



HAL
open science

Différentes approches de l'optimisation du traitement du cancer du sein de phénotype "basal like" triple négatif par un anti-PARP : contournement des protéines "Multidrug Resistance" et traitement combiné radiothérapie / chimiothérapie. Spécialité

Robin Dufour

► **To cite this version:**

Robin Dufour. Différentes approches de l'optimisation du traitement du cancer du sein de phénotype "basal like" triple négatif par un anti-PARP : contournement des protéines "Multidrug Resistance" et traitement combiné radiothérapie / chimiothérapie. Spécialité. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1MM05 . tel-01474056

HAL Id: tel-01474056

<https://theses.hal.science/tel-01474056>

Submitted on 22 Feb 2017

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.

*ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre : 05-DOC

Thèse

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue par

DUFOUR Robin

Le 22 mars 2016

Différentes approches de l'optimisation du traitement du cancer du sein de phénotype « basal like » triple négatif par un anti-PARP : contournement des protéines "Multidrug Resistance" et traitement combiné radiothérapie/chimiothérapie

Membres du jury

Président :

Mme PENAULT-LLORCA Frédérique, PU-PH, ERTICa, Centre de lutte contre le cancer Jean Perrin, Université d'Auvergne (Clermont-Ferrand)

Rapporteurs :

M. Gligorov Joseph, PU-PH, Département d'oncologie médicale, APHP Tenon, Université Pierre & Marie Curie (Paris)

M. Bentaher Azzak, DR Inserm, CIRI-Inserm U111 – CNRS UMR5308, Faculté de Médecine - Hôpital Lyon Sud (Lyon)

Directrice de thèse :

Mme BAMDAD Mahchid, Professeur, ERTICa, Université d'Auvergne (Clermont-Ferrand)

Je remercie sincèrement,

Madame Frédérique PENAULT-LLORCA, directrice de l'EA 4677 pour m'avoir accueilli et autorisé à réaliser ce travail au sein du laboratoire ERTICa. Je lui présente également toute ma gratitude pour la co-direction de ma thèse.

Messieurs Joseph GLIGOROV et Azzak BENTAHHER pour avoir aimablement accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Corinne AUBEL pour son aide et ces précieux conseils qui m'ont permis de résoudre nombre de problèmes rencontrés tout au long de ma thèse.

Madame Catherine ABRIAL pour son aide, son soutien et sa gentillesse.

Madame Anne CAYRE pour son soutien tout au long de ce travail.

Monsieur Fabrice KWIATKOWSKI pour l'aide qu'il m'a apporté dans l'analyse de mes résultats.

Madame Catherine VATOUX pour l'aide inestimable et sa bonne humeur.

Toute l'équipe du laboratoire ERTICa pour m'avoir accueilli durant ce travail.

Madame Mahchid Bamdad, ma directrice de thèse, pour sa confiance, son écoute, son soutien et sa disponibilité durant tout ce temps où nous avons travaillé ensemble. Ce qui n'était au départ qu'une rencontre dû au hasard a finalement débouché sur cette grande aventure... Aventure qui n'aurait jamais vu le jour sans la persévérance dont tu as fait preuve pour me permettre de réaliser cette thèse. Nous n'avons pas toujours été d'accord sur tout mais pour moi ce fut une expérience formidable, je ne pourrais que t'être toujours reconnaissant pour ce que tu m'as permis d'accomplir.

Je tiens aussi à remercier,

Emmanuelle MOUNETOU et Pierre DAUMAR ainsi que toute l'équipe Résistance pour votre aide et votre bonne humeur.

Emeline et Marlene pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble autour d'un café.

Tous les collègues de l'IUT que j'ai croisé durant ces années, pour m'avoir accueilli et m'avoir dépanné à plusieurs reprises.

Tous mes stagiaires, Raphael, James, Jessica, Adrien, Marlene... vous êtes trop nombreux pour que puisse tous vous nommer. J'ai été heureux de vous encadrer et j'espère que vous avez autant apprécié que moi votre passage au sein du laboratoire.

Clémence, que ce soit en stage ou en thèse, ce fut toujours un plaisir de travailler et plaisanter avec toi.

Merci à mes amis, présents et passés, pour tous les bons moments ensemble. Vous êtes trop nombreux pour vous nommer et je ne voudrais pas faire de jaloux.

Enfin ma famille, pour m'avoir soutenu et surtout leur patience pour m'avoir supporté durant toute ces années.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
BIBLIOGRAPHIE	2
<i>A - Le cancer du sein</i>	<i>3</i>
I - Epidémiologie du cancer du sein	3
II - Caractéristiques du cancer du sein	3
a - Architecture normale du sein	3
b - Le cancer du sein : généralités et classifications	5
1 - Classification histologique	5
2 - Classification immunohistochimique	6
3 - Classification génique et correspondance avec la classification immunohistochimique ...	7
<i>B - Les transporteurs « Multidrug Resistance » et la notion de résistance croisée des cellules tumorales</i>	<i>11</i>
I - Les transporteurs de type ATP Binding Cassette	11
a - Structure des transporteurs ABC	11
b - Les domaines de liaison à l'ATP	12
c - Les domaines transmembranaires	13
II - Les transporteurs « Multidrug Resistance »	14
a - « Permeability glycoprotein »	15
b - « Breast Cancer Resistance Protein »	16
III- Les transporteurs MDR et les cellules tumorales	16
IV- Les transporteurs MDR et les traitements ciblés	18
V - Les inhibiteurs de Poly(ADP-ribose) polymérase	18
<i>C – Une nouvelle approche de modélisation in vitro : la culture cellulaire en trois dimensions</i>	<i>21</i>
I - La culture cellulaire	21
II – La culture cellulaire en trois dimensions (3D)	22
a – Principe de la culture en trois dimensions	22
b – Les différentes techniques de culture en trois dimensions	23

III - Utilisation de cultures en trois dimensions	27
a - « Screening » et test de nouvelles molécules thérapeutiques	27
b - Réalisation de co-cultures en trois dimensions	29
OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	31
MATERIELS et METHODES.....	33
I – Conditions de culture de la lignée SUM 1315	34
II – Etude du taux d’expression de la P-gp et de la BCRP par Western blot suite à un traitement par Olaparib (AstraZeneca™)	34
a - Dissolution de l’Olaparib	34
b - Traitement des cellules de la lignée SUM 1315 avec L’Olaparib.....	34
c - Extraction et dosage protéique	35
d - Western Blot.....	35
III - Suivi de l’évolution de la concentration intracellulaire en Olaparib.....	36
a - Préparation des échantillons HPLC.....	36
b - Dosage de l’Olaparib par une technique HPLC	36
III – Traitement des cellules par irradiation	37
a - Conditionnement des cellules avant irradiation	37
b - Protocole d’irradiation	37
c - Méthode de mesure de la survie cellulaire par le test à la SulfoRhodamine B (SRB)	38
V - Culture cellulaire de la lignée SUM1315 en 3D	39
a - Solubilisation du Matrigel®.....	39
b - Détermination de la concentration en Matrigel optimale.....	39
c - Détermination des concentrations cellulaires optimales	39
d - Culture cellulaire 3D, technique Hanging Drop.....	39
e - Entretien des cultures 3D	40
f - Suivi de la formation des sphères	40
g - Transfert des sphères.....	40
h - Etude ultra-structurale des sphéroïdes par Microscopie Electronique à Transmission.....	41
RESULTATS	42
I - Etude de la co-expression de deux protéines « Multidrug Resistance » (MDR) chez la lignée SUM1315 de phénotype BLTN traitée avec l’Olaparib, en corrélation avec la concentration intracellulaire de cet anti-PARP.	43

BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib	45
II - Etude de l'impact d'un traitement combiné par Olaparib et par radiothérapie à hautes et à basses énergies, sur le taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN. .	54
a-Taux de survie des cellules SUM1315 en présence de l'Olaparib au cours du temps	54
b- Taux de survie des cellules SUM1315 après un traitement combiné avec Olaparib et Irradiation à haute énergie par l'accélérateur NOVALIS	55
1- Olaparib/Irradiation à 2 Gy	56
2- Olaparib/Irradiation à 10 Gy	56
c- Taux de survie des cellules SUM1315 après un traitement combiné avec Olaparib et Irradiation à basse énergie par l'accélérateur X-RAD 320.....	57
1- Olaparib/Irradiation à 2 Gy	57
2- Olaparib/Irradiation à 10 Gy	57
III - Mise au point d'un modèle de culture cellulaire en trois dimensions à partir de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN.....	59
Development of a three-dimensional (3D) cell culture from triple-negative basal-like breast cancer SUM1315 cells.....	61
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	91

Abréviations

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

Anti-PARP : anti Poly(ADP-ribose) polymérase

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

BER : mécanisme de réparation par excision de base

BLTN : « Basal like » triple négatif

BRCA : breast cancer

CCI : carcinomes canauxiaux invasifs

CLI : carcinomes lobulaires invasifs

DO : Densité optique

EGFR : epidermal growth factor receptor

ER : oestrogen receptor (récepteurs aux œstrogènes)

Gy : gray

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2

HR : recombinaison homologue

IHC : immunohistochimie

ITK : inhibiteurs de tyrosine kinase

MDR : multidrug resistance

NBD : nucleotide binding domain

NHEJ : Nonhomologous end-joining

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

P-gp : Permeability glycoprotein

PR : progesterone receptor (récepteurs à la progestérone)

RH : récepteurs hormonaux

TMD : transmembrane domain

Transporteur ABC : transporteur ATP Binding Cassette

BIBLIOGRAPHIE

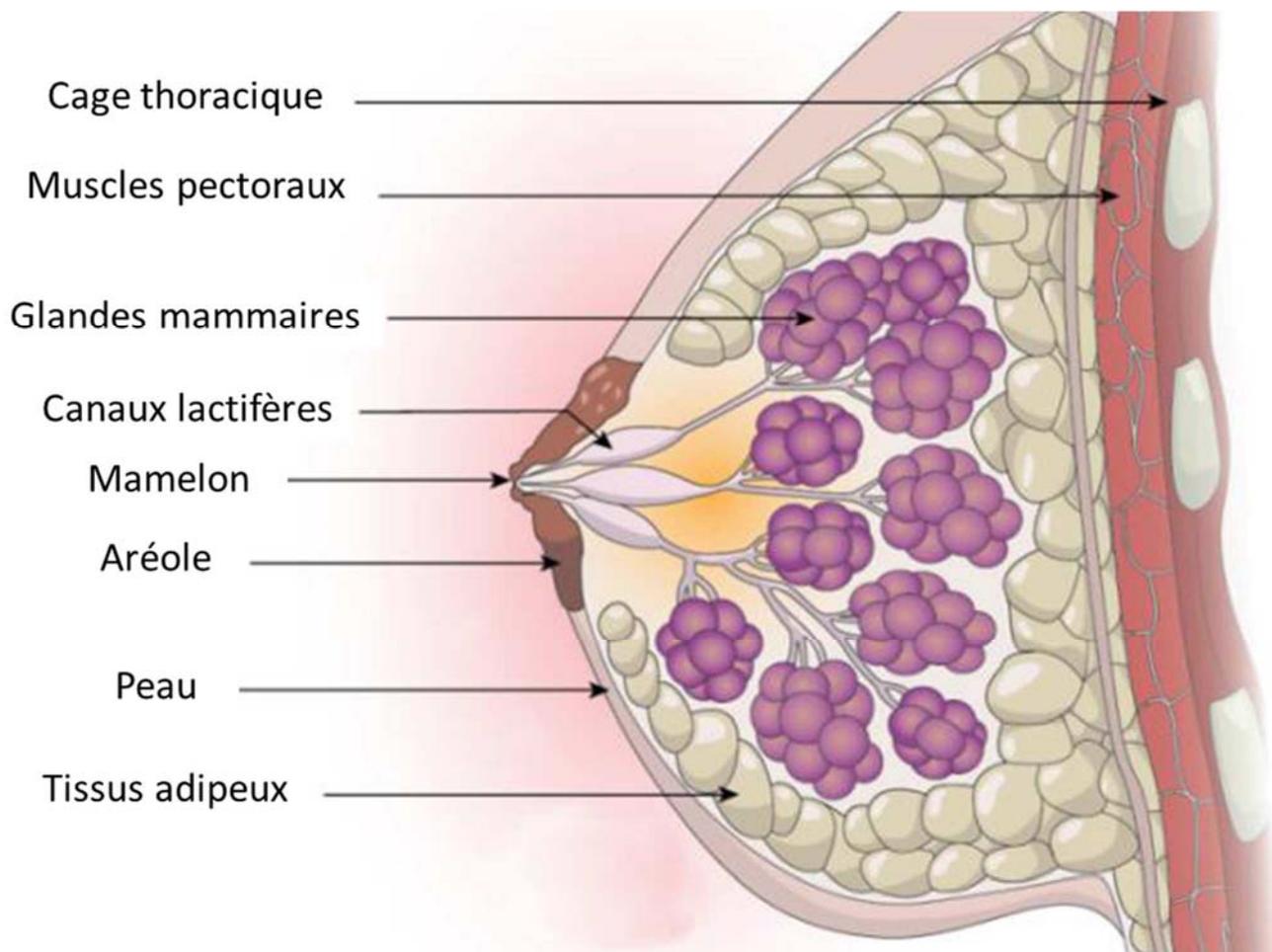


Figure 1 : Coupe sagittale d'un sein

(<http://www.ligue-cancer.net/localisation/sein/> consulté le 19 mai 2015)

A - Le cancer du sein

I - Epidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein est le second cancer le plus diagnostiqué dans le monde (11,9% des cas), derrière le cancer du poumon (12,9% des cas en 2012). C'est le cancer le plus fréquent chez la femme avec 1,7 millions de cas en 2012, soit un cancer féminin sur quatre (World Health Organization., 2013). De plus, les données de l'OMS pour l'année 2012 ont mis en évidence une forte augmentation de l'incidence et de la mortalité due à ce cancer. En effet, depuis 2008, le cancer du sein a vu son incidence et sa mortalité augmenter de 20% et 14% respectivement, soit 552 000 décès en 2014 (31% des femmes diagnostiquées). Par ailleurs, dans les pays en voie de développement, en raison d'une évolution des habitudes de vie vers celle des pays occidentaux (cigarette, alcool, nourriture grasse et manque d'exercice, traitement contraceptif hormonal) (World Health Organization., 2013 ; Boyle P et Levin B., 2008), la fréquence de cette maladie a significativement augmenté. Ce phénomène est également aggravé par de fortes inégalités concernant la détection et la prise en charge de ce type de cancer dans ces pays. Ceci se traduit par une mortalité plus élevée dans ces pays alors que l'incidence de ce cancer est plus forte dans les pays développés. Pour exemple, l'incidence de ce cancer en Europe de l'ouest et en Afrique de l'est est respectivement de 90 et 30 cas pour 100 000 femmes alors que le taux de mortalité dans ces deux régions est pratiquement identique, soit environ 15 décès, pour 100 000 femmes (World Health Organization., 2013). Ainsi, malgré les efforts et les avancées réalisées en termes de prévention et de dépistage, le cancer du sein reste une maladie complexe responsable de nombreux décès au niveau mondial.

II - Caractéristiques du cancer du sein

a - Architecture normale du sein

Avant d'aborder cette pathologie qu'est le cancer du sein, il est important de comprendre comment le sein est normalement organisé. Sur le plan superficiel, le sein est recouvert de peau épaisse en périphérie et s'amincissant au niveau de l'aréole (Figure 1). L'aréole est un disque cutané pigmenté sur lequel on peut observer de petites saillies. Ces dernières sont des glandes sébacées appelées tubercules de Morgagni qui au moment de la grossesse augmentent en volume et en nombre et sont alors appelées tubercules de Montgomery (Ellis H., 2007 ; UVMaF., 2011). Elles ont un rôle protecteur au moment de

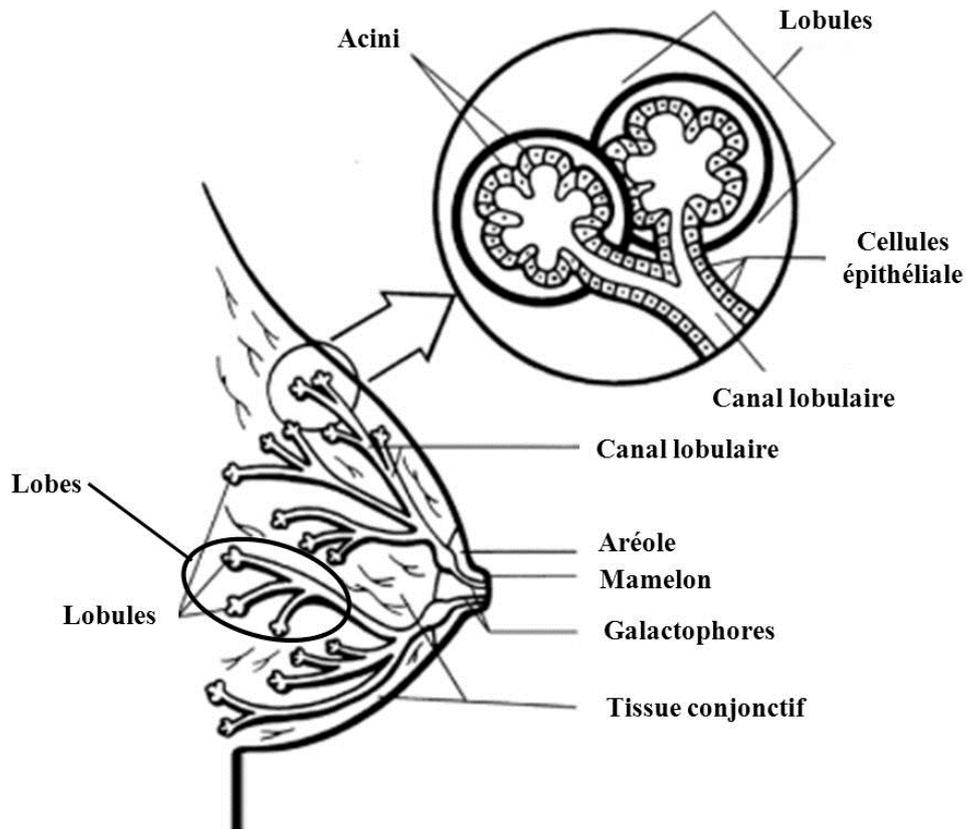


Figure 2 : Représentation schématique de la glande mammaire

(<http://www.cancer.org/healthy/findcancerearly/womenshealth/non-cancerousbreastconditions/non-cancerous-breast-conditions-normal-breast-tissue> consulté le 19 mai 2015)

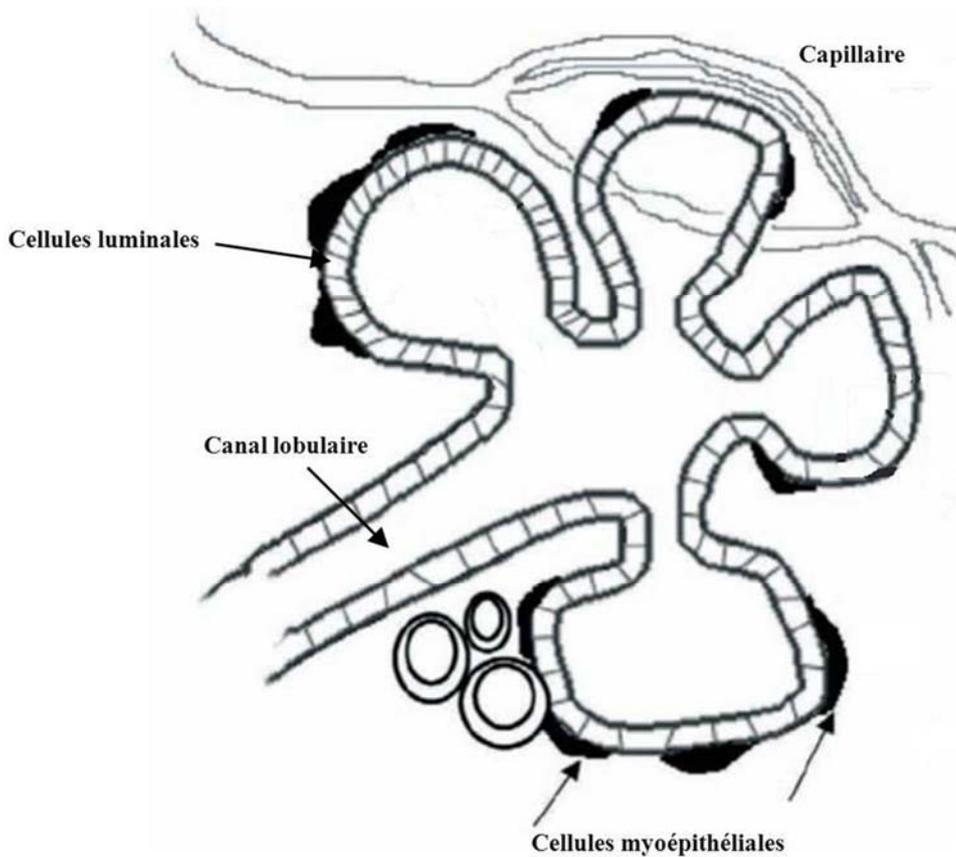


Figure 3 : Représentation schématique des lobules mammaires

(McManaman JL et Neville MC., 2003)

l'allaitement en sécrétant un sébum protecteur. Au centre de l'aréole est situé le mamelon, une partie surélevée sur laquelle débouchent les canaux galactophores permettant l'écoulement du lait. Un muscle circulaire, appelé muscle mamillaire est présent sous l'aréole. La contraction de ce muscle, sous l'influence du froid, de stimulations sexuelles et/ou de la succion, réduit la surface aréolaire, projette le mamelon en avant et permet de contrôler les sécrétions lactées au moment de la lactation (Ellis H., 2007 ; UVMaF., 2011).

Au niveau structural, le sein est constitué en majorité par le stroma et dans une plus faible proportion par la glande mammaire (Figures 1 et 2) (Ellis H., 2007 ; Jesinger RA., 2014 ; Stines J et Tristant H., 2005 ; UVMaF., 2011). La glande mammaire est une masse de taille variable, formée d'une vingtaine de lobes. Chaque lobe est formé de 20 à 40 lobules contenant chacun 40 à 100 alvéoles. Ces alvéoles ou acini, sont drainés par des canaux intralobulaires et sont responsables de la sécrétion du lait. L'ensemble des acini et des canaux intralobulaires forme des lobules qui déversent le lait dans un canal interlobulaire regroupant ainsi les lobules formant chaque lobe. Les lobes sont drainés *via* des canaux galactophores qui se prolongent jusqu'à leur sortie au niveau du mamelon, permettant ainsi l'excrétion du lait maternel (Ellis H., 2007 ; Jesinger RA., 2014 ; Stines J et Tristant H., 2005 ; UVMaF., 2011). Quel que soit leur stade de développement, les glandes et les canaux possèdent une structure épithéliale similaire (Figure 3). Ils forment une bicouche épithéliale polarisée comprenant (i) une couche apicale formée de cellules luminales faisant face au lumen canalaire et alvéolaire, et (ii) une couche basale formée de cellules myoépithéliales en liaison avec la membrane basale entourant la structure (Guinebretière JM *et al.*, 2005 ; Ellis H., 2007 ; Jesinger RA., 2014).

Le stroma occupe la majeure partie du volume du sein et n'a pas d'effet sur la production du lait. Il est formé de tissus adipeux, de la matrice extracellulaire ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques (Figure 4). Il est compartimenté par des travées conjonctives, appelées ligaments de Cooper, qui relient la peau et la glande mammaire, permettant ainsi de maintenir le sein. Un important réseau vasculaire traverse le stroma et irrigue le sein. En effet, le sein est irrigué *via* trois troncs artériels, (i) l'artère thoracique interne, (ii) l'artère axillaire via les artères thoracique latérale et thoraco-acromiale et enfin (iii) les artères intercostales (Figure 5). Le sang est ensuite distribué *via* (i) des rameaux profonds qui pénètrent l'épaisseur de la glande et se ramifient entre les lobes et les lobules et (ii) un rameau superficiel ou cutané très dense qui irrigue la peau. Ces rameaux vont se rejoindre et former un anneau autour de l'aréole.

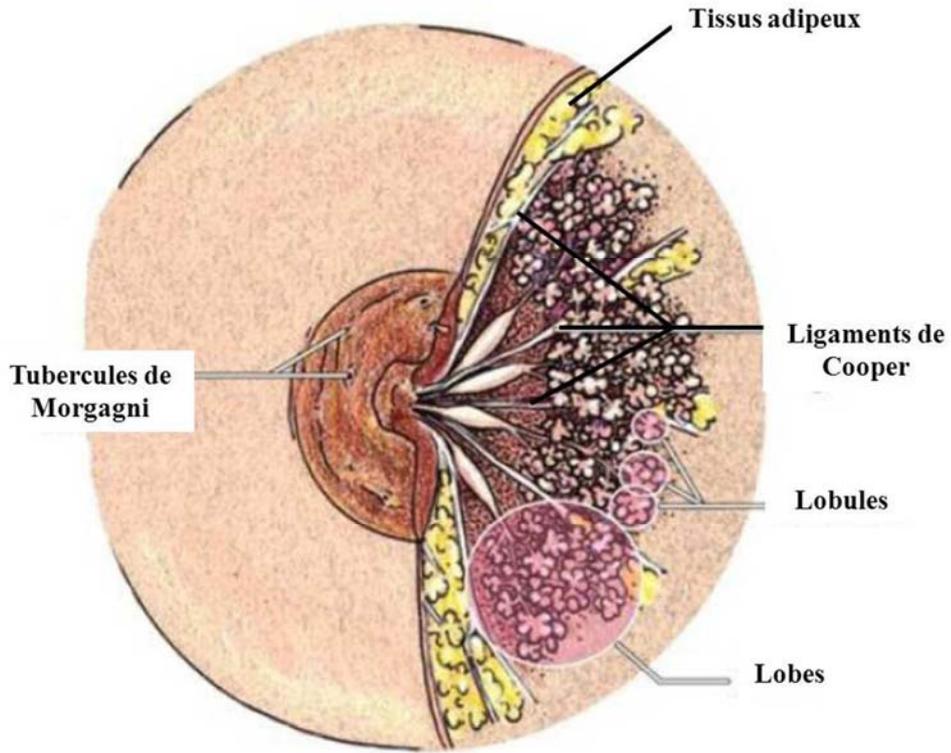


Figure 4 : représentation schématique de la structure générale d'un sein (UVMaF., 2011)

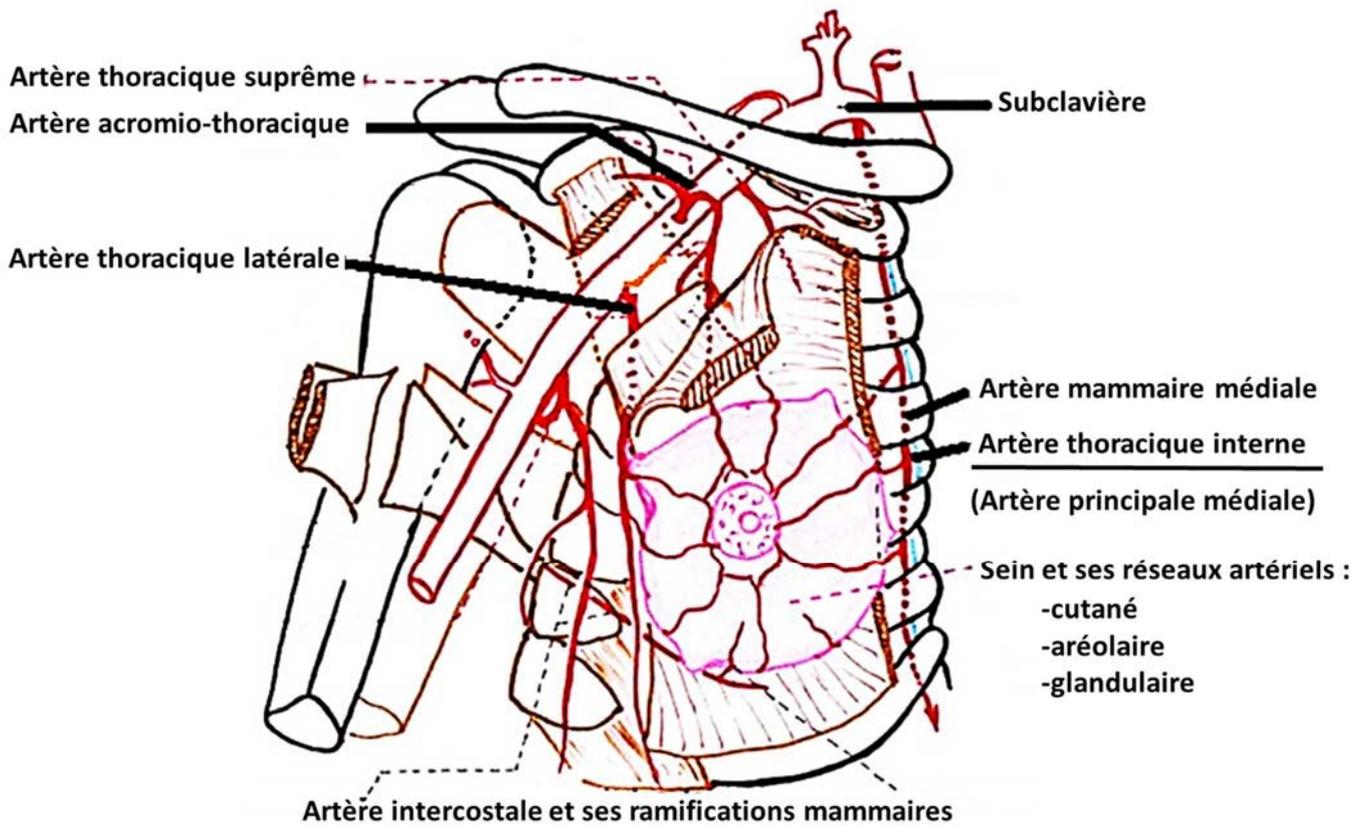


Figure 5 : Vascularisation artérielle du sein : vue antérieure

(http://www.univ-brest.fr/S_Commune/Biblio/ANATOMIE/Scan_anatomie/Genitaux_300dpi/Lymphatiques_seins.jpg consulté le 19 mai 2015)

En plus du réseau vasculaire, un important réseau lymphatique se développe également au niveau du sein. Il est divisé en deux réseaux, (i) le réseau lymphatique sous cutané et (ii) le réseau lymphatique glandulaire (Figure 6). Le réseau lymphatique sous cutané prend origine au niveau du mamelon, irrigue l'aréole puis se prolonge sous toute la surface de la peau recouvrant le sein afin de rejoindre les ganglions axillaires et dans une moindre mesure les voies sus claviculaire, la voie mammaire interne et vers le sein opposé. Le réseau lymphatique glandulaire quant à lui apparaît au niveau des lobules et des galactophores, de là les capillaires lymphatiques vont soit se prolonger jusqu'aux nœuds axillaires et nœuds mammaires internes. Il est à noter que ce réseau est connecté avec le plexus profond. Ces deux réseaux lymphatiques jouent un rôle très important dans la propagation des cellules tumorales mammaires au reste de l'organisme.

b - Le cancer du sein : généralités et classifications

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène. Il présente de grandes variations au niveau morphologique, génétique, phénotypique et de la réponse aux traitements. Il est donc difficile à caractériser. Dans ce contexte, il est donc possible de parler non pas du cancer du sein mais des cancers du sein. De ce fait, plusieurs critères majeurs sont utilisés en clinique, permettant d'établir une classification des différentes tumeurs rencontrées.

