e. invasive ductal carcinoma of no special type (IDC-NST) and lobular carcinoma) or molecular (i.e. luminal, triple-negative or ERBB2) groups [4-7]. The present study provides the first comprehensive molecular characterization of invasive micropapillary carcinoma (IMPC), one of the special types of invasive breast carcinoma. IMPC represents less than 2% of all invasive breast cancers [2]. This entity is characterized by proliferation of carcinomatous cells organized in clusters, separated from the extracellular matrix by an empty clear space with the cellular apical surface polarized towards the outside. This inverted apical pole is clearly visualized by epithelial membrane antigen (EMA) or MUC1 stains [8] and is the hallmark of this entity.

Up to 70% of patients with IMPC have peritumoral lymphovascular invasion (LVI). This LVI rate is higher than the rates usually observed in IDC-NST (20%). However, despite the aggressive phenotype of IMPC, IMPC is associated with a similar prognosis to that of IDC-NST with the same axillary lymph node status [9-11].

Previous molecular studies, based on small series of 16 and 10 cases respectively [12] [13], have identified specific genomic patterns of IMPC, such as 8p losses, 8q gains and 17p and 16q losses in 50 to 100% of cases. It was subsequently demonstrated that the majority of IMPC were estrogen receptor (ER) positive cases associated with a high proliferation rate and could therefore be considered to be luminal B tumors [13]. Furthermore, Marchio *et al.* demonstrated the existence of three different genomic patterns: “simplex” with segments of duplication and deletion of entire chromosomes or chromosome arms, “sawtooth” with numerous low level regions of gains or losses and “firestorm” with numerous amplifications. In addition, compared to ER- and grade-matched IDC-NST, some genomic alterations were more predominantly observed in IMPC such as amplifications on chromosomes 8p, 8q or 17q.

Despite these previous genomic studies, the biological alterations leading to inverted polarity of IMPC cells associated with high rates of axillary lymph node and lymphovascular invasion have yet to be elucidated.

The present study based on comprehensive genomic analysis by *TP53*, *PIK3CA*, *SEC63* and *FOXO3* Sanger sequencing, SNP6.0 and transcriptomic analyses of a large series of IMPC and based on next-generation sequencing of a subset of cases, identified recurrent mutations in genes involved in cell polarity and cell shape.

Patients and Methods

Patients and tumors

We retrospectively selected 77 cases of invasive breast cancer (50 pure IMPC, 27 IDC-NST) on the basis of the availability of both paraffin blocks and frozen specimens from the Institut Curie (45 IMPC and 27 IDC-NST) and Centre Georges François Leclerc (5 IMPC) tumor banks. Initial treatment was surgery in all selected cases. These cases were reviewed by three experienced breast pathologists (AVS, PF and LA), and classified according to the World Health Organization criteria [1]. IMPC cases were confirmed on the basis of inside-out MUC-1 (CA15.3, monoclonal antibody, clone DF3, Abcys laboratory, Paris, France) staining at the inverted apical pole [14]. IDC-NST were selected as being ER-positive and grade-matched with IMPC cases.

Whole-exome sequencing was performed for 4 IMPC and their normal DNAs (peritumoral) and targeted sequencing validation was performed for 47 IMPC with a MiSeq Illumina. Affymetrix SNP6.0 analysis was feasible for 39 IMPC and whole-transcriptome sequencing was performed for 6 IMPC (Type of analyses and number of cases are listed in supplementary Figure 1). All experiments were performed in accordance with the French Bioethics Law 2004-800, the French National Institute of Cancer (INCa) Ethics Charter and after approval by the Institut Curie review board and the ethics committees of our institution (“Comité de Pilotage of the Groupe Sein”). Patients gave their written informed consent to use their tumor specimens for research. Data were analysed anonymously.

Immunohistochemical analyses

Four μm thick sections were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues derived from whole tissue sections of representative blocks for each case. These sections were cut, dried, deparaffinized and rehydrated according to standard procedures. All sections were subjected to heat-induced antigen retrieval in citrate buffer (pH 6.1). Estrogen receptor (ER α , clone 6F11, 1:200, Novocastra, United Kingdom), ERBB2 (clone CB11, 1:1,000, Novocastra, United Kingdom) and MUC-1 (clone DF3, 1:100, BioSB, CA), antibodies were incubated for 1 hour at room temperature. Staining was detected with the universal Vectastain Elite ABC peroxidase mouse and rabbit IgG kit (Vector Burlingame, CA) with diaminobenzidine (Dako A/S, Glostrup, Denmark) as chromogen. Internal and external controls were included for each antibody. The ASCO cut-off were used to determine whether cases were positive for ER ($\geq 1\%$) or ERBB2 ($\geq 30\%$ of complete and intense membranous staining) [15]. MUC-1 protein localization (apical or cytoplasm) was also determined.

DNA and RNA extractions

DNA extraction and preparation for microarray experiments of tumor DNA were performed by the Institut Curie Biological Resource Center. Prior to DNA isolation, a tissue section of tumor fragments was performed and stained with hematoxylin and eosin to evaluate tumor cellularity. All tumors analysed contained more than 70% of tumor cells on the frozen tissue section after manual microdissection of the frozen specimen. DNA was extracted from frozen tumor samples using a standard phenol/chloroform procedure. The quality of DNA was assessed on agarose gel. When a smear was observed instead of a band, the sample was discarded. RNA extractions were performed using a standard procedure, as previously described [16].

SNP6.0 profiling and analysis of genomic alterations

SNP mapping assays were performed according to the manufacturer’s protocol (Affymetrix, Santa Clara, CA). Briefly, 250 ng of gDNA were digested with both *Nsp* and *Sty* restriction enzymes in independent parallel reactions (SNP6.0), ligated to the adaptors, and amplified by PCR using a universal primer. After purification of PCR products with SNP Clean magnetic beads (Agencourt Biosciences, Beverly MA), amplicons were quantified, fragmented, labelled, and hybridized to SNP6.0 arrays. Targets were prepared when 45 μg of amplified DNA were available and when their size was situated between 250 and 2,000 bp, and hybridized according to the manufacturer's recommendations. After washing and staining, the arrays were scanned to

generate .cel files for downstream analysis. Normalization was performed using a Genotyping console (GenomeWideSNP_6.hapmap270.na31.r1.a5) provided by Affymetrix (GTC3.0.1).

Genomic alterations were evaluated according to the GAP methodology [17]. Copy number and allelic content profiles were detected for each tumor based on the overall pattern of alterations, as previously described and validated [17]. The cut-offs for alteration events (gains, losses, amplifications) were adapted according to the inferred ploidy. For near-diploid tumors, the genomic region with inferred copy number less than or equal to 1, or greater than or equal to 3 and 6 were considered to be regions of loss, gain and amplification, respectively. For near-tetraploid tumors, the copy number cut-offs used to define regions of loss, gain and amplification were 2, 6 and 8, respectively. The minimal regions of amplification covering at least 25 consecutive SNPs with the same copy number status were considered to be recurrent regions when the frequency of alterations was higher than 20%. Tumor profiles were visualized with GAP software. Partek® GS software version 6.5 build 6.10.1020 (Copyright © Partek Inc., St. Louis, MO, USA) was used to generate hierarchical clustering of the genomic SNP6.0 data in the IMPC group of tumors. Ward's method with Euclidean distance was used to generate this clustering.

Classical Sanger sequencing

Classical Sanger sequences were performed for *TP53* (Exons 4 to 10; 45 cases), *PIK3CA* (exons 8, 10 and 21; 39 cases), *SEC63* (exons 1 to 21; 43 cases) and *FOXO3* (exons 2 to 4; 51 cases) genes. Each PCR was performed on 30 ng of tumor DNA (*TP53* and *PIK3CA*) or cDNA (*SEC63* and *FOXO3*). PCR amplified and bidirectionally sequenced using Big Dye Terminator chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA) with an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer. Primer sequences are available in Supplementary Table 2. Functional impact of change in amino acid was determined by PolyPhen-2 Score [18].

Whole-exome sequencing

Whole-exome sequencing was performed using the SureSelect Human All Exon Kit 50MB (Agilent) and SOLID™ V4 System (Applied Biosystem). Colored space paired-end reads (50x35bp) were mapped against UCSC hg19 genome (NCBI build 37.1) using BFAST and BWA (bfast+bwa v0.7.0a) [19]. Reads with mapping quality < 20 and reads which were marked as duplicates by Picard v1.65 were excluded from further analysis.

Putative somatic SNVs were subsequently called in exome data using SAMTools mpileup (v0.1.18 (r982:295)) [20] and VarScan v2.2.11[21]. False-positive SNVs were excluded using the following thresholds: FET *p*-value < 0.05, coverage ≥ 10x, phred base quality ≥ 20, minimum variant allele frequency ≥ 20%, high-quality reads supporting variants allele ≥ 4.

For prioritization, we omitted known variants from 1000g and dbSNP v137 and selected missense variants with functional Impact Score (FIS) > 0.5 and GERP score > 3.0. We used an in-house developed variant annotation pipeline GFAP (Daveau *et al*, manuscript submitted) and SeattleSeq Annotation 137 (<http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation137>) server (V7.05, June 2012). A set of potentially deleterious, somatic missense SNVs was validated by classical Sanger sequencing. The validated missense variants were screened in an independent series (n=47) by targeted sequencing on the MiSeq Illumina platform from IntegraGen (Ivry, France). The Reactome functional interaction cytoscape plugin was used to determine the interactions existing between the mutated genes identified (http://wiki.reactome.org/index.php/Reactome_FI_Cytoscape_Plugin). For whole exome and MiSeq sequencing, the average targeted bases covered at 25X are 65% and 68%, respectively.

RNA sequencing

Library preparation and paired-end RNA sequencing were performed by IntegraGen (Genopole Campus 1 - Genavenir 8, 5 rue Henri Desbruyères, 91000 Evry, France) using TruSeq RNA sample prep kit and HiSeq 2000 Illumina platform, respectively. In average, 130 millions of reads were obtained for each sample. RNA sequencing raw reads were mapped using TopHat v2.0.6 (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) and Bowtie v2.0.4

against UCSC hg19 genome (NCBI build 37.1). Single nucleotide variants (SNV) and transcriptome quantitative analysis were performed using SAMtools v0.1.8 and Cufflinks v2.0.2 (<http://cufflinks.cbc.umd.edu/>), respectively. Expression level of validated mutations was determined using RNA sequencing data.

Gene expression analysis

The DNA microarrays used in this study were the GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix®, Santa Clara, CA), containing 54,613 probe sets. Microarray data were simultaneously normalized using the GCRMA package V1.2 in the R environment (R Development Core Team). In this paper, expression data were used to determine correlations between the genomic status of genes localized within the chromosome 6q minimal region of deletion and their level of expression by comparing the log₂ expression signal and the DNA copy number signals using Pearson's correlation test. A correlation between expression levels with respect to DNA copy number was considered significant when $R > 0.4$ and p -value was ≤ 0.05 .

Results

IMPC are predominantly pT1N1 estrogen receptor-positive with high rates of ERBB2 overexpression for T1 tumors

The aim of this study was to identify genomic alterations related to the specific morphology of IMPC i.e. inverted polarity of cells, organized in clusters separated from the extracellular matrix by a clear space (Figures 1A and 1B). IMPC have been previously identified as luminal carcinomas. The 39 IMPC subsequently analysed by SNP6.0 were therefore compared to 27 ER⁺ and grade-matched IDC-NST. All data are shown in supplementary Table 1.

The median age of the IMPC and IDC-NST patients was 62 and 60 years, respectively, and all patients were treated and followed at the Institut Curie from 1990 to 2010. The majority of IMPC were T1 (72%), grade II (51%), estrogen receptor-positive (87%) and ERBB2 overexpression was observed in 26% of cases.

IMPC harbored 17q gain/amplifications associated with 6q deletion

The copy number and allelic status of each altered region in the tumor genome were determined in order to assess chromosome number and infer the ploidy of each tumor sample.

Number of breakpoints (defined as a change in copy number or allelic status within a chromosome) was evaluated for each tumor. The median numbers of breakpoints in IMPC and in ER⁺ and grade-matched IDC-NST were almost identical (65 for IMPC and 79 for IDC-NST).

Frequencies of gains and losses are shown in Figure 1C. Recurrent amplifications (observed in more than 20% of cases) were identified on chromosomes 8q and 17q, as listed in detail in Table 1. The three most frequent regions of amplification observed in IMPC were 8q22.1, 8q23.3-q24.23 and 17q22-q23.3 regions, encompassing *RAD54B*, *CCNE2* and *TP53INP1* genes (21% vs 5% in IDC-NST), *MYC* (21% vs 14% in IDC-NST) and *BCAS3*, *TLK2*, *TBX2* and *TANC2* genes (22% vs 7%), respectively. IMPC cases presented also amplifications of the *ERBB2* region (22% vs 24% in IDC-NST).

As expected, some of the most frequent recurrent changes (observed in at least 40% of cases) were those commonly found in luminal B breast cancers (gains of 8q associated with losses of 8p, 16q, 17p and 22q)[22]. However, IMPC specifically harbored more gains of chromosome 17q22-q24.3 (47% vs 25%) and more losses of chromosome 6q16.3-q22.31 (45% vs 20%) than IDC-NST (Table 1). This chromosome 6q loss was associated with loss of heterozygosity (Table 1 and Figure 2B).

Identification of two different genomic subsets of IMPC

Heterogeneous copy number profiles with a high frequency of recurrent regions of amplification and frequent combinations of recurrent alterations (such as chromosome 8p loss, 8q gain, 16q loss, 17q and or 20q amplifications) observed in the IMPC group prompted us to search for genomic subsets. Unsupervised clustering analysis of IMPC SNP6.0 data identified two major clusters among IMPC (Figure 2A): the first cluster was composed of 19 cases (48%) harboring regions of amplification located on chromosomes 8q, 17q and 20q with frequencies ranging from 20 to 46% and is hereafter called “firestorm /amplifier subset” [23]. The second cluster was composed of 16 cases (41%) harboring rare regions of amplification, but whole arm copy number alterations such as 8p⁺/8q⁺/16p⁺/16q⁺, hereafter called “sawtooth/8/16 subset”[23].

Different gains and losses distinguished “firestorm/amplifier” from “sawtooth/8/16” subsets of IMPC (detailed in supplementary Table 4 and Figures 2A and 2B).

Differences in genomic alterations between each of these two IMPC subsets and IDC-NST were then identified and are presented in Supplementary Tables 5 and 6.

In contrast to their genomic differences, the two IMPC subsets harbored identical rates of grade 3, LVI-, ER and PR-positive cases and the same clinical stage (size and N⁺ number) distribution (Supplementary data Table 7).

SEC63 and FOXO3 genes, localized in the 6q minimal region of deletion observed in both genomic groups of IMPC, down regulation and mutation

We delineated a 1.59-Mb minimal region of 6q deletion, observed in 45% of all IMPC cases.

This deletion was further associated with a loss of heterozygosity specific to IMPC. This region encompassed 9 known genes according to the UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19, February 2009). Two of the 9 genes, *SEC63* and *FOXO3*, encompassed by the common region of deletion presented a direct relationship between DNA copy number and expression level in tumors, with a correlation coefficient $R > 0.4$ ($p\text{-val} \leq 0.05$), indicating that DNA copy number had a significant effect on gene expression level. They were underexpressed in IMPC cases (Welch test, $p\text{-val} \leq 0.05$ and Fold change ≥ 1.5) and were consequently sequenced (Primers used for sequencing are listed in Supplementary Table 6). One of the 51 cases (IMPC_10, < 2% of cases) presented 3 missense *FOXO3* mutations (Figure 3; Table 2). One of 43 cases, IMPC_31, presented a missense *SEC63* mutation (Figure 3; Table 2). According to its Polyphen2 Score (1), this mutation was considered as deleterious.

IMPC harbored mutations in genes involved in polarity, ciliogenesis and cell shape

Whole-exome sequencing analyses of 4 IMPC (one “sawtooth /8/16”; three “firestorm/amplifier”) identified 29 tumor-specific non synonymous variants (SNVs). Twenty-two of the 29 SNVs were validated by classical Sanger Sequencing (Table 2). These SNVs corresponded to missense mutations and transition in 68% (15/22) of cases.

Forty-eight IMPC were subsequently sequenced looking for recurrent SNVs (targeted sequencing analyses, MiSeq Illumina) and were then validated by classical Sanger sequencing (Table 2).

Interestingly, deleterious somatic mutations were identified in *DNAH9* (4 cases), *BBS12* (1 case), *BBS9* (1 case), genes coding for proteins that play a key role in ciliogenesis, a biological process necessary for cell polarity or in *FMN2* (1 case) coding for a protein involved in polarity establishment. Other mutations were observed in genes involved in either lipid metabolism or endoplasmic reticulum, processes participating in cell shape (Figure 3).

Sixteen out 22 (72%) of the validated mutations were found to be expressed at the RNA level and found the RNA sequencing data.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first comprehensive analysis of a series of cases of a rare special type of invasive breast carcinoma. The pure invasive micropapillary carcinoma type is characterized by high rates of lymphovascular invasion and axillary lymph node metastasis associated with inverted polarity of tumor cells organized in clusters surrounded by a clear space [1]. IMPC has been recently shown to predominantly harbor genomic alterations also commonly observed in the molecular luminal B subgroup of tumors [13]. These characteristics prompted us to conduct comprehensive genomic analysis of our series of IMPC based on genome-wide SNP6.0 array together with whole-exome and RNA sequencing.

The prognostic impact of anatomical (i.e. tumor stage) and biological characteristics has been clearly recognized in breast carcinoma [22]. Most of the IMPC in this series were small tumors (T1). However, they presented complex genomic profiles with numerous gains, losses or high-level amplifications and numerous breakpoints. IMPC also presented amplification rates of 20%, considered to be a high rate for such early tumors (stage T1). The most frequently recurrent region of amplification differed between IMPC and IDC-NST and was located on chromosome 17q22-q23.3 in IMPC. This region is less frequently amplified than the *ERBB2* region in other breast carcinoma types. Notably, this region is the hallmark of the cluster 1 of tumors of the METABRIC classification [7, 24] and encompasses druggable genes belonging to the kinase family such as *TLK2*. The second most frequently amplified recurrent region in IMPC was the *ERBB2* region, which was amplified in 26% of cases, a higher rate than that observed in other T1 and small T2 invasive ductal breast carcinomas [25, 26]. The most frequent region of amplification in the IDC-NST control group was located on chromosome 8p (32% vs 13% of IMPC) that encompasses *FGFR1* and *PPAPDC1B* [27]. Another frequently amplified region in IDC-NST was located on 11q13.3 and encompasses *CCND1* (22% vs 7% of the IMPC). The combination of *CCND1* 11q and the 8p regions of amplification has been previously reported to be a characteristic of luminal carcinomas [28, 29]. The low frequency of amplification of these regions in IMPC is another genomic difference between luminal IDC-NST and IMPC.

In line with their luminal phenotype, IMPC demonstrated a genomic profile that shared similarities with that of ER+N+LVI+ IDC-NST: 8q gains, 8p, 16q and 22q losses. It is noteworthy that some of these alterations have been previously reported to be preferentially associated with luminal B group carcinomas, such as 8q gains, 8p and 16q losses [22, 30]. However, the high resolution of the present analysis identified differences between the two groups: chromosome 1q31.3-q44, 20q13.12--q13.33 gains were observed more frequently in IDC-NST and chromosome 17q22-q24.3 gains and 6q losses were observed more frequently in IMPC. The present study showed not only that these 6q losses existed, confirming a previous report of chromosome 6q losses by Marchio *et al* [13], but also showed that they were associated with allelic losses of this region. A correlation was also demonstrated between genomic status and transcriptomic expression level of the genes located within this 6q region. Two of these genes, *SEC63* and *FOXO3*, were downregulated. A missense mutation in *SEC63* and three mutations at different positions in *FOXO3* were identified (Table 2). Both *SEC63* and *FOXO3* proteins have been recently identified as participating in cell polarity control. *SEC63* codes for an endoplasmic reticulum protein involved in the early stage of multispinning membrane protein synthesis [31] and has been found to be mutated in polycystic liver and kidney diseases [32]. *SEC63* protein also participates in quality control and trafficking of protein necessary for ciliogenesis and therefore for epithelial cell polarity [33]. *FOXO3* is known to regulate *LKB1* gene transcription and the *LKB1* protein plays a key role in cell planar polarity during cell division [34]. *FOXO3* downregulation has also been recently reported in high-grade serous ovarian carcinoma [35].

Not surprisingly, *TP53* and *PIK3CA* were among the three most recurrently mutated genes in this series of IMPC. Although *TP53* mutation rates were similar to those reported in ER-positive breast carcinomas [7], it is noteworthy that *PIK3CA* mutations were observed less frequently in IMPC than in other ER+ histological subgroups [36].

For the first time, whole-exome sequencing analysis identified recurrent mutations of the *DNAH9* gene in a special type of breast cancer. *DNAH* gene family mutations were recently identified in triple-negative breast carcinomas [37]. Dynein proteins are necessary for correct apical and apico-basal localization of CRUMBS [38] and PAR3 [39] proteins. Recurrent *DNAH9* mutations in IMPC, a special type of breast cancer associated with a polarity defect, strongly suggest a causative role of these mutations in the IMPC pattern of growth.

FMN2, a formin-like 2 gene, and *BBS9* and *BBS12* genes also harbored mutations, albeit not recurrent. These genes are involved in cell polarity organization and motility [40] or ciliogenesis [41]. Genes playing a role in cytoskeleton organization, such as *HSP90B1*, *UBR4*, *ZFYVE26*, also harbored mutations. These genes have also been identified to be mutated in triple-negative breast carcinomas [4], which raises the hypothesis of their role in tumor cell invasion and motility enhancement in triple-negative tumors or IMPC.

Conclusion

We have demonstrated that IMPC is associated with a specific genomic profile compared to ER+ LVI+ N+ IDC-NST consisting of gains of 17q, high rates of 17q22-23.3 and 17q12 *ERBB2* amplifications, and losses of heterozygosity of 6q. The presence of the *SEC63* and *FOXO3* genes located in this 6q LOH associated with deleterious somatic mutations strongly suggests that they could play a role in the inverted polarity of IMPC cells. Altogether, the mutation spectrum observed in IMPC showed that, in addition to *TP53* and *PIK3CA* mutations, IMPC harbored mutations, often several mutations per case, affecting genes involved in ciliogenesis, polarity maintenance and cell shape. This study demonstrates the importance of genomic phenotypic correlations and emphasizes that cancer cells from a single entity can achieve the same phenotype via different mutations in a constellation of genes to alter the same biological process, in this case polarity and ciliogenesis.

List of Abbreviations

IDC-NST: invasive ductal carcinoma of no special type.
IMPC: Invasive micropapillary carcinoma.
EMA: epithelial membrane antigen.
LVI: lymphovascular invasion.
ER: estrogen receptor.
SNP: single-nucleotide polymorphism.
SNV: single-nucleotide variant.
dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism database.
GCRMA: GC Robust Multi-array Average.
PR: progesterone receptor.
METABRIC: MolEcular Taxonomy of Breast cancer International Consortium.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contribution

NG performed the experiments, interpreted the data and wrote the manuscript. JB performed the bioinformatic analyses and interpreted the data. TP and VB performed the GAP analysis. VB and VR performed part of the experiments. OM prepared the nucleic acids. PF and LA provided the IMPC samples. RR, XSG participated to the study design and the collection of the clinical data. OD and AVS designed the study, interpreted the data and wrote the manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank David Gentien, Cécile Reyes, Jean Philippe Meyniel, Guillem Riguaill and Sergio Roman-Roman for their help to Vanessa Benhamo with SNP6.0 experiments at the Institut Curie Translational Research Department, and Dr Anthony Saul for the English editing.

Grant support

Anne Vincent-Salomon is supported by an “INTERFACE grant” from INSERM. Financial support for experiments was provided by the Institut Curie Translational Department, the “Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC) AAP 2010, n° SFI20101201734 and the Institut Curie “ICGEX” grant for whole-exome sequencing experiments.

Table 1: Frequencies of regions of gains, losses and amplifications in IMPC and ER⁺ and grade-matched IDC-NST.

Pos SNP Start	Pos SNP End	Chr	Cytoband	IMPC (%)	IDC-NST (%)	Genes of interest
Common regions						
<i>Gains</i>						
36948617	146292734	8	p11.23-q24.3	60	45	
<i>Losses</i>						
113565	35436036	8	p23.3-p12	63	63	
46534977	90163275	16	q11.2-q24.3	55*	54	
6689	18896297	17	p13.3-p11.2	46	43*	
16055171	51219006	22	q11.1-q13.33	52	40	
Specific regions						
<i>Gains</i>						
197811282	249198692	1	q31.3-q44	23	48	
52579874	67308196	17	q22-q24.3	47	25	
33435161	62648208	20	q13.12-q13.33	17	44	
<i>Losses</i>						
101380020	125365648	6	q16.3-q22.31	45*	20	
705598	13611533	18	p11.32-p11.21	15	42	
28175177	35313501	18	q12.1-q12.2	24	40	
<i>Amplifications</i>						
37097563	38618768	8	p11.23-p11.22	13	26	<i>FGFR1, PPAPDC1B, WHSC1L1</i>
94967717	97023919	8	q22.1	21	5	<i>RAD54B, CCNE2, TP53INP1</i>
115849871	138121678	8	q23.3-q24.23	21	14	<i>MYC</i>
69073647	70229171	11	q13.3-q25	7	22	<i>CCND1, ORAOV1, FGF19, FGF4, FGF3</i>
37298761	38225021	17	q12-q21.1	22	24	<i>STARD3, ERBB2, GRB7</i>
57159990	62354992	17	q22-q23.3	22	7	<i>BCAS3, TBX2, TLK2, TANC2</i>
50695849	52586281	20	q13.2	15	26	<i>ZNF217, BCAS1</i>

Legends: Recurrent gains, losses or amplifications after exclusion of genomic variant according to the DGV database, observed in more than 20% of cases. Pos SNP Start/ pos SNP End: SNP positions corresponding to the boundaries of gains, losses or amplifications. Genomic positions are provided according to human genome 19 references in bp; Chr: chromosome; IMPC: invasive micropapillary carcinoma; IDC-NST: invasive carcinoma of no special type. *: existence of a homozygous deletion. The homozygous deletion is observed in one case among IMPC and IDC-NST studied.

In the lower part of the Table, are listed the specific regions of gains, losses and amplifications that were statistically different in IMPC compared to IDC-NST with p -value < 0.05 (Fisher's Exact Test).

Table 2: List of mutations in IMPC

Gene	Nb of cases	%	Chr	Mutation	Effect of the mutation	Type of mutation	PolyPhen2 Score	GERP Score	RNA seq expression
<i>TP53</i>	5	10	17	GAA>CAA/p.E286Q	missense	transversion	1.000		yes
				ATG>ACG/p.M246T	missense	transition	1.000		yes
				GAG>AAG/p.E68K	missense	transition	0.087		nd
				TAC>TGC/p.Y234C	missense	transition	0.968		nd
				c.742_743insA	frameshift	Ins/del		5.91	nd
<i>DNAH9</i>	4	8	17	A>G	splice intron	transition		4.05	no coverage
				CGG>CAG/p.R2605Q	missense	transition	0.998		no coverage
				ATG>ATA/p.M3430I	missense	transition	0.000		nd
				CAG>TAG/p.Q3082*	nonsense	transition		4.05	nd
<i>FBXO38</i>	2	4	5	TAT>TGT/p.Y1058C	missense	transition	1.000		yes
				GAA>CAA/p.E20Q	missense	transversion	0.964		nd
<i>THSD4</i>	2	4	15	GAG>AAG/p.E476K	missense	transition	1.000		yes
				GAG>AAG/p.E652K	missense	transition	0.964		nd
<i>TRMT5</i>	2	4	14	TTT>CTT/p.F303L	missense	transition	0.043		yes
				GAG>CAG/p.E152Q	missense	transversion	0.029		nd
<i>PIK3CA</i>	2	4	3	CTC>GTC/p.L540V	missense	transversion	0.993		nd
				CAG>CCG/p.Q546P	missense	transversion	1.000		nd
<i>FOXO3</i>	1	2	6	GCA>ACA/p.A267T	missense	transition	0.970		nd
				CCT>TCT/p.P292S	missense	transition	0.342		nd
				TTG>GTG/p.L528V	missense	transversion	0.027		nd
<i>BBS12</i>	1	2	4	CGC>TGC/p.R674C	missense	transition	1.000		yes
<i>BBS9</i>	1	2	7	CCA>TCA/p.P77S	missense	transition	0.999		no coverage
<i>CASP8AP2</i>	1	2	6	GAT>AAT/p.D1420N	missense	transition	0.996		no coverage
<i>EIF2B5</i>	1	2	3	GCA>ACA/p.A406T	missense	transition	0.049		yes
<i>FMN2</i>	1	2	1	GCT>CCT/p.A659P	missense	transversion	0.736		no coverage
<i>HSP90B1</i>	1	2	12	ACG>ATG/p.T468M	missense	transition	0.981		yes
<i>IKBKE</i>	1	2	1	GAC>TAC/p.D571Y	missense	transversion	0.681		yes
<i>PCF11</i>	1	2	11	AAT>AGT/p.N167S	missense	transition	0.017		yes
<i>PLCL1</i>	1	2	2	AAG>AAT/p.K279N	missense	transversion	0.984		no coverage
<i>PTPN21</i>	1	2	14	CGA>CTA/p.R864L	missense	transversion	1.000		yes
<i>SEC63</i>	1	2	6	CGC>TGC/p.R217C	missense	transition	1.000		nd
<i>SPTLC3</i>	1	2	20	G>A	splice intron	transition		5.91	no coverage
<i>ST7L</i>	1	2	1	GAT>GCT/p.D339A	missense	transversion	1.000		yes
<i>SYNRG</i>	1	2	17	ATG>ATA/p.M970I	missense	transition	0.447		yes
<i>UBR4</i>	1	2	1	AAC>AAA/p.N3400K	missense	transversion	0.981		yes

Legends: IMPC: invasive micropapillary carcinomas; Chr: chromosome. %: percentage of mutated cases out of the sequenced cases. RNA sequence expression: yes: the mutated allele is expressed ; no coverage: no aligned reads available for that genomic position ; nd: not determined (no RNA sequence available for that sample).

Figures legends

Figure 1: Phenotypic and genomic characterization of IMPC.

Legends: (A) and (B): Example of an invasive micropapillary carcinoma of the breast composed of cell clusters surrounded by empty spaces and displaying an inside-out growth pattern, as highlighted by MUC-1 staining. **(C):** Frequency plots of gains and losses are displayed from chromosome 1pter on the left to chromosome Xq on the right. Alternating grey and white bands indicate chromosome boundaries. Dashed blue line represent 40% frequencies, - for losses and + for gains, respectively. IMPC: invasive micropapillary carcinomas. IDC-NST: invasive ductal carcinoma of no special type. ER: estrogen receptor.

Figure 2: Identification of two distinct IMPC genomic subgroups.

Legends: (A). Unsupervised hierarchical clustering of 39 IMPC tumors using SNP6.0 data performed with Partek® software. Each column represents a different tumor, and each row represents SNP status. The tumors are divided into two main clusters. The first cluster contains IMPC associated with numerous regions of amplifications (“firestorm / amplifier”). The second cluster includes “Sawtooth/8/16” IMPC that do not harbor numerous amplifications but that are characterized by 8p and 16q losses, 8q and 16p gains. Color code legends lines above the dendrogram: ER⁺: black ; *ERBB2* amplification: pink ; *ERBB2* overexpression: brown ; N⁺: green ; LVI⁺: blue ; grade 3: black ; grade 2: dark grey ; grade 1: pale grey. **(B).** Frequencies of genome copy number gains and losses plotted as a function of genome location in “sawtooth/8/16” IMPC (upper panel) and “firestorm/amplifier” IMPC (middle panel). Gains and losses are displayed above or below the blue line, respectively, from chromosome 1pter on the left to chromosome Xq on the right. Alternating grey and white bands indicate chromosome boundaries. The regions exhibiting significantly more frequent gains or losses between “sawtooth/8/16” IMPC and “firestorm/amplifier” IMPC are indicated above and below the frequency plots. Frequency of loss of heterozygosity of chromosome 6q assessed on SNP6.0 profiles observed in the tumors presenting a deletion of chromosome 6 long arm. The minimal region of deletion is highlighted. LOH: loss of heterozygosity (lower panel). **(C).** Real-time PCR results of relative expression of *SEC63* and *FOXO3* genes in IMPC without (n=9) and with (n=11) chromosome 6q deletion and in IDC-NST (n=10) samples. w/o: without ; w: with ; * $p\text{-value} \leq 0.05$; ** $p\text{-value} \leq 0.001$. **(D).** Summary of the common and distinct genomic alterations between IMPC genomic subgroups and ER⁺ IDC-NST.

Figure 3: Mutations landscape in IMPC according to their grade, genomic subgroups and phenotype and pathways interactions between the 21 mutated genes.

Legends: (A). Distribution of validated somatic mutations among the 47 cases as determined by whole-exome, targeted MiSeq Illumina sequencing and classic Sanger sequencing (*TP53*, *PIK3CA*, *SEC63*, *FOXO3*). Central heat map: distribution of significant mutations across sequenced samples with a color-coding according to the allelic genomic status determined by SNP6.0 analysis: yellow: neutral copy number, green: deletion, dark pink: gain. Upper chart color-coding from top to bottom: chromosome 6q allelic status (dark green: deletion; light green: loss of heterozygosity), tumor ploidy (dark grey: tetraploid; light grey: diploid), IMPC genomic group (red: “firestorm/amplifier” ; green: “sawtooth/8/16”), ER and PR status (dark blue: positive; light blue: negative), *ERBB2* overexpression (negative: pink; positive 3+: orange), grade (light grey: grade 1; intermediate grey: grade 2; dark grey: grade 3), axillary lymph node status (dark: N+, white: N-). Chr: chromosome. Function: defined according to Gene Ontology and UCSC genome browser. **(B).** Interactions and pathways between the 21 mutated genes in IMPC deduced from the Reactome algorithm [42]. In this diagram, the Functional Interaction (FI) network connections are symbolized by arrows for activating/catalyzing, -| for inhibition, - for FIs extracted from complexes or inputs, --- for predicted FIs and defined FIs.