1 - Classification histologique

Le premier critère utilisé pour différencier les différentes tumeurs entre elles est de nature purement morphologique et structurale. Plusieurs formes histologiques de cancer du sein ont alors été déterminées :

-Les **carcinomes**, correspondant à des tumeurs se développant à partir de tissus épithéliaux, en l'occurrence la glande mammaire (Tableau 1).

-Les **sarcomes**, qui se développent à partir des tissus conjonctifs (ACS., 2013 ; ACS., 2014 ; Baillet F *et al.*, 2004 ; Bertos NR et Park M., 2011 ; Guinebretière JM *et al.*, 2005).

La grande majorité des cancers du sein sont des carcinomes et parmi ceux-ci, les plus courants sont les carcinomes canaux invasifs (CCI) et les carcinomes lobulaires invasifs (CLI). Les CCI correspondent à des tumeurs se développant à l'intérieur des canaux lactiques et représentent 75% des cancers du sein. Ils sont considérés comme invasifs, à partir du moment où ils traversent la membrane basale, se propageant ainsi dans l'organisme *via* le système lymphatique. Les CLI se développent au sein des lobules constituant les glandes mammaires et ils représentent 10% des cancers du sein. Tout comme les CCI, ces tumeurs ne

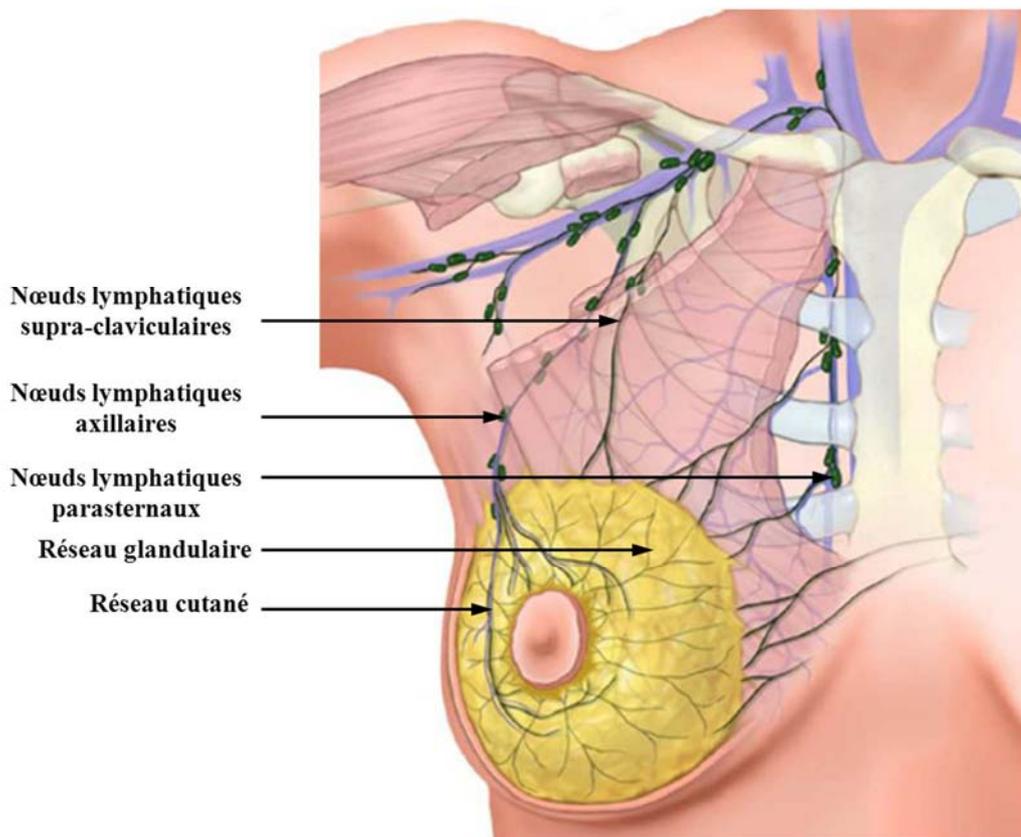


Figure 6 : Réseau lymphatiques du sein : vue antérieure
(Jesinger RA., 2014)

Tableau 1 : Carcinomes invasifs du sein (sans les carcinomes microinvasifs et les lésions papillaire invasives)

Tumeur non infiltrante
Carcinome intracanaulaire
Carcinome lobulaire <i>in situ</i>
Tumeurs infiltrantes
Carcinome canalaire infiltrant
Carcinome canalaire infiltrant avec composante intracanaulaire
Carcinome lobulaire infiltrant
Carcinome mucineux
Carcinome médullaire
Carcinome papillaire
Carcinome tubuleux
Carcinome adénoïde kystique
Carcinome sécrétant (juvénile)
Carcinome apocrine
Carcinome métaplasique
(i) de type épidermoïde
(ii) de type à cellules fusiformes
(iii) de type chondroïde et osseux
(iv) de type mixte
Autres
Maladie de Paget du mamelon

sont invasives qu'à partir du moment où elles traversent la membrane basale. Le reste des cancers du sein appartiennent à d'autres groupes moins communs tels les carcinomes mucineux (environ 3%), les carcinomes tubuleux (environ 2%), les carcinomes médullaires (1 à 3%) et les carcinomes papillaires (environ 2%) (ACS., 2013 ; ACS., 2014 ; Baillet F *et al.*, 2004 ; Bertos NR et Park M., 2011 ; Guinebretière JM *et al.*, 2005 ; Tavassoli FA et Devilee P., 2003 ; WHO., 1981).

Cette classification des carcinomes selon leurs aspects morphologiques permet de mettre en place une première classification, mais elle est insuffisante pour décrire toute l'hétérogénéité des tumeurs mammaires. En effet, elle ne permet pas d'expliquer les différences de réponses aux traitements, entre tumeurs appartenant au même groupe.

2 - Classification immunohistochimique

Avec les avancées dans le domaine de l'immunomarquage, et pour pallier aux faiblesses de la classification histologique, une nouvelle approche diagnostique a été développée. Elle est basée sur la mise en évidence par immunohistochimie, de l'expression de biomarqueurs permettant de différencier plus efficacement les différents types de tumeurs mammaires. Cette approche permet une caractérisation plus précise du cancer du sein et oriente les cliniciens vers une stratégie thérapeutique adaptée au patient, avec pour but la mise en place de stratégies de traitement individualisé.

Les principaux marqueurs recherchés en routine sont les récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR), et les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques dont notamment HER2 (ACS., 2013 ; Bertos NR et Park M., 2011 ; Duffy MJ., 2005 ; Kerlikowske K *et al.*, 2010 ; Rastelli F et Crispino S., 2008 ; Yang XR *et al.*, 2011). De ce fait, leur absence ou leur surexpression à la surface des cellules cancéreuses conditionnerait le comportement des tumeurs ainsi que leur éligibilité aux différentes thérapies ciblées disponibles. Un autre biomarqueur couramment recherché est la protéine Ki-67 qui détermine la prolifération cellulaire. Il est utilisé pour déterminer la sensibilité des tumeurs aux agents cytotoxiques (Kerlikowske K *et al.*, 2010).

Quatre grandes catégories du cancer du sein ont ainsi pu être établies par analyse immunohistochimique à partir de l'étude de ces biomarqueurs (Goldhirsch *et al.*, 2011 ; Bertos NR et Park M., 2011 ; Duffy MJ., 2005 ; Gnant M *et al.*, 2011 ; Goldhirsch *et al.*, 2011 ; Yang XR *et al.*, 2011) : (i) les tumeurs de phénotype triple négatif, qui sont Her2- et RH- (RE- et RP-) en immunohistochimie (IHC), (ii) les tumeurs de phénotype Her2+, qui sont Her2+ en IHC, (iii) les tumeurs de phénotype luminal A, qui sont Her2-/RH+, Ki67 <14%, en

Tableau 2 : Caractéristiques des sous-types moléculaires du cancer du sein

Les voies surexprimées sont indiquées en gras, les voies sous-exprimées sont indiquées en italique

Sous type moléculaire	Statut ER	groupe de gènes enrichis
Luminal A	+	Jonctions adhérentes
		<i>Apoptose</i>
		<i>Voie de signalisation de l'insuline</i>
		<i>Recepteur aux endrogènes</i>
		Voie de signalisation du calcium
		<i>Recepteur aux eostrogènes</i>
		Voie de signalisation Wnt
Luminal B	+	Adhésions focales
		<i>Mobilité cellulaire</i>
		<i>Cycle cellulaire</i>
		Voie de signalisation de P53
		<i>Replication et réparation de l'ADN</i>
		Voie de signalisation de l'insuline
		<i>Recepteur aux eostrogènes</i>
		Recepteur aux lymphocytes B
HER2 overexpression	-	<i>Signalisation du TGF-β</i>
		Voie de signalisation de EGFR
		<i>Voie de contrôle par PTEN de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'entrée en apoptose</i>
		Cycle cellulaire
		Replication et réparation de l'ADN
Normal breast-like	-	<i>Jonctions adhérentes</i>
		<i>Mobilité cellulaire</i>
		Cycle cellulaire
		<i>Voie de signalisation de P53</i>
		Replication et réparation de l'ADN
		<i>Recepteur aux eostrogènes</i>
		<i>Signalisation du TGF-β</i>
<i>Voie de signalisation de mTOR</i>		
Basal-like	-	<i>Cycle cellulaire</i>
		Voie de signalisation de P53
		<i>Replication et réparation de l'ADN</i>
		Métabolisme lié aux androgènes et oestrogènes
		Metabolisme des acides gras
		Voie de signalisation de l'insuline
		Recepteur aux endrogènes
Voie de contrôle par PTEN de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'entrée en apoptose		
Claudin-low	-	<i>Jonctions serrées</i>
		<i>Adhésion intercellulaire</i>
		<i>Recepteur aux HER2</i>
		<i>Prolifération cellulaire</i>
		Différenciation mésenchymateuse
		Transition épithélio-mésenchymateuse
		Réponse immunitaire

IHC et (iv) les tumeurs de phénotype luminal B, qui sont soit Her2-/RH+, Ki67 \geq 14%, soit Her2+/RH+, quel que soit le Ki67, en IHC (Prat et Perou, 2011 ; Gnant et al, 2011). Les tumeurs de phénotype luminal A et B sont les tumeurs présentant le meilleur pronostic comparées aux tumeurs de phénotype triple négatif et de phénotype HER2+.

3 - Classification génique et correspondance avec la classification immunohistochimique

L'utilisation de ces biomarqueurs présente un réel intérêt diagnostique et clinique. Cependant ils ne sont pas suffisants pour refléter l'hétérogénéité d'une maladie telle que le cancer du sein. Il était donc nécessaire d'utiliser une nouvelle approche.

C'est dans cette optique que depuis une dizaine d'années des études transcriptomiques ont été menées afin de classer les différentes tumeurs en fonction de leur expression génique (Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001). Cinq sous types moléculaires ont ainsi été mis en évidence : (i) « Luminal A », (ii) « Luminal B », (iii) « HER2 surexprimé », (iv) « Normal Breast-Like » et (v) « Basal-Like » (Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001 ; Sotiriou C *et al.*, 2003). Par la suite, un sous type supplémentaire appelé (vi) « Claudin-Low », apparenté aux cellules souches mammaires, a été ajouté, portant ce nombre à six (Tableau 2) (Herschkowitz JI *et al.*, 2007). Ces six sous types peuvent être partagés en deux grands groupes en fonction de leur expression des récepteurs aux œstrogènes, les ER+ regroupant les Luminal A et B, tandis que les quatre sous types restant sont ER- (Eroles P *et al.*, 2012 ; Herschkowitz JI *et al.*, 2007 ; Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001 ; Sotiriou C *et al.*, 2003).

Le sous type Luminal A est le plus fréquemment rencontré et représente 50 à 60% des cancers du sein. Il se caractérise par l'expression de gènes spécifiques des cellules luminales qui tapissent les canaux galactophores ainsi que par une faible expression de gènes impliqués dans la prolifération. Les tumeurs appartenant à ce groupe sont ER+, PR+ et expriment Bcl-2 ainsi que les cytokératines CK8/18. Par contre, elles présentent une faible expression Ki-67, une absence d'expression d'HER2 (Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001). Elles sont majoritairement de faible grade histologique et de bon pronostic. Leur taux de rechute est de 27.8% avec une survie médiane de 2,2 ans après la rechute, les métastases se développant alors principalement au niveau des os (Kennecke H *et al.*, 2010 ; Sørlie T *et al.*, 2001).

Les tumeurs Luminales B représentent 10 à 20% des cancers du sein. Bien qu'elles expriment des gènes spécifiques des cellules luminales, elles se distinguent des tumeurs Luminales A, par une forte expression de gènes liés à la prolifération comme la cycline B1 ainsi que la présence d'EGFR et HER2 (Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001). Ceci se traduit par un grade histologique plus élevé et un indice de prolifération plus fort, rendant ces tumeurs plus agressives et de plus mauvais pronostic que les Luminales A. En effet, leur temps de survie après rechute est de 1,6 an, et les métastases se développent aussi bien au niveau des os que du foie (Cheang MC *et al.*, 2009 ; Feeley LP *et al.*, 2014 ; Kennecke H *et al.*, 2010). En raison de ces différences d'agressivité, de nombreux efforts ont été menés afin de trouver des biomarqueurs permettant de différencier ces deux sous-types. Une des voies explorées les plus prometteuses, est l'utilisation du biomarqueur Ki-67. En effet, les Luminales B, à l'inverse des tumeurs Luminales A, expriment fortement cette protéine (Cheang MC *et al.*, 2009 ; Feeley LP *et al.*, 2014).

Le sous type HER2 positif fait partie du groupe de tumeurs n'exprimant pas les récepteurs aux œstrogènes, tout comme les « Normal Breast-Like », les « Basal-Like » et les « Claudin-Low ». Ce sous type, qui représente 15 à 20% des cancers du sein, se caractérise par une forte expression du gène HER2, des gènes liés à la voie de signalisation HER2, de gènes liés à la prolifération cellulaire et une faible expression de gènes spécifiques des cellules luminales (Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001). Ces tumeurs très prolifératives sont majoritairement de grade histologique élevé (75% des tumeurs) et sont caractérisées au niveau immunohistochimique (IHC) par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. Cependant, bien que leur analyse transcriptomique indique une surexpression du gène HER2, celle-ci n'est constatée par IHC que dans 70% des cas, rendant ainsi nécessaire une confirmation du statut HER2 des tumeurs avant l'utilisation de traitements ciblant ce récepteur (Kennecke H *et al.*, 2010 ; Prat A et Perou CM., 2011 ; Staaf J *et al.*, 2010). Ces résultats indiquent que la caractérisation des sous type HER2 est plus complexe que prévu au premier abord. Cependant une étude récente a permis de subdiviser les tumeurs HER2 en trois sous classes de pronostics différents. Ainsi, bien que les tumeurs HER2 soient généralement considérées de mauvais pronostic, de grandes variations existent entre ces sous classes, deux d'entre elles présentant un taux de survie de 50-55% à 10 ans alors qu'il n'atteint que 12% pour la dernière sous classe (Staaf J *et al.*, 2010). De nombreux efforts restent encore à fournir avant de pouvoir caractériser correctement ce sous type.

Le sous type « Normal Breast-Like » est à part dans cette classification, bien qu'il compte pour 5 à 10% des tumeurs du sein. En effet, celui-ci exprime des gènes caractéristiques des cellules adipeuses et présente un statut ER-, PR- et HER2- en IHC, le rattachant ainsi au phénotype triple négatif et présente un pronostic intermédiaire entre les sous types Luminal et les Basal-like (Perou CM *et al.*, 2000). Cependant, ce sous type est encore peu étudié et, de plus, des doutes ont été formulés sur son existence. En effet, certains chercheurs pensent qu'il pourrait s'agir d'un artefact dû à une contamination des échantillons par des tissus normaux pendant l'analyse des tumeurs (Prat A et Perou CM., 2011 ; Weigelt B *et al.*, 2010). En effet, lors d'une récente étude utilisant une technique de microdissection pour isoler les cellules cancéreuses avant leur analyse sur biopuce, aucun cas de cancer Normal breast-like n'a été retrouvé, supportant ainsi la thèse de l'artefact (Weigelt B *et al.*, 2010).

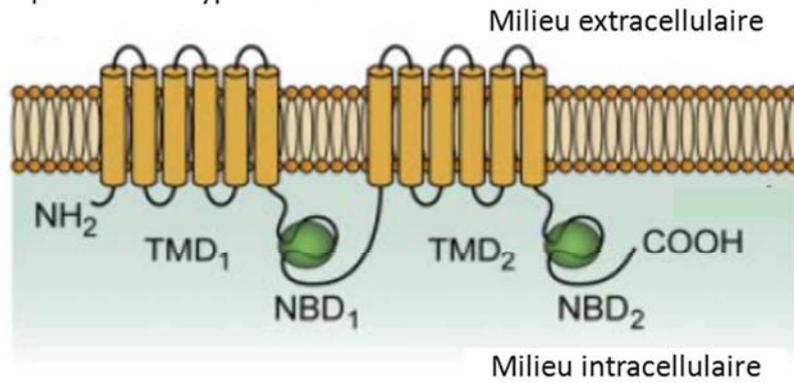
Le phénotype « Basal-like » (BL) est le plus agressif de tous les sous types moléculaires (Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001). Il représente 10 à 20% des tumeurs du sein rencontrées à travers le monde et apparaît préférentiellement chez les jeunes femmes non ménopausées, les femmes afro-américaines ainsi que celles d'origine hispanique (Leidy J *et al.*, 2014). Il doit son nom au fait qu'il exprime des gènes spécifiques des cellules basales formant les canaux galactophores. Il s'agit notamment des gènes des cytokératines CK5 et CK17, de la P-cadherine, de la caveoline 1 et 2, et de CD44. Il présente aussi une faible expression des gènes des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et d'HER2/neu mais une forte expression d'EGFR. Une autre caractéristique importante de ce sous type est la forte expression de gènes liés à la prolifération cellulaire, à l'origine probable de son agressivité, ainsi qu'une forte fréquence de mutation sur p53, PTEN et sur les gènes BRCA (de Ruijter TC *et al.*, 2011 ; Leidy J *et al.*, 2014 ; Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001). Il est à noter que les femmes porteuses de mutations héréditaires sur le gène BRCA ont 80% de chance de développer un cancer du sein et que 75% des tumeurs présentant des mutations sur BRCA sont classifiées dans le sous type Basal-like (de Ruijter TC *et al.*, 2011 ; Eroles P *et al.*, 2012 ; Leidy J *et al.*, 2014). La présence de mutation sur BRCA est donc un facteur de risque important dans le développement de tumeurs Basal-like. Ceci peut être lié au fait que les protéines codées par ces gènes sont essentielles au maintien de l'intégrité du génome, leur inactivation entraînerait une instabilité génétique favorable au développement de ce sous type (Eroles P *et al.*, 2012).

Du point de vue immunohistochimique, la caractéristique majeure de ces tumeurs est l'appartenance de 70% d'entre elles au phénotype triple négatif (TN) (statut ER-, PR- et

HER2-), les 30% restant exprimant l'un de ces trois récepteurs (de Ruijter TC *et al.*, 2011 ; Ismail-Khan R et Bui MM., 2010). Le terme triple négatif désigne des tumeurs qui n'expriment pas en IHC ni les récepteurs aux estrogènes, ni les récepteurs à la progestérone, ni HER2. Ces tumeurs très agressives, appelées triple négatives, apparaissent préférentiellement chez les jeunes femmes, les femmes afro-américaines et les porteuses de mutations héréditaires sur les gènes BRCA1 et 2 comme c'est le cas pour le phénotype Basal-like (de Ruijter TC *et al.*, 2011 ; Ismail-Khan R et Bui MM., 2010). Comme évoqué précédemment, un grand nombre de tumeurs triple négatives (75%) sont aussi classées comme basal-like et, bien que les 20 à 30% restant appartiennent à d'autres sous-types moléculaires, les deux sont souvent confondus en clinique (de Ruijter TC *et al.*, 2011 ; Ismail-Khan R et Bui MM., 2010). Ces tumeurs sont alors désignées sous le terme « **Basal-like** » **triple négatif**. Elles sont généralement de haut grade mitotique et de grande taille avec une faible expression de Bcl2 ainsi qu'une forte expression de p53 et Ki67, ce qui est spécifique d'un profil agressif (de Ruijter TC *et al.*, 2011). De plus, ces tumeurs forment préférentiellement des métastases au niveau des tissus mous et des viscères, notamment les poumons et le foie, ainsi qu'au niveau du cerveau, mais peu au niveau des os (Ismail-Khan R et Bui MM., 2010 ; Kennecke H *et al.*, 2010 ; Luck AA *et al.*, 2008). Ceci se traduit par un faible taux de survie sans rechute, un temps moyen avant récurrence plus court que pour les autres types de cancers, et un taux de survie sur 5 ans plus élevé que pour les autres phénotypes.

Le sous type « Claudin-Low » est le sous type le plus récemment découvert (depuis 2007). Ce sous type est principalement caractérisé au niveau moléculaire par une faible expression des gènes impliqués dans les jonctions cellulaires tels ceux des claudin-3, -4, -7, de la cinguline, de l'occludine et de l'E-cadherine, d'où son nom de Claudin-Low (Herschkowitz JI *et al.*, 2007 ; Prat A et Perou CM., 2011). Ces tumeurs sont classées comme proche des « Basal-Like », indiquant que ces tumeurs pourraient partager certaines caractéristiques moléculaires. Cependant, contrairement aux « Basal-Like », ce nouveau sous type présente une surexpression de quarante gènes impliqués dans la réponse immunitaire, indiquant une probable infiltration de ces tumeurs par des cellules immunitaires (Prat A *et al.*, 2010 ; Prat A et Perou CM., 2011). Une autre de leur caractéristique est l'expression de gènes liés à la différenciation mésenchymateuse, caractéristique également du phénotype « Cancer Stem Cell » (CSC). En immunohistochimie, 80% de ces tumeurs apparaissent comme triple négatives, les 20% restant exprimant l'un des trois récepteurs (Prat A et Perou CM., 2011).

A-Transporteurs de type ABCB



B-Transporteurs de type ABCG

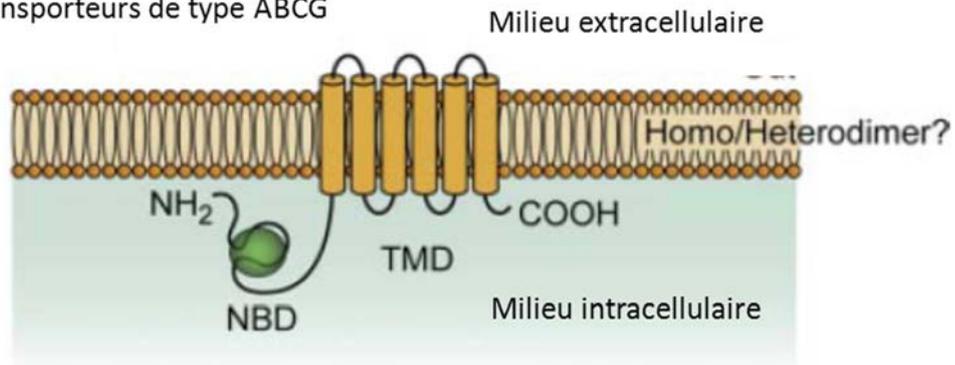


Figure 7 – Structure des Transporteurs de type ABC

A : structure des transporteurs ABC monomériques : exemple des transporteurs de la famille ABCB. **B** : structure d'un monomère des transporteurs ABC dimériques : exemple des transporteurs de la famille ABCG. Les monomères doivent s'associer pour former un homo ou Hétérodimère fonctionnel (Sarkadi B. *et al.*, 2006).

Du point de vue clinique, ces tumeurs représentent 12 à 14% des cas de cancer du sein et sont généralement de haut grade avec un pronostic défavorable (Prat A *et al.*, 2010 ; Prat A et Perou CM., 2011).

B - Les transporteurs « Multidrug Resistance » et la notion de résistance croisée des cellules tumorales

I - Les transporteurs de type ATP Binding Cassette

Les transporteurs de type ATP Binding Cassette (ABC) représentent une large famille de protéines membranaires. Très ubiquitaires, ils sont retrouvés chez tous les organismes vivants et ont pour rôle le transport d'un grand nombre de substrats variés à travers la membrane cellulaire. Ils peuvent prendre en charge des molécules de nature très différente comme des xénobiotiques et leur métabolites endogènes (molécules organiques et inorganiques, cations et/ou anions), ainsi que d'autres substrats endogènes comme les lipides, les sucres/polysaccharides, les acides aminés/peptides/protéines, les anions inorganiques et les vitamines entre autres (Leslie EM *et al.*, 2005 ; Raaijmakers MHGP., 2007 ; Sarkadi B *et al.*, 2006). Sur le génome humain, 49 gènes correspondant aux transporteurs ABC ont été identifiés, mais seulement 47 transporteurs ont été mis en évidence jusqu'à présent (Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Sarkadi B *et al.*, 2006). La comparaison des séquences en acides aminés des différents transporteurs, permet de les classer en 7 sous-familles allant de A à G. Bien que fonctionnant sur le même principe, ces sous familles présentent des structures, des fonctions et des arrangements différents (Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Sarkadi B. et al., 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009).

a - Structure des transporteurs ABC

Chez les mammifères, les transporteurs sont formés de deux types de domaines caractéristiques, (i) le domaine transmembranaire (« transmembrane domain » ou TMD) et (ii) le domaine de liaison à l'ATP (« nucleotide binding domain » ou NBD) (Figure 7), d'où le nom de ATP Binding Cassettes (ABC). Ces deux types de domaines remplissent des fonctions différentes. Ainsi, les TMD sont responsables du transport des substrats en formant un port à travers les membranes, tandis que les NBD fournissent l'énergie pour le transport de ces mêmes substrats en hydrolysant des molécules d'ATP. Ces domaines peuvent être présents

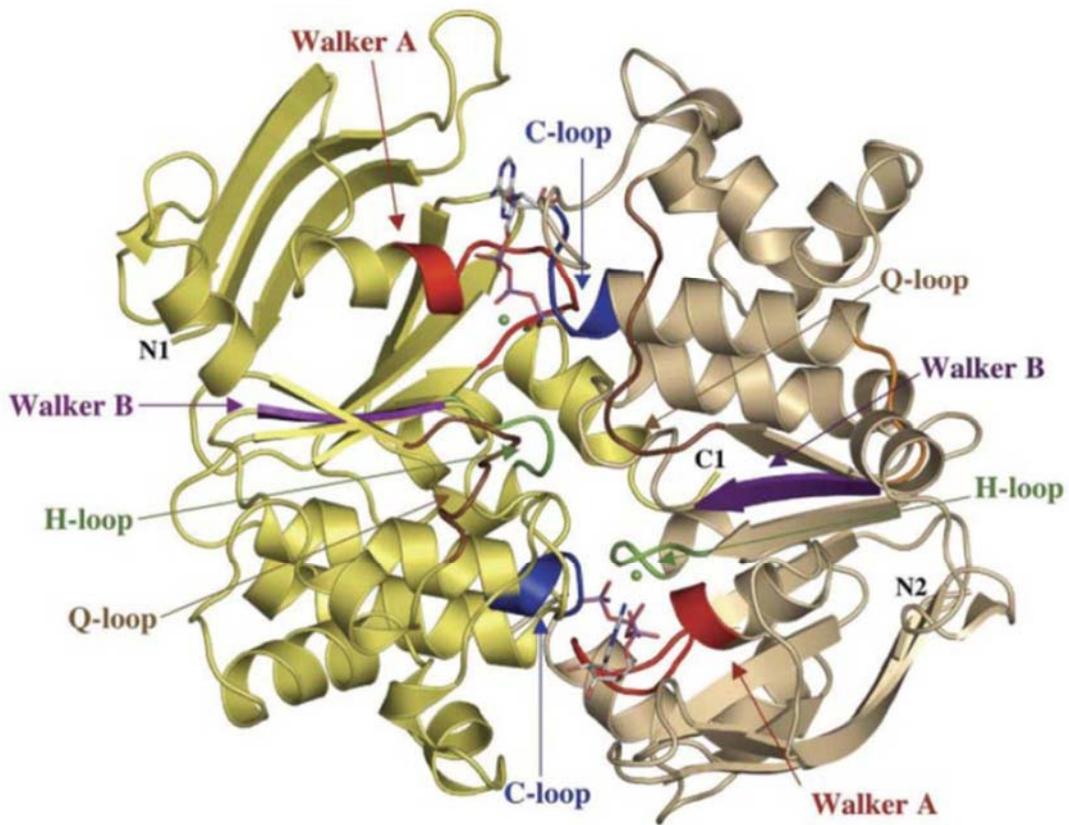


Figure 8 – Structure en trois dimensions des NBD dimérisés du transporteur HlyB

Les motifs conservés sont colorés et nommés en : rouge (Walker A), violet (Walker B), vert (H-loop), marron (Q-loop) et bleu (C-loop) (Sarkadi B. *et al.*, 2006).

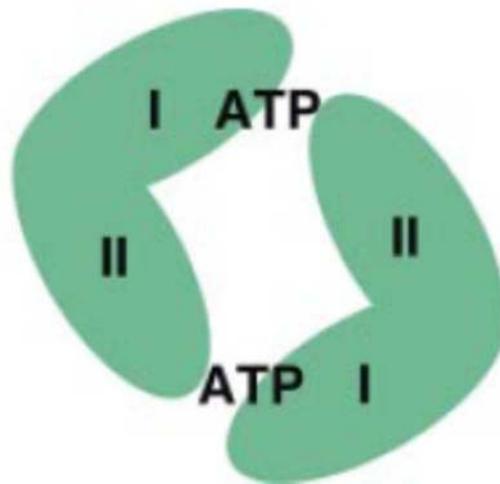


Figure 9 – Représentation schématique des deux NBD en conformation antiparallèle

I : sous domaine "F1-type ATP-binding core" et sous sous-domaine β . II : sous-domaine α . Les deux ATP hydrolysés sont représentés au niveau des deux domaines catalytiques. Les deux domaines catalytiques sont formés par les sous domaines "F1-type ATP-binding core" et β du NBD1 et le sous domaine α du BBD2. (Sarkadi B. *et al.*, 2006).

sur une seule chaîne polypeptidique ou bien, sur deux chaînes polypeptidiques (demi-transporteur) comportant chacune un TMD et un NBD et devant s'associer par deux afin d'être fonctionnels (Hollenstein K *et al.*, 2007 ; Jones PM *et al.*, 2009; Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Leslie EM *et al.*, 2005; Sarkadi B. *et al.*, 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009).

b - Les domaines de liaison à l'ATP

Les domaines de liaison à l'ATP sont responsables de la production de l'énergie nécessaire au transport des molécules grâce à leur activité ATPasique. Leur structure en forme de « L » peut être divisée en trois sous-domaines qui contiennent chacun des motifs très conservés retrouvés chez tous les ABC transporteurs (Hollenstein K *et al.*, 2007 ; Jones PM *et al.*, 2009 ; Sarkadi B. *et al.*, 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009). Le premier sous-domaine est le « F1-type ATP-binding core », il est formé de six feuillets β et porte dans l'ordre (i) les motifs Walker A (P-loop), (ii) le motif Q-loop riche en glycine, (iii) le motif Walker B et (iv) une histidine conservée (His-switch). Le sous-domaine α est formé de quatre hélices α et porte la séquence signature LSGGQ (C-loop), spécifique des transporteurs ABC (Figures 8 et 9). Enfin, le sous-domaine β , qui ne porte pas de motif particulier, forme avec le sous-domaine F1 le lobe le plus large de la protéine (le bras long du « L ») tandis que le sous-domaine α forme seul, le plus petit lobe. Afin d'être actif, les deux domaines NBD se dimérisent avec une conformation antiparallèle (Figure 9) (les sous-domaines F1 et β d'un NBD face au sous-domaine α du deuxième domaine) (Hollenstein K *et al.*, 2007 ; Jones PM *et al.*, 2009 ; Sarkadi B. *et al.*, 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009).

Le cycle d'hydrolyse de l'ATP par les NBD ainsi que son lien avec la translocation des substrats à travers la membrane ne sont pas encore bien définis. En effet, le dimère formé par les deux NBD possède deux sites de fixation où l'ATP viendrait se fixer, engendrant ainsi un changement de conformation des NBD en position fermée (Figure 10). L'ATP est ensuite hydrolysé en ADP et phosphate inorganique (Pi). Cette réaction fournit l'énergie nécessaire à la translocation du substrat à travers la membrane par les TMD (Hollenstein K *et al.*, 2007 ; Jones PM *et al.*, 2009 ; Sarkadi B. *et al.*, 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009). Cependant, bien qu'il a été établi que les deux molécules d'ATP sont hydrolysées l'une après l'autre, il n'a pas encore été déterminé si les produits de ces réactions sont libérés en même temps ou l'un après l'autre. Deux hypothèses sont proposées à ce jour. La première suggère que le changement de conformation engendré par la fermeture du dimère suite à la fixation des molécules d'ATP fournirait l'énergie nécessaire à la translocation du substrat à travers la membrane. Ensuite, c'est l'hydrolyse des deux ATP qui permettrait alors le retour du dimère à

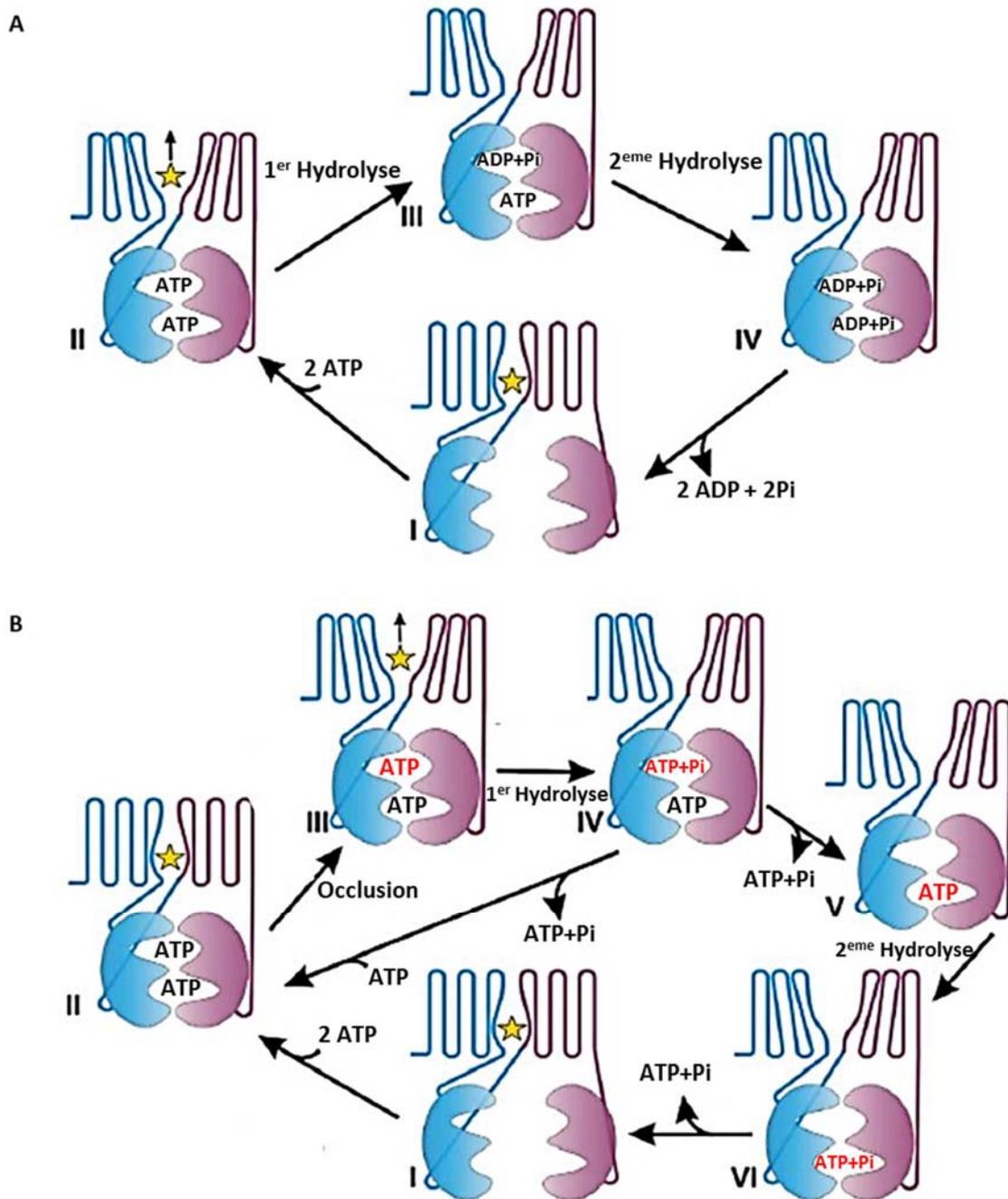


Figure 10 – Représentation schématique des deux modèles d’hydrolyse de l’ATP par les domaines TMD des transporteurs ABC

A : (I) Les deux NBD sont en conformation ouverte tandis qu’un substrat vient se fixer aux NBDs. (II) La fixation de deux ATP sur les sites catalytiques des NBDs entraîne la fermeture de ces derniers et la translocation du substrat. (III et IV) Les deux ATP sont hydrolysés chacun l’un après l’autre. (IV et I) La libération des produits d’hydrolyse entraîne le retour de la protéine à sa conformation initiale. **B :** (I) Les deux NBDs sont en conformation ouverte tandis qu’un substrat vient se fixer aux NBDs. (II) La fixation de deux ATP sur les sites catalytiques des NBDs entraîne la fermeture de ces derniers. (III et IV) Un premier ATP est hydrolysé, permettant la translocation du substrat à travers la membrane. (V et VI) Le deuxième ATP est hydrolysé, permettant le retour de la protéine à sa conformation initiale (I). Pour les deux modèles, l’ordre dans lequel sont hydrolysés les deux ATP est aléatoire (Seeger MA et van Veen HW., 2009).

une conformation « ouverte », libérant ainsi les produits d'hydrolyse. Dans le cadre de la deuxième hypothèse, c'est l'hydrolyse du premier ATP qui entraînerait la translocation du substrat à travers la membrane, suivie de la libération de l'ADP et du Pi produits. La deuxième ATP serait ensuite hydrolysée afin de permettre à la protéine de reprendre sa conformation de départ et ainsi recommencer le cycle (Seeger MA et van Veen HW., 2009).

L'énergie produite lors des changements de conformation des NBD est transmise aux TMD *via* des interactions non covalentes entre le motif Q-loop des NBD et l'extrémité intracellulaire du troisième feuillet α des TMD (Jones PM *et al.*, 2009 ; Sarkadi B. *et al.*, 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009).

c - Les domaines transmembranaires

La structure des TMD est beaucoup moins conservée que celle des NBD. Ceci pourrait s'expliquer par la grande diversité de substrats pris en charge par les différents transporteurs. Ainsi, chez les eucaryotes, les TMD sont formés de six hélices α , mais chez les procaryotes ce nombre peut aller de cinq à dix (Hollenstein K *et al.*, 2007 ; Jones PM *et al.*, 2009). Les deux TMD s'associent pour former un dimère traversant la membrane cellulaire, une extrémité au contact du cytoplasme et l'autre avec le milieu extracellulaire (Figures 7 et 11). Ces protéines sont impliquées dans le transport de nombreux substrats. Les TMD sont donc capables de prendre en charge de nombreuses molécules de structures et de propriétés différentes allant de xénobiotiques, aux produits de métabolisation, en passant par des peptides, des vitamines, le cholestérol ou les ions (Jones PM *et al.*, 2009 ; Sarkadi B. *et al.*, 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009).

Le dimère formé par les TMD possède deux sites de fixation pour les substrats, l'un de forte affinité et l'autre de faible affinité (Figures 10 et 11). Ces deux sites sont reliés par une cavité apolaire formée entre les deux TMD. La translocation du substrat à travers la membrane est permise par le passage de la molécule d'un site à l'autre, cette action étant couplée avec l'hydrolyse des ATP par les NBD. Ainsi, le substrat viendrait se fixer sur le site de forte affinité qui est accessible depuis le cytoplasme. En même temps, les ATP vont être fixés et hydrolysés par les NBD, fournissant ainsi l'énergie nécessaire aux TMD pour changer de conformation. Ce changement entraîne la fermeture du dimère au niveau du cytoplasme et son ouverture sur le milieu extracellulaire. Le substrat serait alors transféré du site de haute affinité vers le site de faible affinité avant d'être relargué dans le milieu extracellulaire. La libération des ATP et l'ouverture des NBD permettent ensuite le retour des TMD à leur conformation initiale (Jones PM *et al.*, 2009 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009).

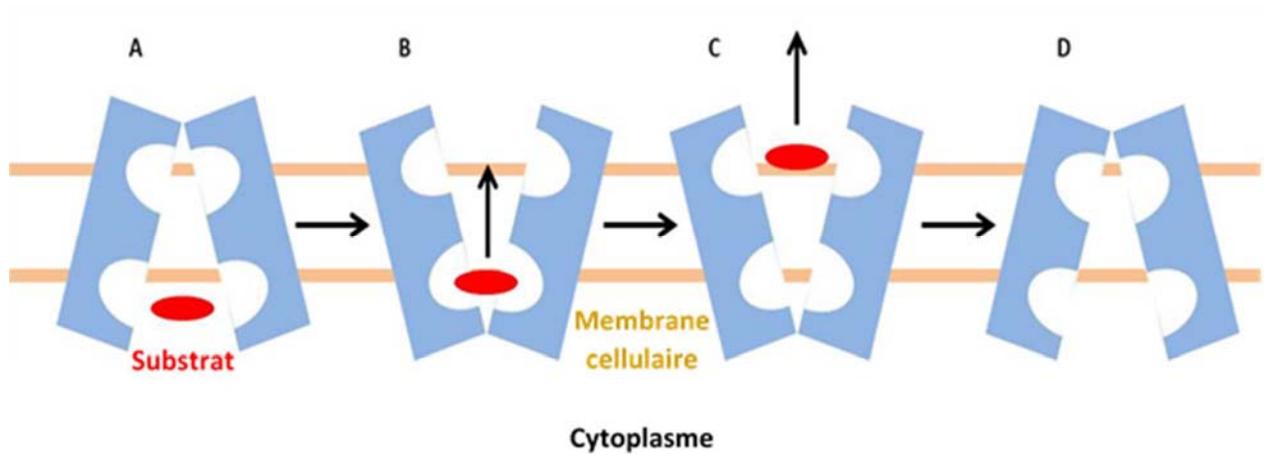


Figure 11 – Représentation schématique du transfert des substrats à travers la membrane par les TMD

A : Un substrat se fixe sur le site de haute affinité des TMDs qui est ouvert sur le cytoplasme. B : Les TMDs changent de conformation, ils se referment sur le cytoplasme et s'ouvrent au niveau du milieu extracellulaire. Le substrat est alors transféré du site de forte affinité au site de faible affinité. C : Le substrat est libéré dans le milieu extracellulaire depuis le site de faible affinité. D : Les TMDs retrouvent leur conformation initiale.

II - Les transporteurs « Multidrug Resistance »

Parmi la superfamille des transporteurs ABC, la classe des protéines « Multidrug Résistances » (MDR) est extrêmement étudiée depuis de nombreuses années. En effet, la notion de « Multidrug Resistance (MDR) » ou la résistance croisée des cellules cancéreuses vis-à-vis des agents anticancéreux est connue depuis très longtemps. Elle se réfère principalement à une surexpression de transporteurs membranaires dans les cellules tumorales qui sont à l'origine de l'efflux des médicaments et donc la chimiorésistance. Dans ce contexte, certaines tumeurs montrent un profil de résistance inhérente, tandis que d'autres développent des résistances au cours du traitement contre un certain nombre de composés chimiothérapeutiques, rendant ainsi le traitement inefficace (Kathawala RJ et al., 2015 ; Sarkadi B *et al.*, 2006).

Les protéines MDR sont extrêmement conservées au cours de l'évolution. En effet, hormis les cellules cancéreuses, elles sont exprimées à l'état naturel dans pratiquement tous les organismes vivants de procaryotes aux mammifères. Ainsi, la présence des transporteurs MDR (gènes/protéines) a été démontrée chez les bactéries et parasites (Gerlach JH *et al.*, 1986 ; Krogstad DJ *et al.*, 1992 ; Bottova I *et al.*, 2009), les protozoaires (Bamdad M *et al.*, 1997 ; 1999 ; 2004) , les invertébrés aquatiques (Kurelec B *et al.*, 1992), le poisson (Zaja R *et al.*, 2007 ; Loncar J *et al.*, 2010 ; Valton *et al.*, 2013 ; 2015), la drosophile (Vaché C *et al.*, 2006 ; 2007), et même chez les végétaux (Dudler R & Sidler M (1998) ; Geisler M *et al.*, 2005). Chez l'homme, ces protéines sont naturellement exprimées dans plusieurs tissus de l'organisme comme la barrière hématoencéphalique du cerveau, la glande surrénale, le pancréas, le foie, le rein, les cellules hématopoïétiques et les cellules souches, entre autres. Les trois principaux types de transporteurs MDR comprennent les sous-familles du ABCB (ABCB1/MDR1/P-glycoprotéine), l'ABCC (ABCC1/MRP1, ABCC2/MRP2, probablement aussi ABCC3-6, et ABCC10-11) et le ABCG (ABCG2/MXR/BCRP) (Glavinas H *et al.*, 2004 ; Kathawala RJ et al., 2015 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006 ; Seeger MA et van Veen HW., 2009). Parmi ces MDR, seuls ABCB1/MDR1/P-glycoprotéine, ABCC10/MRP7 et l'ABCG2/MXR/BCRP présenteraient un intérêt clinique (Kathawala RJ et al., 2015).

En terme fonctionnel, les transporteurs MDR jouent un rôle important de protection à l'échelle cellulaire. En effet, il s'agit de pompes d'efflux membranaire, de type ATPasique, avec un rôle de détoxificateur. Elles expulsent vers le milieu extracellulaire les xénobiotiques entrés passivement ou *via* d'autres transporteurs membranaires dans les cellules. De plus, ces

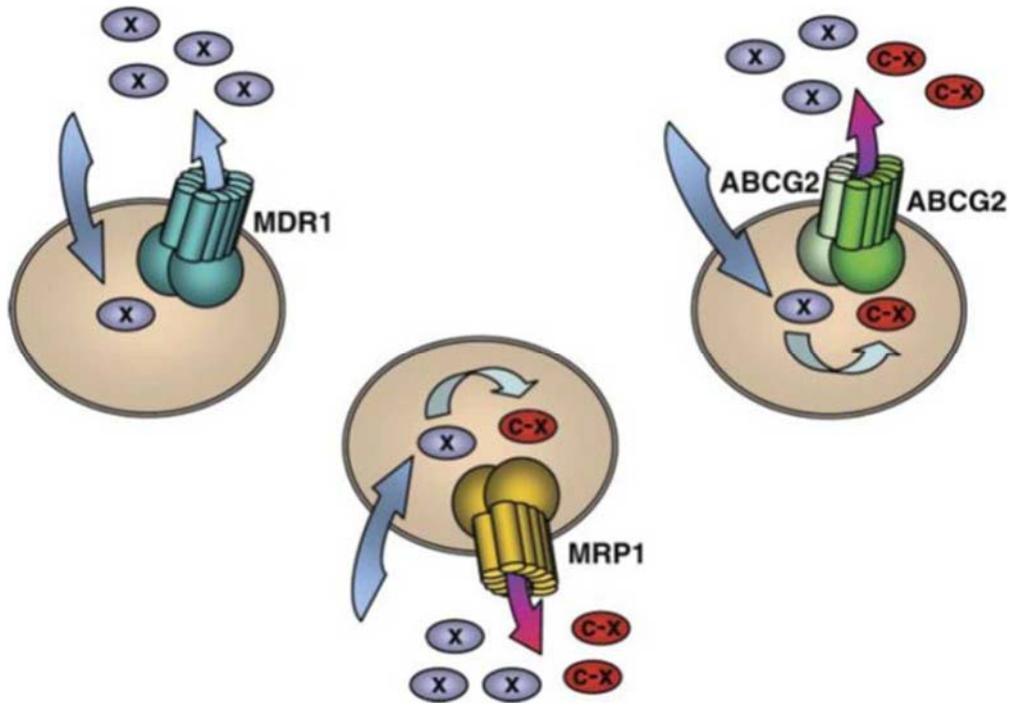


Figure 12 – Type de substrats transportés par des protéines MDR majeures

Les protéines MDR, qui sont localisées au niveau de la membrane cellulaire, expulsent vers le milieu extracellulaire les xénobiotiques entrés dans les cellules. Ces pompes peuvent prendre en charge une large gamme de molécules hydrophobes ou amphipathiques. Ainsi MDR1/ P-gp peut prendre en charge des composés hydrophobes (X) tandis que ABCG2 et MRP1 peuvent prendre en charge ces mêmes composés ainsi que leurs métabolites conjugués (C-X) (Sarkadi B. *et al.*, 2006).

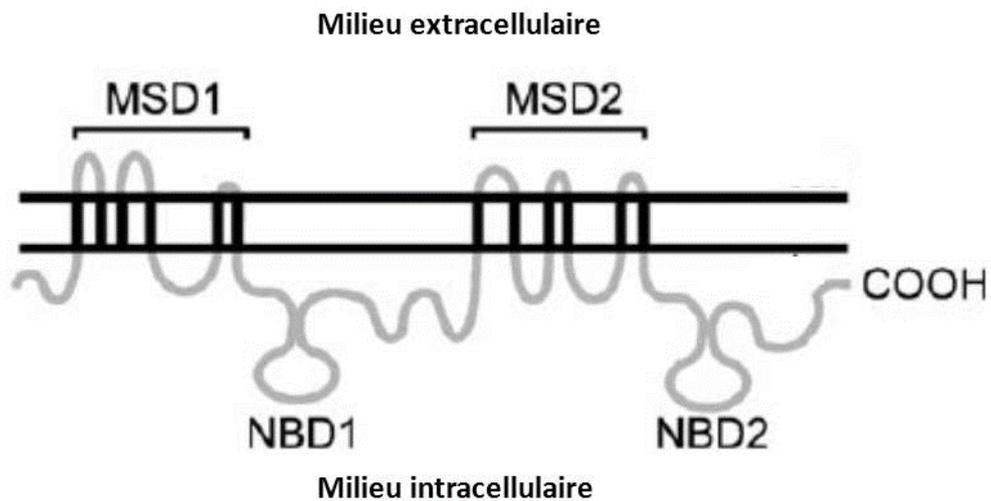


Figure 13 – Structure secondaire de MDR1/P-gp/ABCB1 (Leslie EM *et al.*, 2005)

pompes reconnaissent des molécules de structures et de propriétés très variées (médicaments, polluants, autres...). Il s'agit principalement de composés de type hydrophobe, mais elles sont également capables d'expulser une grande variété de molécules amphipathiques de type anions et/ou cations. A titre d'exemple, ABCB1 expulse préférentiellement vers le milieu extracellulaire, les grosses molécules hydrophobes, tandis que ABCC1 et ABCG2 peuvent transporter des médicaments hydrophobes et/ou de grands composés anioniques de type drogues conjugués (produits de biotransformation intracellulaire) (Figure 12). Par ailleurs, les trois grandes classes de transporteurs MDR présentent également la propriété de reconnaissance de différents substrats par la même protéine. Cette propriété de chevauchement d'affinité des MDR pour les mêmes xénobiotiques limiterait considérablement leurs inhibitions. En effet, si un transporteur est inhibé, une autre protéine MDR pourrait prendre le relais (Glavinas H *et al.*, 2004 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006). Ainsi, les protéines MDR forment à l'échelle cellulaire un véritable réseau de protection à l'encontre des xénobiotiques.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés particulièrement aux deux principaux transporteurs MDR, la « Permeability glycoprotein » ou la P-gp et la « Breast Cancer Resistance Protein » ou la BCRP.

a – « Permeability glycoprotein »

La « permeability glycoprotein » (P-gp) a été le premier transporteur de type MDR découvert chez l'homme et de ce fait, elle est la plus étudiée du point de vue structural et fonctionnel. Membre de la sous famille des ABCB, elle est codée par le gène ABCB1, appelé généralement MDR1, localisé sur le chromosome 7 (Sarkadi B *et al.*, 2006). La P-gp est une glycoprotéine constituée de 1280 acides aminés avec un poids moléculaire de 170 kDa chez l'homme (Sarkadi B *et al.*, 2006).

Du point de vue structural, la P-gp est formée d'une chaîne polypeptidique contenant deux domaines transmembranaires (TMD) et deux domaines de liaisons nucléotidiques (NBD) avec un arrangement de type: TMD-NBD-TMD-NBD (Figure 13). La P-gp reconnaît une large gamme de substrats, notamment des composés hydrophobes et des composés amphipathiques avec un haut poids moléculaire et contenant des domaines aromatiques. Ce profil recouvre de nombreux xénobiotiques tels les médicaments anticancéreux (Glavinas H *et al.*, 2004 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006 ; Kathawala RJ *et al.*, 2015).

La P-gp est l'une des principales protéines impliquées dans les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses. Cette activité de détoxification est d'autant plus renforcée que ces

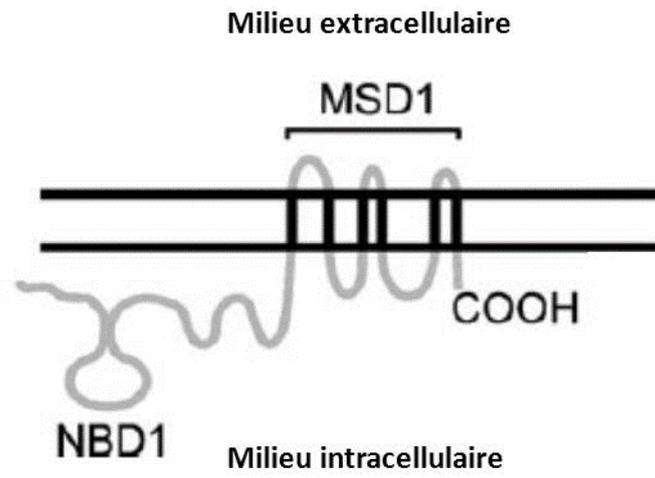


Figure 14 – Structure secondaire de BCRP/ABG1 (Leslie EM *et al.*, 2005).

médicaments peuvent être pris en charge par la P-gp directement dans l'espace périplasmique, évitant ainsi leur entrée dans les cellules tumorales (Glavinas H *et al.*, 2004 ; Jones P.M. *et al.*, 2009 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006 ; Kathawala RJ *et al.*, 2015).

b – « Breast Cancer Resistance Protein »

La « Breast Cancer Resistance Protein » (BCRP) est une glycoprotéine constituée de 655 acides-aminés codée par le gène ABCG2, situé sur le chromosome 4. Elle se distingue du transporteur décrit précédemment de par sa structure dimérique formée de deux monomères associés par des ponts disulfures (Glavinas H *et al.*, 2004 ; Jones P.M. *et al.*, 2009 ; Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006). Ces monomères possèdent chacun un TMD à leur extrémité COOH et un NBD à leur extrémité NH₂ (Figure 14). Ainsi la forme active de tous les transporteurs ABCG est un dimère pouvant être formé de deux sous unités différentes (hétérodimère) ou homologues (homodimère). Cependant, dans les cellules humaines, la majorité des transporteurs rencontrés sont des homodimères. La BCRP est aussi extrêmement glycosylée et de type tissu dépendant. Cependant, il a été démontré que le taux de ces glycosylations n'impactait pas le bon fonctionnement de ces protéines. Les substrats cibles de la BCRP sont des molécules hydrophobes et/ou des molécules chargées positivement ou négativement et amphiphiles avec un haut poids moléculaire comme c'est le cas de nombreux anticancéreux (ex : le mixantrone, le topotecan, le flavopiridol, entre autres...) ainsi que leurs métabolites (ex : le methotrexate). Elle pourrait également prendre en charge l'efflux d'autres xénobiotiques comme des antibiotiques (nitrofurantoin), divers flavonoïdes, des hydrocarbures aromatiques polycycliques et leurs métabolites, ainsi que des métabolites de composés endogènes tels que les métabolites sulfatés d'hormones (Glavinas H *et al.*, 2004 ; Jones P.M. *et al.*, 2009 ; Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006).