References

1. Lakhani SR, I.O. E, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (eds.): WHO Classification of Tumours of the Breast, 4th edn: IARC; 2012.
2. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS: Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 2010, **4 (3)**:192-208.
3. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL: Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 2008, **216 (2)**:141-150.
4. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, Lawrence MS, Sivachenko AY, Sougnez C, Zou L *et al*: Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012, **486 (7403)**: 405-409.
5. Network TCGA: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012, **490 (7418)**: 61-70.
6. Shah SP, Morin RD, Khattra J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, Delaney A, Gelmon K, Guliany R, Senz J *et al*: Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* 2009, **461 (7265)**: 809-813.
7. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y *et al*: The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012, **486 (7403)**: 346-352.
8. Ellis I, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, L T, Jacquemier J *et al* (eds.): Invasive breast carcinoma: IARC; 2002.
9. Nassar H, Wallis T, Andea A, Dey J, Adsay V, Visscher D: Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2001, **14 (9)**: 836-841.
10. Paterakos M, Watkin WG, Edgerton SM, Moore DH, 2nd, Thor AD: Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. *Hum Pathol* 1999, **30 (12)**: 1459-1463.
11. Chen AC, Paulino AC, Schwartz MR, Rodriguez AA, Bass BL, Chang JC, Teh BS: Prognostic Markers for Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: A Population-Based Analysis. *Clin Breast Cancer* 2013, **13 (2)**: 133-139.
12. Thor AD, Eng C, Devries S, Paterakos M, Watkin WG, Edgerton S, Moore DH, 2nd, Etzell J, Waldman FM: Invasive micropapillary carcinoma of the breast is associated with chromosome 8 abnormalities detected by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 2002, **33 (6)**: 628-631.
13. Marchio C, Irvani M, Natrajan R, Lambros MB, Savage K, Tamber N, Fenwick K, Mackay A, Senetta R, Di Palma S *et al*: Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *J Pathol* 2008, **215 (4)**: 398-410.
14. Nassar H, Pansare V, Zhang H, Che M, Sakr W, Ali-Fehmi R, Grignon D, Sarkar F, Cheng J, Adsay V: Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein. 2004, **17 (9)**: 1045-1050.
15. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A *et al*: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007, **131 (1)**: 18-32.
16. Gruel N, Lucchesi C, Raynal V, Rodrigues MJ, Pierron G, Goudefroye R, Cottu P, Reyat F, Sastre-Garau X, Fourquet A *et al*: Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *Eur J Cancer* 2010, **46 (13)**: 2399-2407.

17. Popova T, Manie E, Stoppa-Lyonnet D, Rigai G, Barillot E, Stern MH: Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol* 2009, **10** (11): R128.
18. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010, **7** (4): 248-249.
19. Homer N, Merriman B, Nelson SF: BFAST: an alignment tool for large scale genome resequencing. *PLoS One* 2009, **4** (11): e7767.
20. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009, **25** (16): 2078-2079.
21. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK: VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012, **22** (3): 568-576.
22. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, Lapuk A, Neve RM, Qian Z, Ryder T *et al*: Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 2006, **10** (6): 529-541.
23. Marchio C, Natrajan R, Shiu KK, Lambros MB, Rodriguez-Pinilla SM, Tan DS, Lord CJ, Hungermann D, Fenwick K, Tamber N *et al*: The genomic profile of HER2-amplified breast cancers: the influence of ER status. *J Pathol* 2008, **216** (4): 399-407.
24. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C: A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J*, 2013, **32** (5): 617-628.
25. Rodrigues MJ, Wassermann J, Albiges L, Brain E, Delaloge S, Stevens D, Guinebreteiere JM, Mathieu MC, Kirova Y, Guillot E *et al*: Trastuzumab treatment in t1ab, node-negative, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast carcinomas. *J Clin Oncol* 2010, **28** (28): e541-542.
26. Curigliano G, Viale G, Bagnardi V, Fumagalli L, Locatelli M, Rotmensz N, Ghisini R, Colleoni M, Munzone E, Veronesi P *et al*: Clinical relevance of HER2 overexpression/amplification in patients with small tumor size and node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2009, **27** (34): 5693-5699.
27. Bernard-Pierrot I, Gruel N, Stransky N, Vincent-Salomon A, Rey F, Raynal V, Vallot C, Pierron G, Radvanyi F, Delattre O: Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008, **68** (17): 7165-7175.
28. Kwek SS, Roy R, Zhou H, Climent J, Martinez-Climent JA, Fridlyand J, Albertson DG: Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis. *Oncogene* 2009, **28** (17): 1892-1903.
29. Adelaide J, Finetti P, Bekhouche I, Repellini L, Geneix J, Sircoulomb F, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Desplans J, Parzy D *et al*: Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res* 2007, **67** (24): 11565-11575.
30. Jonsson G, Staaf J, Vallon-Christersson J, Ringner M, Holm K, Hegardt C, Gunnarsson H, Fagerholm R, Strand C, Agnarsson BA *et al*: Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res* 2010, **12** (3): R42.
31. Lang S, Benedix J, Fedeles SV, Schorr S, Schirra C, Schauble N, Jalal C, Greiner M, Hassdenteufel S, Tatzelt J *et al*: Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci* 2012, **125** (Pt 8): 1958-1969.
32. Banales JM, Munoz-Garrido P, Bujanda L: Somatic second-hit mutations leads to polycystic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2013, **19** (1): 141-143.
33. Bergmann C, Weiskirchen R: It's not all in the cilium, but on the road to it: genetic interaction network in polycystic kidney and liver diseases and how trafficking and quality control matter. *J Hepatol* 2011, **56** (5): 1201-1203.

34. Lutzner N, Kalbacher H, Krones-Herzig A, Rosl F: FOXO3 is a glucocorticoid receptor target and regulates LKB1 and its own expression based on cellular AMP levels via a positive autoregulatory loop. *PLoS One* 2012, **7** (7): e42166.
35. McMillen BD, Aponte MM, Liu Z, Helenowski IB, Scholtens DM, Buttin BM, Wei JJ: Expression analysis of MIR182 and its associated target genes in advanced ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 2012, **25** (12): 1644-1653.
36. Buttitta F, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Paolizzi D, Fresu G, Salvatore S, Cuccurullo F, Mezzetti A, Campani D *et al*: PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *J Pathol* 2006, **208** (3): 350-355.
37. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G *et al*: The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012, **486** (7403): 395-399.
38. Li Z, Wang L, Hays TS, Cai Y: Dynein-mediated apical localization of crumbs transcripts is required for Crumbs activity in epithelial polarity. *J Cell Biol* 2008, **180** (1): 31-38.
39. Schmoranz J, Fawcett JP, Segura M, Tan S, Vallee RB, Pawson T, Gundersen GG: Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Curr Biol* 2009, **19** (13): 1065-1074.
40. Kitzing TM, Wang Y, Pertz O, Copeland JW, Grosse R: Formin-like 2 drives amoeboid invasive cell motility downstream of RhoC. *Oncogene* 2010, **29** (16): 2441-2448.
41. Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF: Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *J Cell Biol* 2012, **197** (6): 697-709.
42. Matthews L, Gopinath G, Gillespie M, Caudy M, Croft D, de Bono B, Garapati P, Hemish J, Hermjakob H, Jassal B *et al*: Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes. *Nucleic Acids Res* 2009, **37** (Database issue): D619-622.

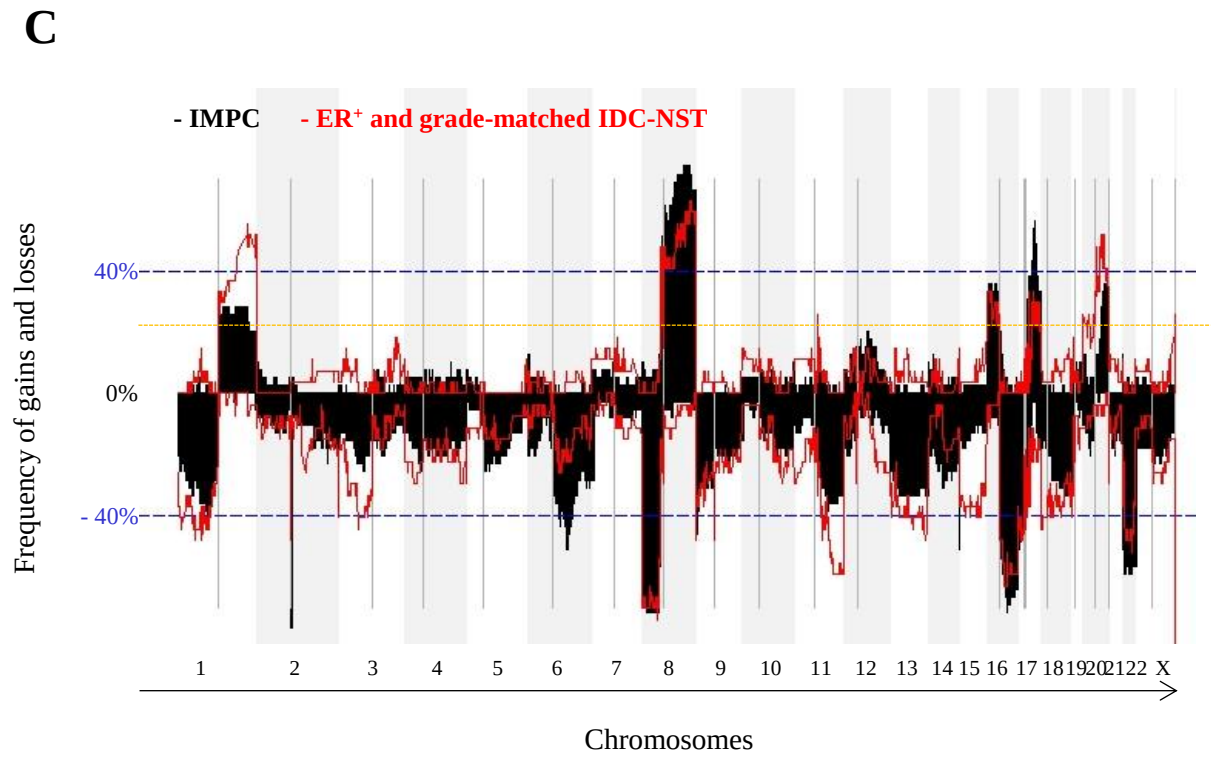
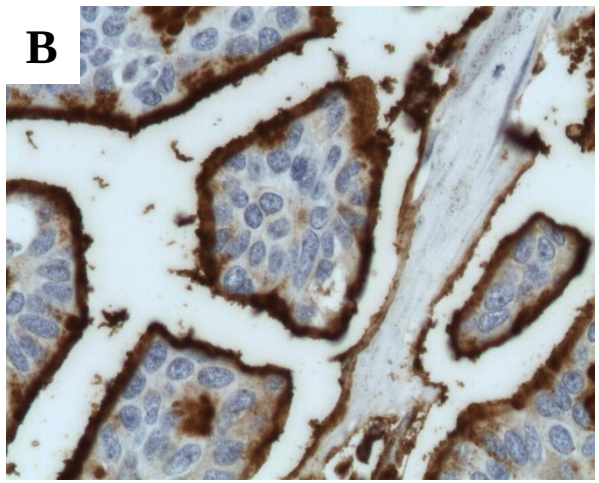
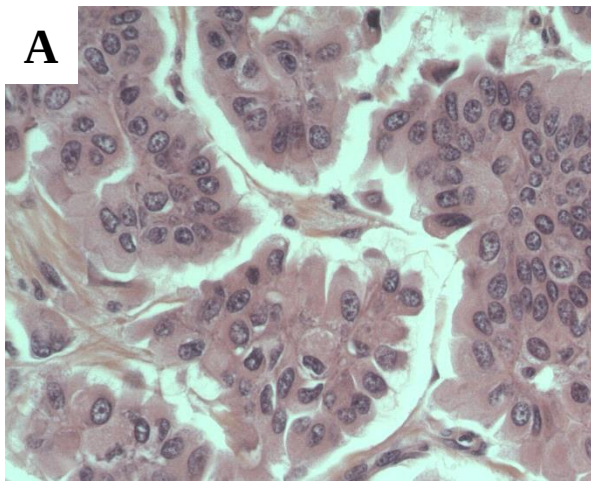


Figure 1

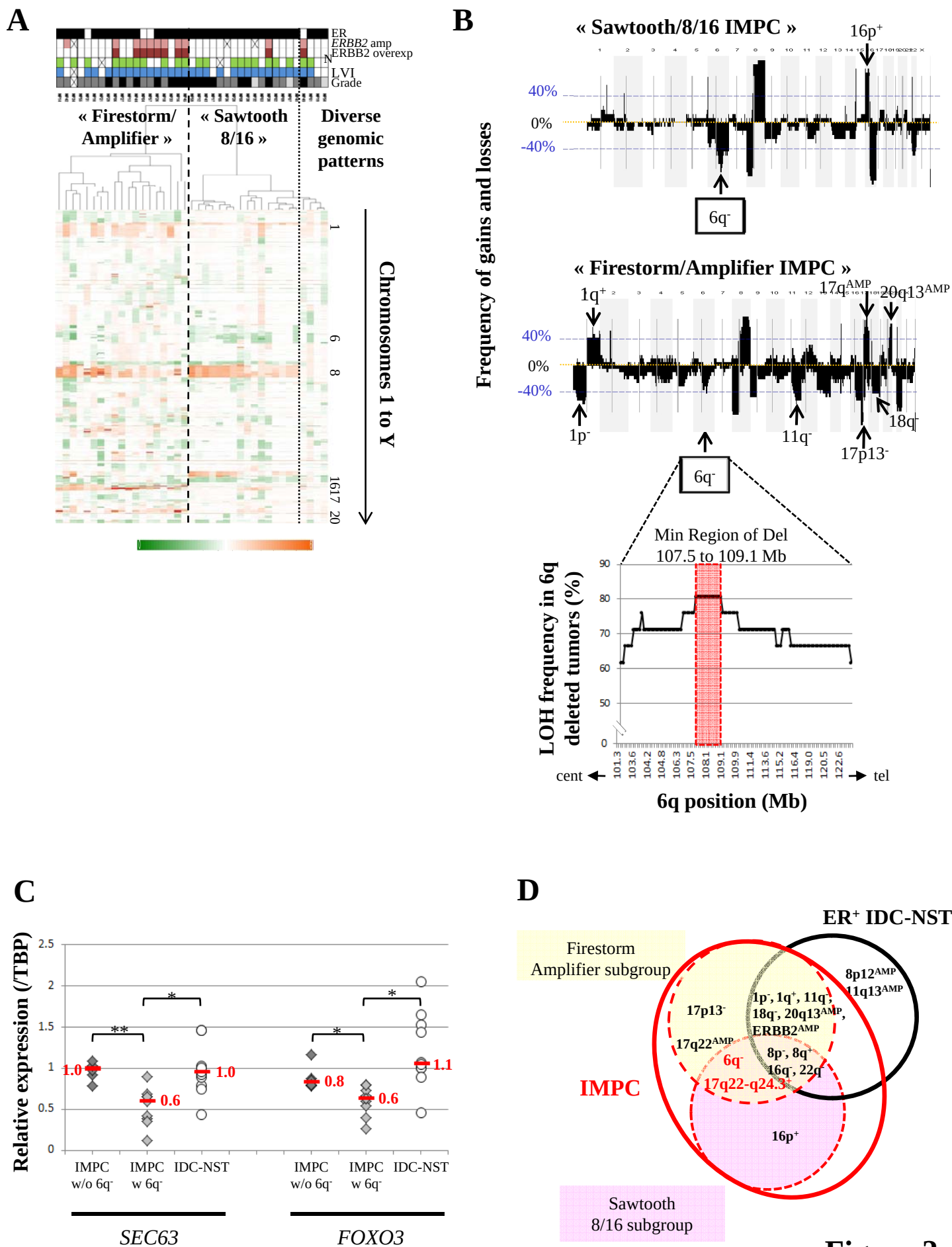
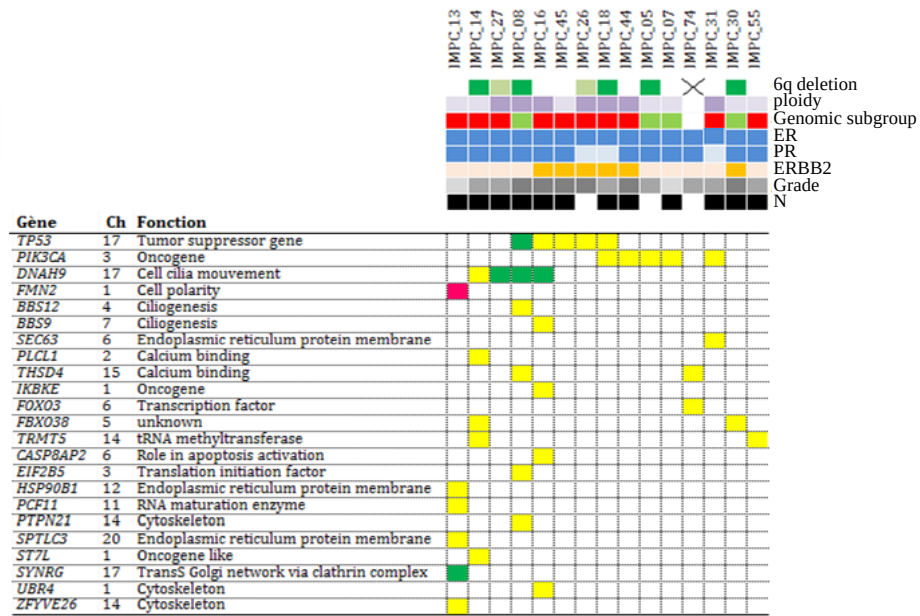


Figure 2

A



B

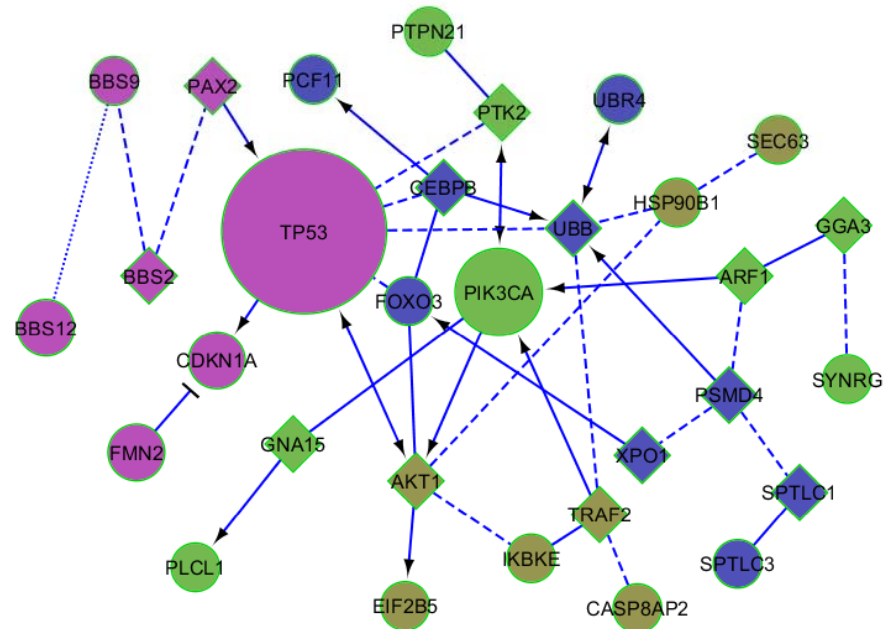


Figure 3

2-5. Conclusion

L'analyse exhaustive réalisée sur une large série d'IMPC nous a permis de montrer que, même si elles partagent des similitudes biologiques avec les carcinomes sans autre spécificité de type luminal B, les tumeurs de type IMPC présentent des spécificités au niveau de :

1) leur différenciation: en effet, ce sont des tumeurs différenciées, avec une expression apicale externe du marqueur CD24 associée à une rare expression des marqueurs EZH2 et CD44⁺CD24⁻, et de meilleur pronostic.