III- Les transporteurs MDR et les cellules tumorales

La chimiorésistance des cellules tumorales médiée par les protéines MDR peut être un mécanisme inné ou acquis. Dans le premier cas, les cellules tumorales surexpriment naturellement les protéines MDR, montrant d'emblée une résistance intrinsèque aux médicaments. Dans le deuxième cas, les tumeurs vont développer progressivement au cours du traitement une résistance acquise. Ainsi, dans un premier temps, les médicaments anticancéreux arrivent à éliminer la majorité des cellules tumorales. Néanmoins, suite à des mutations et sélections successives des cellules malignes au cours du traitement, des cellules

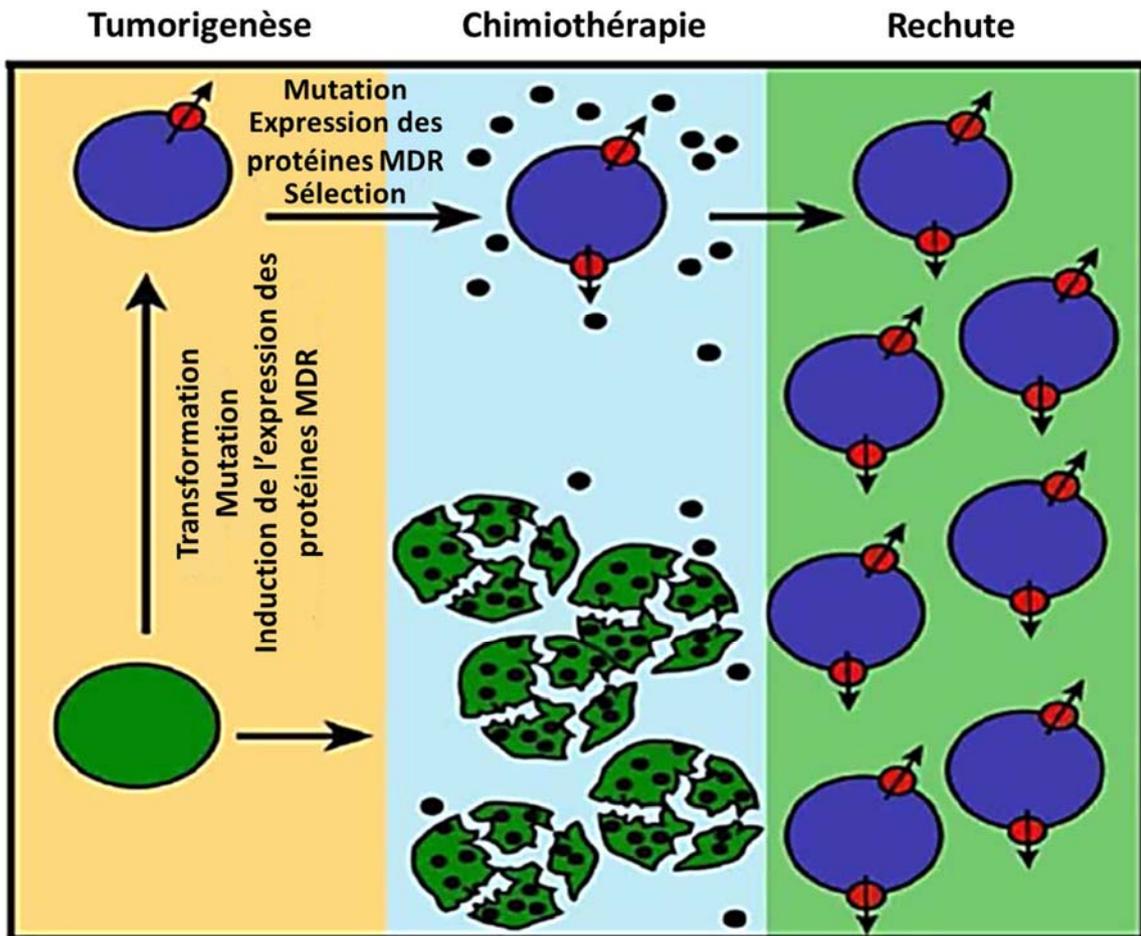


Figure 15 – Evolution vers le phénotype « Multidrug Resistance » (MDR)

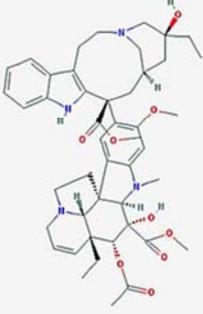
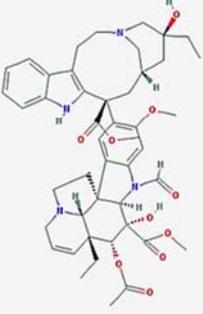
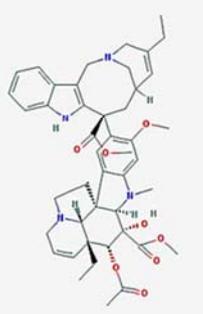
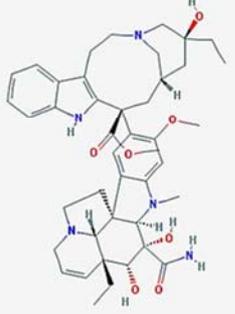
Les cellules tumorales ne surexprimant pas les ABC transporteurs sont éliminées par la chimiothérapie. Au cours du traitement, les cellules résistantes surexprimant les transporteurs MDR seront donc sélectionnées, renforçant ainsi leur défense face aux chimiothérapeutiques et engendrant par la suite une rechute de la maladie. (Sarkadi B. *et al.*, 2006).

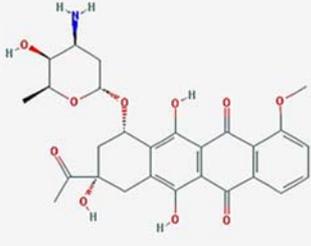
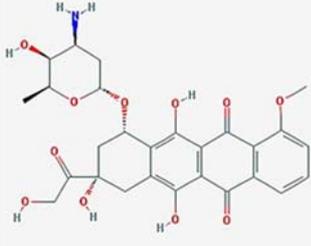
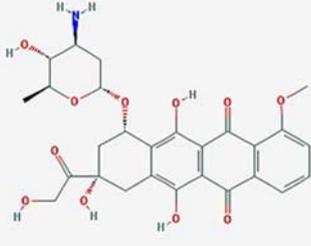
tumorales résistantes peuvent émerger. Ces dernières présentent souvent une meilleure adaptabilité à l'environnement hostile (hypoxie et/ou inflammation) et une surexpression des protéines MDR, rendant ainsi le traitement inefficace. Ce mécanisme est souvent l'origine d'une récurrence (Figure 15) (Glavinas H *et al.*, 2004 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006).

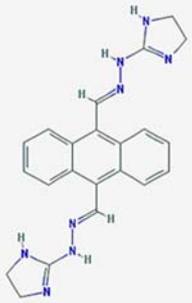
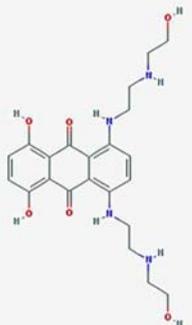
Les anticancéreux sont des substrats cibles des protéines MDR. En effet, la P-gp et la BCRP peuvent reconnaître et expulser hors de la cellule de nombreux anticancéreux de classes différentes. A titre d'exemple, la P-gp reconnaît des anthracyclines (Daunorubicine, Doxorubicine, Epirubicine), des anthracènes (Bisantrene, Mitoxantrone), des Vinca-alcaloïdes (Vinblastine, Vincristine, Vinorelbine, Vindesine) ou bien des taxanes (Paclitaxel, Docetaxel) (Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Sarkadi B *et al.*, 2006) (Tableau 3). Quant à la BCRP, elle peut prendre en charge le methotrexate, le flavopiridol, le topotecan et le mitoxantrone. Cependant, l'affinité de la BCRP pour ces substrats peut être modifiée par des mutations, dont la plus connue est le remplacement d'un résidu Arginine par un résidu Glycine, en position 482 sur la chaîne polypeptidique. Ce variant ne reconnaît plus la methotrexate mais peut par contre expulser la doxorubicine, la daunorubicine et l'épirubicine (Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Sarkadi B *et al.*, 2006) (Tableau 4). Ainsi, la gamme des substrats pris en charge par ces deux protéines couvre le spectre des différents anticancéreux classiques utilisés en clinique, rendant ces traitements inefficaces sur les cellules cancéreuses.

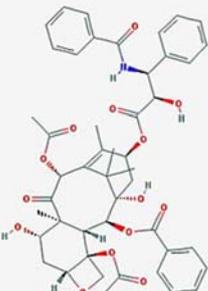
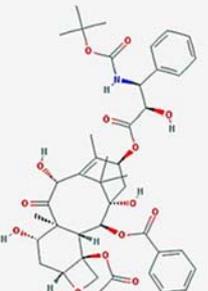
Afin de parer au problème que pose l'efflux des médicaments anticancéreux par des protéines MDR majeures, engendrant ainsi la résistance des cellules tumorales, de nombreux travaux ont été menés afin de développer de nouvelles thérapies pouvant bloquer ou inactiver ces transporteurs (Kathawala RJ *et al.*, 2015). La première génération d'inhibiteurs découverte comprenait la Vérapamil, la Cyclosporine A et la Quinine. Cependant, bien qu'efficaces en préclinique, ces molécules ne semblent pas être efficaces en clinique. Une deuxième génération de composés plus spécifiques des transporteurs MDR a ensuite été développée, avec notamment le Valspodar et le Biricodar. Bien que plus efficaces en préclinique, lorsque utilisées en combinaison avec la chimiothérapie classique, que les molécules de première génération, ces thérapies n'étaient toujours pas efficaces en clinique. De plus, ces composés entraînent un ralentissement de l'activité de détoxification hépatique, engendrant ainsi une toxicité systémique pour les patients (Kathawala RJ *et al.*, 2015). Afin de contourner ces problèmes, une approche *in silico* a été utilisée afin de synthétiser une troisième génération d'inhibiteurs très spécifique des protéines MDR impliquées dans la chimiorésistance. Bien qu'efficaces et moins toxiques lorsque utilisés en clinique, ces

Tableau 3 – Chimiothérapies classiques substrats de la P-gp (Kathawala RJ *et al.*, 2015)

Vinca-alcoïdes			
Vinblastine	Vincristine	Vinorelbine	Vindesine
			

Anthracyclines		
Daunorubicine	Doxorubicine	Epirubicine
		

Anthracenes	
Bisantrene	Mitoxantrone
	

Taxanes	
Paclitaxel	Docetaxel
	

inhibiteurs présentent le désavantage de cibler principalement la P-gp, laissant les autres protéines libres d'agir (Kathawala RJ *et al.*, 2015).

IV- Les transporteurs MDR et les traitements ciblés

Afin de cibler plus efficacement les cellules tumorales et d'atténuer les effets secondaires dus à la toxicité des médicaments anticancéreux, des travaux de recherches ont été menés afin de développer des thérapies ciblées exploitant les différences biologiques entre les cellules saines et les cellules cancéreuses. Ces molécules ciblent spécifiquement des protéines ou des mécanismes impliqués dans le développement des cellules cancéreuses, comme un récepteur ou un facteur de croissance. Ces médicaments qui cibleraient préférentiellement des cellules tumorales seraient donc théoriquement moins agressifs pour les cellules saines et engendreraient moins d'effets secondaires pour le patient (Anreddy N *et al.*, 2014 ; Kathawala RJ *et al.*, 2015). Ces molécules peuvent ainsi viser les mécanismes de l'angiogenèse, les récepteurs HER1 / HER2, ou la voie de signalisation mTOR. L'un des mécanismes d'action de ces thérapeutiques ciblées est l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de leur cible, ces molécules sont alors appelées inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). Or, des études *in vitro* ont mis en évidence que plusieurs ITK inhibaient l'activité et/ou l'expression de certains transporteurs MDR (Tableau 5) (Anreddy N *et al.*, 2014 ; Kathawala RJ *et al.*, 2015).

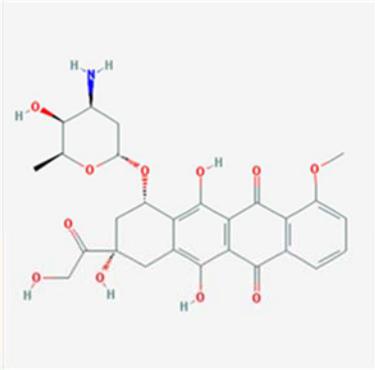
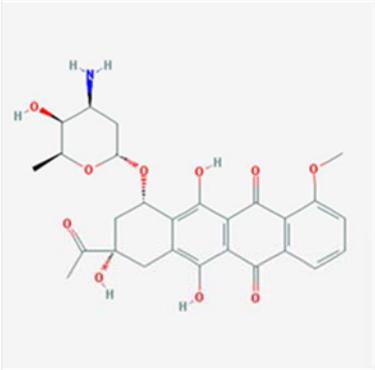
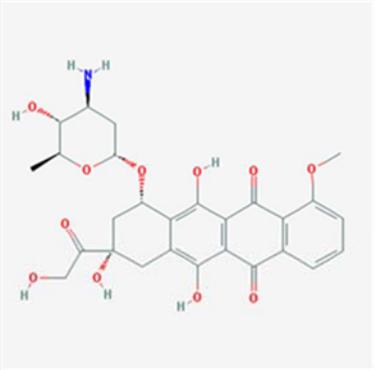
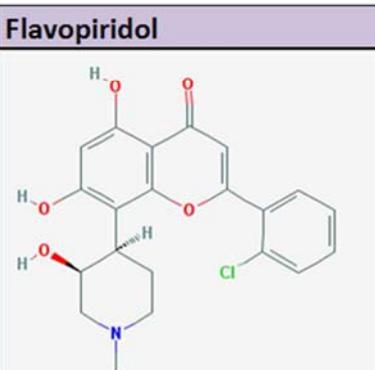
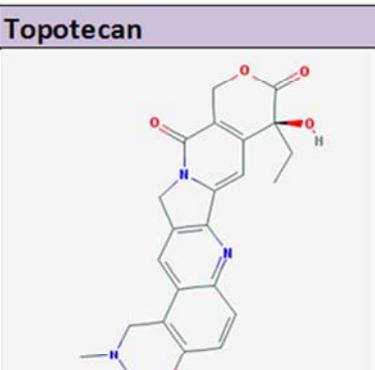
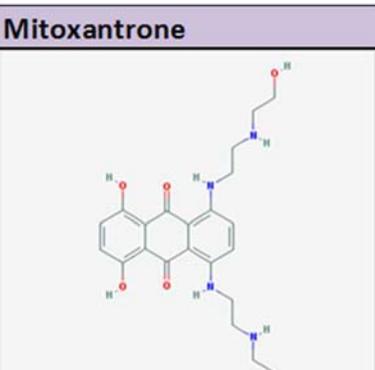
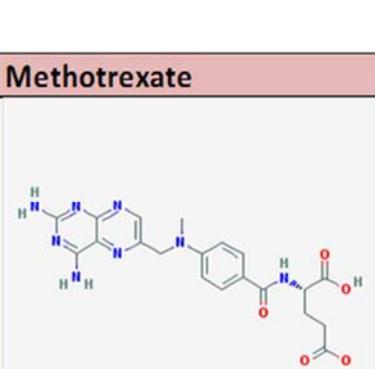
Ainsi, des lignées cellulaires résistantes (cancer du rein, du poumon, du sein de la peau,...), surexprimant la P-gp ainsi que la BCRP et traitées avec soit de l'Imatinib, du Lapatinib, de l'Erlotinib, du Gefitinib ou du Sunitinib, redeviennent sensibles aux traitements de chimiothérapies classiques (Anreddy N *et al.*, 2014 ; Kathawala RJ *et al.*, 2015).

Ces résultats démontrent qu'il serait intéressant d'étudier le comportement des protéines MDR, tel que la P-gp et la BCRP, chez les cellules cancéreuses traitées avec ces nouvelles thérapies ciblées. Cette approche permettrait de déterminer si ces molécules ont une action sur l'expression et/ou l'activité de ces transporteurs, et sur l'apparition de résistances chez la tumeur. Parmi les thérapies ciblées en cours de recherche clinique, la classe des anti Poly(ADP-ribose) polymérase (anti-PARP), est particulièrement intéressante pour le traitement du cancer du sein basal-like « triple négatif ».

V - Les inhibiteurs de Poly(ADP-ribose) polymérase

Les inhibiteurs de Poly(ADP-ribose) polymérase (anti-PARP1) sont une classe de thérapie ciblée qui utilise le principe de la « létalité synthétique ». Ce concept désigne la

Tableau 4 – Chimiothérapies classiques substrats de la BCRP (Kathawala RJ et al., 2015 ; Sarkadi B et al., 2006).

	Doxorubicine	Daunorubicine	Epirubicine
A			
	Flavopiridol	Topotecan	Mitoxantrone
B			
	Methotrexate		
C			

A : Substrats reconnus par l'un des variants de la BCRP intitulé mutant R482G. **B** : Substrats reconnus par le variant R482G et la forme sauvage de la BCRP. **C** : Substrats reconnus par la forme sauvage de la BCRP (Kathawala RJ et al., 2015 ; Sarkadi B et al., 2006).

création d'un phénotype létal suite à l'apparition de mutations dans deux gènes ou plus. Ainsi, deux gènes A et B sont synthétiques létaux si l'apparition de mutations sur l'un des deux ne change pas la viabilité de la cellule, alors que l'apparition de mutations sur les deux est létale (Fang B., 2014). Cette approche concerne principalement les processus cellulaires assurés par au moins deux voies génétiques distinctes. La perte de l'une des voies n'est pas mortelle pour la cellule, comme c'est le cas chez les cellules cancéreuses où de nombreux mécanismes et voies de signalisations sont inactivés, mais les processus cellulaires auxquels ils participent sont assurés par une deuxième voie. Toutefois, l'inhibition de cette deuxième voie, par exemple par des inhibiteurs spécifiques, est mortelle pour les cellules (Fang B., 2014) (Figure 16). C'est sur ce principe qu'est basée l'action ciblée des inhibiteurs de la protéine PARP autrement appelés anti-PARP. En effet, la protéine PARP est une enzyme qui intervient dans le mécanisme de réparation de l'ADN dit par excision de base (BER) et permet l'activation de ce dernier lors de l'apparition de cassures simple brin (Carey LA., 2011 ; Fang B., 2014 ; Lee JM *et al.*, 2014 ; Menear KA *et al.*, 2008). Plus précisément, PARP1 est un intermédiaire qui a pour rôle de signaler et d'assister la réparation des cassures d'ADN simple brins, en se fixant sur l'une des extrémités des cassures grâce à son domaine de liaison en « doigts de zinc ». A l'aide de NAD⁺, PARP1 va alors synthétiser de longues chaînes interconnectées de poly(ADP-ribose) qu'il va greffer sur lui-même ainsi que sur les protéines qui entourent la cassure sur laquelle il s'est fixé. Cette auto poly(ADP-ribosylation) permet le recrutement des enzymes de la voie BER nécessaires pour la réparation de la cassure (Fang B., 2014 ; Lee JM *et al.*, 2014 ; Menear KA *et al.*, 2008). L'inhibition de cette protéine aurait pour conséquence l'inhibition de la voie BER et l'accumulation de cassures simple brin le long de l'ADN génomique. Ces cassures vont bloquer la fourche de réplication de l'ADN, provoquant l'effondrement du complexe de réplication et la dégénérescence des cassures simple brin en cassures double brin (Carey LA., 2011 ; Fang B., 2014 ; Lee JM *et al.*, 2014 ; Menear KA *et al.*, 2008). Chez les cellules saines, cette inhibition n'est pas problématique, les nouvelles cassures double brin seraient prises en charge par un mécanisme de réparation dit par recombinaison homologue (HR). Ce dernier utilise un brin d'ADN intact comme modèle afin de réparer le brin endommagé sans créer d'erreur. Ce mécanisme fait appel à deux protéines essentielles, la BRCA 1 et la BRCA 2. La protéine BRCA1 est un intermédiaire qui vient se fixer sur l'une des extrémités des cassures d'ADN afin de recruter les enzymes nécessaires pour les réparer, tandis que la protéine BRCA2, dont le rôle n'est pas encore bien défini, intervient dans la réparation en transportant jusqu'à la cassure la protéine RAD51 recombinase (Fang B., 2014 ; Lee JM *et al.*, 2014 ; Menear KA *et al.*, 2008). Le complexe BRCA2-RAD51

Tableau 5 - Effet de différents ITK sur l'accumulation et l'efflux de différents anticancéreux substrats des transporteurs MDR et sur l'expression des transporteurs MDR.

Composés (concentrations utilisées)	Transporter MDR inhibés	Effet sur l'accumulation de médicaments anticancéreux	Effet sur l'efflux des anticancéreux substrats des transporteurs MDR	Effet sur l'expression des transporteurs MDR
Anti BCR-ABL (Breakpoint cluster region-abelson)				
Imatinib (STI571) (1, 2.5 and 5 M)	ABCB1, ABCC10, ABCG2	↑	↓	↔
Nilotinib (AMN107) (1, 2.5 and 5 M)	ABCB1, ABCC10, ABCG2	↑	↓	↔
Ponatinib (0.1, 0.25 and 0.5 M)	ABCB1, ABCC10, ABCG2	↑	↓	↓
Anti EGFR (Epidermal growth factor receptor)				
Icotinib (1 and 5 M)	ABCG2	↑	↓	↔
Lapatinib (GW-572016) (0.625, 1.25 and 2.5 M)	ABCB1, ABCC10, ABCG2	↑	↓	↔
Erlotinib (OSI-774) (0.625, 1.25 and 2.5 M)	ABCB1, ABCC10, ABCG2	↑	↓	↔
AST1306 (0.25 and 1 M)	ABCG2	↑	↓	↔
WHI-P154 (1 and 4 M)	ABCG2	↑	↓	↔
Gefitinib (1 M)	ABCB1, ABCG2	↑	↓	↔
Canertinib (8 M)	ABCB1, ABCG2	↑	↓	↔
Anti VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor)				
Telatinib (1 M)	ABCG2	↑	↓	↔
Motesanib (1 and 3 M)	ABCB1, ABCG2	↑	↓	↔
Vandetanib (10 M)	ABCB1, ABCC1, ABCG2	↑	↓	↔
Sunitinib (0.625, 1.25 and 2.5 M)	ABCB1, ABCG2	↑	↓	↔
Sorafenib (BAY43-9006) (10 M)	ABCC10, ABCC11	↑	↓	N/A
Autre Inhibiteurs de tyrosine kinases				
Masitinib (0.625, 1.25 and 2.5 M)	ABCC10, ABCG2	↑	↓	↔
Linsitinib (1 and 2 M)	ABCC10, ABCG2	↑	↓	↔
Crizotinib (0.375, 0.75 and 1.5 M)	ABCB1	↑	↓	↔
Vemurafenib (PLX4032) (5 and 20 M)	ABCB1, ABCC10, ABCG2	↑	↓	↔

(↑): augmentation; (↓): diminution; (↔): pas de changement significatif; (N/A): non mesurable. D'après Kathawala RJ *et al.*, 2015.

recherche dans un premier temps sur un brin d'ADN intact la séquence homologue de la séquence endommagée. Ensuite, dans un deuxième temps, il maintient les deux brins ensemble durant la réparation par recombinaison homologue (Sung P et al., 2003). Par conséquent, toute mutation inhibant l'activité ou l'expression des protéines BRCA1 et 2 entraînerait l'arrêt de cette voie de réparation. Or, dans le cas des cancers « Basal-like » triple négatif, les gènes codant pour les protéines BRCA 1 et 2 portent, dans la majorité des cas, une mutation inhibant l'activité de ces protéines. La seule voie encore active pouvant alors réparer les cassures double brin est la voie NHEJ (Nonhomologous end-joining) (Fang B., 2014 ; Lee JM *et al.*, 2014 ; Menear KA *et al.*, 2008). Cette dernière permet une réparation sans erreur des cassures double brin si les deux extrémités de la cassure ne sont pas endommagées, mais dans le cas où des nucléotides ont été endommagés ou perdus, la réparation sera possible mais comportera des erreurs. Ainsi, dans les cellules BRCA mutées, les cassures double brin seront bien réparées par le système NHEJ mais avec formation d'erreurs. L'accumulation de ces dernières sur le génome au fil des réparations, engendrerait une instabilité génétique entraînant à terme la mort cellulaire par apoptose. Dans ce cas, l'inhibition de BER par des inhibiteurs de PARP, va entraîner chez les cellules cancéreuses l'augmentation du nombre d'erreurs sur le génome, aboutissant à l'entrée en apoptose des cellules tumorales (Figure 17) (Carey LA., 2011 ; Fang B., 2014 ; Lee JM *et al.*, 2014 ; Menear KA *et al.*, 2008). De plus, ce traitement devrait ainsi être inoffensif pour les cellules saines, ces dernières portant un ou deux allèles fonctionnels des gènes BRCA 1 et/ou 2, et pouvant ainsi réparer les cassures double brin sans erreurs. PARP1 représente alors une cible de choix dans le traitement des tumeurs « Basal-like » triple négatives portant une ou des mutations sur BRCA. De ce fait, à l'heure actuelle, de nombreux laboratoires pharmaceutiques développent des inhibiteurs de PARP, dont certains sont en phase d'essais cliniques (Tableau 6). C'est le cas pour l'Olaparib étudié au sein de notre laboratoire, un anti PARP a été homologué et mis sur le marché récemment pour le traitement du cancer l'ovaire.

Cependant, malgré le grand intérêt de ce type de thérapie, plusieurs mécanismes de résistance ont été identifiés par des approches *in vitro* et *in vivo*. Ces mécanismes peuvent mettre en jeu des mutations secondaires des gènes BRCA 1 et 2, la perte d'expression de la protéine PARP, ou bien la surexpression des protéines MDR. En effet, dans ce dernier cas et comme dit précédemment, les protéines MDR, et notamment la P-gp et la BCRP, sont l'une des causes majeures de résistance des cellules tumorales aux traitements. Cependant, il existe à ce jour peu de données dans la littérature sur l'implication des protéines MDR chez les tumeurs triple négatives. Par ailleurs, concernant l'anti-PARP Olaparib, il a déjà été démontré

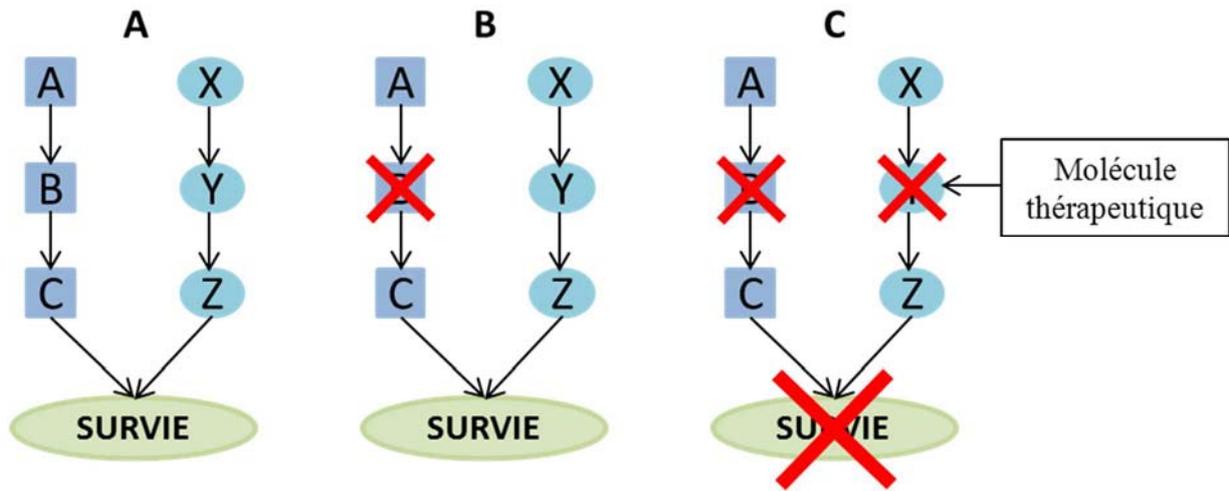


Figure 16 – Principe de la létalité synthétique

A : Un processus cellulaire vital est régulé par deux voies cellulaires différentes composées respectivement de A, B, C et X, Y, Z. **B :** L'inactivation de l'une des deux voies n'est pas suffisante pour entraîner l'arrêt du processus, celui-ci est toujours régulé par la voie toujours active. **C :** Même cas qu'en **B**, mais la deuxième voie est inhibée par une molécule thérapeutique. La fonction cellulaire n'est plus régulée et n'assure plus son rôle, entraînant la mort de la cellule (Fang B., 2014).