2) leur polarité: ces tumeurs présentent en effet des altérations de la polarité avec un pôle apical apical MUC-1⁺ orienté vers la matrice extracellulaire, des défauts d'expression et/ou de localisation de la protéine golgienne GM130, du marqueur apical ERM, des protéines impliquées dans la formation des jonctions adhérentes (E-CADH) et serrées (OCLN, ZO-1) ou appartenant aux complexes PAR (CDC42, aPKC ζ)

3) leur phénotype: ces tumeurs surexpriment des protéines impliquées dans la formation des jonctions cellulaires de type adhérentes (β -CAT) ou serrées (LIN7A, claudine 23, MPP7, PAR-6). Cette dérégulation est associée à une sous-expression des intégrines ou de leurs ligands, ce qui pourrait expliquer la présence d'un espace clair de rétraction entre les cellules et la matrice extracellulaire. La surexpression de la protéine LIN7A altère la polarité apico-basale des tumeurs de type IMPC en inhibant la formation de la lumière des cystes, via l'inhibition d'une protéine aPKC ζ active. Nous avons également montré que la surexpression de LIN7A était responsable de la résistance des cellules à l'anoïkis, certainement en participant à l'inhibition de la phosphorylation de la protéine P38 α . L'analyse des mécanismes moléculaires mis en jeu sont actuellement en cours.

4) leur génomique: outre des altérations génomiques partagées par les carcinomes mammaires de type luminal B (8p⁻, 8q⁺, 16q⁻, 22q⁺), ces tumeurs présentent une perte spécifique de la région 6q16.3-q22.31, associée à une constellation de mutations somatiques récurrentes et délétères de gènes impliqués dans l'établissement ou le maintien de la polarité apico-basale (*DNAH9*, *FMN2*, *SEC63*, *FOXO3A*), la ciliogenèse (*BBS12*, *BBS9*) et le maintien de l'intégrité du cytosquelette (*PTPN21*, *UBR4*, *ZFYVE26*). Cette étude a démontré, même dans une entité extrêmement rare, l'importance de la corrélation génome/phénotype. Cette analyse combinée nous a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations de différents gènes impliqués dans le même processus biologique, la régulation de la polarité cellulaire.

Conclusion et Perspectives

1- Altérations de la polarité apico-basale et de l'adhésion dans les cancers du sein

Au cours de la carcinogenèse mammaire, l'architecture normale de la glande mammaire est détruite. La perte de la polarité cellulaire, l'augmentation de la capacité de migration et la résistance à l'anoïkis des cellules tumorales sont des mécanismes qui participent à la formation des métastases.

Nous avons choisi, dans une démarche originale, de partir de deux modèles de cancer du sein bien décrits phénotypiquement, les carcinomes lobulaires infiltrants (ILC) et les micropapillaires infiltrants (IMPC). Nous avons décrypté les altérations génomiques et transcriptomiques de ces deux entités tumorales, et tenté, pour les IMPC, de reconstruire *in vitro*, le phénotype observé.

Ces carcinomes ont en commun des perturbations de la polarité cellulaire apico-basale et de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Ces deux types histologiques ont des phénotypes très spécifiques, mais néanmoins très différents l'un de l'autre.

Le **carcinome infiltrant de type lobulaire** présente un phénotype en adéquation avec les altérations génomiques et transcriptomiques observées. Ces tumeurs, composées de cellules carcinomateuses rondes, non cohésives entre elles et détachées de la matrice extracellulaire, sont caractérisées essentiellement par l'inactivation du gène *CDH1*, conduisant à la perte d'expression de la E-cadhérine, protéine essentielle à la formation et au maintien des jonctions adhérentes. Elles présentent de nombreuses métastases viscérales dans plusieurs sites atypiques (Ferlicot S *et al*, 2004).

Nous avons pu établir une signature transcriptomique spécifique et complémentaire des données de la littérature. En effet, outre la sous-expression de la E-cadhérine impliquée dans la cohésion cellule-cellule, d'autres gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (*ADAM12*, *LOXL2*, *CEACAM5*, *CEACAM6*, *THBS4*, *SORBS1*), l'interaction cellule-matrice extracellulaire (*MMP11*, *COL11A1*, *COL10A1*, *ITGA2B*, *ITGA6*, *ITGB1*, *ITGB3*), la polarité apico-basale (*PARD3*) et l'invasion (*TWF1*, *ACTR2*, *AQP1*, *PAK1*) sont spécifiquement dérégulés dans les ILC, confirmant à la fois un défaut d'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice de ces tumeurs. Cette dérégulation, associée à des défauts quantitatifs des constituants de la matrice extracellulaire (sous-expression des collagènes 11 α 1, 1 α 1, 6 α 1, de la fibronectine et de la spondine et surexpression des laminines α 2, α 5, β 1, β 2, β 3), pourrait expliquer la forte proportion de métastases observées chez ces patientes.

La protéine d'adhésion cellulaire LOXL2, lorsqu'elle est surexprimée, peut altérer l'expression et/ou la localisation subcellulaire d'autres protéines des jonctions intercellulaires (claudine 1, E-CADH) ou impliquées dans la polarité (PAR-3, LGL-2) (Peinado H *et al*, 2005 ; Moreno-Bueno G *et al*, 2011). Elle peut également participer à la formation

de métastases (Peinado H *et al*, 2008 ; Barker et al, 2011). Sa forte surexpression dans les ILC pourrait représenter un évènement important dans la perte de la polarité cellulaire et participer à l'activation des propriétés migratoires des cellules carcinomateuses de type lobulaire.

Ainsi, la perte totale de la polarité apico-basale, avec l'absence de jonctions adhérentes (absence d'expression de E-cadhérine), les anomalies des jonctions serrées (sous-expression de PAR-3) ainsi que les défauts d'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire pourraient expliquer le phénotype morphologique caractéristique (*ie* petites cellules rondes non cohésives) et invasif des cellules tumorales de type lobulaire.

Le second modèle tumoral choisi est le **carcinome invasif de type micropapillaire**, maladie bien décrite par les pathologistes sur le plan morphologique : les cellules sont regroupées en amas, sans lumière centrale, avec un pôle apical MUC-1⁺ ou EMA⁺ inversé, tourné vers un espace clair de rétraction qui les sépare de la matrice extracellulaire. Ces tumeurs, comme nous l'avons montré, sont différenciées (expression du marqueur CD24), mais présentent au diagnostic une extension lymphatique et ganglionnaire importante (79 et 61%, respectivement). Le stroma tumoral est particulier car peu abondant et constitué de myofibroblastes. Malgré cette présentation anatomo-clinique, les patientes de notre étude ne présentent que très rarement des métastases viscérales (7 cas sur 76, soit moins de 10% des cas dans notre série, même pour les patientes présentant une surexpression de ERBB2 et n'ayant pas reçu d'anti-ERBB2). Nous avons montré, en accord avec la littérature récente (Chen AC *et al*, 2012), que le pronostic de ces patientes était identique, si ce n'est meilleur, à celui des patientes atteintes de carcinomes infiltrants sans autre spécificité.

Au-delà de la description, communément admise par les pathologistes, de l'existence d'une polarité apico-basale « inversée », notre analyse phénotypique fine, réalisée avec des anticorps utilisés par les biologistes cellulaires dans leurs analyses fonctionnelles de la polarité apico-basale, complétée par une analyse transcriptomique, nous a permis de préciser les modifications de la polarité dans les carcinomes micropapillaires:

- au niveau apical: absence d'expression du marqueur ERM dans 60% des cas analysés
- au niveau des jonctions adhérentes: marquage E-CADH⁺ « épais et rétracté », surexpression de la β -caténine, sous-expression de l' α -caténine
- au niveau des jonctions serrées: expression cytoplasmique de ZO-1 (16% des cas) et de l'occludine (57% des cas) ou absence d'expression de l'occludine (25% des cas)
- au niveau de l'appareil de Golgi: présence de la protéine golgienne GM130 orientée vers le pôle apical inversé dans 38% des cas ou placée de façon aléatoire en intra-cytoplasmique (58% des cas)

- au niveau des complexes de la polarité: absence d'expression ou mauvaise localisation des protéines CDC42 et aPKC ζ (complexe PAR) et surexpression de LIN7-A (complexe CRUMBS)

Des modulations d'expression des intégrines (chaînes $\alpha 11$, $\alpha 5$, $\beta 11$), de leurs ligands, ainsi que des protéines impliquées dans le maintien du cytosquelette (actine musculaire lisse $\alpha 2$, actinine $\alpha 4$, CKAP2L, dynéine, fascine 1, ILK) et des microtubules (MAP1B, MAP1S, MAP2, tubuline β) ont également été observées. Les interactions du domaine basal avec la matrice extracellulaire d'une part, et le réseau de microtubules, d'autre part, étant nécessaires à l'établissement et à la bonne orientation de l'axe apico-basal de la cellule, on imagine aisément que ces défauts d'expression puissent avoir des conséquences dramatiques sur la polarisation épithéliale de ces cellules tumorales.

La surexpression de LIN7A est un évènement récurrent (49/72 cas, soit 68% des cas) dans cette entité tumorale, et surtout très spécifiquement associé à ce type tumoral. En effet, seul 13% des IC-NST (3/23 cas) sont associés à une expression élevée de LIN7A, et on ne retrouve pas de surexpression de cette protéine dans les tissus sains analysés.

Afin d'évaluer les conséquences de cette surexpression sur l'établissement de la polarité, nous avons élaboré un modèle *in vitro*, à partir des cellules épithéliales mammaires MCF10A surexprimant LIN7A et cultivées en 3-D. Ce modèle nous a permis de reconstituer en partie le phénotype micropapillaire. Nous avons ainsi pu démontrer que la protéine LIN7A est un puissant perturbateur de l'organisation et de la formation de la lumière centrale des glandes, élément essentiel de la définition de la polarité apico-basale. En effet, les cellules MCF10A-LIN7A, lorsqu'elles sont cultivées en 3-D dans du Matrigel™ forment des *acini* polylobés, à forte prolifération, sans lumière centrale et résistants à l'anoïkis. LIN7A induit une prolifération cellulaire en activant la voie de signalisation des MAPK et perturbe la formation de la lumière centrale des glandes en inhibant l'activité de la protéine aPKC ζ (inhibition de sa phosphorylation). Dans les tumeurs de type micropapillaire, nous avons observé une absence d'expression (4% des cas) ou une mauvaise localisation (protéine cytoplasmique dans 74% des cas analysés) de la forme active de la protéine aPKC ζ . Quand on sait que la présence et la fonctionnalité de chacun des membres du complexe PAR est nécessaire à la bonne formation des jonctions serrées et de la lumière centrale, on peut supposer que l'absence d'expression de la protéine aPKC ζ ou sa simple délocalisation subcellulaire soit suffisante pour déséquilibrer l'harmonie du complexe et provoquer des altérations architecturales, comme l'absence de lumière ou la délocalisation de l'occludine (Brennan K *et al*, 2009).

Les cellules MCF10A surexprimant LIN7A sont résistantes à l'anoïkis. Cette observation pourrait expliquer la survie des cellules tumorales de type micropapillaire au sein de l'espace clair de rétraction qui les isole de la matrice

extracellulaire. Lors de l'anoïkis, l'expression de la protéine P38 α phosphorylée est augmentée (Wen HC *et al*, 2011). La surexpression de LIN7A est corrélée à l'inhibition de l'expression de la protéine P38 α active (forme phosphorylée). Des expériences complémentaires sont actuellement en cours, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Des expériences préliminaires ont montré que LIN7A seul n'était pas suffisant pour induire la formation de tumeurs chez la souris immunodéficiente SCID. Comme cela a déjà été décrit pour PAR-3 (Xue B *et al*, 2013), nous pouvons faire l'hypothèse que la coopération entre LIN7A et un oncogène (*ERBB2*, *C-MYC*) soit nécessaire pour induire la formation de tumeurs *in vivo*. Nous prévoyons donc l'injection de cellules MCF10A-LIN7A chez des souris transgéniques pour *ERBB2* ou *C-MYC*, par voie sous-cutanée ou intra-ductale.

En conclusion, notre étude des analyses phénotypiques fines des protéines impliquées fonctionnellement dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire, complétées par des analyses transcriptomiques et fonctionnelles *in vitro*, ont montré que les carcinomes infiltrants de type micropapillaire ont une polarité cellulaire très perturbée, avec des jonctions adhérentes et serrées présentes, mais anormales. Ces carcinomes sont également caractérisés par des modifications des protéines appartenant aux complexes PAR et CRUMBS. Ces tumeurs présentent une extension loco-régionale dès le diagnostic, mais peu de métastases viscérales (< 10% des cas analysés).

L'analyse génomique complémentaire a identifié deux sous-groupes génomiques différents (groupe présentant la combinaison chromosomique 8p+8q+16p+16q ou groupe présentant des amplifications sur les chromosomes 8q, 17q et 20q), présentant deux altérations communes: la perte de la région 6q16.3-q22.31 dans 45% des cas et le gain de la région 17q22-q24.3 dans 47% des cas. Nous avons montré que la région 6q16.3-q22.31 contient deux gènes également sous-exprimés dans les IMPC: *SEC63*, impliqué dans la ciliogenèse et *FOXO3*, qui participe à la régulation de la polarité planaire.

A ces altérations génomiques, sont associées des mutations somatiques, trouvées dans 23% des cas, quelquefois de façon récurrente, de gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette (*HSP90B1*, *UBR4*, *ZFYVE26*), la motilité (*FMN2*), la régulation de la polarité (*DNAH9*, *FOXO3*) ou la ciliogenèse (*BBS9*, *BBS12*, *SEC63*).

Nous savons que la constitution du cil est un élément clef du maintien de la polarité de la cellule épithéliale. Des mutations des gènes participant à l'élaboration du cil donnent des ciliopathies. Les ciliopathies rénales, les plus étudiées, sont caractérisées par la formation de kystes rénaux induite par la dérégulation de la prolifération cellulaire, la perte de la polarité et de la différenciation épithéliale. De plus, certaines protéines de la polarité qui se localisent aux jonctions cellulaires, donc actrices majeures de la polarité apico-basale, sont également impliquées dans le bon

fonctionnement du cil, comme PAR-6γ, CDC42 ou aPKC (Wang G *et al*, 2009 ; Dormoy V *et al*, 2013). Les connections moléculaires identifiées entre la polarité apico-basale, la polarité planaire et l'apparition du cil primaire, ainsi que la présence de mutations dans les gènes de la ciliogenèse nous incite à poursuivre notre exploration des altérations de la polarité, en initiant une étude phénotypique basée sur l'exploration des gènes impliqués dans la polarité planaire et/ou la ciliogenèse. Des premières expériences fonctionnelles basées sur l'invalidation de l'expression de FOXO3, SEC63 et DNAH9 dans la lignée épithéliale mammaire MCF10-A sont actuellement en cours.