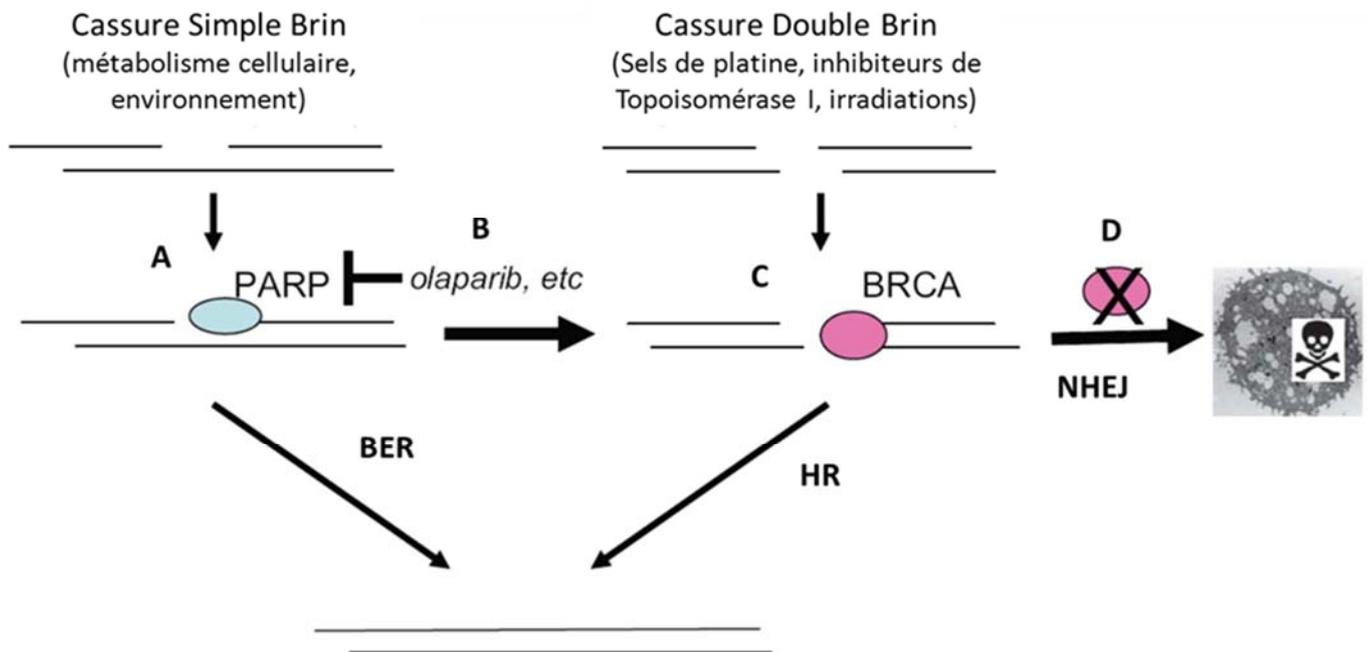


Figure 17 – Principe de fonctionnement des inhibiteurs de PARP dans les cellules BRCA déficientes

A : Des cassures simple brin se forment sur l'ADN génomique des cellules, celles-ci sont signalées par la protéine PARP qui se fixe dessus puis sont réparées par le mécanisme BER. **B :** En présence d'inhibiteur de PARP, les cassures simple brin ne sont pas réparées par le système BER et dégénèrent en cassure double brin. **C :** La protéine BRCA se fixe sur les cassures double brin permettant leur réparation grâce au mécanisme par recombinaison homologue. **D :** En absence de protéine BRCA fonctionnelle, comme c'est le cas chez les cellules BRCA mutées, les cassures double brin sont réparées par le mécanisme NHEJ. Le mécanisme NHEJ étant peu fidèle, des erreurs s'accumulent sur le génome, provoquant l'entrée de la cellule en apoptose (Annunziata C.M et al. 2010). BER : Base excision repair, HR : Homologous recombination, NHEJ : non-homologous end joining.

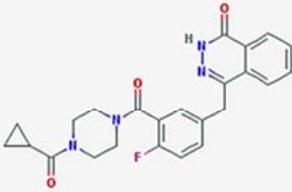
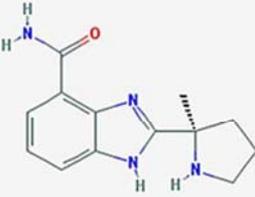
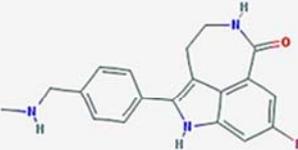
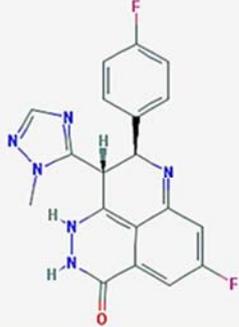
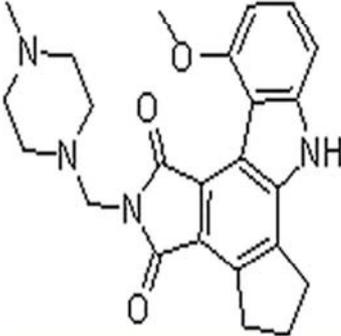
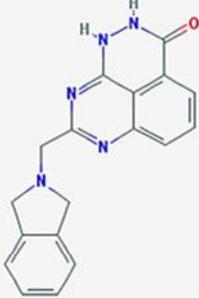
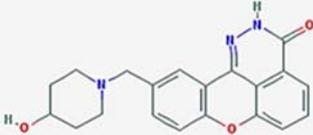
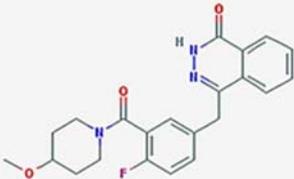
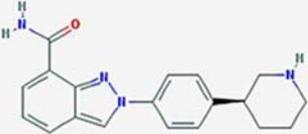
qu'il est reconnu par la P-gp chez la lignée du cancer de l'ovaire IGROVCDDP, des lignées « Multidrug » résistantes KB-8-5-11 (Lawlor D *et al.*, 2014 ; Rottenberg S *et al.*, 2008) et des lignées de cancer du sein portant une mutation sur les gènes BRCA. De plus, chez des modèles de souris porteuses de tumeurs triple négatives, l'augmentation de l'expression du gène *Abcb1a/b* dans les tumeurs, engendrerait une résistance à l'Olaparib (Rottenberg S *et al.*, 2008).

C – Une nouvelle approche de modélisation *in vitro* : la culture cellulaire en trois dimensions

I - La culture cellulaire

En cancérologie, les techniques de cultures cellulaires servent d'outils permettant d'étudier, d'une part, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'apparition et la propagation des cellules cancéreuses, et d'autre part, de réaliser un dépistage de nouvelles molécules cytotoxiques à usage thérapeutique. En effet, cette technologie permet de tester rapidement l'action d'un grand nombre de composés anti-cancéreux en conditions *in vitro* et ainsi limite le nombre d'expériences *in vivo* nécessaires à la validation de nouveaux anti-cancéreux. Elles présentent ainsi l'avantage d'abaisser les coûts des recherches pharmaceutiques, les expériences *in vivo* étant coûteuses. Cependant, la grande majorité de ces expériences sont réalisées sur des modèles de culture cellulaire en deux dimensions (2D). Bien que leur utilité dans l'étude des mécanismes cellulaires et le screening de drogues cytotoxiques soit indéniable, ces modèles restent cependant très éloignés des modèles de tumeur *in vivo* (Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010 ; Chwalek K. *et al.*, 2014 ; Nyga A. *et al.*, 2011). En effet, le modèle de culture cellulaire en 2D ne permet pas de mimer (i) les interactions intercellulaires, avec les échanges de facteurs de croissances et de nutriments, (ii) la synthèse de la matrice extracellulaire, essentielle à la stabilité des tumeurs et à la régulation des fonctions cellulaires, (iii) les différents gradients qui se mettent en place au sein des tumeurs (pression en oxygène, concentration en nutriments, pH...) et les stratégies d'adaptation métabolique mises en place par les cellules pour y faire face, et enfin (iv) les interactions avec le milieu tumoral (cellules non cancéreuses, système immunitaire, vascularisation, ...) (Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010 ; Kim JB., 2005 ; Nyga A. *et al.*, 2011). De plus, les cellules cultivées en monocouche, en contact direct avec le milieu de culture, ont uniformément et

Tableau 6 – Anti-PARP en cours d'essais.

Olaparib (AZD2281)	Veliparib (ABT-888)	Rucaparib (PF-0136738)	Talazoparib (BMN-673)
			
CEP-9722	E7449	E7016	AZD2461
			
Niraparib (MK-4827)	BGB290	JPI-289	Fluzoparib
	Structure non disponible	Structure non disponible	Structure non disponible

Données recueillies sur le site clinicaltrials.gov avec les mots clés « anti-PARP » et « PARP inhibitor ». Dernière connexion le 17/11/2015.

facilement accès aux nutriments, contrairement aux masses cellulaires compactes que l'on retrouve *in vivo*. Dans ces conditions, les cellules dans des cultures en 2D se développeraieent plus rapidement que dans des tumeurs où ces conditions ne sont retrouvées qu'à la périphérie des masses tumorales. Par ailleurs, et pour les mêmes raisons, les cultures en 2D sont plus facilement accessibles aux molécules testées, ce qui les rend plus sensibles aux traitements et biaise ainsi les résultats (Kim JB., 2005 ; Nyga A. *et al.*, 2011). De plus, *in vivo*, le statut métabolique ainsi que la régulation du cycle cellulaire peuvent varier en fonction de la localisation des cellules au sein des tumeurs, ce qui impacte leur réponse aux différents traitements utilisés. Ce phénomène n'est pas retrouvé dans les cultures en monocouche (Desoize B. *et al.*, 2000 ; Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015). Par conséquent, les observations et les résultats obtenus par la technique traditionnelle de culture cellulaire en deux dimensions sont très éloignés de ceux retrouvés *in vivo*, limitant la valeur prédictive de cette approche pour, par exemple, la recherche de nouvelles molécules cytotoxiques, ou bien l'étude des interactions intercellulaires.

Ces limites ont alors amené la communauté scientifique à développer de nouvelles stratégies de cultures cellulaires, et notamment la culture cellulaire en trois dimensions (culture 3D). Celle-ci pourrait fournir des conditions plus proches de celles retrouvées *in vivo*, et donc améliorer la pertinence des prédictions dans les études de modélisation *in vitro* ainsi que dans le screening de nouvelles molécules thérapeutiques (tableau 7) (Lama R. *et al.*, 2013, Nyga A. *et al.*, 2011).

II – La culture cellulaire en trois dimensions (3D)

a – Principe de la culture en trois dimensions

La culture cellulaire en 3D consiste à cultiver *in vitro* des cellules dans une conformation proche de celle retrouvée *in vivo*, dans la pratique cela se traduisant le plus souvent par la formation d'amas cellulaires agrégés et compacts sous forme de sphéroïdes. Ces derniers peuvent être composés d'une seule (mono) ou de plusieurs lignées cellulaires (multicellulaires). Plusieurs techniques ont été développées pour la formation de cultures cellulaires en 3D. Elles peuvent être classées en deux grands groupes, selon qu'elles utilisent ou non une matrice sur laquelle les cellules qui sont déposées vont se fixer et former des structures en trois dimensions prenant la forme de la matrice (Chwalek K. *et al.*, 2014 ; Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Kim JB., 2005 ; Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010 ; Nyga A. *et al.*, 2011 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015). Le premier groupe utilise des cellules en suspension et regroupe

Tableau 7 – Comparaison des cultures cellulaires en monocouche (2 dimensions) et en 3 dimensions

	Avantages	Inconvénients
	<p>Simple à réaliser et à manipuler</p> <p>Faible coût de réalisation et d'entretien</p> <p>Croissance rapide des cellules</p> <p>Conditions physico-chimique facilement contrôlables</p> <p>Les cultures peuvent être automatisées</p> <p>Plusieurs tests de cytotoxicité validés</p> <p>Utilisation en co-culture</p>	<p>Pas de formation de gradients (O_2, pH, nutriments,...)</p> <p>Pas de formation de zones aérobies/anaérobies sur une même culture</p> <p>-Pas de formation de centre nécrotique</p> <p>Non représentatif de l'organisation tumorale du fait de l'absence de structure tridimensionnel</p> <p>La réalisation de co-culture est limitée</p>
Culture en monocouche		
	<p>Structure tridimensionnel proche de celle des tumeurs</p> <p>Formation de gradients (O_2, pH, nutriments,...)</p> <p>Formation d'une zone anaérobie au centre des sphéroïdes mimant les tumeurs avasculaires</p> <p>-Formation d'un centre nécrotique</p> <p>L'état métabolique des cellules change selon leur position dans le sphéroïde</p> <p>Réalisation de co-cultures avec plusieurs lignées</p> <p>-Hétérogénéité cellulaire</p> <p>-Reproduction de l'environnement tumoral (tissus conjonctif, vascularisation,...)</p> <p>-Etude des interactions cellulaires dans l'environnement tumoral (cellules souches, cellules immunitaires,...)</p>	<p>Plus difficile à réaliser</p> <p>Manipulation pouvant être délicate</p> <p>Coût de réalisation pouvant être élevé selon la technique utilisée</p> <p>Ne fonctionne pas avec toutes les lignées cellulaires</p> <p>Croissance cellulaire plus lente</p> <p>Coût des tests de cytotoxicité plus élevé ou utilisation plus contraignante</p> <p>Automatisation difficile</p>
Culture en 3 dimensions		

les techniques « Hanging Drop », « Gyrotory rotation », « Spinner flask », « Microcarrier beads » et « Rotary cell culture system ». Le deuxième groupe désigne les techniques utilisant des matrices d'origine naturelle ou synthétique, comme c'est le cas pour la technique « Liquid Overlay » ou la formation de sphéroïdes se réalise par « l'encapsulation » des cellules dans un hydrogel (Chwalek K. *et al.*, 2014 ; Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Kim JB., 2005 ; Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010 ; Nyga A. *et al.*, 2011 ; Song HH. *et al.*, 2014 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015).

b – Les différentes techniques de culture en trois dimensions

Le principe du premier grand groupe de techniques de cultures cellulaires en 3D est basé sur la capacité des cellules à se regrouper pour former un agrégat sphérique puis à établir des liaisons intercellulaires. Ainsi, dans le cadre de la technique « Hanging Drop » (Figure 18), les cellules contenues dans une goutte de milieu en suspension vont s'agréger sous l'action de la gravité et former des liaisons entre elles. Les sphéroïdes ainsi obtenus offrent des conditions proches de celles retrouvées chez les tumeurs avasculaires avec la formation de gradients (O₂, nutriments, acidité,...) et des différences métaboliques en fonction de l'emplacement des cellules dans le sphéroïde (Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Kim JB., 2005 ; Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010). Cette technique est peu coûteuse et facile à mettre en place comparativement aux autres techniques de culture en trois dimensions, cependant seul un faible nombre de lignées cellulaires aurait la capacité de former des liaisons entre elles. Pour pallier à ce problème, il est possible d'ajouter du Matrigel au milieu de culture. Il s'agit d'un mélange de composants de la membrane basale extrait à partir de cellules de la lignée EHS (« Engelbreth-Holm-Swarm ») (Nyga A. *et al.*, 2011). Cet extrait est composé principalement de laminine-111, collagène IV, entactine, et de sulfate d'héparane, composé jouant un rôle important dans l'organisation et la transmission des signaux cellulaires. Sous sa forme complète, il contient plusieurs facteurs de croissances, mais une forme purifiée sans facteurs de croissance est également disponible. Cette forme permet de l'utiliser sans qu'elle ne modifie la teneur en facteur de croissance du milieu de culture. Le Matrigel se présente sous forme liquide à 4°C mais sa forte teneur en laminine-111 entraîne sa gélification à des températures de 24-37°C. Lorsque rajouté au milieu de culture, il stimule la formation des liaisons intercellulaires et facilite l'organisation des cellules entre elles, permettant ainsi la formation de sphéroïdes avec des lignées normalement réfractaires (Nyga A. *et al.*, 2011).

Le principe des deux techniques « Gyrotory rotation » et « Spinner flask » consiste à soumettre des cellules en suspension à un mouvement giratoire qui facilite leur agrégation en sphéroïdes (Figure 19). De plus, l'agitation du milieu permet également de faciliter le

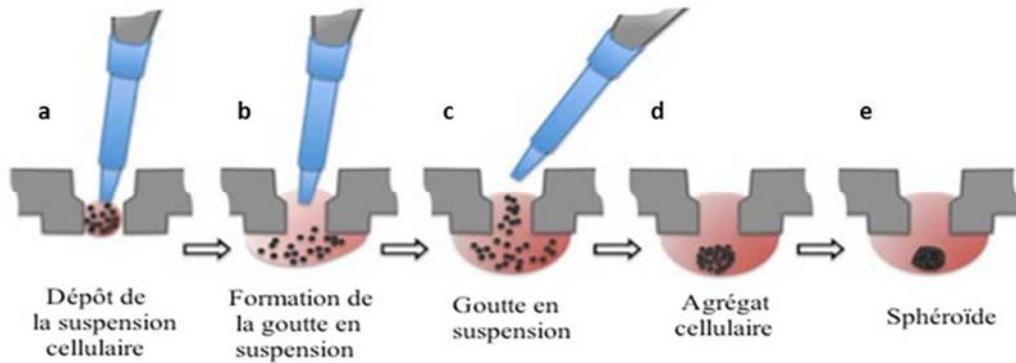


Figure 18 – Formation de sphéroïdes par la technique « Hanging Drop »

a : les cellules sont déposées dans un puit un puit sans fond. **b et c** : la suspension cellulaire forme une goutte qui est retenue dans le puit par rétention. **d** : Sous l'effet de la gravité les cellules tombent au fond de la goutte et s'agrègent entre elles. **e** : les cellules forment un sphéroïde compact, cette dernière étape peut nécessiter l'addition de Matrigel® pour faciliter la formation des jonctions intercellulaires.

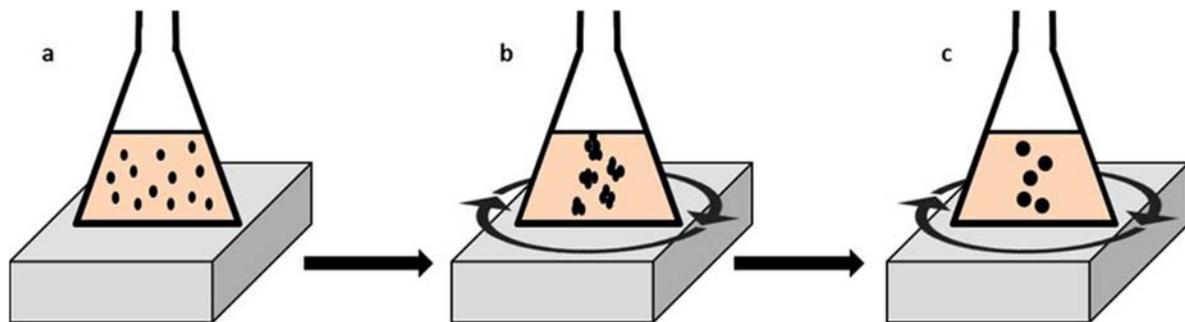


Figure 19 – Formation de sphéroïdes par la technique « spinner flask »

a : une suspension cellulaire est déposée dans une flasque fixé à un agitateur. **b** : sous l'effet de l'agitation, les cellules en suspension s'agrègent entre elles et forment des amas cellulaire. **c** : les cellules forment un sphéroïde compact, cette dernière étape peut nécessiter l'addition de Matrigel® pour faciliter la formation des jonctions intercellulaires.

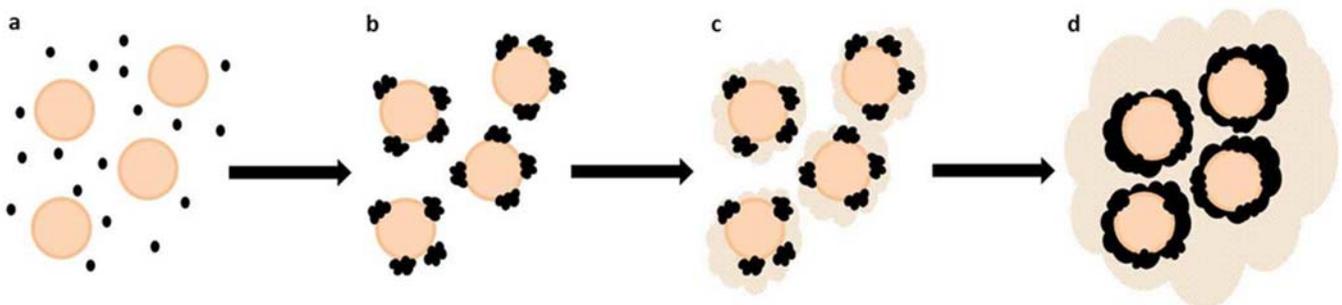


Figure 20 – Formation de sphéroïdes par la technique « Microcarrier beads ».

a : des « Microcarrier » sont ajoutés à une suspension cellulaire et laissés à incuber. **b** : les cellules se fixent sur les « Microcarrier » et forment des colonies. **c** : les cellules excrètent une matrice extracellulaire qui englobe le « Microcarrier » sur lequel elles sont fixées. **d** : les « Microcarrier » s'agglutinent et sont maintenus ensemble grâce à la matrice extracellulaire, formant ainsi des agrégats compacts.

transport des nutriments aux cellules, ainsi que l'évacuation des déchets cellulaires. Cette approche permet de contrôler facilement les conditions physicochimiques du milieu (pH, nutriments, O₂,...) et aussi de produire simultanément un grand nombre de sphéroïdes. Elle est de plus peu coûteuse, simple d'utilisation et permet de maintenir des cultures sur de longues périodes. Cependant, certains problèmes existent. Ainsi, les turbulences dans le milieu entraînent un stress cellulaire pouvant induire des changements métaboliques jusqu'à l'endommagement des cellules animales les plus fragiles. De plus, du fait des forces exercées, l'architecture interne des sphéroïdes est difficilement conservée. Enfin, comme pour la technique « Hanging Drop », le problème des lignées ne formant pas naturellement de liaisons entre elles persiste, nécessitant ainsi l'utilisation du Matrigel (Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Kim JB., 2005 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015).

Une autre approche est l'utilisation dans le milieu de « Microcarrier beads » (Figure 20). Il s'agit de sphères qui peuvent être composées de différents matériaux (plastique, silicone, dextrane, collagène,...), de taille variable (95 à 210µm) et traitées avec des revêtements de surface différents (diéthylaminoéthyl chargé positivement, trimethyl-2-hydroxy aminopropyl, collagène, polylysine,...) qui conditionnent la fixation des cellules à la surface des billes. Du fait de cette grande variété, il est donc nécessaire de bien sélectionner les « Microcarrier » les plus adaptés pour les lignées utilisées. Un autre paramètre à prendre en compte est la forme de ces billes et la structure de leur surface. En effet, celle-ci peut être lisse, les cellules adhérant alors simplement pour former un tapis cellulaire, ou bien recouverte de petites cavités dans lesquelles les cellules vont former de petites colonies. La surface de culture disponible peut ainsi être modifiée en ajustant la concentration en «Microcarrier beads » du milieu. Cette technique est souvent utilisée dans des bioréacteurs sous agitation, ce qui permet de cultiver en même temps un grand nombre de cellules. Cette approche permet aussi de contrôler les conditions de culture en ajustant le pH, oxygénation, les nutriments et les autres facteurs limitant la croissance cellulaire. De plus, les cellules fixées sur une bille peuvent excréter des protéines matricielles qui vont former une matrice tout autour du « Microcarrier ». Cette matrice permet à plusieurs billes d'adhérer ensemble, formant ainsi des structures proches d'un sphéroïde. Cependant, les sphéroïdes obtenus ne reproduisent pas la structure des tumeurs avasculaires, contrairement à ceux obtenus avec d'autres techniques telle que l'approche « Hanging Drop », et s'apparentent plus à des amas de gros « Microcarrier beads ». Cette technique est peu coûteuse et permet de mettre en culture des cellules sensibles (cellules endothéliales), ainsi que de réaliser facilement des cocultures en mixant des « Microcarrier beads »ensemencées avec des lignées différentes.

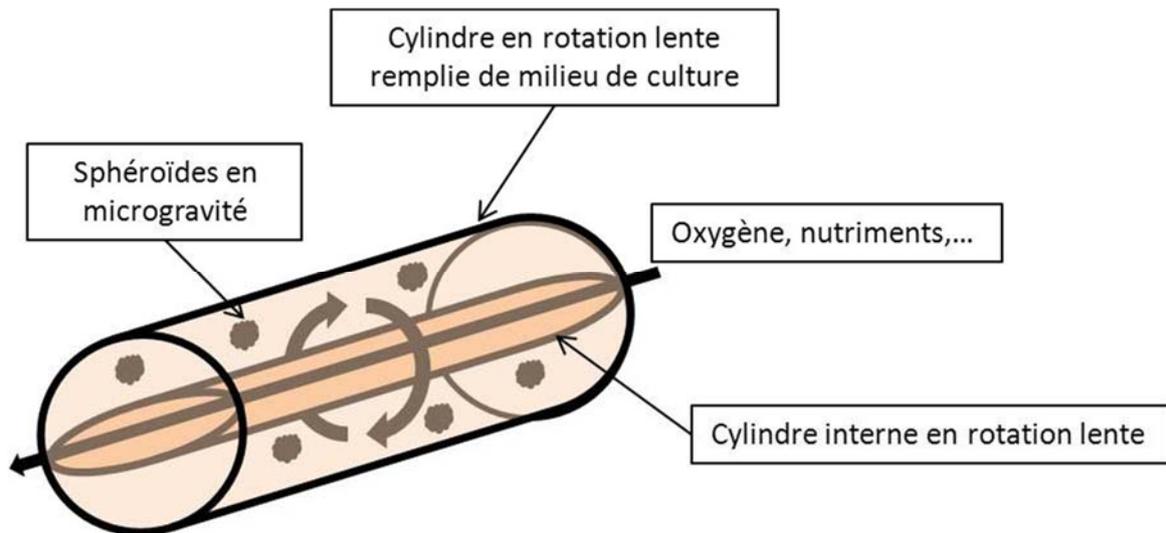


Figure 21 – Formation de sphéroïdes par la technique « Rotary cell culture system »

La rotation lente et synchronisée des deux cylindres formant le montage permet de maintenir en suspension les cellules et éviter les contacts avec les surfaces. Comme pour la technique « spinner flask », les cellules vont s'agréger pour former des sphéroïdes mais les forces exercées étant plus faible elles ne sont pas stressées comme dans cette dernière. Les échanges qui ont lieu à travers la membrane hémiperméable du cylindre central permettent de maintenir les conditions physico-chimiques du milieu.

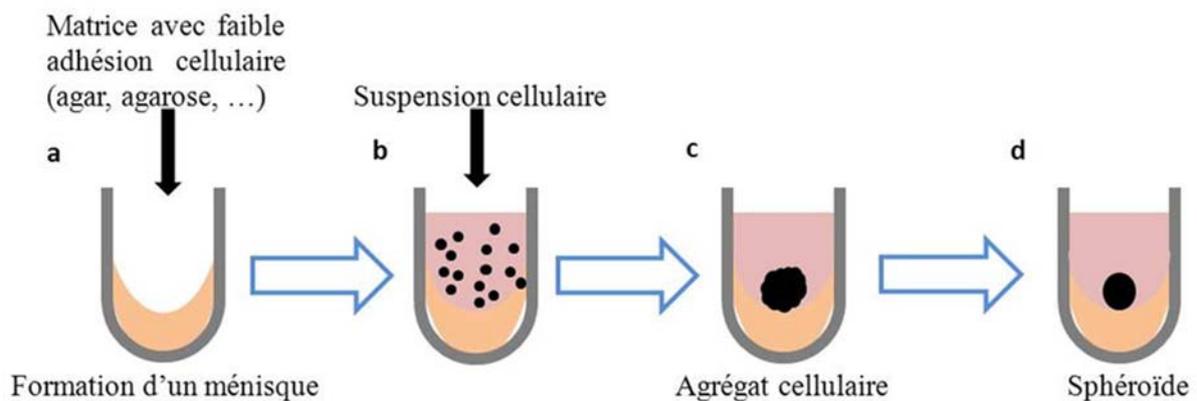


Figure 22 – Formation de sphéroïdes par la technique « Liquid Overlay » sur Matrice d'Agarose

1 : une matrice gélosée est déposée dans les puits d'une microplaque (fonds en « U ») pour former un tapis sur lequel les cellules ne peuvent pas adhérer. **2** : les cellules sont déposées sur la matrice sans y adhérer. **3** : de par la conformation en ménisque, les cellules s'agrègent progressivement et forment des agrégats. **4** : les cellules forment un sphéroïde compact, cette dernière étape peut nécessiter l'addition de Matrigel® pour faciliter la formation des jonctions intercellulaires.

Cependant, comme dans le cas des techniques « Gyrotory rotation » et « Spinner flask », les contraintes exercées par l'agitation sur les cellules peuvent les endommager et/ou gêner la formation de structures en 3D (Kim JB., 2005 ; Nyga A. *et al.*, 2011).

Le « Rotary cell culture system », dernier-né des techniques de culture en 3D en suspension, a été mis récemment au point par la NASA. Elle consiste à cultiver les cellules dans un conteneur en rotation lente sur un axe horizontal, limitant ainsi les brusques mouvements de fluides (Figure 21). Afin de diminuer encore les turbulences, le conteneur est intégralement rempli de milieu, et les échanges de gaz sont réalisés grâce à une membrane hémiperméable, empêchant ainsi la formation de bulles. Ceci permet de maintenir les cellules en suspension tout en évitant les turbulences dues à des mouvements rapides comme ceux retrouvés dans les techniques citées précédemment. Cette technique permet de cultiver de nombreuses lignées cellulaires seules ou en co-culture afin d'obtenir rapidement des sphéroïdes mimant fidèlement des tumeurs avasculaires. Ceci est d'autant plus vrai que dans le cas de co-cultures de cellules épithéliales/cellules cancéreuses, celles-ci vont adopter une organisation proche de celle retrouvée *in vivo*, avec les cellules cancéreuses formant une sphère entourée de cellules épithéliales formant un « tissu ». Malgré tous ces avantages, du fait qu'elle est encore en cours de développement et très coûteuse, cette technique est encore difficile à mettre en place pour un travail de routine en laboratoire (Hammond TG et Hammond JM., 2001 ; Kim JB., 2005).