Notre étude sur les IMPC, basée sur la corrélation génome/transcriptome/phénotype, met en lumière le fait que des cellules cancéreuses d'une même entité phénotypique peuvent présenter des altérations génomiques et/ou transcriptomiques différentes: profils génomiques différents (combinaison 8p-8q+16p+16q dans 41% des cas ou amplifications des chromosomes 8q, 17q et/ou 20q dans 49% des cas), mutations sur une multitude de gènes impliqués dans la régulation de la polarité, la ciliogenèse ou la motilité (23% des cas), délétion de la région 6q16-q22 associée à la perte d'expression de FOXO3 et SEC63 (45% des cas), surexpression de la protéine du complexe Crumbs LIN7A dans 68% des cas. Toutes ces modifications contribuent à l'altération d'un même processus biologique, ici, la polarité, et participent très certainement au phénotype des micropapillaires. Néanmoins, de nombreux points restent à expliquer, comme, par exemple, la dérégulation de *LIN7A*. D'autres mécanismes tels les mécanismes de régulation épigénétique ou post-transcriptionnelle (expression dérégulée de petits ou longs ARN non codants), pourraient participer au phénotype particulier des IMPC, en agissant, par exemple, sur l'expression de *LIN7A*. La surexpression de Hsa-miR-375 a récemment été montrée comme responsable de la transition carcinome *in situ*/infiltrant et perturbateur de la polarité apico-basale dans le modèle de carcinome mammaire de type lobulaire (Gircz O *et al*, 2012). Nous souhaitons donc compléter notre étude par une analyse des profils d'expression des ARN non codants.

Parallèlement, nous souhaiterions initier une analyse trans-organe. En effet, des tumeurs de type micropapillaire avec le même phénotype (pôle apical externe MUC-1+, espace clair de rétraction et métastases axillaires dès le diagnostic) a été décrit dans le poumon, la vessie ou les glandes salivaires. Cette analyse nous permettrait de confirmer ou de mettre en évidence d'autres altérations responsables du phénotype « micropapillaire ». En collaboration avec le Dr A. Mansuet-Lupo (Hôpital Hôtel-Dieu, AP-HP, Paris) et le Dr L. Arnould (Centre Georges-François Leclerc, Dijon), nous commençons à constituer une série de tels échantillons.

Certaines tumeurs du sein de type micropapillaire présentent une composante *in situ*, qui présente déjà des modifications de la polarité. Cette observation suggère un évènement précoce dans le processus de cancérogenèse. Il serait donc intéressant de

rechercher les altérations génomiques (mutations, insertions, délétions, translocations) spécifique de chacune de ces entités, afin de pouvoir « isoler » d'une part, les altérations fondatrices du statut micropapillaire, et d'autre part, celles responsables de la transition *in situ*/infiltrant. En collaboration avec le Dr P. Chavrier et le Dr C. Lodillinsky (UMR144, Institut Curie, Paris), nous nous intéressons aux mécanismes qui sous-tendent la progression des carcinomes du sein *in situ* en infiltrant et la motilité cellulaire, favorisant l'invasion loco-régionale et à distance. Nous cherchons donc à mettre en évidence l'implication de la protéine LIN7A dans la motilité cellulaire. Nous avons vu que la surexpression de la protéine LIN7A dans les cellules MCF10A cultivées en 3-D provoque la formation d'*acini* polylobés et invasifs. Afin de savoir ce phénotype peut être reproduit *in vivo*, les cellules MCF10A-LIN7A ont, d'une part, été injectées en Matrigel par voie sous-cutanée et, d'autre part, par voie intra-ductale (Valdez KE *et al*, 2011). Ces expériences sont actuellement en cours d'analyse.

En parallèle, en collaboration avec le Laboratoire d'Investigation Préclinique (Dr D. Decaudin et F. Assayag, LIP, Institut Curie), nous avons établi deux modèles de xénogreffes de type micropapillaire. Leur caractérisation génomique, transcriptomique et phénotypique est en cours. Nous essayons d'établir également des lignées cellulaires carcinomateuses stables à partir de tumeurs de type micropapillaire, afin de mieux caractériser les fonctions du gène LIN7A ou des gènes impliqués dans la ciliogenèse.

Les ILC et les IMPC sont deux entités présentant des perturbations de la polarité et de l'adhésion à la matrice. Cependant, leurs profils métastatiques et l'évolution clinique des patientes sont spécifiques. Mieux comprendre les mécanismes d'altérations de la polarité dans ces deux modèles est un enjeu cognitif, mais également clinique puisque bon nombre de protéines de la polarité dérégulées spécifiquement dans ces deux modèles pourraient éventuellement représenter de nouvelles cibles thérapeutiques (LIN7A et LOXL2 par exemple). Une entité comme les IMPC présente une extension loco-régionale nette dès le diagnostic. Selon les recommandations actuelles, la chimiothérapie adjuvante est volontiers prescrite. Or, nos données incitent à penser que malgré une lymphophilie nette, la capacité à former des métastases à distance des IMPC est probablement modeste. Des possibilités éventuelles de désescalade thérapeutique sont donc envisageables à terme.

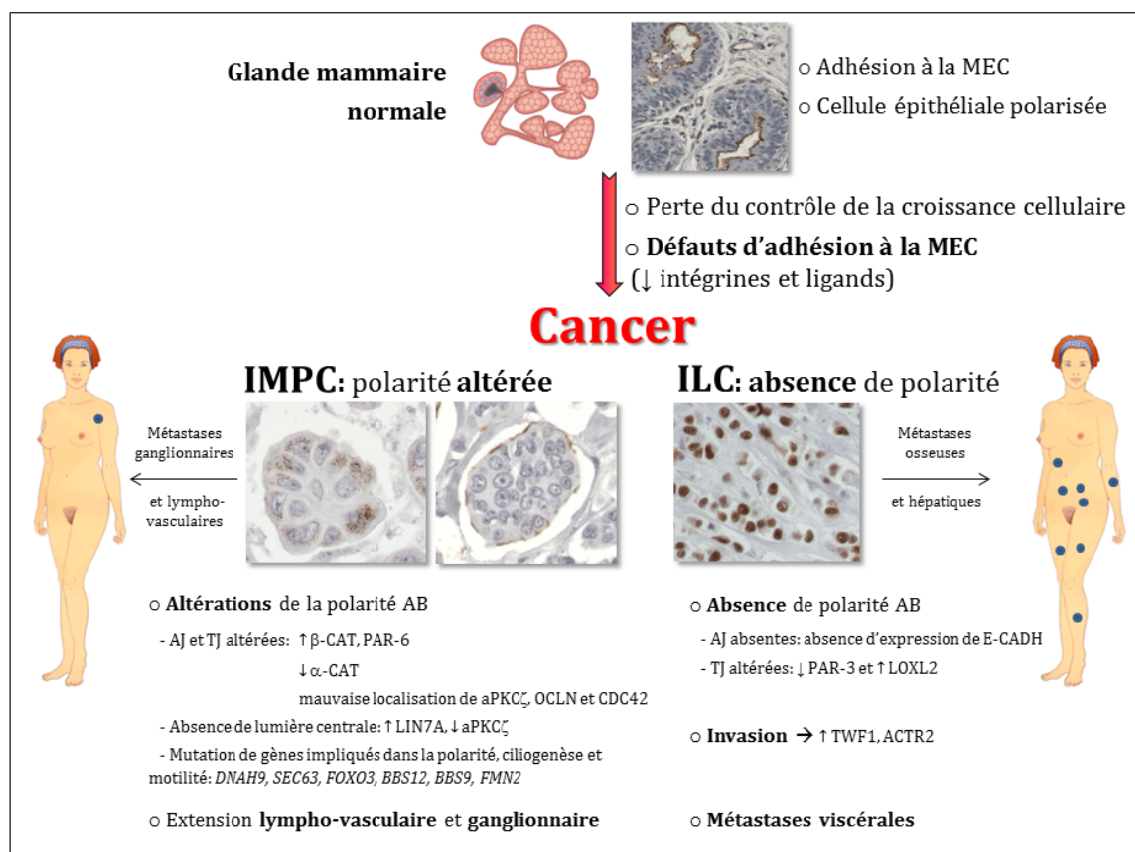


Figure 45: Les carcinomes infiltrants de type micropapillaire (IMPC) et lobulaires (ILC) : deux entités de la perturbation de la polarité apico-basale et de l'adhésion à la matrice.

2- Hétérogénéité moléculaire et évolution de la prise en charge des patientes

Les analyses combinées phénotypiques et moléculaires à grande échelle permettent de documenter en détail l'hétérogénéité réelle des carcinomes mammaires. Mon travail a permis de confirmer que, d'une part, certaines entités, même rares représentent assurément un spectre de lésions distinctes et que, d'autre part, une hétérogénéité génétique existe en intra-tumoral (IMPC). Ce travail a également permis d'affiner les caractéristiques moléculaires de ces carcinomes mammaires, mettant en lumière leur hétérogénéité biologique et leur évolution biologique. Préciser la connaissance fine de la biologie des types rares de carcinomes mammaires devrait améliorer la prise en charge clinique des patientes, soit en développant des thérapies spécifiques du sous-type, soit en proposant une désescalade thérapeutique.

Nous avons pu montrer que les carcinomes infiltrants de type lobulaire, qui présentent un profil génomique complexe, sont spécifiquement caractérisés par deux

régions génomiques de perte (13q21.33–q31.3 et 22q11.23–q12.1), trouvées dans environ 50% des cas analysés. Dans ces régions, sont localisés des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'adhésion cellulaire (*KLF5*, *CYTSA*), dont la perte d'expression peut être corrélée à un mauvais pronostic et à la présence de métastases (Kwak MK *et al*, 2008). Par ailleurs, nous avons observé une amplification du gène *CCND1* (région chromosomique 11q13.2) dans environ 25% de ces tumeurs. Cette amplification est corrélée avec la surexpression de la protéine Cycline D1 ($p\text{-val}=5\times 10^{-4}$).

Ces anomalies récurrentes ouvrent de nouvelles et d'encourageantes voies de thérapies ciblées, surtout lorsque l'on sait que ces tumeurs sont souvent accompagnées de métastases viscérales et que le pronostic à 10 ans n'est alors que d'environ 50%. On pourrait proposer de traiter ces patientes avec, par exemple, des inhibiteurs de l'hydrolase EglN2, dont la cible contrôle la carcinogénèse mammaire via son interaction avec la cycline D1, ou des inhibiteurs de LOXL2, dont la surexpression peut altérer l'expression et/ou la localisation subcellulaire d'autres protéines de la polarité, comme PAR-3, la claudine 1, la E-cadhérine ou LGL-2, et induire la formation de métastases. A l'heure actuelle, et dans la majorité des cas, ces tumeurs, moins sensibles à la chimiothérapie que les IC-NST, sont le plus souvent traitées par une hormonothérapie adjuvante.

Nous avons également identifiée une région fréquemment amplifiée dans les IMPC, localisée en 17q22–q23.3 qui contient de nouvelles cibles thérapeutiques éventuelles, comme *TLK2* ou *PPM1D*. Neutraliser la protéine PPM1D semble être très intéressant, car on peut imaginer qu'elle pourrait inhiber la résistance à l'anoïkis engendrée par l'inactivation de la MAPK p38 α via la surexpression PPM1D (Bulavin DV *et al*, 2002). Cibler et neutraliser la protéine LIN7A, puissant perturbateur de la polarité apico-basale, pourrait être également une cible de choix, car une grande majorité des IMPC (68% des cas dans notre étude) surexprime cette protéine.

3- Perspectives

L'analyse intégrée morphologique, génétique et transcriptomique doit naturellement être poursuivie avec la description approfondie d'autres entités rares de cancers du sein tels les carcinomes mucineux et lobulaires avec surexpression/amplification de ERBB2 ou les carcinomes lobulaires triple négatifs. Mieux comprendre comment les changements de polarité induisent la plasticité morphologique, c'est améliorer la compréhension des mécanismes qui induisent l'invasion et la formation des métastases. Les progrès attendus pour la prise en charge des cancers du sein seront ainsi, d'une part, une amélioration de la prévention de l'apparition des métastases des

tumeurs du sein et d'autre part, la mise au point de thérapeutiques plus efficaces sur les cellules tumorales avec le moins d'effets secondaires sur les cellules normales. Ces progrès passent par l'analyse biologique détaillée de toutes les formes de carcinomes mammaires, intégrant les différentes approches développées au cours de notre travail, morphologiques, phénotypiques/protéiques, transcriptomiques et génomiques. L'utilisation de modèles intégrant l'analyse de lignées cellulaires ainsi que des modèles murins (souris transgéniques) est indispensable pour affiner la compréhension de la carcinogenèse de ces maladies complexes, multigéniques et multifactorielles.

Autres publications au cours de ma thèse

- Mahmood SF*, **Gruel N***, Chapeaublanc E, Lescure A, Jones T, Reyat F, Vincent-Salomon A, Raynal V, Pierron G, Perez F, Camonis J, Del Nery E, Delattre O, Radvanyi F, Bernard-Pierrot I. A siRNA screen identifies *RAD21*, *EIF3H*, *CHRA1* and *TANC2* as new driver genes within the 8q23, 8q24.3 and 17q23 amplicons in breast cancer with an impact on cell growth, survival and transformation. *Carcinogenesis*. Soumis
- Vincent-Salomon A, Benhamo V, Gravier E, Rigauill G, **Gruel N**, Robin S, de Rycke Y, Mariani O, Pierron G, Gentien D, Reyat F, Cottu P, Fourquet A, Rouzier R, Sastre-Garau X, Delattre O. Genomic instability: a stronger prognostic marker than proliferation for early stage luminal breast carcinomas. *PlosOne*. En révision
- Mahmood SF, **Gruel N***, Nicolle R*, Chapeaublanc E, Radvanyi F, Bernard-Pierrot I. (2013) *PPAPDC1B* and *WHSC1L1* are common drivers of the 8p11-12 amplicon, not only in breast tumors, but also in pancreatic adenocarcinoma and lung tumors. *Am J Pathol*. En révision
- Molina A, Velot L, Ghouinem L, Abdelkarim M, Bouchet BP, Luissint A-C, Bouhlel I, Morel M, Sapharikas E, di Tommaso A, Honore S, Braguer D, **Gruel N**, Vincent-Salomon A, Delattre O, Sigal-Zafrani B, Andre F, Terris B, Akhmanova A, Di Benedetto M, Nahmias C, Rodrigues-Ferreira S. (2013) ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res*. **73 (9)**: 2905-2915.
- Vincent-Salomon A, Hajage D, Rouquette A, Cedenot A, **Gruel N**, Alran S, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Fourquet A, Kirova Y. (2012) High Ki67 expression is a risk marker of invasive relapse for classical lobular carcinoma *in situ* patients. *The Breast*. **21**: 380-383.
- Gravier E, Pierron G, Vincent-Salomon A, **Gruel N**, Savignoni A, De Rycke Y, Pierga J-Y, Lucchesi C, Reyat F, Fourquet A, Roman-Roman S, Radvanyi F, Sastre-Garau X, Asselain B, Delattre O. (2010) A prognostic DNA signature for T1T2 node-negative breast cancer patients. *Genes, Chrom, Cancer*. **49**: 1125-1134.
- Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Dimitrov A, Cazaubon S, **Gruel N**, Colasson H, Nicolas A, Chaverot N, Molinié V, Reyat F, Sigal-Zafrani B, Terris B, Delattre O, Radvanyi F, Perrez F, Vincent-Salomon A, Nahmias C. (2009) 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One*. **4 (10)**: e7239-e7250.
- Manié E, Vincent-Salomon A, Lehmann-Che J, Pierron G, Turpin E, Warcoin M, **Gruel N**, Lebigot I, Sastre-Garau X, Lidereau R, Remenieras A, Feunteun J, Delattre O, de Thé H, Stoppa-Lyonnet D, Stern M-H. (2009) High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer Res*. **69 (2)**: 663-672.

Références bibliographiques

- Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Lee AH, Reis-Filho JS, Ellis IO. (2007) High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma *in situ* with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. *Am J Surg Pathol.* **31 (3)**: 417-426.
- Acs G, Lawton TJ, Rebbeck TR, LiVolsi VA, Zhang PJ. (2001) Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *Am J Clin Pathol.* **115 (1)**: 85-98.
- Adriance MC, Inman JL, Petersen OX, Bissel MJ. (2005) Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res.* **7 (5)**: 190-197.
- Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A. (2007) The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene.* **26 (49)**: 6979-6988.
- Akhtar N, Streuli CH. (2013) An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol.* **15 (1)**: 17-27.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100 (7)**: 3983-3988.
- Allred DC, Wu Y, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, Perou CM, Mohsin SK, O'Connell P, Tsimelzon A, Medina D. (2008) Ductal carcinoma *in situ* and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res.* **14 (2)**: 370-378.
- Altucci L, Addeo R, Cicatiello L Bifulco M, Laezza C, Salzano S, Sica V, Bresciani F, Weisz A. (1996) 17beta-oestradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene.* **12**: 2315-2324.
- Aranda V, Haire T, Nolan ME, Calarco JP, Rosenberg AZ, Fawcett JP, Pawson T, Muthuswamy SK. (2006) Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol.* **8 (11)**: 1235-1245.
- Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. (2004) Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* **6 (3)**: R149-56.
- Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, Lindeman GJ, Visvader JE. (2007) Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol.* **9 (2)**: 201-209.
- Banales JM, Munoz-Garrido P, Bujanda L. (2013) Somatic second-hit mutations leads to polycystic liver diseases. *World J Gastroenterol.* **19 (1)**: 141-143.
- Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, Lawrence MS, Sivachenko AY, Sougnez C, Zou L, Cortes ML, Fernandez-Lopez JC, Peng S, Ardlie KG, Auclair D, Bautista-Piña V, Duke F, Francis J, Jung J, Maffuz-Aziz A, Onofrio RC, Parkin M, Pho NH, Quintanar-Jurado V, Ramos AH, Rebollar-Vega R, Rodriguez-Cuevas S, Romero-Cordoba SL, Schumacher SE, Stransky N, Thompson KM, Uribe-Figueroa L, Baselga J, Beroukhi R, Polyak K, Sgroi DC, Richardson AL, Jimenez-Sanchez G, Lander ES, Gabriel SB, Garraway LA, Golub TR, Melendez-Zajgla J, Toker A, Getz G, Hidalgo-Miranda A, Meyerson M. (2012) Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature.* **486 (7403)**: 405-409.
- Banneau G, Guedj M, MacGrogan G, de Mascarel I, Velasco V, Schiappa R, Bonadona V, David A, Dugast C, Gilbert-Dussardier B, Ingster O, Vabres P, Caux F, de Reynies A, Iggo R, Sevenet N, Bonnet F, Longy M. (2010) Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations. *Breast Cancer Res.* **12 (4)**: R63.
- Barker HE, Chang J, Cox TR, Lang G, Bird D, Nicolau M, Evans HR, Gartland A, Erler JT. (2011) LOXL2-mediated matrix remodelling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res.* **71**: 1561-1572
- Baselga J, Norton L. (2002) Focus on breast cancer. *Cancer Cell.* **1 (4)**: 319-322.
- Bazellieres E, Assemet E, Arsanto JP, Le Bivic A, Massey-Harroche D. (2009) Crumbs protein in epithelial morphogenesis. *Front Biosci.* **14**: 2149-2169.

- Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H. (1994) E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* **54 (14)**: 3845-3852.
- Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sørbye T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, Tibshirani R, Børresen-Dale AL, Pollack JR. (2006) Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* **45 (11)**: 1033-1040.
- Bergmann C, von Bothmer J, Ortiz Brüche N, Venghaus A, Frank V, Fehrenbach H, Hampel T, Pape L, Buske A, Jonsson J, Sarioglu N, Santos A, Ferreira JC, Becker JU, Cremer R, Hoefele J, Benz MR, Weber LT, Buettner R, Zerres K. (2011) Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* **22 (11)**: 2047-2056.
- Bernard-Pierrot I, Gruel N, Stransky N, Vincent-Salomon A, Reyat F, Raynal V, Vallot C, Pierron G, Radvanyi F, Delattre O. (2008) Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* **68 (17)**: 7165-7175.
- Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, Eisinger F, Adelaïde J, Tagett R, Loriod B, Giaconia A, Benziane A, Devilard E, Jacquemier J, Viens P, Nguyen C, Birnbaum D, Houlgatte R. (2002) Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Hum Mol Genet.* **11 (8)**: 863-72.
- Bertucci F, Orsetti B, Nègre V, Finetti P, Rougé C, Ahomadegbe JC, Bibeau F, Mathieu MC, Treilleux I, Jacquemier J, Ursule L, Martinec A, Wang Q, Bénard J, Puisieux A, Birnbaum D, Theillet C. (2008) Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. *Oncogene.* **27 (40)**: 5359-5372.
- Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. (1995) E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.* **14**: 6107-6115.
- Bilder D, Perrimon N. (2000a) Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature.* **403 (6770)**: 676-680.
- Bilder D, Li M, Perrimon N. (2000b) Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science.* **289**: 113-116.
- Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, Lee AH, Macmillan RD, Morgan DA, Robertson JF, Mitchell MJ, Ball GR, Haybittle JL, Elston CW. (2007) Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham prognostic index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer.* **43**:1548-1555.
- Brennan K, Offiah G, McSherry EA, Hopkins AM. (2009) Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J Biomed Biotechnol.* **2010**: 1-16.
- Briskin C. (2002) Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **7 (1)**: 39-48.
- Brumby A, Secombe J, Horsfield J, Coombe M, Amin N, Coates D, Saint R, Richardson H. (2004) A genetic screen for dominant modifiers of a cyclin E hypomorphic mutation identifies novel regulators of S-phase entry in *Drosophila*. *Genetics.* **168**: 227-251.
- Bryant DM, Mostov KE. (2008) From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9 (11)**: 887-901.
- Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, Kallioniemi A, Fornace Jr AJ, Appella E. (2002) Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet.* **31**: 210-215.
- Bulgakova NA, Knust E. (2009) The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci.* **122 (Pt 15)**: 2587-2596.
- Buttitta F, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Paolizzi D, Fresu G, Salvatore S, Cuccurullo F, Mezzetti A, Campani D, Marchetti A. (2006) PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *J Pathol.* **208 (3)**: 350-855.
- Cancer Genome Atlas Network. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* **490 (7418)**: 61-70.

- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* **295** (21): 2492-2502.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. (2007) The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* **13** (8): 2329-2334.
- Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, Eeckhoutte J, Shao W, Hestermann EV, Geistlinger TR, Fox EA, Silver PA, Brown M. (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell.* **122** (1): 33-43.
- Castellane B, Escuin D, Pérez-Olabarria M, Vasquez T, Munoz J, Peiro G, Barnadas A, Lerma E. (2012) Genetic up-regulation and overexpression of PLEKHA7 differentiates invasive lobular carcinomas from invasive ductal carcinomas. *Human Pathol.* **43** (11): 1902-1909.
- Cavatorta AL, Fumero G, Chouhy D, Aguirre R, Nocito AL, Giri AA, Banks L, Gardiol D. (2004) Differential expression of the human homologue of drosophila discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int J Cancer.* **111** (3): 373-380.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. (2010) Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res.* **16** (1): 45-55.
- Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* **101** (10): 736-750.
- Chen AC, Paulino AC, Schwartz MR, Rodriguez AA, bass BL, Chang JC, The BS. (2012) Prognostic markers for invasive micropapillary carcinoma of the breast: a population-based analysis. *Clin Cancer Res.* **13** (2): 133-139.
- Chen X, Macara IG. (2005) Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol.* **7** (3): 262-269.
- Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, Lapuk A, Neve RM, Qian Z, Ryder T, Chen F, Feiler H, Tokuyasu T, Kingsley C, Dairkee S, Meng Z, Chew K, Pinkel D, Jain A, Ljung BM, Esserman L, Albertson DG, Waldman FM, Gray JW. (2006) Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell.* **10** (6): 529-541.
- Chin SF, Wang Y, Thorne NP, Teschendorff AE, Pinder SE, Vias M, Naderi A, Roberts I, Barbosa-Morais NL, Garcia MJ, Iyer NG, Kranjac T, Robertson JF, Aparicio S, Tavaré S, Ellis I, Brenton JD, Caldas C. (2007a) Using array-comparative genomic hybridization to define molecular portraits of primary breast cancers. *Oncogene.* **26** (13): 1959-1970.
- Chin SF, Teschendorff AE, Marioni JC, Wang Y, Barbosa-Morais NL, Thorne NP, Costa JL, Pinder SE, van de Wiel MA, Green AR, Ellis IO, Porter PL, Tavaré S, Brenton JD, Ylstra B, Caldas C. (2007b) High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol.* **8** (10): R215.
- Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, Fourme E, Lidereau R, Bièche I. (2012) PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res.* **14** (1): R28.
- Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC. (2009) Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106** (33): 13820-13825.
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S; METABRIC Group, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* **486** (7403): 346-352.
- Dabbs DJ, Kaplai M, Chivukula M, Kanbour A, Kanbour-Shakir A, Carter GJ. (2007) The spectrum of morphomolecular abnormalities of the E-cadherin/catenin complex in pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* **15** (3): 260-266.

- Davila S, Furu L, Gharavi AG, Tian X, Onoe T, Qian Q, Li A, Cai Y, Kamath PS, King BF, Azurmendi PJ, Tahvanainen P, Kääriäinen H, Höckerstedt K, Devuyst O, Pirson Y, Martin RS, Lifton RP, Tahvanainen E, Tores VE, Somlo S. (2004) Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Gen.* **36**: 575–577.
- Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS. (2002) The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell.* **111**: 29–40.
- Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. (2003) Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods.* **30** (3): 256–268.
- De Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Fourquet A, Soussi T. (1999) p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* **91**: 641–643.
- Deugnier M-A, Teulière J, Faraldo MM, Thierry J-P, Glukhova MA. (2002) The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res.* **4** (6): 224–230.
- Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris C, Mc Lellan MD, Fulton RS, Fulton LL, Abbott RM, Hoog J, Dooling DJ, Kobold DC, Schmidt H, Kalicki J, Zhang Q, Chen L, Lin L, Wendl MC, McMichael JF, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Appelbaum E, De Schryver K, Davies S, Dukes T, Sanderson GE, Pohl CS, Delehaunty KD, Fronick CC, Pape KA, Ree JS, Robinson JS, Hodges JS, Schierding W, Dees ND, Shen D, Locke DP, Wiechert ME, Eldred JM, Peck JB, Oberkfell BJ, Lolofie JT, Du F, Hawkins AE, O'Laughlin MD, Bernard KE, Cunningham M, Elliott G, Mason MD, Thompson Jr. DM, Goodfellow J, Perou CM, Weinstock GM, Aft R, Watson M, Ley TJ, Wilson RK, Mardis ER. (2010) Genome remodeling in a Basal-like Breast Cancer Metastasis and xenograft. *Nature.* **464** (7291): 999–1005.
- Djonov V, Hogger K, Sedlacek R, Laissue J, Draeger A. (2001) MMP-19: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours. *J Pathol.* **195**: 147–155.
- Dörfel MJ, Huber O. (2011) Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol.* **2012**: 1–14.
- Dormoy V, Tormanen K, Sütterlin C. (2013) Par6γ is at the mother centriole and controls centrosomal protein composition through a Par6α-dependent pathway. *J Cell Sci.* **126** (Pt3): 860–870.
- Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. (2001) Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer.* **92**: 404–408.
- Du GS, Wang JM, Lu JX, Li Q, Ma CQ, Du JT, Zou SQ. (2009) Expression of P-aPKC-ι, E-cadherin, and β-catenin related to invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* **16** (6): 1578–1586.
- Durgan J, Kaji N, Jin D, Hall A. (2011) Par6B and atypical PKC regulate mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *J Biol Chem.* **286** (14): 12461–12474.
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D. (2001) The cell polarity protein ASIP/Par-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J.* **20** (14): 3738–3748.
- Ebnet K. (2008) Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem Cell Biol.* **130** (1): 1–20.
- Ellenbroek SI, Iden S, Collard JG. (2012) Cell polarity proteins and cancer. *Semin Cancer Biol.* **22** (3): 208–215.
- Elston C, Ellis I. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* **19**: 403–410.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* **92**: 564–569.
- Etienne-Manneville S. (2008) Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene.* **27** (55): 6970–6980.
- Etzell JE, Devries S, Chew K, Florendo C, Molinaro A, Ljung BM, Waldman FM. (2001) Loss of chromosome 16q in lobular carcinoma *in situ*. *Hum Pathol.* **32**: 292–296.
- Farkas AE, Capaldo CT, Nusrat A. (2012) Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins. *NY Acad Sci.* **1258**: 115–124.
- Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, Macgrogan G, Bergh J, Cameron D, Goldstein D, Duss S, Nicoulaz AL, Briskin C, Fiche M, Delorenzi M, Iggo R. (2005) Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene.* **24** (29): 4660–4671.

- Fei M, Zhao Y, Wang Y, Lu M, Cheng C, Huang X, Zhang D, Lu J, He S, Shen A. (2009) Low expression of Foxo3a is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Cancer Invest.* **27 (1)**: 52-59.
- Feigin ME, Muthuswamy SK. (2009) Polarity proteins regulate mammalian cell-cell junctions and cancer pathogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **21 (5)**: 694-700.
- Ferlicot S, Vincent-Salomon A, Médioni J, Genin P, Rosty C, Sigal-Zafrani B, Fréneaux P, Jouve M, Thiery JP, Sastre-Garau X. (2004) Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Cancer.* **40 (3)**: 336-341.
- Fogg VC, Liu C-J, Margolis B. (2005) Multiple regions of Crumbs 3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J Cell Sci.* **118 (13)**: 1859-1869.
- Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, Naghavi M. (2011) Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010 : a systematic analysis. *Lancet.* **378 (9801)**: 1461-1484.
- Foulkes WD. (2007) Clinically relevant biology of hereditary breast cancer. *Semin Oncol.* **34**: 379-383.
- Frisch SM, Screaton RA. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* **13 (5)**: 555-562.
- Frisch SM, Schaller M, Cieply B. (2013) Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci.* **126**: 21-29.
- Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF. (2012) Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *J Cell Biol.* **197 (6)**: 697-709.
- Gardioli D, Zacchi A, Petrera F, Stanta G, Banks L. (2006) Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int J Cancer.* **119 (6)**: 1285-1290.
- Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z. (2002) Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* **14**: 537-545.
- Gilmore AP. (2005) Anoikis. *Cell Death Differ.* **12 (2)**: 1473-1477.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* **1 (5)**: 555-567.
- Giricz O, Reynolds PA, Ramnauth A, Liu C, Wang T, Stead L, Childs G, Rohan T, Shapiro N, Fineberg S, Kenny PA, Loudig O. (2012) Hsa-miR-375 is differentially expressed during breast lobular neoplasia and promotes loss of mammary acinar polarity. *J Pathol.* **226 (1)**: 108-119.
- Glukhova M, Kotliansky V, Sastre-Gateau X, Thiery J-P. (1995) Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *Am J Pathol.* **146** : 706-716.
- Grifoni D, Garoia F, Schimanski CC, Schmitz G, Laurenti E, Galle PR, Pession A, Cavicchi S, Strand D. (2004) The human protein Hurler-1 substitutes for Drosophila lethal giant larvae tumour suppressor function *in vivo*. *Oncogene.* **23 (53)**: 8688-8694.
- Grifoni D, Garoia F, Bellosta P, Parisi F, De Biase D, Collina G, Strand D, Cavicchi S, Pession A. (2007) aPKC ζ cortical loading is associated with Lgl cytoplasmic release and tumor growth in Drosophila and human epithelia. *Oncogene.* **26 (40)**: 5960-5965.
- Gudjonsson T, Rønnov-Jessen L, Villadsen R, Rank F, Bissell MJ, Petersen OW. (2002) Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci.* **115 (Pt 1)**: 39-50.
- Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. (2005) Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **10 (3)**: 261-272.
- Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, MacGrogan G, Lerebours F, Finetti P, Longy M, Bertheau P, Bertrand F, Bonnet F, Martin AL, Feugeas JP, Bièche I, Lehmann-Che J, Lidereau R, Birnbaum D, Bertucci F, de Thé H, Theillet C. (2012) A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene.* **31 (9)**: 1196-1206.
- Guérin S, Hill C. (2010) Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA. *Bull Cancer.* **97 (1)**: 47-54.
- Haibe-Kains B, Desmedt C, Loi S, Culhane AC, Bontempi G, Quackenbush J and Sotiriou C. (2012). A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst.* **104 (4)**: 311-325.
- Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Iluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden

- LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB. (2009) Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* **69 (10)**: 4116-4124.
- Hill C. (2003) Breast cancer screening after age 70. *Bull Cancer.* **90 (12)**: 1035-1037.
- Hinck L, Silberstein GB. (2005) Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res.* **7 (6)**: 245-251.
- Ho L, Crabtree GR. (2008) An EZ mark to miss. *Cell Stem Cell.* **3 (6)**: 577-578.
- Horikoshi Y, Suzuki A, Yamanaka T, Sasaki K, Mizuno K, Sawada H, Yonemura S, Ohno S. (2009) Interaction between PAR-3 and the a PKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J of Cell Sci.* **122 (10)**: 1595-1606.
- Horne-Badovinac S, Bilder D. (2008). Dynein regulates epithelial polarity and the apical localization of stardust A mRNA. *PLoS Genet.* **4**: e8.
- Howard B, Ashworth A. (2006) Signalling pathways implicated in early mammary gland morphogenesis and breast cancer. *PLoS Genet.* **2 (8)**: e112, 1121-1130.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, tretiakova M, Orrico AR, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM. (2006) The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarrays platforms. *BMC genomics.* **7**: 96.
- Huang L, Muthuswamy SK. (2010) Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators. *Curr Opin Genet Dev.* **20 (1)**: 41-50.
- Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C. (2009) Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* **27**: 1168-1176.
- Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S. (2001) Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer. *BMC Cancer.* **1**: 16.
- Humbert PO, Grzeschik NA, Brumby AM, Galea R, Elsum I, Richardson HE. (2008) Control of tumorigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene.* **27 (55)**: 6888-6907.
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. (2003) Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol.* **5 (2)**: 137-142.
- Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, Mandai K, Ishizaki H, Tanaka M, Togawa A, Takahashi K, Nishioka H, Yoshida H, Mizoguchi A, Nishikawa S, Takai Y. (1999) Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J Cell Biol.* **146 (5)**: 1117-1132.
- Imhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, Birchmeier W. (1983) Cell-cell interaction and polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell.* **35**: 667-675.
- Jackson-Fisher AJ, Bellinger G, Ramabhadran R, Morris JK, Lee K-F, Stern DF. (2004) ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101 (49)**: 17138-17143.
- Jaffe AB, Kaji N, Durgan J, Hall A. (2008) Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol.* **183 (4)**: 625-633.
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene.* **27 (55)**: 6920-6929.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* **59**: 225-249.
- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. (2000) The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol.* **2**: 531-539.
- Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, Dexter T, Davies S, Bulmer K, Ford E, Parry S, Budroni M, Palmieri G, Munro Neville A, O'Hare MJ, Lakhani SR. (2004) Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res.* **64**: 3037-3045.
- Kao J, Pollack JR. (2006) RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes Chromosomes Cancer.* **45 (8)**: 761-769.