Le deuxième grand groupe de techniques de culture cellulaire en 3D regroupe celles faisant appel à des matrices. La plus simple est la technique « Liquid Overlay », qui consiste à déposer une suspension de cellules sur un ménisque formé d'un matériau permettant la survie cellulaire tout en ayant une faible capacité d'adhésion (Figure 22). Les cellules ne pouvant se fixer à la surface de la culture, vont se regrouper puis adhérer entre elles pour former un sphéroïde. Le substrat utilisé pour la matrice peut être de l'agar ou de l'agarose et du Matrigel peut également être ajouté pour faciliter la culture. Cette technique peu coûteuse permet d'obtenir des sphéroïdes individualisés dans chaque puits de culture, ce qui est essentiel pour des expériences de « screening ». De plus, les cellules composant les sphéroïdes vont se différencier comme au sein des tissus et peuvent reproduire des structures proches de celles retrouvées *in vivo*. Cette dernière capacité pouvant être influencée par l'ajout de composants de matrice extracellulaire. Les seuls désavantages de cette technique sont, (i) le faible nombre de sphéroïdes obtenus, un seul sphéroïde par puits contrairement à une technique comme le « spinner flask », et (ii) les interactions des cellules avec la matrice entraînent des changements du métabolisme cellulaire et de la morphologie des cellules. Dans ce dernier cas, ces

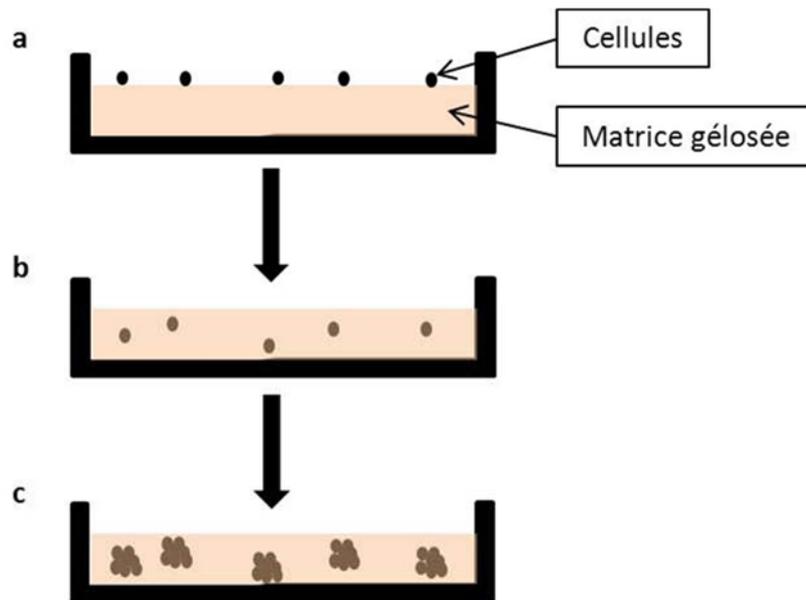


Figure 23 – Formation de sphéroïdes par inclusion dans une matrice

a : une suspension cellulaire est déposée sur une gélose d'origine naturelle ou synthétique. **b** : les cellules infiltrent la matrice et peuvent former des liaisons avec elle, reproduisant ainsi les interactions avec la matrice extracellulaire retrouvées *in vivo*. **c** : les cellules forment un sphéroïde compact à l'intérieur de la matrice.

modifications entraînent des conditions qui ne sont pas aussi proches de celles observées *in vivo* par rapport à celles, par exemple, observées dans les sphéroïdes obtenus par des techniques en suspension (Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Kim JB., 2005 ; Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015).

La dernière technique est dérivée des prothèses utilisées en médecine pour régénérer les tissus endommagés comme par exemple des os, et a été adaptée pour la culture en 3D. Elle fait appel à des matrices qui sont soit utilisées comme structure sur lesquelles vont se fixer les cellules avant de s'infiltrer dans le matériau (Figure 23), soit comme des moules dans lesquelles sont enfermées les cellules, pour former un sphéroïde. Dans les deux cas, la matrice va contrôler le développement des cellules afin de donner la forme désirée à la structure finale. Il est ainsi possible de reproduire des structures retrouvées *in vivo* comme des acini, des canaux ou bien de reproduire des mécanismes physiologiques à l'échelle de tissus comme l'angiogenèse. Les matrices utilisées peuvent être de deux natures différentes : naturelles ou synthétiques. Les premières sont principalement réalisées à partir de matériaux naturels comme les protéines de soie ou bien les constituants de la matrice extracellulaire. Elles se présentent majoritairement sous la forme de gels et sont de bons modèles pour étudier les interactions cellules / matrice extracellulaire ainsi qu'entre différents types cellulaires. Les matrices synthétiques sont principalement fabriquées à partir de polymères tel le polylactide (PLA), polyglycolide (PGA) ou de copolymères comme le poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ou le Polyethylene glycol (PEG). Ces matériaux sont biodégradables, plus résistants que leurs homologues naturels et peuvent prendre différentes formes, selon les besoins. Cependant, les cellules ont peu d'affinité pour ces polymères par rapport aux matériaux naturels. Il est donc nécessaire d'insérer des groupements fonctionnels sur les chaînes de polymères afin que les cellules puissent y adhérer et s'y développer. Une autre possibilité consiste à incorporer dans le polymère des éléments de la matrice extracellulaire, facilitant ainsi sa colonisation par les cellules. Enfin, le dernier problème rencontré par ces techniques est leur coût encore élevé, ce qui en limite encore leur utilisation (Chwalek K. *et al.*, 2014 ; Kim JB., 2005 ; Hirschhaeuser F. *et al.*, 2010 ; Nyga A. *et al.*, 2011 ; Song HH. *et al.*, 2014 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015).

Toutes ces techniques peuvent être réalisées à partir de lignées cellulaires établies (Tableau 8), en mono ou hétéroculture, ou bien à partir de prélèvements de patients. Ce dernier cas permet de réaliser des modèles reproduisant l'hétérogénéité cellulaire retrouvée dans les tumeurs. Ainsi, ces différentes approches rendent possible de tester l'action des traitements anti-cancéreux dans des conditions plus proches de celles retrouvées *in vivo* par

Tableau 8 – Techniques utilisées pour la culture

Techniques de culture	Avantages	Inconvénients
<p>Hang ing drop</p> <p>Coût peu élevé Nécessite peu de travail Formation de sphéroïdes reproduisant les conditions retrouvées chez les tumeurs avasculaires Permet d'obtenir des sphéroïdes isolés</p>	<p>Coût peu élevé Nécessite peu de travail Formation de sphéroïdes reproduisant les conditions retrouvées chez les tumeurs avasculaires Permet d'obtenir des sphéroïdes isolés</p>	<p>Ne fonctionne pas avec toutes les lignées cellulaires -Nécessite l'utilisation de Matrigel selon la lignée sélectionnée</p>
<p>Gyratory rotation et spinner flask</p> <p>Coût peu élevé</p> <p>Facile à utiliser Adapté pour des cultures sur de longues périodes Production de grandes quantités de sphéroïdes Permet de contrôler facilement les conditions physico-chimiques du milieu (pH, nutriments, glucose, Oxygène,...)</p>	<p>Coût peu élevé Permet de créer des structures tridimensionnelles à partir de lignées sensibles ou ne formant pas naturellement des sphéroïdes Permet de réaliser facilement des co-cultures Production d'une grande quantité de sphéroïdes Permet de contrôler facilement les conditions physico-chimiques du milieu (pH, nutriments, glucose, Oxygène,...)</p>	<p>Important stress mécanique exercé sur les cellules L'architecture interne des sphéroïdes est peu conservée Selon la lignée utilisée, il peut être nécessaire d'ajouter du Matrigel</p>
<p>Culture en suspension</p> <p>Microcarrier beads</p> <p>Coût peu élevé</p>	<p>Permet de créer des structures tridimensionnelles à partir de lignées sensibles ou ne formant pas naturellement des sphéroïdes Permet de réaliser facilement des co-cultures Production d'une grande quantité de sphéroïdes Permet de contrôler facilement les conditions physico-chimiques du milieu (pH, nutriments, glucose, Oxygène,...)</p>	<p>Structures tridimensionnelles s'apparentant plus à des amas qu'à des sphéroïdes Important stress mécanique exercé sur les cellules</p>
<p>Rotary cell culture system</p> <p>Faible stress mécanique Pas de contact avec une surface (culture en quasi apesanteur) Formation rapide d'une grande quantité de sphéroïdes Permet de réaliser facilement des co-cultures Création de structures complexes</p>	<p>Faible stress mécanique Pas de contact avec une surface (culture en quasi apesanteur) Formation rapide d'une grande quantité de sphéroïdes Permet de réaliser facilement des co-cultures Création de structures complexes</p>	<p>Technique très coûteuse</p>
<p>Liquid Overlay</p> <p>Coût peu élevé Facile à mettre en place Permet d'obtenir des sphéroïdes isolés Utilisation facile et rapide pour le screening de molécules</p>	<p>Coût peu élevé Facile à mettre en place Permet d'obtenir des sphéroïdes isolés Utilisation facile et rapide pour le screening de molécules</p>	<p>Produit un nombre limité de sphéroïdes Le contact avec la matrice peut altérer le comportement des cellules</p>
<p>Culture sur matrice</p> <p>Permet de donner une forme prédéterminée à la structure tridimensionnelle Permet de réaliser facilement des co-cultures La matrice peut être biodégradable</p>	<p>Permet de donner une forme prédéterminée à la structure tridimensionnelle Permet de réaliser facilement des co-cultures La matrice peut être biodégradable</p>	<p>Technique très coûteuse La matrice peut inhiber la croissance cellulaire -Nécessaire de modifier la matrice pour l'adapter aux cellules</p>

rapport à des cultures en 2D. Mais elles permettent aussi d'étudier les interactions entre les types cellulaires retrouvés dans une tumeur et dans quelle mesure elles influencent le développement du corps tumoral.

III - Utilisation de cultures en trois dimensions

a - « Screening » et test de nouvelles molécules thérapeutiques

Comme indiqué plus haut, les techniques de culture cellulaire font partie des principaux outils utilisés pour identifier et tester de nouvelles molécules thérapeutiques. La majeure partie de ces recherches a été réalisée sur des cultures en 2D qui sont très éloignées des conditions retrouvées *in vivo*, engendrant ainsi le risque de sélection de molécules thérapeutiques peu efficaces, une fois utilisées *in vivo*. C'est pourquoi il serait intéressant d'utiliser des modèles en 3D qui reflètent mieux les conditions retrouvées chez les tumeurs. En effet, de grandes différences de sensibilité aux composés testés ont été constatées entre les modèles 2D et 3D, les modèles 3D donnant des résultats plus proches de ceux retrouvés lors des tests *in vivo*. Ainsi, en conditions 3D, comme pour les nutriments et l'oxygène, des gradients se forment lors de la pénétration des molécules testées dans les sphéroïdes. En effet, la concentration des molécules thérapeutiques diminue en s'approchant du centre du sphéroïde, ce qui n'est pas le cas des cellules cultivées en conditions 2D où toutes les cellules ont le même accès aux médicaments testés dans le milieu. De plus, la surface de contact entre le milieu et les cellules est plus faible dans les sphéroïdes que sur les cultures en monocouche, limitant la pénétration des composés testés. En outre, les cellules au sein des sphéroïdes vont former une matrice extracellulaire entre elles qui les protège contre les attaques extérieures et peut agir sur leur comportement, les rendant plus résistantes. Ainsi, seules les cellules à la périphérie des sphéroïdes sont directement touchées par les composés testés, tandis que les cellules au centre sont relativement protégées. Ce phénomène qui n'est pas retrouvé en conditions 2D se rapproche de celui observé *in vivo*, permettant ainsi de mieux prédire la capacité des agents cytotoxiques testés à pénétrer les tumeurs et donc *in fine*, à les éliminer (Yang Luo. *et al.*, 2012 ; Van-Minh Le. *et al.*, 2014 ; Rati Lama. *et al.*, 2013 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015).

Une autre caractéristique importante des sphéroïdes est la formation de zones hypoxiques au centre de la masse cellulaire, comme celles retrouvées chez les tumeurs avasculaires. Les cellules présentes dans cette zone vont entrer dans un état de quiescence, phénomène qui n'est pas retrouvé en condition 2D où toutes les cellules se divisent

normalement. Cet arrêt du cycle cellulaire rendrait les cellules peu, voire non sensibles aux traitements visant les cellules en division, comme c'est le cas pour de nombreux anti-cancéreux ou en radiothérapie. Ce modèle peut alors être utilisé afin de tester l'efficacité des anti-cancéreux sur des tumeurs avasculaires ainsi que pour développer de nouvelles molécules qui seront actives en milieu hypoxique (Desoize B. *et al.*, 2000 ; Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Weiswald LB. *et al.*, 2015 ; Tung YC ; *et al.*, 2011). De plus, ces cellules quiescentes présentent une faible activité métabolique qui les rendrait moins sensibles aux traitements ciblant l'ADN. En effet, la diminution de leur activité transcriptionnelle permettrait aux mécanismes de réparation de l'ADN de corriger les dommages subis du génome. Par ailleurs, l'efficacité de ces systèmes de réparation peut encore être renforcée (i) par la modification de l'expression des enzymes impliquées, (ii) l'apparition de mutations sur ces dernières les rendant moins sensibles aux traitements ou encore (iii) des réarrangements chromatiques facilitant la réparation de l'ADN. La mise en place de ces mécanismes de résistance, très fréquents chez les tumeurs, est peu observée dans les cultures en 2D alors qu'ils sont souvent présents chez les sphéroïdes, faisant de ces derniers un modèle pertinent pour l'étude de ces mécanismes (Desoize B. *et al.*, 2000 ; Dubessy C. *et al.*, 2000).

De plus, contrairement aux cellules cultivées en 2D, les cellules cultivées en 3D possèdent la capacité à inhiber leur entrée en apoptose. Cette capacité, très importante pour la résistance des cellules tumorales aux traitements, ne peut donc être étudiée *in vitro* que sur des cultures en 3D, ce qui les rend alors plus pertinentes que les cultures en 2D. Ce phénomène pourrait être lié à une modification de l'expression de protéines impliquées dans l'apoptose, comme il a été observé pour bcl-X (Desoize B. *et al.*, 2000 ; Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Frankel A. *et al.*, 1997). Un autre facteur rentrant en compte dans l'inhibition de l'apoptose est la présence d'interactions entre cellules. En effet, il a été démontré que les cellules qui forment de nombreuses jonctions entre elles résistent mieux aux traitements que les cellules cultivées en monocouche et ceci notamment en inhibant leur entrée en apoptose. Ce phénomène a été aussi bien observé après un traitement par chimiothérapie et/ou par radiothérapie et les résultats retrouvés *in vivo* sont proches de ceux obtenus en xénogreffe (Desoize B. *et al.*, 2000 ; Dubessy C. *et al.*, 2000 ; Durand RE and Sutherland RM., 1972). Cette résistance accrue pourrait être due à des échanges de molécules entre les cellules et notamment de fragments d'ADN, *via* les jonctions cellulaires. Ce mécanisme inhiberait l'apoptose et stimulerait en même temps les mécanismes de réparation de l'ADN qui vont alors corriger les erreurs pouvant entraîner l'entrée en apoptose de la cellule.

b - Réalisation de co-cultures en trois dimensions

Un autre intérêt de la culture en 3D est de permettre la réalisation de co-culture beaucoup plus facilement qu'en condition 2D. En effet, le comportement des tumeurs dépend en grande partie de leur microenvironnement et il est donc essentiel de reproduire ce dernier afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement des tumeurs. Dans cette optique, des cultures en 3D ont été réalisées en utilisant des cellules cancéreuses cultivées avec des cellules du stroma. Ainsi, Kunz-Schughart *et al.*, (2001), ont produit des sphéroïdes à partir de cellules tumorales mammaires co-cultivées avec des cellules endothéliales afin d'étudier le phénomène de desmoplasie dans les tumeurs mammaires squirrheuses. Une autre expérience, menée par Petersen OW *et al.*, (1992), a démontré que lorsque des sphéroïdes cultivés en présence d'éléments du stroma (obtenus soit à partir de lignées de cancer du sein soit de cellules non cancéreuses) sont déposés sur un gel de collagène I, ils ne se comportaient pas de la même façon. Ainsi, les cellules cultivées avec du stroma non cancéreux se polarisent et forment des structures organisées proches des acini tandis que les cellules cultivées avec du stroma cancéreux forment des structures désorganisées proches des tumeurs. Cette technique permet donc de reproduire la réaction des cellules aux éléments du stroma comme retrouvé *in vivo*. Ce même modèle a aussi permis d'étudier l'influence des cellules cancéreuses sur leur environnement en remplaçant les extraits de stroma par des fibroblastes. Ces derniers se différencient en myofibroblastes après la mise en contact avec les sphéroïdes (Ronnov-Jessen *et al.*, 1995).

Une autre voie d'exploration est la co-culture de cellules tumorales avec des cellules immunitaires. Cette approche permet d'étudier leurs interactions, notamment l'infiltration des tumeurs par des cellules immunitaires, ainsi que l'activation et la maturation de ces dernières (Hirschhaeuser *et al.*, 2010). Konur *et al.* (1998) ont ainsi mis au point un modèle d'étude en co-cultivant des cellules tumorales de la vessie avec des monocytes et des macrophages afin de mesurer les niveaux de cytokines produites par ces cellules. Bingle *et al.* (2006) ont également réalisé des cocultures de cellules de la lignée T47D en sphéroïdes avec des macrophages, mettant ainsi en évidence une augmentation du niveau des facteurs de l'angiogenèse en présence de cellules immunitaires. Un autre intérêt de ces co-cultures est de pouvoir rechercher et de tester de nouvelles stratégies en immunothérapie (Hirschhaeuser *et al.*, 2010). Ainsi, Hoffmann *et al.* (2009) ont mis en évidence la capacité des anti-EGFR à augmenter l'infiltration des tumeurs par des leucocytes. Pour cela, des sphéroïdes formés à partir de cellules cancéreuses et de fibroblastes ont été prétraités avec des anti-EGFR avant

d'être cultivés en présence de monocytes. Les modèles de co-cultures en 3D seraient donc un moyen efficace pour l'étude des interactions entre cellules cancéreuses et cellules immunitaires.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Nos travaux de recherche visent l'optimisation du traitement du cancer du sein de phénotype « Basal like » triple négatif (BLTN), très agressif et de mauvais pronostic. En effet, malgré une bonne réponse à la chimiothérapie classique au début du traitement, les risques de rechute sont très fréquents pour ce type de cancer. C'est pourquoi de nouveaux traitements ciblés, tel que les inhibiteurs de PARP, ont été développés et sont pour la plupart en cours de recherche clinique pour cette pathologie.

Dans ce contexte, nos travaux de recherche ont été orientés sur l'étude de l'optimisation du traitement du cancer du sein BLTN par un anti-PARP modèle, l'Olaparib®, à travers trois approches différentes:

(i) Approche Résistance : par l'étude de la co-expression de deux protéines « Multidrug Resistance » (MDR) chez la lignée SUM1315, lignée de cancer du sein de phénotype BLTN. L'expression des protéines a été quantifiée chez des cellules SUM1315 après différents temps d'incubation avec un anti-PARP, l'Olaparib. En parallèle, la quantification de la concentration intracellulaire de cet anti-PARP a été réalisée sur des cellules SUM1315, traitées avec de l'Olaparib dans les mêmes conditions que lors de l'étude de l'expression des protéines MDR.

(ii) Approche potentialisation du traitement : par l'étude de l'impact d'un traitement combiné par Olaparib et par radiothérapie à haute et à basse énergies sur la survie cellulaire. Cette étude a été réalisée sur des cellules de la lignée SUM1315 préalablement traitées avec de l'Olaparib puis irradiées avec une dose de 10 Gy fractionnée à raison de 2 Gy par jours.

(iii) Approche modélisation 3D : par la mise au point d'un modèle de culture en trois dimensions à partir de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN. Pour ce faire deux techniques de culture en 3D, Hanging drop et Liquid overlay en matrice d'agarose, ont été utilisées et comparées afin de déterminer la plus appropriée pour la formation de sphéroïdes avec la lignée SUM1315.

MATERIELS et METHODES

I – Conditions de culture de la lignée SUM 1315

Pour ces travaux, la lignée cellulaire SUM 1315, issue d'un cancer du sein de phénotype Basal like triple négatif et obtenue auprès de la société Asterand, a été utilisée. Les cellules SUM1315 sontensemencées en raison de 25 000 cellules/ml dans des flasques de culture Falcon à 37°C sous 5% de CO₂, dans 15 ml du milieu Ham's F12 (GIBCO™) additionné de 5% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 10 mM Tampon HEPES, 20 µg/ml Gentamycine, 10 ng/ml EGF et 4 µg/ml d'insuline. Ces conditions correspondent aux instructions du fournisseur (Privat M *et al.*, 2009).

II – Etude du taux d'expression de la P-gp et de la BCRP par Western blot suite à un traitement par Olaparib (AstraZeneca™)

a - Dissolution de l'Olaparib

L'Olaparib (Tableau 6) est une molécule organique et donc insoluble dans l'eau. Pour les expériences de traitement des cultures cellulaires de la lignée SUM1315 par l'Olaparib, il a été solubilisé dans un solvant organique, le DMSO (diméthylsulfoxyde) couramment utilisé dans les cultures cellulaires. La concentration du DMSO dans les cultures cellulaires est toujours de 0,1%.

b - Traitement des cellules de la lignée SUM 1315 avec L'Olaparib

La cinétique du taux d'expression de la P-gp et de la BCRP a été étudiée après 1h30, 3h, 4h30, 6h, 15h et 24 h d'exposition à une concentration de 50 µM en Olaparib. Pour cela, des cellules de la lignée SUM1315 sontensemencées dans des flasques de culture de 25 cm² à raison de 250 000 cellules/ml dans un volume final de 5 ml de milieu de culture avant d'être laissées à incuber pendant 24h. Les cellules sont alors traitées avec une concentration de 50 µM en Olaparib et la cinétique du taux d'expression de la P-gp et de la BCRP étant étudiée après 1h30, 3h, 4h30, 6h, 15h et 24h d'exposition. La concentration finale en DMSO dans toutes les boîtes de culture étant toujours de 0,1%, un témoin avec 0,1% de DMSO est réalisé en parallèle pour chaque temps d'exposition afin de vérifier que le DMSO n'influence pas à cette concentration l'expression de ces protéines. Après chaque temps d'exposition, chaque culture est traitée avec de la trypsine afin de décrocher les cellules puis celles-ci sont récupérées par deux rinçages successifs avec 2,5 ml de milieu de culture. Chaque échantillon est alors centrifugé 10min à 250 g et 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé et les culots obtenus sont ensuite congelés à -20 °C, pour conservation.

c - Extraction et dosage protéique

Les culots cellulaires obtenus précédemment sont décongelés sur glace et repris dans 50 µL de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 6 µM β-Mercaptoéthanol et 1 µL Protein Inhibitor Cocktail (SigmaTM) à 100X). Les cellules sont alors lysées à l'aide d'un sonicateur à sonde. Chaque échantillon est soumis dans la glace, à cinq sonications de 3 secondes séparées par 5 secondes de pause. La concentration en protéines de chaque échantillon est ensuite déterminée à l'aide du kit Pierce Coomassie Plus (BradfordTM) Assay Kit en suivant les instructions du fabricant. Durant l'intégralité de cette manipulation, les échantillons doivent être conservés dans la glace.

d - Western Blot

80 µg d'extraits protéiques de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à 7,5%. La migration est effectuée à voltage constant (60 V par gels) pendant 2h. Sur ce gel est aussi déposée une échelle de poids moléculaire. Après migration, les protéines présentes sur le gel sont transférées sur une membrane PVDF (Immobilon[®]-P Polyvinylidene Difluoride membranes (SigmaTM)), en utilisant un appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot Turbo, Biorad[®]). Avant l'étape de transfert, la membrane est activée en la recouvrant de méthanol durant 10s puis équilibrée dans du tampon de transfert pendant 15min. Après cela, les différents éléments nécessaires pour le transfert sont déposés dans l'appareil de transfert de la manière suivante : 3 papiers buvard imbibés dans du tampon de transfert, la membrane PVDF, le gel d'électrophorèse et pour finir 3 autres papiers buvard. La durée du transfert est de 43 minutes sous un ampérage de 500 mA. Après le transfert, une étape de saturation de la membrane contenant les protéines d'intérêt est réalisée dans 10ml de PBS (+0,1% Triton X100) à 5% de Régilait pendant 1h. Cette étape est nécessaire afin de limiter le bruit de fond, c'est-à-dire d'empêcher la formation de liaisons non spécifiques entre l'anticorps primaire et des protéines autres que les protéines d'intérêt. A la fin de l'incubation, chaque membrane est lavée quatre fois pendant 5min avec une solution de PBS (+0,1% Triton X100). Chaque membrane est ensuite incubée pendant 12h à 4 °C dans 5 ml d'une solution de PBS (+0,1% Triton X100) contenant les anticorps primaires aux dilutions suivantes : anticorps anti P-gp (Anti-P-Glycoprotein Mouse mAb (C219) CalbiochemTM) dilué au 1/500^{eme}, anticorps anti BCRP (OP 191 Anti-BCRP Mouse mAb (BXP-21) CalbiochemTM) dilué au 1/400^{eme} et anticorps anti α-Tubulin (Monoclonal Anti-α-Tubulin antibody produced in mouse, SigmaTM) dilué au 1/100 000. A la fin de l'incubation, chaque membrane est lavée quatre fois pendant 5min avec une solution de PBS (+0,1% Triton X100). Chaque membrane

est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante, dans 5 ml de PBS (+0,1% Triton X100) contenant l'anticorps secondaire anti IgG murin conjugué à une peroxydase (Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate, Promega™), à la dilution 1/10 000^{ème}. Après trois lavages dans une solution de PBS (+0,1% Triton X100), le signal des spots d'intérêts est détecté par fluorescence en utilisant le kit ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham™) et des films auto-radiographique Hyperfilm ECL (Amersham™). Le logiciel Quantity One (BioRad™) est utilisé par la suite, pour le traitement des données et la quantification relative des protéines d'intérêts. L'expression de la BCRP et de la P-gp est déterminée en calculant le rapport de la densité de bandes correspondantes aux protéines d'intérêts sur la densité des bandes d' α -Tubuline, notre témoin interne de protéine. Ce rapport est exprimé en unités arbitraires (u.a).

III - Suivit de l'évolution de la concentration intracellulaire en Olaparib

a - Préparation des échantillons HPLC

L'évolution de la concentration intracellulaire en Olaparib dans la lignée SUM1315 a été étudiée après 1h, 2h, 3h, 6h, 15h et 24h d'exposition à une concentration de 50 μ M en Olaparib. Pour cela, des cellules de la lignée SUM1315 sontensemencées dans des flasques de culture de 25 cm² à raison de 250 000 cellules/ml dans un volume final de 5 ml de milieu de culture, avant d'être laissées à incuber pendant 24h. Les cellules sont alors traitées avec une concentration de 50 μ M en Olaparib, la concentration intracellulaire en Olaparib est ensuite étudiée après 1h, 2h, 3h, 6h, 15h et 24h d'exposition. Pour chaque temps, le milieu de culture est récupéré avant de rincer les cellules 1 fois avec du PBS à 4 °C. Les cellules ont ensuite été lysées dans de l'acétonitrile à l'aide d'un « grattoir » pour cellule combiné à une étape de sonication (5 x 3s). Le lysat est ensuite récupéré et centrifugé à 4 °C (350 g, 10min), avant d'être filtré à travers un filtre en membrane de PVDF de 0,45 μ m puis introduit à la pipette dans un flacon auto-échantillonneur de 1 ml pour injection. L'Olaparib étant solubilisé dans du DMSO, un témoin traité avec 0,1% de DMSO est aussi réalisé en parallèle pour chaque temps.

b - Dosage de l'Olaparib par une technique HPLC

Les expériences de dosage par HPLC ont été réalisées sur un système LC série HP 1100 équipé d'un dégazeur en ligne, une pompe quaternaire, un four à colonne, un détecteur à barrette de photodiodes et un échantillonneur automatique. Les solvants (H₂O et MeCN (acétonitrile) chacun avec 0,1% v/v de TFA (trifluoroacetic acid)) utilisés pour la préparation

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Témoïn	A									
Témoïn DMSO	B									
Anti-PARP 100 μ M	C									
Anti-PARP 75 μ M	D									
Anti-PARP 50 μ M	E									
Anti-PARP 25 μ M	F									
Anti-PARP 10 μ M	G									

Figure 24 : Protocole de préparation des plaques de culture

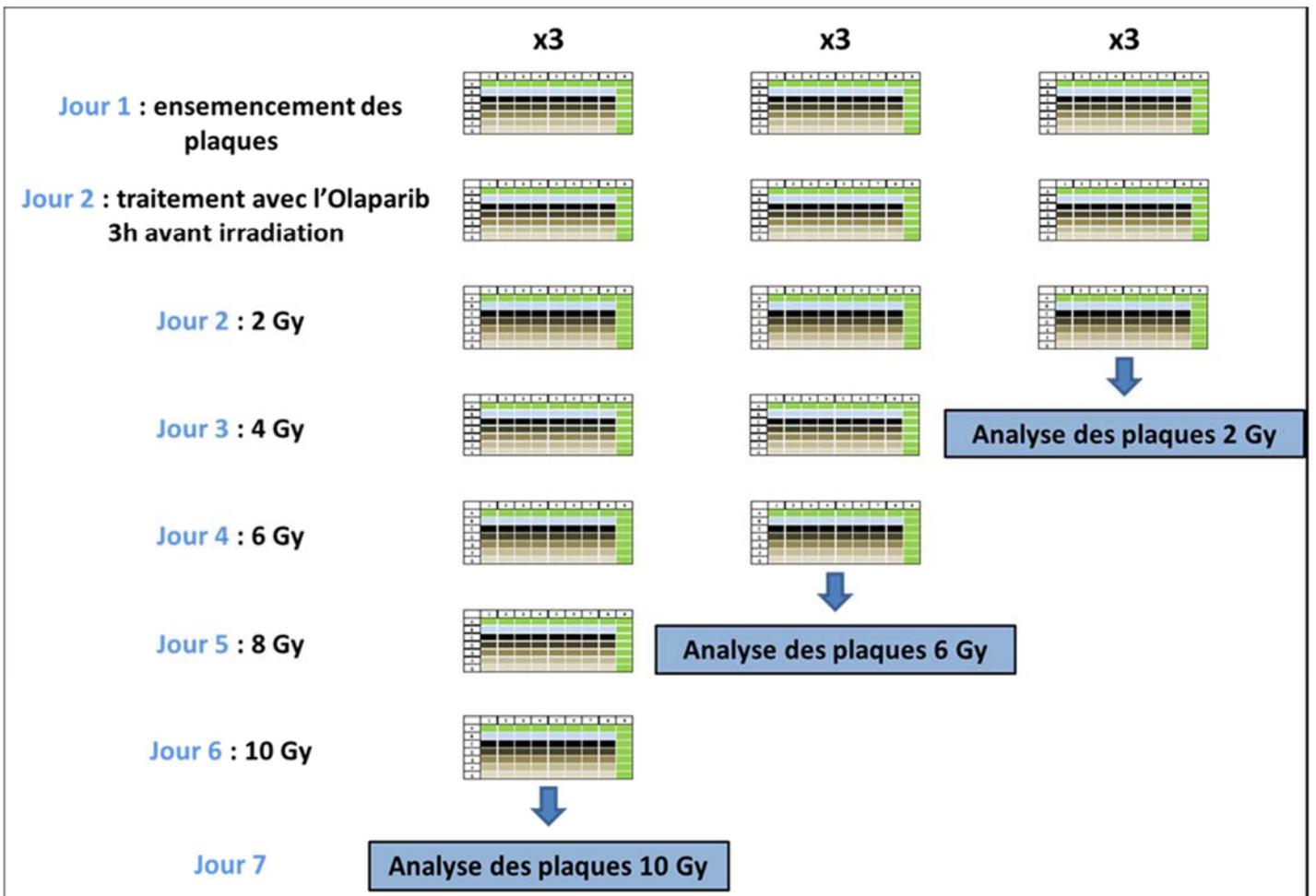


Figure 25 : Plan de lecture des plaques sur une semaine

de la phase mobile ont été filtrés avant utilisation. La température du four à colonne a été maintenue à 25 ° C. Un gradient d'élution a été appliqué à un débit de 0,8 ml/min à travers une colonne C18 en phase inverse Nouvelle-Pak® 4 um (150 x 3,9 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA). Afin de séparer les différents constituants du lysat et doser l'Olaparib, le gradient suivant a été utilisé: 0-11 min, 5-80% de MeCN; 11-13 min, 80% de MeCN; 13-15 min, 80 à 5% de MeCN; 15-19 min, 20%. Pour chacun des échantillons, 20 ul de lysat ont été injectés dans le système HPLC. Le détecteur à barrette de photodiodes a balayé sur une plage de longueur d'onde allant de 190 à 350 nm.