- Karp CM, Tan TT, Mathew R, Nelson D, Mukherjee C, Degenhardt K, Karantza-Wadsworth V, White E. (2008) Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer Res.* **68 (11)**: 4105-4115.
- Katz A. (2005) Does neoadjuvant/adjuvant chemotherapy change the natural history of classic invasive lobular carcinoma? *J Clin Oncol.* **23 (27)**: 6796.
- Kaur JS. (2000) Migration patterns and breast carcinoma. *Cancer.* **88 (5)**: 1203-1206.
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang M-C H, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. (2010) Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* **28 (20)**: 3271-3277.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ. (2007) The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol.* **1 (1)**: 84-96.
- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. (2001) Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* **2 (3)**:133-140.
- Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ. (2008) Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology.* **53 (1)**: 48-55.
- Kim YN, Koo KH, Sung JY, Yun UJ, Kim H. (2012) Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol.* **2012**: 1-11.
- Kitzing TM, Wang Y, Pertz O, Copeland JW, Grosse R. (2010) Formin-like 2 drives amoeboid invasive cell motility downstream of RhoC. *Oncogene.* **29 (16)**: 2441-2448.
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100 (20)**: 11606-11611.
- Kojima Y, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Shirai S, Chishima T, Ichikawa Y, Ishikawa T, Sasaki T, Kubota Y, Inayama Y, Aoki I, Ohno S, Shimada H. (2008) The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Hum Pathol.* **39 (6)**: 824-831.
- Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. (2003) 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.* **22 (13)**: 2021-2033.
- Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. (2006) Gata-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell.* **127 (5)**: 1041-1055.
- Kuphal S, Wallner S, Schimanski CC, Bataille F, Hofer P, Strand S, Strand D, Bosserhoff AK. (2006) Expression of HUGL-1 is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene.* **25 (1)**: 103-110.
- Kuroda H, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S. (2004) Overexpression of Her2/neu, estrogen and progesterone receptors in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Breast Cancer.* **11 (3)**: 301-306.
- Kwak MK, Lee HJ, Hur K, Park J, Lee HS, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Guilford P, Yang HK. (2008) Expression of Kruppel-like factor 5 in human gastric carcinomas. *J Can Res Clin Oncol.* **134**: 163-167.
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. (eds): WHO Classification of tumours of the breast. 4ème edition: IARC. 2012.
- Lamovec J, Bracko M. (1991) Metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma of the breast: an autopsy study. *J Surg Oncol.* **48 (1)**: 28-33.
- Langzam L, Koren R, Gal R, Kugel V, Paz A, Farkas A, Sampson SR. (2001) Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *Am J Clin Pathol.* **116 (3)**: 377-385.
- Lang S, Benedix J, Fedeles SV, Schorr S, Schirra C, Schäuble N, Jalal C, Greiner M, Hassdenteufel S, Tatzelt J, Kreutzer B, Edelmann L, Krause E, Rettig J, Somlo S, Zimmermann R, Dudek J. (2012) Different effects of Sec61α, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci.* **125 (Pt 8)**: 1958-1969.
- Lanigan F, O'Connor D, Martin F, Gallagher WM. (2007) Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci.* **64 (24)**: 3159-3184.

- Laprise P, Viel A, Rivard N. (2004) Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* **279 (11)**: 10157-10166.
- La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, Bertuccio P, Negri E, Boyle P, Levi F. (2010) Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Int. J. Cancer.* **127 (1)**: 160-171.
- Li CI, Malone KE, Porter PL, Weiss NS, Tang MT, Daling JR. (2003) Reproductive and anthropometric factors in relation to the risk of lobular and ductal breast carcinoma among women 65-79 years of age. *Int J Cancer.* **107 (4)**: 647-651.
- Li W, Liu F, Lei T, Xu X, Liu B, Cui L, Wei J, Guo X, Lang R, Fan Y, Gu F, Tang P, Zhang X, Fu L. (2010) The clinicopathological significance of CD44+/CD24-/low and CD24+ tumor cells in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract.* **206 (12)**: 828-834.
- Li YS, Kaneko M, Sakamoto DG, Takeshima Y, Inai K. (2006) The reversed apical pattern of MUC1 expression is characteristic of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Breast Cancer.* **13**: 58-63.
- Li Z, Wang L, Hays TS, Cai Y. (2008) Dynein-mediated apical localization of crumbs transcripts is required for Crumbs activity in epithelial polarity. *J. Cell Biol.* **180**: 31-38.
- Lisovsky M, Dresser K, Baker S, Fisher A, Woda B, Banner B, Lauwers GY. (2009) Cell polarity protein Lgl2 is lost or aberrantly localized in gastric dysplasia and adenocarcinoma: an immunohistochemical study. *Mod Pathol.* **22 (7)**: 977-984.
- Loo LW, Grove DI, Williams EM, Neal CL, Cousens LA, Schubert EL, Holcomb IN, Massa HF, Glogovac J, Li CI, Malone KE, Daling JR, Delrow JJ, Trask BJ, Hsu L, Porter PL. (2004) Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. *Cancer Res.* **64**: 8541-8549.
- Lüttner N, De-Castro Arce J, Rösl F. (2012) Gene expression of the tumour suppressor LKB1 is mediated by Sp1, NF-Y and FOXO transcription factors. *PLoS One.* **7 (3)**: e32590.
- Macara IG. (2004) Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 220-231.
- Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, Kreike B, Natrajan R, A'Hern R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. (2011) Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *J Natl Cancer Inst.* **103 (8)**: 662-673.
- McMillen BD, Aponte MM, Liu Z, Helenowski IB, Scholtens DM, Buttin BM, Wei JJ. (2012) Expression analysis of MIR182 and its associated target genes in advanced ovarian carcinoma. *Mod Pathol.* **25 (12)**: 1644-1653.
- Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS. (2007) BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell.* **12 (2)**: 221-234.
- Manié E, Vincent-Salomon A, Lehmann-Che J, Pierron G, Turpin E, Warcoin M, Gruel N, Lebigot I, Sastre-Garau X, Lidereau R, Remenieras A, Feunteun J, Delattre O, de Thé H, Stoppa-Lyonnet D, Stern MH. (2009) High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer Res.* **69 (2)**: 663-671.
- Marchiò C, Irvani M, Natrajan R, Lambros MB, Savage K, Tamber N, Fenwick K, Mackay A, Senetta R, Di Palma S, Schmitt FC, Bussolati G, Ellis LO, Ashworth A, Sapino A, Reis-Filho JS. (2008) Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *J Pathol.* **215 (4)**: 398-410.
- Martin-Belmonte F, Mostov K. (2007) Phosphoinositides control epithelial development. *Cell Cycle.* **6 (16)**: 1957-1961.
- Martín-Belmonte F, Yu W, Rodríguez-Fraticelli AE, Ewald AJ, Werb Z, Alonso MA, Mostov K. (2008) Cell-polarity dynamics controls the mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis. *Curr Biol.* **18 (7)**: 507-513.
- Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. (2011) Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer.* **12 (1)**: 23-38.
- Matter K, Balda MS. (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 225-236.
- Médina E, Williams J, Klipfell E, Zarnescu D, Thomas G, Le Bivic A. (2002) Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of Drosophila. *J Cell Biol.* **158 (5)**: 941-951.
- Mehra R, Varambally S, Ding L, Shen R, Sabel MS, Ghosh D, Chinnaiyan AM, Kleet CG. (2005) Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res.* **65 (24)**: 11259-11264.
- Mertens AE, Rygiel TP, Olivo C, van der Kammen R, Collard JG. (2005) The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol.* **170 (7)**: 1029-1037.

- Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, Smith LV, Lobbok MH, Geradts J, Bensen JT, Jackson S, Nyante S, Livasy C, Carey L, Earp HS, Perou CM. (2008) Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **109 (1)**: 123-139.
- Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. (2001) Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res.* **12 (11-12)**: 469-476.
- Morais-de-Sa E, Mirouse V, and St. Johnston D. (2010) aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell.* **141**: 509-523.
- Moreno-Bueno G, Salvador F, Martín A, Floristán A, Cuevas EP, Santos V, Montes A, Morales S, Castilla MA, Rojo-Sebastián A, Martínez A, Hardisson D, Csiszar K, Portillo F, Peinado H, Palacios J, Cano A. (2011) Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol Med.* **3 (9)**: 528-544.
- Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. (2007) Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med.* **20 (2)**: 139-143.
- Muthuswamy SK, Li D, Lelievre S, Bissell MJ, Brugge JS. (2001). ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol.* **3 (9)**: 785-792.
- Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Takizawa S, Matsumoto Y, Tsuruga T, Nakagawa K, Minaguchi T, Oda K, Hiraike-Wada O, Ooishi H, Yasugi T, Taketani Y. (2006) Human homolog of *Drosophila* tumor suppressor Scribble negatively regulates cell-cycle progression from G1 to S phase by localizing at the basolateral membrane in epithelial cells. *Cancer Sci.* **97 (11)**: 1217-1225.
- Naik MU, Naik TU, Suckow AT, Duncan MK, Naik UP. (2008a) Attenuation of junctional adhesion molecule-A is a contributing factor for breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* **68**: 2194-2203.
- Naik UP, Naik MU. (2008b) Putting the brakes on cancer cell migration: JAM-A restrains integrin activation. *Cell Adh Migr.* **2**: 249-251.
- Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Takizawa S, Suzuki Y, Yasugi T, Huijbregtse JM, Taketani Y. (2004) Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br J Cancer.* **90 (1)**: 194-199.
- Nakayama M, Goto TM, Sugimoto M, Nishimura T, Shinagawa T, Ohno S, Amano M, Kaibuchi K. (2008) Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation. *Dev Cell.* **14 (2)**: 205-215.
- Nakano A, Takashima S. (2012) LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes Cells.* **17 (9)**: 737-747.
- Narod SA. (2011) Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* **8 (11)**: 669-676.
- Nassar H, Wallis T, Andea A, Dey J, Adsay V, Visscher D (2001) Clinicopathologic analysis of invasive micropapillary differentiation in breast carcinoma. *Mod Pathol.* **14**: 836-841.
- Nassar H. (2004) Carcinomas with micropapillary morphology: clinical significance and current concepts. *Adv Anat Pathol.* **11**: 297-303.
- Natrajan R, Mackay A, Lambros MB, Weigelt B, Wilkerson PM, Manie E, Grigoriadis A, A'hern R, van der Groep P, Kozarewa I, Popova T, Mariani O, Turajlic S, Furney SJ, Marais R, Rodruigues DN, Flora AC, Wai P, Pawar V, McDade S, Carroll J, Stoppa-Lyonnet D, Green AR, Ellis IO, Swanton C, van Diest P, Delattre O, Lord CJ, Foulkes WD, Vincent-Salomon A, Ashworth A, Henri Stern M, Reis-Filho JS. (2012) A whole-genome massively parallel sequencing analysis of BRCA1 mutant oestrogen receptor-negative and -positive breast cancers. *J Pathol.* **227 (1)**: 29-41.
- Nelson CM, Bissell MJ. (2006) Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**: 287-309.
- Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc, K.D., Ebbert, M, Vickery TL, Davies SR, Snider JE, Stijleman IJ, Reed J, Cheang MCU, Mardis ER, Perou CM, Bernard PS, Ellis MJ. (2010) A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* **16**: 5222-5232.
- Niessen CM. (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* **127 (11)**: 2525-2532.

- Nishimura T, Yamaguchi T, Kato K, Yoshizawa M, Nabeshima Y, Ohno S, Hoshino M, Kaibuchi K. (2005) PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol.* **7 (3)**: 270-277.
- Nishizaki T, Chew K, Chu L, Isola J, Kallioniemi A, Weidner N, Waldman FM. (1997) Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer.* **74**: 513-517.
- Nolan ME, Aranda V, Lee S, Lakshmi B, Basu S, Allred DC, Muthuswamy SK. (2008) The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res.* **68 (20)**: 8201-8209.
- Nourry C, Grant SG, Borg JP. (2003) PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE.* **(179)**: RE7.
- Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White CL 3rd, Sontag E. (2002) Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol.* **158 (5)**: 967-78.
- O'Brien LE, Jou TS, Pollack AL, Zhang Q, Hansen SH, Yurchenco P, Mostov KE. (2001) Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol.* **3 (9)**: 831-838.
- Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T, Hirohashi S. (1994) E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91 (5)**: 1858-1862.
- Ohtani S, Terashima M, Satoh J, Soeta N, Saze Z, Kashimura S, Ohsuka F, Hoshino Y, Kogure M, Gotoh M. (2009) Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival. *Gastric Cancer.* **12 (1)**: 43-51.
- Olsen O, Moore KA, Fukata M, Kazuta T, Trinidad JC, Kauer FW, Streuli M, Misawa H, Burlingame AL, Nicoll RA, Brecht DS. (2005) Neurotransmitter release regulated by a MALS-liprin-alpha presynaptic complex. *J Cell Biol.* **170 (7)**: 1127-1134.
- Osmani N, Vitale N, Borg JP, Etienne-Manneville S. (2006) Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol.* **16 (24)**: 2395-4205.
- Ouyang Z, Zhan W, Dan L. (2010) hScrib, a human homolog of Drosophila neoplastic tumor suppressor, is involved in the progress of endometrial cancer. *Oncol Res.* **18 (11-12)**: 593-599.
- Pagliarini RA, Xu T. (2003) A genetic screen in Drosophila for metastatic behavior. *Science.* **302 (5648)**: 1227-1231.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* **27 (8)**: 1160-1167.
- Paterakos M, Watkin WG, Edgerton SM, Paterakos M, Watkin WG, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Thor AD. (1999) Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. *Hum Pathol.* **30**: 1459-1463.
- Pearson HB, Perez-Mancera PA, Dow LE, Ryan A, Tennstedt P, Bogani D, Elsum I, Greenfield A, Tuveson DA, Simon R, Humbert PO. (2011) SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *J Clin Invest.* **121 (11)**: 4257-4267.
- Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F. (2005) A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* **24 (19)**: 3446-3458.
- Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Perez-Gomez E, Santos V, Mendiola M, de Diego JI, Nistal M, Quintanilla M, Portillo F, Cano A. (2008) Lysyl oxidaselike2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **68**: 4541-4550.
- Perego C, Vanoni C, Massari S, Raimondi A, Pola S, Cattaneo MG, Francolini M, Vicentini LM, Pietrini G. (2002) Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J Cell Sci.* **115 (Pt 16)**: 3331-3340.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffreyk SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lunning PE, Borresen-Dale A-L, Brown PO, Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* **406**: 747-752.
- Peterse JL. (1993) Breast carcinomas with an unexpected inside out growth pattern. Rotation of polarisation associated with angiogenesis. *Pathol Res Pract.* **189**: 780.
- Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* **26**: 2157-2165.

- Pettinato G, Manivel CJ, Panico L, Sparano L, Petrella G. (2004) Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. *Am J Clin Pathol.* **121**: 857-866.
- Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, Holdorf AD, Binns K, Kulkarni S, Pawson T. (2003) A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol.* **5**: 301-308.
- Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. (2004) Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* **51** (1): 55-67.
- Polyak K, Hahn WC. (2006) Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med.* **12** (3): 296-300.
- Polyak K, Kalluri R. (2010) The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2** (11): a003244.
- Popova T, Manié E, Stoppa-Lyonnet D, Rigaiil G, Barillot E, Stern MH. (2009) Genome Alteration Print (GAP) : a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol.* **10** (11): R128.
- Popova T, Manié E, Rieunier G, Caux-Moncoutier V, Tirapo C, Dubois T, Delattre O, Sigal-Zafrani B, Bollet M, Longy M, Houdayer C, Sastre-Garau X, Vincent-Salomon A, Stoppa-Lyonnet D, Stern MH. (2012) Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. *Cancer Res.* **72** (21): 5454-5462.
- Powell CT, Fair WR, Heston WD. (1994) Differential expression of protein kinase C isozyme messenger RNAs in dunning R-3327 rat prostatic tumors. *Cell Growth Differ.* **5** (2): 143-149.
- Prat A, Parker J, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz J, He X, Perou, CM. (2010.) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**: R68.
- Prat A, Perou CM. (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* **5** (1): 5-23.
- Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. (2013) Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal a breast cancer. *J Clin Oncol.* **31** (2): 203-209.
- Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG. (2005) The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol.* **171**: 1061-1071.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, Nicholson RI, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. (2007) Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol.* **25** (30): 4772-4778.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebl V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan P-H, Tse GM, Badve S, Ellis IO. (2010) Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* **12**: 207-218.
- Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alò PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. (2003) Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res.* **9** (7): 2567-2575.
- Ray ME, Yang ZQ, Albertson D, Kleer CG, Washburn JG, Macoska JA, Ethier SP. (2004) Genomic and expression analysis of the 8p11-12 amplicon in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **64** (1): 40-47.
- Regala RP, Weems C, Jamieson L, Koor A, Edell ES, Lohse CM, Fields AP. (2005) Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **65** (19): 8905-8911.
- Rehder D, Iden S, Nasdala I, Wegener J, Meyer Zu Brickwedde MK, Vestweber D, Ebnet K. (2006) junctional adhesion molecule-1 participates in the formation of apico-basal polarity through different domains. *Exp Cell Res.* **312** (17): 3389-3403.
- Reyal F, van Vliet MH, Armstrong NJ, Horlings HM, de Visser KE, Kok M, Teschendorff AE, Mook S, van 't Veer L, Caldas C, Salmon RJ, van de Vijver MJ, Wessels LF. (2008) A comprehensive analysis of prognostic signatures reveals the high predictive capacity of the proliferation, immune response and RNA splicing modules in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **10** (6): R93.
- Robinson DR, Kalyana-Sundaram S, Wu YM, Shankar S, Cao X, Ateeq B, Asangani IA, Iyer M, Maher CA, Grasso CS, Lonigro RJ, Quist M, Siddiqui J, Mehra R, Jing X, Giordano TJ, Sabel MS, Kleer CG, Palanisamy N, Natrajan R, Lambros MB, Reis-Filho JS, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan AM. (2012) Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer. *Nat Med.* **17** (12): 1646-1651.