III – Traitement des cellules par irradiation

a - Conditionnement des cellules avant irradiation

Pour ces expériences, des plaques de culture à 96 puits (Falcon® Microtest 96) sontensemencées à raison de 1800 cellules par puit, dans 100 µL de milieu de culture. Le nombre de cellules à déposer dans chaque puit a été déterminé en ramenant à la surface d'un puit d'une plaque de culture le nombre de cellules/cm² utilisé pour l'ensemencement de nos boîtes de culture. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C sous 5% de CO₂, pendant 12 heures. Les cellules sont ensuite traitées avec des concentrations d'Olaparib de 10, 25, 50, 75 et 100 µM et mises à incuber pendant 3 heures avant de les irradier (Figure 24). Le temps d'incubation de 3h avant irradiation a été déterminé par HPLC et correspond au temps à partir duquel l'Olaparib atteint sa concentration maximale dans les cellules. Des témoins non traités et des témoins 0,1% DMSO ont été réalisés en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 24). Des plaques témoins, qui ne seront pas irradiées, sont préparées en parallèle afin de pouvoir les comparer aux plaques irradiées.

b - Protocole d'irradiation

Le protocole d'irradiation est mis en place avec l'utilisation de deux irradiateurs : (i) l'accélérateur Novalis, produisant des rayonnements de haute énergie et utilisé pour le traitement des patients au centre Jean Perrin, (ii) l'accélérateur PAVIRMA utilisé pour des expériences impliquant des rayonnements de basse énergie, localisé dans le laboratoire de physique corpusculaire, et devant permettre de réaliser une modélisation de la dose d'irradiation déposée sur les cellules. On associe une irradiation journalière de 2 Gy sur une semaine, pour une dose finale de 10 Gy, à un traitement avec l'anti-PARP afin d'évaluer la mortalité cellulaire avec les traitements seuls ou en combinaison. Le choix de 2 Gy par jour a été retenu car il est utilisé pour le traitement des patients (Figure 25).

Les plaques sont préparées et ensemencées à J0. L'anti-PARP est ajouté J+1, 3 heures avant l'irradiation comme indiqué ci dessus. L'irradiation est ensuite réalisée tous les jours de la semaine à la même heure, des plaques témoins (non-irradiées) restant quant à elles dans l'incubateur. Une lecture des plaques afin d'établir la survie cellulaire est effectuée 24 h après l'irradiation, pour les doses de 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy. Le pourcentage de survie cellulaire est déterminé par la méthode colorimétrique du SRB (SulfoRhodamine B).

c - Méthode de mesure de la survie cellulaire par le test à la SulfoRhodamine B (SRB)

Il s'agit d'un test colorimétrique dont le principe est basé sur l'utilisation de la quantité de protéines synthétisées comme indicateur de la prolifération cellulaire. Le Sulforhodamine B est un colorant anionique se fixant électrostatiquement sur les protéines cellulaires. Le colorant fixé est ensuite extrait par lyse cellulaire et solubilisé par une solution basique afin d'être mesuré optiquement. La densité optique ainsi obtenue correspondant à la quantité de protéines totales et reflèterait donc la concentration des cellules vivantes.

24h après irradiation, 50 µL d'une solution de TCA à 50% (m/v) sont ajoutés à chaque puits. Après une incubation d'1h à 4 °C, la plaque est alors lavée 3 fois à l'eau, séchée et 50 µL d'une solution de SRB à 0,4% (m/v) dans de l'acide acétique à 1% (v/v) sont ajoutés à chaque puits. Après un temps d'incubation de 15 minutes à température ambiante, la plaque est ensuite lavée 3 fois avec une solution d'acide acétique à 1%, et séchée. Une fois la plaque sèche, chaque puits est complété avec 200 µL d'une solution tampon de Tris-base à 10 mM avant d'être mis sous agitation pendant 30 minutes. La densité optique de chaque puits est alors lue avec un lecteur de plaque VWR Multiskan FC®. La lecture des densités optiques (DO) est effectuée à 540 nm, au niveau du pic d'absorbance du SRB. La survie cellulaire est donc mesurée par la relation suivante :

$$\text{Survie cellulaire \%} = \frac{DO_{\text{expérience}}}{DO_{\text{témoin}}} \cdot 100$$

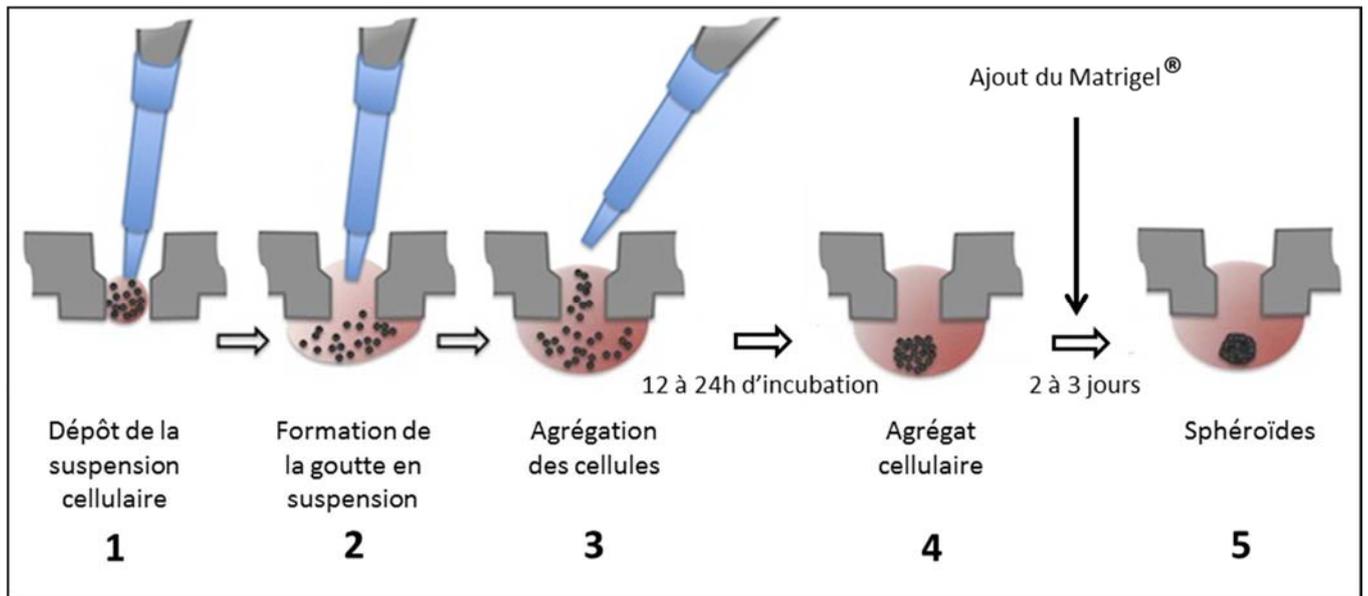


Figure 26 – Formation de sphéroïdes par la technique « Hanging Drop »

1 : 25µl de suspension cellulaire sont déposées dans les puits de la plaque Perfecta3D[®]. 2 : par effet de rétention, une goutte de suspension cellulaire se forme sous les puits. 3 et 4 : par effet de la gravité les cellules tombent au fond de la goutte et s'agrègent entre elles. 5 : l'addition de Matrigel[®] facilite la formation des jonctions intercellulaires, permettant ainsi aux cellules de former un sphéroïde compact.

V - Culture cellulaire de la lignée SUM1315 en 3D

Afin d'obtenir des sphéroïdes à partir de la lignée SUM1315, une technique de culture en trois dimensions dite par « Hanging Drop » a été utilisée.

a - Solubilisation du Matrigel®

Le Matrigel®, (Geltrex™ LDEV-Free, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, GIBCO®) est un gel à base de protéines de membrane basale nécessaire chez certaines lignées, comme c'est le cas pour la lignée SUM1315, à la formation de liaisons intercellulaires lorsqu'elles sont utilisées pour former des sphéroïdes. Sous sa forme pure il est liquide à 4 °C, mais gélifie à 37 °C, température à laquelle sont cultivées les cellules. Afin d'éviter qu'il ne prenne en masse au moment de l'ajouté aux suspensions cellulaires ou aux puits de culture, une solution mère de Matrigel est préalablement préparée en le diluant dans du milieu de culture maintenu à 4°C.

b - Détermination de la concentration en Matrigel optimale

Lorsque cultivées en trois dimensions, les cellules de la lignée SUM1315 ne forment pas naturellement de liaisons entre elles. Ce problème peut être contourné par l'utilisation de Matrigel, ce dernier pouvant induire la formation de liaisons intercellulaires. Un gradient de concentrations a donc été réalisé sur microplaque en utilisant des concentrations de 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 et 6% en Matrigel dans un volume final de milieu de culture de 25 µL/puits. Ce gradient a été testé sur deux concentrations cellulaires : 5 000 et 20 000 cellules/puits.

c - Détermination des concentrations cellulaires optimales

Le nombre de cellules nécessaires pour obtenir un sphéroïde compact et homogène diffère selon les propriétés de la lignée cellulaire utilisée. Pour la lignée SUM1315, un gradient de concentrations cellulaires a donc été réalisé sur microplaque en utilisant 500, 1500, 5000, 6000, 10000, 12000, 20000, 30000 et 50000 cellules par puits, dans un volume final de milieu de culture de 25 µL/puits.

d - Culture cellulaire 3D, technique Hanging Drop

La technique Hanging Drop utilise des microplaques avec puits sans fonds (Plaques Perfecta 3D, Biomatrix®) (Figure 26), permettant le dépôt des cellules sous forme de gouttelettes, suspendues par rétention dans la partie inférieure du puits (Tung YC. et al., 2011). Dans ces conditions, les cellules sont déposées délicatement dans les puits de la plaque à

raison de 25 μL de milieu par puits. Selon les recommandations du fournisseur, le réservoir entourant les puits est rempli d'eau distillée stérile, afin de prévenir l'évaporation du milieu. Les cellules sont ensuite mises à incuber minimum 12h à 37 °C et 5% CO_2 afin de permettre aux cellules de s'agréger et former une sphère au centre du puit. Une fois la formation des agrégats confirmés par observation au microscope optique, 5 μl de milieu à 7% en Matrigel est rajouté à chaque puits pour une concentration finale en Matrigel de 2% dans le milieu. Les cellules sont ensuite remises à 37°C et 5% CO_2 , le Matrigel permettant la formation de liaisons entre les cellules afin d'obtenir des sphéroïdes compacts.

e - Entretien des cultures 3D

De par les conditions particulières des cultures 3D (culture en microplaques et volume restreint de milieu), le milieu s'évapore de manière journalière et il est nécessaire d'en rajouter quotidiennement afin d'entretenir les cultures. Ainsi, 1/5 du volume initial (5 μL) est rajouté chaque jour dans chacun des puits de culture. Cette proportion correspond au volume moyen de milieu s'évaporant journallement.

f - Suivi de la formation des sphères

Le suivi de la formation des sphères est réalisé à l'aide d'un microscope optique (Microscope Realux, CFM-BDS-200, Cofemo®) associé à une caméra (Industrial Digital Camera, UCMOS05100KPA). Selon la taille des amas cellulaires, les observations s'effectuent au grossissement 40X, ou 100X. La caméra, associée au microscope, permet via le logiciel de pilotage ToupView®, la capture des images de sphères, et la mesure du diamètre de celles-ci (conformément aux instructions du fournisseur). L'aspect et la taille des agrégats peuvent ainsi être répertoriés tout au long de l'expérience.

g - Transfert des sphères

Une fois les amas cellulaires compacts (« sphéroïdes ») formés, ils peuvent être transférés dans des microplaques stériles à fonds ronds (Nunc®) à destination d'autres expériences. Dans le cas de la technique Hanging Drop, la plaque de culture Perfecta 3D est détachée de son support et positionnée au-dessus d'une plaque 96 puits à fond rond en faisant coïncider les puits des deux plaques. Les sphères sont ensuite transférées dans le puits situé en dessous par l'addition d'un volume important de milieu (70 à 90 μL), les faisant tomber dans le puit préalablement rempli de milieu.

h - Etude ultra-structurale des sphéroïdes par Microscopie Electronique à Transmission

L'étude ultra-structurale des sphéroïdes est réalisée en microscopie électronique à transmission (MET). Les réactifs utilisés pour la préparation des échantillons sont fournis par le Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (CICS) de Clermont-Ferrand. Pour ce faire, les sphéroïdes, transférés dans une plaque à fond rond, sont dans un premier temps lavés avec du tampon cacodylate de sodium à 0,2M (pH 7,4), puis préfixés dans du glutaraldéhyde à 3,2 % pendant 24h à 4 °C. Afin de faciliter par la suite la manipulation des sphéroïdes, une solution de rouge de ruthénium à 0,15% (fixateur des capsides bactériennes, de couleur rouge) est ajoutée au tampon et au fixateur. Le rouge de ruthénium colore les sphéroïdes, permettant ainsi de les visualiser dans les puits et de les manipuler plus facilement. Cette coloration n'interfère pas avec les manipulations suivantes.

Une fois la préfixation terminée, les sphères sont prises en charge par le CICS qui prépare les sphéroïdes pour l'observation microscopique selon le protocole suivant. Dans un premier temps les sphéroïdes sont transférés dans des tubes ependorfs contenant du cacodylate de sodium à 0,2M (pH 7,4) puis centrifugés 3min à 250g. Les sphéroïdes sont ensuite lavés trois fois pendant 10min avec du tampon cacodylate puis soumis à une post-fixation de 1h00 à température ambiante dans du tétraoxyde d'osmium OsO₄ à 1% dans du tampon cacodylate. Les sphères sont ensuite rincées trois fois pendant 10min avec du tampon cacodylate avant d'être recouvertes avec une goutte d'agar-agar à 2% et chauffé à 42 °C. Une fois l'agar durci, le culot est récupéré et taillé de façon à obtenir un cube de 2mm de côté contenant la sphère. Celui-ci est alors déshydraté grâce à des bains successifs d'éthanol à 70% (3x10min), éthanol 95% (3x10min), éthanol 100% (3x10min) et pour finir d'acétone (3x10min). Après déshydratation, les sphéroïdes sont inclus dans de la résine époxy grâce à des bains successifs dans un mélange acétone/résine épon : 1h dans un mélange 2/3 acétone / 1/3épon, 1h dans un mélange ½ acétone / ½ épon, 1h dans un mélange 1/3 acétone / 2/3 épon et pour finir, une nuit d'incubation dans de la résine épon pure. L'inclusion se poursuit pendant deux nuits dans une étuve à 60 °C. Les échantillons inclus sont alors découpés, grâce à un ultramicrotome UC6 (Leica®), en coupes ultra fines de 80nm qui sont marquées au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyl avant observation au microscope électronique à transmission H7650 (Hitachi®) couplé à une caméra en position latérale (AMT Hamamatsu).

RESULTATS

I - Etude de la co-expression de deux protéines « Multidrug Resistance » (MDR) chez la lignée SUM1315 de phénotype BLTN traitée avec l'Olaparib, en corrélation avec la concentration intracellulaire de cet anti-PARP.

L'efficacité d'un traitement est en relation directe avec le maintien du médicament cytotoxique dans les cellules cibles. Cette efficacité est le plus souvent compromise par l'action des pompes d'efflux membranaires, intitulées transporteurs MDR, reconnues comme étant l'une des causes principales de la chimiorésistance. Dans ce contexte, nous avons commencé nos travaux par l'étude de la cinétique d'expression de deux protéines MDR majeures, la P-gp et la BCRP, chez la lignée cellulaire SUM1315, de phénotype BLTN. Cette étude a été réalisée par la technique de western blot en utilisant l'anticorps monoclonal anti P-gp C219 et l'anticorps monoclonal anti BCRP MAB4146. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une co-expression basale de ces deux protéines chez cette lignée.

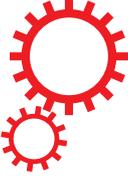
Nous avons ensuite analysé la cytotoxicité de l'Olaparib sur la lignée SUM1315. Pour cela, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes (20 à 100 μM) d'Olaparib sur la survie des cellules de la lignée SUM1315 à l'aide du test au Sulforhodamine B. Ces expériences ont démontré qu'après 24h de traitement avec Olaparib, un effet cytotoxique de type dose dépendant est détecté sur les cellules de cette lignée. Cependant au cours de cette période, la viabilité cellulaire ne descend pas en dessous de 80%. Suite à ces résultats, la concentration de 50 μM en Olaparib a été choisie pour la suite des expériences.

La modulation d'expression de la BCRP et de la P-gp chez les cellules de la lignée SUM1315 a ensuite été étudiée pendant 24h d'exposition à 50 μM d'Olaparib. Nos résultats indiquent que l'exposition des cellules SUM1315 à cette concentration d'Olaparib entraîne une induction de l'expression de ces deux protéines MDR avec une réponse de type relais. En effet, l'expression de la BCRP augmente dès la première heure de traitement et persiste durant 4,5h avant son retour à un taux basal. Ensuite, la P-gp prend le relais à partir de la 3^{ème} heure de traitement, par une forte augmentation de son expression. Le taux d'expression de la P-gp diminue ensuite progressivement au cours du temps, pour retrouver sa valeur basale à 24h. Ainsi, chez les cellules de la lignée SUM1315, un mécanisme précoce de résistance *via* la co-expression de deux protéines MDR majeures, la BCRP et la P-gp, est mise en place à l'encontre de l'Olaparib au début du traitement. Cependant, ce phénomène semble être limité dans le temps.

En parallèle, nous avons également étudié l'évolution de la concentration intracellulaire en Olaparib dans les cellules de la lignée SUM1315 dans les mêmes conditions expérimentales. A cette fin, nous avons mis au point une technique de dosage de l'Olaparib intracellulaire par HPLC. Les résultats montrent que (i) l'Olaparib entre rapidement dans les cellules, (ii) atteint sa concentration maximale dans les cellules SU1315 après 3h de traitement et (iii) se maintient/stabilise ensuite dans ces cellules. Par ailleurs, aucun produit de dégradation d'Olaparib n'est détecté ni dans le milieu, ni dans les cellules, durant nos expériences. De plus l'étude de la cytotoxicité de l'Olaparib à 50 μ M sur les cellules de la lignée SUM1315 au cours du temps montre une baisse du taux de survie cellulaire de l'ordre de $90 \pm 3\%$, $76 \pm 13\%$ et $36 \pm 4\%$ après une exposition respective de 24h, 72h et 120h à cet anti-PARP.

L'ensemble de ces résultats suggère que les mécanismes de résistance instaurés par la surexpression des pompes d'efflux membranaires au début du traitement peuvent être détournés par le maintien d'une quantité stable et cytotoxique d'Olaparib dans les cellules tumorales au cours du temps. Comme les effets secondaires d'Olaparib sont modérés, cette stratégie pourrait être adaptée en clinique afin de favoriser l'optimisation du traitement des tumeurs du sein de phénotype TNBL avec cet anti-PARP. Ces travaux sont exposés dans la publication présentée ci-dessous et intitulée « *BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib* ».

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib

Received: 05 January 2015

Accepted: 29 June 2015

Published: 03 August 2015

Robin Dufour^{1,2}, Pierre Daumar¹, Emmanuelle Mounetou^{4,*}, Corinne Aubel^{3,*}, Fabrice Kwiatkowski², Catherine Abrial², Catherine Vatoux², Frédérique Penault-Llorca^{2,*} & Mahchid Bamdad^{1,*,†}

The triple negative basal-like (TNBL) breast carcinoma is an aggressive and unfavorable prognosis disease. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase such as Olaparib could represent a promising targeted therapy but their sensitivity against Multidrug Resistance proteins (MDR), which causes resistance, is not well defined. Thus, our work focused on the analysis of P-gp and BCRP coexpression in the SUM1315 TNBL human cell line, in correlation with Olaparib intracellular concentration. Western blot analyses showed a clear coexpression of P-gp and BCRP in SUM1315 cells. A low cytotoxic Olaparib treatment clearly led to an increased expression of both BCRP and P-gp in these cells. Indeed, after 1.5 h of treatment, BCRP expression was increased with a 1.8 fold increase rate. Then, P-gp took over from 3 h to 15 h with an average increase rate of 1.8 fold, and finally returned to control value at 24 h. HPLC-UV analyses showed that, in the same treatment conditions, the intracellular Olaparib concentration increased from 1 h to 3 h and remained relatively stable until 24 h. Results suggest that the resistance mechanism induced by Olaparib in TNBL SUM1315 cell line may be overpassed if a cytotoxic and stable intracellular level of the drug can be maintained.

Basal-like (BL) carcinomas represent 10–15% of all invasive breast cancers (BC). These tumors are recognized in clinical practice by their “triple negative” (TN) immunophenotype, *i.e.* estrogen receptor, progesterone receptor and HER2 negative, associated with expression of one or more high molecular weight cytokeratins (5/6,14 or 17) and/or endothelial growth factor receptor (EGFR)¹. The triple negative basal-like (TNBL) carcinoma is an aggressive and unfavorable prognosis disease. It appears frequently

¹Clermont Université - Université d'Auvergne - ERTICa – EA 4677 - Institut Universitaire de Technologie, Département Génie Biologique, Ensemble universitaire des Cézeaux, B.P. 86 - 63172 AUBIERE CEDEX, France.

²Clermont Université - Université d'Auvergne - ERTICa – EA 4677. Centre Jean Perrin, 58 Rue Montalembert, BP 392 - 63011 CLERMONT-FERRAND CEDEX France. ³Clermont Université - Université d'Auvergne - ERTICa – EA 4677. Faculté de médecine, 28 place Henri Dunant, BP 38 - 63001 Clermont-Ferrand, France. ⁴UMR 990 INSERM - Université d'Auvergne, BP 184, 63005 CLERMONT-FERRAND CEDEX, France. *These authors contributed equally to this work. †Current address: Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand – Université d'Auvergne, Département Génie Biologique, Ensemble Universitaire des Cézeaux, 5 avenue Blaise Pascal, CS30086 - 63172 AUBIERE CEDEX France. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.B. (email: mahchid.bamdad@udamail.fr)

in young women, shows an unusual sarcoma-like pattern of metastasis, and is highly associated with constitutive mutations of the BRCA1 gene².

The management of TNBL carcinomas is not standardized yet. It is based on the use of classical cytotoxic drugs *i.e.* anthracyclines and/or taxanes, although conventional chemotherapy is not always effective in these tumors. Indeed, due to their high proliferative capacity, TNBL tumors first respond to neoadjuvant treatments, but a systematic relapse is then detected, probably caused by resistance³. There is an urgent need for more specific therapies for TNBL and BRCA1-mutated tumors². Therapeutic progress relies on a better understanding of underlying molecular alterations that occur in these tumors. BRCA1 and BRCA2 play a major role in DNA repair. As a consequence, their defects lead to genetic instability and resistance to the classical drugs used in BC treatment, *i.e.* anthracyclines and taxanes^{4,5}.

Thus, new targeted therapies in general and inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in particular could represent a promising therapeutic approach for this type of cancer^{6–8}. BRCA1 and BRCA2 genes regulate the repair of damaged DNA *via* the homologous recombination (HR) mechanism, one of the DNA repair pathway^{9,10}. Therefore, TNBL tumors, which are often BRCA1/2 deficient, are HR-deficient². PARP is a nuclear enzyme involved in another DNA repair pathway called base excision repair (BER)¹⁰. Through the concept of synthetic lethality, inhibition of PARP in TNBL-BRCA deficient cells causes tumor cells death¹¹. Several PARP inhibitors are currently under clinical trial, including Olaparib (AZD 2281; AstraZeneca, London, UK). About ten clinical studies are underway to test Olaparib for breast and ovarian cancer treatments¹². However, despite the great interest in this type of targeted therapy, several anti-PARPs resistance mechanisms have been identified by *in vitro* and *in vivo* preclinical approaches. The PARP inhibitors action can be altered, either by molecular mechanisms involving the mode of operation of anti-PARPs such as partial HR deficiency, genetic reversion of BRCA mutations or loss of PARP1 expression, or by the Multidrug Resistance transporters (MDR) resistance mechanism^{13–17}.

The so-called MDR proteins were discovered as membrane transporters inducing chemotherapy resistance in cancer. MDR transporters belong to the “ATP-binding cassette” (ABC) superfamily of proteins, which were highly conserved during evolution. Indeed, these proteins are naturally expressed in all living organisms from prokaryotes to eukaryotes¹⁸. The two major MDR proteins, Permeability-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), which belong to the ABCB and ABCG subfamily, respectively, have been showed to be frequently expressed in human cancer. MDR proteins act as xenobiotics efflux pumps able to transport various drugs out of cells. They recognize a large variety of substrates with different structures and properties, including many classical chemotherapeutic agents¹⁹. Target substrates of these transporters are mainly hydrophobic, but also ionic amphipathic molecules. The MDR system complexity is particularly reflected in the fact that one compound can be the substrate of several MDR transporters. During evolution, the MDR system has formed a cell membrane-localized network that protects the cell from xenobiotics. At present, MDR transporters are considered to be the essential part of an innate cellular defense system, the “chemoimmunity” network, which has a number of reminiscent features of classical immunology¹⁹.

In this context, the present work focused on the analysis of P-gp and BCRP coexpression in the SUM1315 TNBL human cell line, in correlation with Olaparib intracellular concentration.

Results

BCRP and P-gp coexpression in SUM1315 TNBL cell line. Intrinsic expression of BCRP and P-gp was studied in SUM1315 cell line, using Western blot analysis. Results showed that the monoclonal anti-P-gp antibody C219 and the anti-BCRP MAB4146 antibody clearly marked two proteins of 170 kDa and 72 kDa, respectively. More, the monoclonal anti-tubulin antibody DM1A marked a tubulin protein with a molecular weight of about 50 kDa, which was used as the internal protein control (Fig. 1A and supplementary Fig. S1). The expression level of BCRP in TNBL cells was 0.34 ± 0.03 a.u. and that of P-gp was 0.54 ± 0.05 a.u. (Fig. 1B).

SUM1315 cell viability in presence of increasing concentrations of Olaparib. The rate of SUM1315 cell viability was analyzed after treatment with increasing Olaparib concentrations (20, 40, 50, 60, 80 and 100 μ M) during 24 h, using sulforhodamine B (SRB) viability assay. In parallel, a 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) control without Olaparib was also performed. The results (Fig. 2) showed that the SUM1315 cell viability was $100 \pm 5\%$ for 0.1% DMSO control. 0.1% DMSO had no effect on the cell viability. In presence of 20 to 40 μ M Olaparib, the cell viability rate decreased slightly but significantly (a mean $94 \pm 4\%$) as compared to control values. For 50 and 60 μ M Olaparib, the cell viability rate decreased to a mean of about $90 \pm 3\%$. In presence of higher Olaparib concentrations (80 and 100 μ M) the viability cell rate decreased to $85 \pm 5\%$.