- Robinson GW. (2007) Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nat Rev Genet.* **8**: 963-972.
- Rodriguez-Fraticelli AE, Vergara-Jauregui S, Eastburn DJ, Datta A, Alonso MA, Mostov K, Martín-Belmonte F. (2010) The Cdc42 GEF Intersectin 2 controls mitotic spindle orientation to form the lumen during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol.* **189** (4): 725-738.
- Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Calero F, Benítez J, Palacios J. (2007) Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. *J Clin Pathol.* **60** (9): 1006-1012.
- Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, Leitch CC, Chapple JP, Munro PM, Fisher S, Tan PL, Phillips HM, Leroux MR, Henderson DJ, Murdoch JN, Copp AJ, Eliot MM, Lupski JR, Kemp DT, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A, Beales PL. (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet.* **37** (10): 1135-1140.
- Rouzier R, Perou C, Symmans W, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess K, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross J, Hortobagyi G, Pusztai, L. (2005) Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* **11**: 5678-5685.
- Runswick SK, O'Hare MJ, Jones L, Streuli CH, Garrod DR. (2001) Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat Cell Biol.* **3**: 823-830.
- Russnes HG, Moen Volla HK, Lingjærde OC, Krasnitz A, Lundin P, Naume B, Sørli T, Borgen E, Rye IH, Langerød A, Chin SF, Teschendorff AE, Stephens PJ, Månér S, Schlichting E, Baumbusch LO, Kåresen R, Stratton MP, Wigler M, Caldas C, Zetterberg A, Hicks J, Borresen-Dale AL. (2010) Genomic architecture characterizes tumor progression patches and fate in breast cancer patients. *Sci transl Med.* **2** (38): 38ra47.
- Russnes HG, Navin N, Hicks J, Borresen-Dale AL. (2011) Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest.* **121** (10): 3810-3818.
- Sarrió D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez-Estévez C, Guo M, Herman JG, Gamallo C, Esteller M, Palacios J. (2003) Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer.* **106**: 208-215.
- Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, Durand JC, Fourquet A, Pouillart P. (1996) Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer.* **77** (1): 113-120.
- Sawyer JK, Harris NJ, Slep KC, Gaul U, Peifer M. (2009) The Drosophila afadin homologue Canoe regulates linkage of the actin cytoskeleton to adherens junctions during apical constriction. *J Cell Biol.* **186** (1): 57-73.
- Schimanski CC, Schmitz G, Kashyap A, Bosserhoff AK, Bataille F, Schäfer SC, Lehr HA, Berger MR, Galle PR, Strand S, Strand D. (2005) Reduced expression of Hg1-1, the human homologue of Drosophila tumour suppressor gene lgl, contributes to progression of colorectal cancer. *Oncogene.* **24** (19): 3100-3109.
- Schmoranz J, Fawcett JP, Segura M, Tan S, Vallee RB, Pawson T, Gundersen GG. (2009) Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation in migrating cells. *Curr Biol.* **19** (13): 1065-1074.
- Schlüter MA, Pfarr CS, Pieczynski J, Whiteman EL, Hurd TW, Fan S, Liu C-J, Margolis B. (2009) Trafficking of Crumbs 3 during cytokinesis is crucial for lumen formation. *Mol Biol Cell.* **20**: 4652-4663.
- Séradour B, Allemand H, Weill A, Ricordeau P. (2009) Changes by age in breast cancer incidence, mammography screening and hormone therapy use in France from 2000 to 2006. *Bull Cancer.* **96** (4): E1-E6.
- Shah SP, Morin RD, Khattria J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, Delaney A, Gelmon K, Guliany R, Senz J, Steidl C, Holt RA, Jones S, Sun M, Leung G, Moore R, Severson T, Taylor GA, Teschendorff AE, Tse K, Turashvili G, Varhol R, Warren RL, Watson P, Zhao Y, Caldas C, Huntsman D, Hirst M, Marra MA, Aparicio S. (2009) Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature.* **461** (7265): 809-813.
- Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G, Bashashati A, Prentice LM, Khattria J, Burleigh A, Yap D, Bernard V, McPherson A, Shumansky K, Crisan A, Giuliany R, Heravi-Moussavi A, Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, Dhalla N, Zeng T, Ma K, Chan SK, Griffith M, Moradian A, Cheng SW, Morin GB, Watson P, Gelmon K, Chia S, Chin SF, Curtis C, Rueda OM, Pharoah PD, Damaraju S, Mackey J, Hoon K, Harkins T, Tadigotla V, Sigaroudinia M, Gascard P, Tlsty T, Costello JF, Meyer IM, Eaves CJ, Wasserman WW, Jones S, Huntsman D, Hirst M, Caldas C, Marra MA, Aparicio S.

- (2012) The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple_negative breast cancers. *Nature*. **486 (7403)**: 395-399.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B. (2006) Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **22**: 207-235.
- Siegel R, De Santis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedel S, Lin C, Leach C, Spillers Cannady R, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. (2012) Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. **62 (4)**: 220-241.
- Simonetti S, Terracciano L, Zlobec I, Kilic E, Stasio L, Quarto M, Pettinato G, Insabato L. (2012) Immunophenotyping analysis in invasive micropapillary carcinoma of the breast: role of CD24 and CD44 isoforms expression. *Breast*. **21 (2)**: 165-170.
- Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. (2008) Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Letters*. **272** : 177-185.
- Simpson PT, Reis-Filho JS, Lambros MB, Jones C, Steele D, Mackay A, Irvani M, Fenwick K, Dexter T, Jones A, Reid L, Da Silva L, Shin SJ, Hardisson D, Ashworth A, Schmitt FC, Palacios J, Lakhani SR. (2008) Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. *J Pathol*. **215 (3)**: 231-244.
- Singh AB, Sharma A, Dhawan P. (2012) Claudin-1 expression confers resistance to anoikis in colon cancer cells in a Src-dependent manner. *Carcinogenesis*. **33 (12)**: 2538-2547.
- Smalley M, Ashworth A. (2003) Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*. **3 (11)**: 832-844.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matesse JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale A-L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98(19)**: 10869-10874.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale A-L, Botstein D. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100 (14)**: 8418-8423.
- Sorlie T. (2004) Molecular portraits of breast cancer: tumor subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. **40(18)**: 2667-2675.
- Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Borresen-Dale A-L. (2006) Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. **7**: 127.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100 (18)**: 10393-10398.
- Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC. (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*. **50 (18)**: 6075-6086.
- Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T. (2008) The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res*. **68 (2)**: 537-544.
- Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Mudie LJ, Greenman CD, Jia M, Latimer C, Teague JW, Lau KW, Burton J, Quail MA, Swerdlow H, Churcher C, Natrajan R, Sieuwerts AM, Martens JW, Silver DP, Langerød A, Russnes HE, Foekens JA, Reis-Filho JS, van 't Veer L, Richardson AL, Børresen-Dale AL, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. (2009) Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. **462 (7276)**: 1005-1010.
- Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, Nik-Zainal S, Martin S, Varela I, Bignell GR, Yates LR, Papaemmanuil E, Beare D, Butler A, Cheverton A, Gamble J, Hinton J, Jia M, Jayakumar A, Jones D, Latimer C, Lau KW, McLaren S, McBride DJ, Menzies A, Mudie L, Raine K, Rad R, Chapman MS, Teague J, Easton D, Langerød A; Oslo Breast Cancer Consortium (OSBREAC), Lee MT, Shen CY, Tee BT, Huimin BW, Broeks A, Vargas AC, Turashvili G, Martens J, Fatima A, Miron P, Chin SF, Thomas G, Boyault S, Mariani O, Lakhani SR, van de Vijver M, van 't Veer L, Foekens J, Desmedt C, Sotiriou C, Tutt A, Caldas C, Reis-Filho JS, Aparicio SA, Salomon AV, Børresen-Dale AL, Richardson AL, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. (2012) The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. **486 (7403)**: 400-404.

- Sternlicht MD. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res.* **8** (1): 201-211.
- Straight SW, Shin K, Fogg VC, Fan S, Liu CJ, Roh M, Margolis B. (2004) Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell.* **15** (4): 1981-1990.
- Straight SW, Pieczynski JN, Whiteman EL, Liu CJ, Margolis B. (2006) Mammalian lin-7 stabilizes polarity protein complexes. *J Biol Chem.* **281**: 37738–37747.
- Stucke VM, Timmerman E, Vandekerckhove J, Gevaert K, Hall A. (2007) The MAGUK protein MPP7 binds to the polarity protein hDlg1 and facilitates epithelial tight junction formation. *Mol Biol Cell.* **18** (5): 1744-1755.
- St Johnston D, Sanson B. (2011) Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **23** (5): 540-546.
- Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T, Ohno S. (2001) Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol.* **152** (6): 1183-1196.
- Takahashi M, Nakajima M, Ogata H, Domeki Y, Ohtsuka K, Ihara K, Kurayama E, Yamaguchi S, Sasaki K, Miyachi K, Kato H. (2012) CD24 expression is associated with progression of gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* **60** (124): doi: 10.5754/hge12763.
- Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaić V, Massimi P, Nagasaka K, Kranjec C, Gammoh N, Banks L. (2008) Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene.* **27** (55): 7018-7030.
- Thor AD, Eng C, Devries S, Paterakos M, Watkin WG, Edgerton S, Moore DH, Etzell J, Waldman FM. (2002) Invasive micropapillary carcinoma of the breast is associated with chromosome 8 abnormalities detected by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol.* **33**: 628–631.
- Traweger A, Wiggin G, Taylor L, Tate SA, Metalnikov P, Pawson T. (2008) Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105** (30): 10402-10407.
- Tsai JH, Hsieh YS, Kuo SJ, Chen ST, Yu SY, Huang CY, Chang AC, Wang YW, Tsai MT, Liu JY. (2000) Alteration in the expression of protein kinase C isoforms in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **161** (2): 171-175.
- Tubiana-Hulin M, Stevens D, Lasry S, Guinebretière JM, Bouita L, Cohen-Solal C, Cherel P, Rouëssé J. (2006) Response to neoadjuvant chemotherapy in lobular and ductal breast carcinomas: a retrospective study on 860 patients from one institution. *Ann Oncol.* **17** (8): 1228-1233.
- Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Gunzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM. (2005) E-cadherin is essential for *in vivo* epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J.* **24**: 1146–1156.
- Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, Savage K, Gillett CE, Schmitt FC, Ashworth A, Tutt AN. (2007) Brca1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene.* **26**: 2126-2132.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell.* **126**: 741–754.
- Vaira V, Favarsani A, Dohi T, Maggioni M, Nosotti M, Tosi D, Altieri DC, Bosari S. (2011) Aberrant overexpression of the cell polarity module scribble in human cancer. *Am J Pathol.* **178** (6): 2478-2483.
- Valdez KE, Fan F, Smith W, Allred DC, Medina D, Behbod F. (2011) Human primary ductal carcinoma *in situ* (DCIS) subtype-specific pathology is preserved in a mouse intraductal (MIND) xenograft model. *J Pathol.* **225** (4): 565-573.
- Vargas AC, Lakhani SR, Simpson PT. (2009) Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: molecular pathology and clinical impact. *Future Oncol.* **5** (2): 233-243.
- Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Orvieto E, Maiorano E, Galimberti V, Luini A, Colleoni M, Goldhirsch A, Coates AS. (2009) Lack of prognostic significance of "classic" lobular breast carcinoma: a matched, single institution series. *Breast Cancer Res Treat.* **117** (1): 211-214.
- Viloria-Petit AM, David L, Jia JY, Erdemir T, Bane AL, Pinnaduwa D, Roncari L, Narimatsu M, Bose R, Moffat J, Wong JW, Kerbel RS, O'Malley FP, Andrulis IL, Wrana JL. (2009) A role for the TGFbeta-Par6 polarity pathway in breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106** (33): 14028-14033.
- Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, MacGrogan G, Dendale R, Sigal-Zafrani B, Longy M, Raynal V, Pierron G, de Mascarel I, Taris C, Stoppa-Lyonnet D, Pierga JY, Salmon R, Sastre-Garau X, Fourquet A, Delattre O, de Cremoux P, Aurias A. (2007)

- Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res.* **9 (2)**: R24.
- Vincent-Salomon A, Lucchesi C, Gruel N, Raynal V, Pierron G, Goudefroye R, Reyat F, Radvanyi F, Salmon R, Thiery JP, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Fourquet A, Delattre O; breast cancer study group of the Institut Curie. (2008) Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res.* **14 (7)**: 1956-1965.
- Visvader JE. (2011) Cells of origin in cancer. *Nature.* **469 (7330)**: 314-322.
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. (2010) Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* **28 (10)**: 1684-1691.
- Vollan HKM, Caldas C. (2011) The breast cancer genome – a key for better oncology. *BMC Cancer.* **11**: 501-506.
- Vos CB, Cleton-Jansen AM, Berx G de Leeuw WJ, ter Haar NT, van Roy F, Cornelisse CJ, Peterse JL, van de Vijver MJ. (1997) E-cadherin inactivation in lobular carcinoma *in situ* of the breast: an early event in tumorigenesis. *Br J Cancer.* **76 (9)**: 1131-1133.
- Wahed A, Connelly J, Reese T. (2002) E-cadherin expression in pleomorphic lobular carcinoma: an aid to differentiation from ductal carcinoma. *Ann Diagn Pathol.* **6 (6)**: 349-351.
- Walsh MM, Bleiweiss JJ. (2001) Invasive micropapillary carcinoma of the breast: eighty cases of an underrecognized entity. *Hum Pathol.* **32**: 583-589.
- Wang G, Krishnamurthy K, Bieberich E. (2009) Regulation of primary cilia formation by ceramide. *J Lipid Res.* **50 (10)**: 2103-2110.
- Wang Q, Chen XW, Margolis B. (2007) PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell.* **18 (3)**: 874-885.
- Wang X, Nie J, Zhou Q, Liu W, Zhu F, Chen W, Mao H, Luo N, Dong X, Yu X. (2008) Downregulation of Par-3 expression and disruption of Par complex integrity by TGF-beta during the process of epithelial to mesenchymal transition in rat proximal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* **1782 (1)**: 51-59.
- Weigelt B, Geyer FC, Natrajan R, Lopez-Garcia MA, Ahmad AS, Savage K, Kreike B, Reis-Filho JS. (2010) The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type. *J Pathol.* **220 (1)**: 45-57.
- Wen HC, Avivar-Valderas A, Sosa MS, Girnius N, Farias EF, Davis RJ, Aguirre-Ghiso JA. (2011) p38 α Signaling induces anoikis and lumen formation during mammary morphogenesis. *Sci Signal.* **4 (174)**: ra34.
- Whyte J, Thornton L, McNally S, McCarthy S, Lanigan F, Gallagher WM, Stein T, Martin F. (2010) PKC ζ regulates cell polarisation and proliferation restriction during mammary acinus formation. *J Cell Sci.* **123**: 3316-3328.
- Xue B, Krishnamurthy K, Allred DC, Muthuswamy SK. (2013) Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat Cell Biol.* **15 (2)**: 189-200.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A, Ohno S. (2003) Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol.* **13**: 734-743.
- Yamanaka T, Ohno S. (2008) Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front Biosci.* **13**: 6693-6707.
- Yi P, Feng Q, Amazit L, Lonard DM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (2008) Atypical protein kinase C regulates dual pathways for degradation of the oncogenic coactivator SRC-3/AIB1. *Mol Cell.* **29 (4)**: 465-476.
- Yonemura S. (2011) Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol.* **23 (5)**: 515-522.
- Youlden DR, Cramb SM, Dunn NAM, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. (2012). The descriptive epidemiology of female comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* **36 (3)**: 237-248.
- Yu W, Datta A, Leroy P, O'Brien LE, Mak G, Jou TS, Matlin KS, Mostov KE, Zegers MM. (2005) Beta-1 integrin orients epithelial polarity via Rac 1 and laminin. *Mol Biol Cell.* **16**: 433-445.
- Zeidler M, Kleer CG. (2006) The Polycomb group protein Enhancer of Zeste 2: its links to DNA repair and breast cancer. *J Mol Histol.* **37 (5-7)**: 219-223.

- Zekioglu O, Erhan Y, Ciris M, Bayramoglu H, Ozdemir N. (2004) Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology*. **44 (1)**: 18-23.
- Zen K, Yasui K, Gen Y, Dohi O, Wakabayashi N, Mitsufuji S, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Okanoue T, Yoshikawa T. (2009) Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*. **28 (32)**: 2910-2918.
- Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, Allred C, Muthuswamy SK. (2008) Dereglulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell*. **135**: 865-878.
- Zhang Q, Gu J, Li L, Liu J, Luo B, Cheung HW, Boehm JS, Ni M, Geisen C, Root DE, Polyak K, Brown M, Richardson AL, Hahn WC, Kaelin WG Jr, Bommi-Reddy A. (2009) Control of cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. **16 (5)**: 413-424.