Coexpression kinetic level of BCRP and P-gp in SUM1315 cell line in presence of Olaparib. The kinetic of BCRP and P-gp coexpression levels in SUM1315 cell line was then investigated during 24 h, with or without 50 μ M Olaparib treatment, using Western blot analysis (Fig. 3). Control and DMSO 0.1% control cells were also performed (Fig. 3A,B). The BCRP expression levels remained stable from 1.5 h to 24 h in the control cells (0.31 ± 0.04 a.u. and 0.33 ± 0.04 a.u., respectively) and in the 0.1% DMSO controls (0.32 ± 0.03 and 0.31 ± 0.03 a.u., respectively). Statistical analysis showed no significant difference

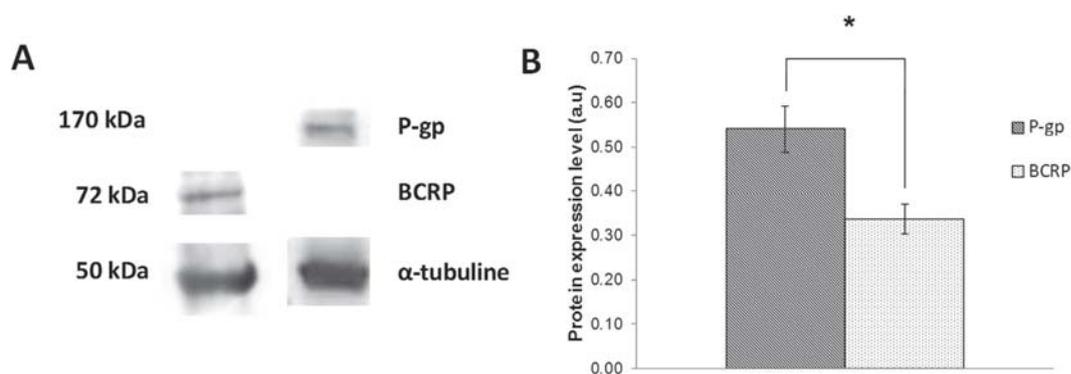


Figure 1. Basal coexpression of BCRP and P-gp in SUM1315 cell line. (A) P-gp and BCRP expression were analyzed using Western blot analysis. P-gp and BCRP weighed 170 kDa and 72 kDa, respectively. α -tubulin was used as internal control and presented a molecular weight of about 50 kDa. The full-length blot is presented in Supplementary Fig. S1. (B) P-gp and BCRP expression level was quantified using QuantityOne software (Biorad[®]). Statistical analyses were performed by student's t test. *indicates a significant difference ($p < 0.05$) in P-gp and BCRP expression.

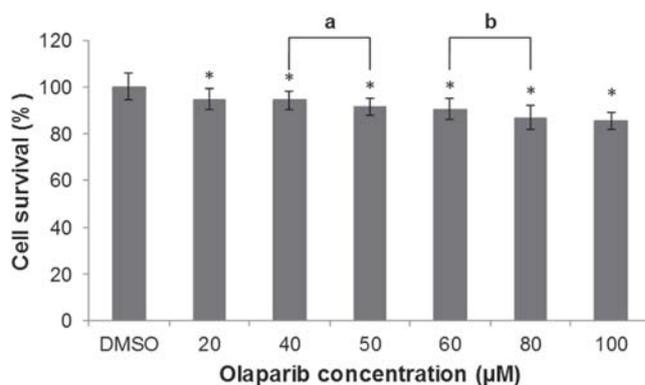


Figure 2. Cell survival rate of SUM1315 cell line in presence of increasing Olaparib concentration. Cell viability was analyzed using the SRB cell viability assay. Statistical analyses were performed by student's t test. *indicates a significant difference ($p < 0.05$) in cells survival between 0.1% DMSO control and Olaparib treated cells. "a" and "b" indicate a significant difference ($p < 0.05$) in cells survival between two concentrations of Olaparib.

between control cells and the 0.1% DMSO control. Therefore, 0.1% DMSO had no effect on the expression level of BCRP in TNBL SUM1315 cell line (Fig. 3A). In parallel, P-gp expression levels in the SUM1315 cell line were measured during 24 h (Fig. 3B,D). As for BCRP, the P-gp expression levels remained stable from 1.5 h to 24 h in control cells (0.52 ± 0.02 , 0.53 ± 0.03 a.u., respectively) and in 0.1% DMSO control (0.53 ± 0.02 , 0.52 ± 0.06 a.u., respectively). Similarly, statistical analysis showed no significant difference between control cells and 0.1% DMSO control, for P-gp expression during the experiment. Consequently, 0.1% DMSO had no effect on the P-gp expression in SUM1315 cell lines (Fig. 3B).

The kinetic coexpression of BCRP and P-gp in SUM1315 cell cultures was then analyzed after 1.5 h, 3 h, 4.5 h, 6 h, 15 h and 24 h of treatment with 50 μ M Olaparib (Fig. 3C,D). After adding 50 μ M Olaparib in cell culture, BCRP expression (Fig. 3C) increased significantly from 1.5 h and remained high until 4.5 h (0.59 ± 0.05 a.u. and 0.51 ± 0.08 a.u., respectively). In control 0.1% DMSO control, the BCRP level was 0.32 ± 0.04 a.u. at 1.5 h and 0.28 ± 0.01 a.u. at 4.5 h. Then, the rate of BCRP expression decreased and remained relatively close to controls from 6 h to 24 h (0.31 ± 0.02 a.u. and 0.28 ± 0.02 a.u., respectively). In the same TNBL treated cell culture, P-gp expression level increased significantly from 3 h to 6 h after 50 μ M Olaparib treatment (Fig. 3D) (1.21 ± 0.14 a.u. and 0.94 ± 0.07 a.u. against 0.55 ± 0.04 a.u. and 0.52 ± 0.05 a.u. for 0.1% DMSO control, respectively). Then, the P-gp expression level slightly decreased at 15 h (0.71 ± 0.15 a.u.) but still remained significantly higher than the control 0.1% DMSO (0.52 ± 0.03 a.u.). After 24 h of treatment, the level of P-gp expression returned to the control level (0.58 ± 0.05 a.u. for P-gp and 0.52 ± 0.06 a.u. for 0.1% DMSO control).

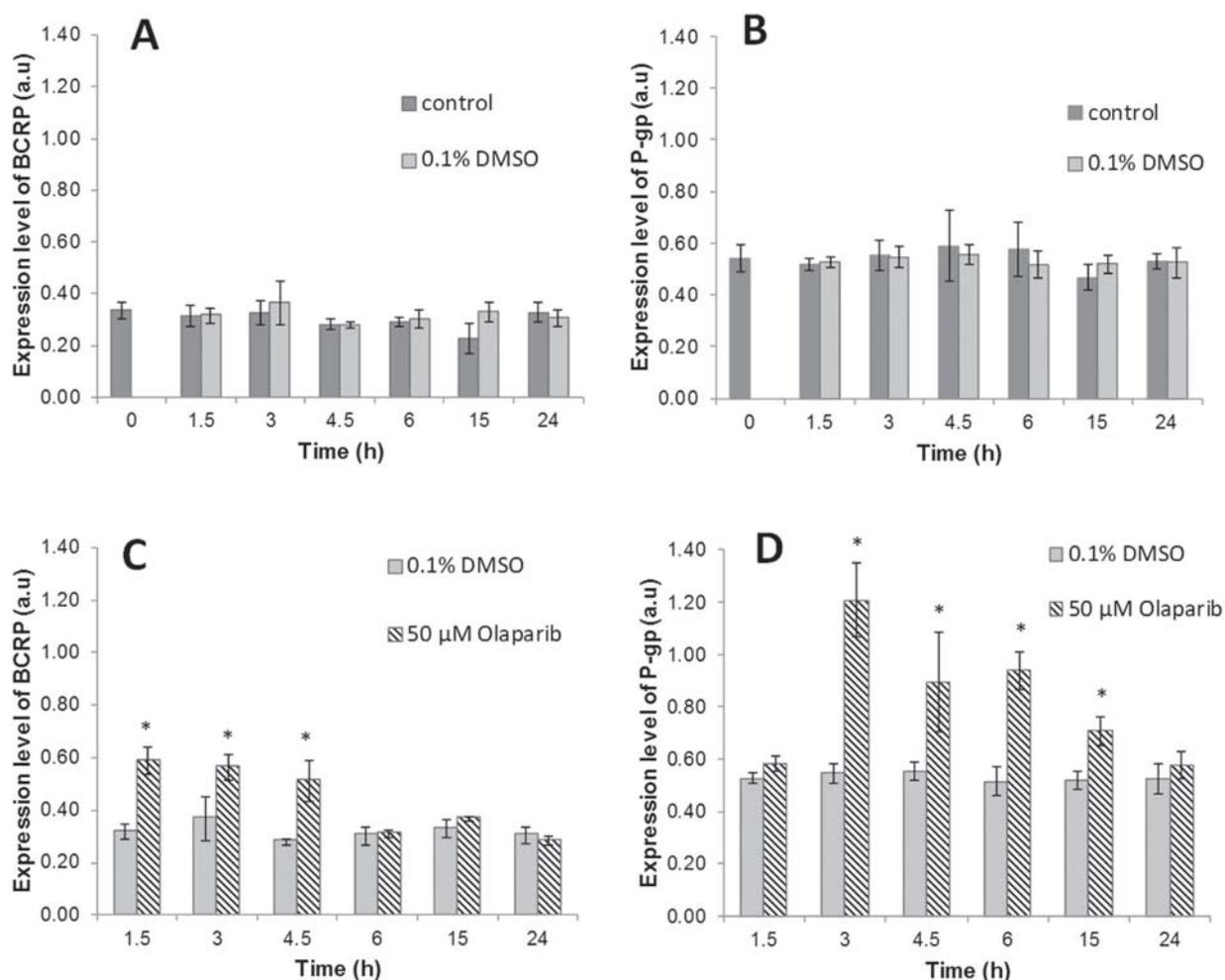


Figure 3. P-gp and BCRP coexpression induction in SUM1315 cell line in the presence of Olaparib. P-gp and BCRP expression levels were analyzed in total protein extract from SUM1315 cells using Western blot analysis. Protein expression was quantified using QuantityOne software (Biorad®). (A) Expression level of BCRP in untreated cells and cells treated with 0.1% DMSO. (B) Expression level of P-gp in untreated cells and cells treated with 0.1% DMSO. (C) Expression level of BCRP in 0.1% DMSO control cells and in cells treated with 50 μM Olaparib. (D) Expression level of P-gp in 0.1% DMSO control cells and in cells treated with 50 μM Olaparib. Statistical analyses were performed by student's t test. *indicate a significant difference ($p < 0.05$) in BCRP or P-gp expression between control 0.1% DMSO and Olaparib treated cells.

Intracellular quantification of Olaparib in SUM1315 cell line. In parallel of MDR proteins expression level studies, a high performance liquid chromatography analytical method with UV detection (HPLC-UV) was developed. This method was used to determine the intracellular quantity of Olaparib in SUM1315 cells after a 50 μM treatment with the drug. The analytical method was used to determine intracellular Olaparib quantities both in cells and in the cell media after different incubation times.

The retention time (t_R) for Olaparib under the chromatographic conditions was 6.4 min. It was checked each day an experiment was performed with a freshly prepared standard solution of the drug in acetonitrile. The UV detection was performed at 218 nm and compared with the standard Olaparib UV spectrum (200–380 nm). Quantitative analyses were performed at 1, 2, 3, 6, 15 and 24 hours. Results are normalized to the highest concentration value and are expressed in percentage. For each incubation time, an untreated control sample was prepared and injected on the chromatographic system.

Results of intracellular Olaparib quantification are shown in Fig. 4. Olaparib was detected at every time points, from 1 to 24 h. The Olaparib level in TNBL cells increased regularly over time from 1 h to 3 h and then remained stable until 24 h. It increased significantly ($p < 0.05$) from 1 h to 3 h ($61.9 \pm 2.2\%$ and $93.9 \pm 10.8\%$, respectively). Then, the quantity of Olaparib remained steady until 24 h with no statistically different variation. No degradation product was detected. Also, analysis of the culture media showed that the Olaparib extracellular level remained stable until the latest 24 h time point (Supplementary Fig. S2), and that Olaparib was stable under the incubation conditions as no degradation product was observed.

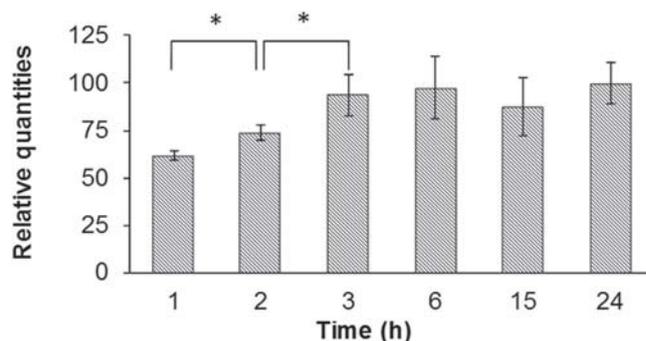


Figure 4. Intracellular Olaparib quantification in SUM1315 cell line over time. For intracellular Olaparib quantification, analytical HPLC experiments were performed. Olaparib was detected at 218 nm and quantified by measuring the area under the curve (AUC) of the corresponding chromatographic peak. Results are expressed in percentage of the highest AUC value.

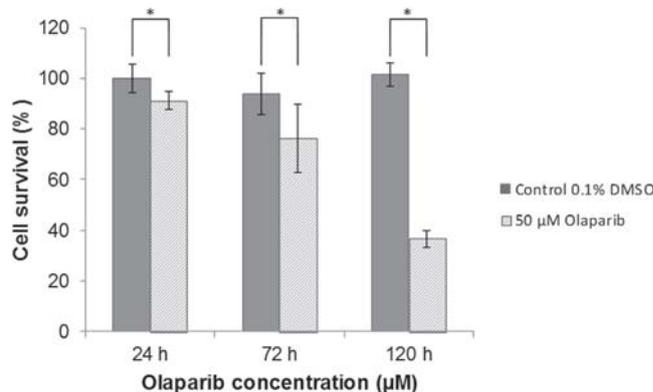


Figure 5. Cell survival rate of SUM1315 cell line in presence of 50 μM Olaparib over time. SUM1315 cells were treated with 50 μM Olaparib and the cell viability was analyzed with the SRB cell viability assay after 24, 72 and 120 h of treatment. Statistical analyses were performed by student's t test. *indicate a significant difference ($p < 0.05$) in cells survival between controls and treated cells.

SUM1315 cell viability in presence of 50 μM Olaparib over time. The rate of SUM1315 cell viability was analyzed in presence of 50 μM Olaparib until 120 h, using sulforhodamine B (SRB) viability assay. In parallel, a 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) control without Olaparib was also performed. The results (Fig. 5) showed that the SUM1315 cells viability was $100 \pm 5\%$ for the 0.1% DMSO control. In presence of 50 μM Olaparib, the cell viability rate decreased to $90 \pm 3\%$, $76 \pm 13\%$ and $36 \pm 4\%$ after 24, 72 and 120 h, respectively.

Discussion

Breast cancer is one of the most diagnosed diseases in the world. Among the subtypes of breast cancer, the TNBL phenotype, which affects mainly young women, is particularly aggressive and presents a poor prognosis. Indeed, the lack of estrogen, progesterone and HER2 receptors expression in these tumor cells makes them insensitive to targeted anti-hormone and/or anti-HER2 therapies¹. As a consequence, the main treatment remains conventional chemotherapy, with good initial response in some cases, but the tumor is rarely eradicated. Therefore, new targeted therapies represent an urgent need^{20,21}. PARP inhibitors, a new class of targeted drugs, specifically targeting TNBL tumor cells is being developed and is currently being tested in clinical research^{6,7}. Based on the synthetic lethality concept, anti-PARPs specifically target TNBL-BRCA deficient tumor cells, thus causing their death¹¹. Olaparib (AZD 2281; AstraZeneca, London, UK) is an anti-PARP, which was recently approved by the US Food and Drug Administration and European commission for the treatment of advanced ovarian cancer in patients with BRCA mutations. This drug is also currently in clinical research for various cancers such as solid tumors, breast, prostate, lung, esophagi, gastric, colorectal and brain and central nervous system cancers. In these studies, Olaparib is either used alone or in combination with other anticancer drugs¹². Regarding breast cancer, several clinical studies are currently underway with Olaparib on triple negative breast cancer¹². However, despite the great interest in this type of targeted therapy, three mechanisms of resistance to

PARP inhibitors have been identified. Namely, secondary BRCA gene mutations, the loss of PARP target protein expression, and the upregulation of MDR efflux transporters^{13,15,17,22}.

MDR proteins were identified long ago as a major cause of drug resistance in tumor cells. This defense system causes the efflux of cytotoxic drugs outside the tumor cells¹⁹. At present, ABCB1/MDR1/P-gp, ABCC1/MRP1, ABCC10/MRP7 and ABCG2/BCRP/MXR are recognized as the major clinically relevant MDR transporters¹⁴. In this context, the present work focused on the respective implication of P-gp and BCRP, in SUM1315 TNBL cell line model, in response to the PARP inhibitor Olaparib.

The analysis of the expression of P-gp and BCRP in untreated TNBL SUM1315 cell line showed a clear basal coexpression of the two MDR proteins. However, P-gp expression was 1.6 times higher than BCRP. These results suggest that this mechanism of cellular resistance is already present in this TNBL cell line before treatment. Interestingly, the basal coexpression of these two MDR proteins may be partly responsible for the TNBL tumors aggressiveness and poor outcomes reported in clinical practice. Little data exists on the implication of MDR proteins in TN tumors. For instance, it was reported that chemotherapy treatments on TN breast cancers could be individualized and their efficiency rose based on the expression patterns of P-gp obtained from immunohistochemical analyses of patients' biopsies²³. Regarding BCRP, it was reported that the IMP3 protein promotes chemoresistance in SUM1315 and MDA-468 TNBL cell lines by regulating this MDR protein expression²⁴. Moreover, BCRP expression was also clearly detected in side population of MDA-MB-231 TNBL cell lines²⁵.

After basal co-expression of P-gp and BCRP analysis, the impact toxicity of Olaparib was analyzed in SUM1315 cell line in presence of increasing concentrations of drug, ranging from 20 to 100 μ M. SRB viability test highlighted few toxicity of Olaparib on these TNBL cell line, with a decrease of about 10% of cell viability at 50 μ M and 15% at 100 μ M, after a 24h exposure. The low toxicity concentration of 50 μ M Olaparib was then chosen for the next experiments.

To analyze the "resistance response" of TNBL tumor cells against Olaparib in SUM1315 model cell line, the coexpression of P-gp and BCRP was studied in relationship with intracellular concentration of this anti-PARP, during 24h. The coexpression pattern of BCRP and P-gp over time with a 50 μ M Olaparib treatment clearly showed relay overexpression of the two MDR proteins. Indeed, after 1.5h of treatment, only BCRP expression was clearly increased, with a rate 1.8 fold higher than the control. BCRP expression level remained stable and still high to 4.5h and then returned to control level at 6h. P-gp expression level was clearly induced after BCRP, from 3h to 15h of treatment, with an average rate of 1.8 fold higher than control. P-gp expression level decreased to the control value after 24h. These results first showed that Olaparib clearly induced the expression increase of both MDR proteins in this TNBL cell line, which may represent a defense system against this drug. Interestingly, Rucaparib, another PARP inhibitor, was also showed to be transported by both BCRP and P-gp, in polarized monolayers MDCKII human cell line²⁶. In our study, the coexpression pattern in SUM1315 cell line of both MDR against Olaparib suggests that BCRP would constitute the first line of defense against this drug. This defense line was strengthened and then relayed by P-gp. All these results suggest that in TNBL tumors, a resistance network settles rapidly against Olaparib. The recognition of Olaparib by P-gp was already reported in *in vitro* models such as in the overexpressing drug-resistant IGROVCDDP cisplatin-resistant ovarian cancer cell line, in the KB-8-5-11 multidrug resistant epidermal carcinoma cell line and in BRCA1-mutated mouse mammary tumors^{27,28}. In *in vivo* mouse model, it was shown that the resistance to Olaparib could be acquired by the upregulation of Abcb1a/b genes in a TN tumor model¹⁶.

In parallel of MDR proteins expression studies, the intracellular level of Olaparib in SUM1315 cell line treated in the same experimental conditions was investigated. To that end, a new high performance liquid chromatography method was developed. Results showed that Olaparib rapidly enters the cells. Intracellular Olaparib quantities in cells increased steadily and significantly from 1h to 3h (52% increase) and then remained stable at the same level until 24h. No degradation products were detected in cell samples or in the culture media, which showed that Olaparib was stable under the incubation conditions even after 24 hours. Moreover, the Olaparib concentration in the culture media remained constant at each time point.

Overall, our results show that the presence of Olaparib in the intracellular milieu leads to the significant overexpression of BCRP. That first line of defense settles very rapidly after the beginning of drug exposure and, while dropping back to its basal level, is relayed by the marked overexpression of P-gp. Interestingly, the P-gp overexpression occurs after 3h, when the intracellular Olaparib reaches its highest level. As mentioned before, this intracellular level remained stable at later time points until 24h, but the MDR protein expression slowly returned to basal level at 24h. Thus, in presence of a low toxic Olaparib concentration, a stable level of PARP inhibitor remains into cells despite the early induction of MDR proteins. This intracellular level of Olaparib led to the establishment of a progressive cytotoxicity in these cells, which could explain the return to basal expression of both MDR proteins that was observed. This hypothesis was further supported by the significant decrease in cell viability that was observed after a longer term of 50 μ M Olaparib treatment.

In conclusion, a BCRP and P-gp relay overexpression induced by Olaparib in TNBL SUM1315 cell line may be involved in resistance to PARP inhibitor Olaparib. Our results further suggest that this resistance mechanism may be overpassed if a cytotoxic and stable intracellular level of the drug can be maintained. As Olaparib adverse effects are moderate and generally well manageable, this strategy could be adapted to clinical settings and foster the optimization of TNBL Olaparib treatment regimen.

Methods

Chemicals and Reagents. All chemicals, unless otherwise noted, were acquired from Sigma-Aldrich (France) and were used as received without further purification. Olaparib was obtained from Sequoia Research Products (Pangbourne, UK). Sulforhodamine B (SRB) was purchased from Sigma-Aldrich (France). All chemicals and solvents used were of HPLC or analytical-reagent grade, and water was purified using Milli-Q gradient A10 (Merck Millipore, UK). All the solvents were filtered through a 0.45 μm Durapore PVDF membrane filter (Merck Millipore, UK) before being used in the chromatographic system. DMSO was of molecular biology grade.

SUM1315 Cell Culture. SUM1315 cells were obtained from Asterand (Royston, UK) and maintained by weekly serial passage in a 5% CO_2 atmosphere at 37 °C. Cells were cultured in Ham's F12 medium (GIBCO™, France) supplemented with 5% fetal bovine serum, 10 mM HEPES buffer, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin, 10 ng/mL EGF and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin.

Preparation of Olaparib solutions and cell culture exposure. Olaparib was dissolved in DMSO as a stock solution at 50 mM. For each experiment, 250 000 cells/ml were first seeded in 5 ml of culture medium and incubated at 37 °C during 24 h for cell adhesion to the flask. The cell cultures were then exposed to 50 μM Olaparib during 1.5 h, 3 h, 4.5 h, 6 h, 15 h and 24 h. For each Olaparib concentration studied, the required volume of Olaparib was removed from the Olaparib stock solution. This was then supplemented with the appropriate volume of DMSO, so that the final DMSO concentration remained always constant *i.e.* 0.1%, in all analyzed cell cultures. In parallel, two controls (i) untreated cells and (ii) cells treated with 0.1% DMSO were carried out.

Cell Viability Assay. SUM1315 cell viability was measured using the Sulforhodamine B (SRB) colorimetric assay²⁹. For this, 5000 cells/well in 200 μL of culture medium were seeded in 96-well microplates and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 , for cells adhesion to the well. In each microplate, a range of controls (untreated cells), controls 0.1% DMSO was performed. In a first series of assays, increasing Olaparib concentrations (20, 40, 50, 60, 80 and 100 μM) were tested and the cell viability was measured after 24 h of incubation. In another series of assays, a fixed 50 μM Olaparib concentration was chosen and the cell viability was measured after various incubation times (24 h, 48 h and 120 h). The final DMSO concentration in each well was always 0.1%. After treatment, cell culture was fixed with trichloroacetic acid at the final concentration of 10% per well. After 1 h incubation at 4 °C, the medium was removed. Cells were washed three times with distilled water. Then, cells were stained by adding 50 μL of 0.4% SRB in 1% acetic acid solution, for 15 min. After three washing with 1% acetic acid, each well was treated with 200 μL of Tris base (10 mM; pH 10.5) and the plate was stirred 30 min for homogenization at room temperature. The absorbance of each well was measured at 540 nm using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). The viability rate of control cells was determined by the ratio of 0.1% DMSO treated cells/untreated cells. For Olaparib treated cells, viability rate was determined for each concentration by calculating the ratio Olaparib treated cells/0.1% DMSO treated cells.

MDR expression studies by Western blot analysis. For each experiment, with or without Olaparib treatment, SUM1315 cell cultures pellet were washed with phosphate buffered saline (PBS) (2 \times 5 mL), trypsinized (1X trypsin) and re-suspended in culture medium (10 mL) before centrifugation at 4 °C (250 g, 10 min). Cell lysates were prepared from cell pellets using a lysis buffer of 20 mM tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 6 mM 2-mercaptoethanol (100 μL) supplemented with 1% protease inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail P8340, Sigma-Aldrich, France) in conjunction with sonication (5 \times 3s) at 4 °C. Protein concentration was determined using a protein assay kit (Coomassie Plus – The Better Bradford Assay™ Kit, Thermo Scientific, France) according to the manufacturer's protocol. Western blotting was then carried out according to Valton *et al.*, 2013¹⁸. Briefly, each lysate was diluted in a sample buffer (1.25 M tris-HCl, 20% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, 2 M dithiothreitol, 0.5% bromophenol blue, pH 6.8) to a protein concentration of 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, and 20 μL of each diluted sample were electrophoresed. P-gp and BCRP were probed using the C219 monoclonal antibody (Calbiochem, Millipore, France) at a 1:500 dilution and the MAB4146 monoclonal antibody (Calbiochem, Millipore, France) at a 1:400 dilution, respectively, and a goat anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Promega, France) at a 1:10000 dilution. The α -tubulin loading control was probed using the DM1A mouse monoclonal antibody at a 1:100000 dilution and the same HRP conjugated secondary antibody. Immune complexes were visualized by chemiluminescence using the ECL2-enhanced chemiluminescence detection system (Pierce, Thermo Scientific, France) according to the manufacturer's specifications. Densitometric analyses were performed using Quantity-One software (version 4.6.6, Bio-Rad, France). P-gp or BCRP expression was determined by calculating the ratio of the density of the corresponding band over the density of the α -tubulin band. This ratio was expressed in arbitrary unit (a.u.).

High performance liquid chromatography for intracellular Olaparib quantification. For intracellular Olaparib quantification, analytical HPLC experiments were performed on a HP 1100 series LC system equipped with an online degasser, a quaternary pump, a column oven, a photodiode array detector and an autosampler. Solvents A (H_2O with 0.1% v/v TFA) and B (acetonitrile with 0.1% v/v

TFA) used for the preparation of the mobile phase were filtered before use. The temperature of the column oven was kept at 25 °C. A gradient elution was applied at a flow rate of 0.8 mL/min through a reversed-phase Nova-Pak® 4 µm C18 column (150 × 3.9 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA) with an additional Nova-Pak® guard column. The following gradient was employed: 0–11 min, 5–80% B; 11–13 min, 80% B; 13–15 min, 80–5% B; 15–19 min, 20%. 20 µL were injected into the HPLC system. The photodiode array detection was carried out from 200 to 380 nm. Olaparib was detected at 218 nm and quantified by measuring the area under the curve (AUC) of the corresponding chromatographic peak at a retention time of 6.4 min. Results are expressed in percentage of the highest AUC value and the purity of the peak was assessed by comparing the UV spectrum (200–380 nm) with the one obtained with a 50 µM standard solution of Olaparib in acetonitrile. HP Chemstation software (version B.04.03-SP1, Agilent Technologies, France) was used for acquisition of chromatograms and integration data.

SUM1315 cell culture (250 000 cells/mL) was treated with 50 µM Olaparib during 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 15 h and 24 h). After each incubation time, the culture medium was removed and stored at 4 °C for analysis. Cells were subsequently washed with ice-cold PBS (2 × 2 mL) and then lysed by scraping in acetonitrile (2 mL) in conjunction with sonication (5 × 3 s). After centrifugation of the samples at 4 °C (350 g, 10 min), the supernatant was filtered through a 0.45 µm PVDF membrane filter and pipetted into a 1 mL autosampler vial for injection.

For each experiment, the concentration of Olaparib in the cell culture medium was also determined. The culture medium was diluted (1:2) with acetonitrile and the mixture was subsequently stirred and centrifuged at 4 °C (350 g, 10 min). The supernatant was filtered through a 0.45 µm PVDF membrane filter and pipetted into a 1 mL autosampler vial for injection.

Data analysis. All experiments were performed at least in triplicate. Results are presented as means ± standard deviation. Statistical analyses were performed with Microsoft Excel using a two-sided Student's *t* test. *p* < 0.05 was considered as significant.

References

1. Badve, S. *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* **24**, 157–167 (2011).
2. Dawson, S. J., Provenzano, E. & Caldas, C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer* **45 Suppl 1**, 27–40 (2009).
3. Haupt, B., Ro, J. Y. & Schwartz, M. R. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. *Arch Pathol Lab Med* **134**, 130–133 (2010).
4. D'Andrea, A. D. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N Engl J Med* **362**, 1909–1919 (2010).
5. Penault-Llorca, F. & Arnould, L. Adjuvant breast cancer: which clinical and pathological characteristics in 2007? *Bull Cancer* **97**, 1421–1426 (2010).
6. Annunziata, C. M. & Bates, S. E. PARP inhibitors in BRCA1/BRCA2 germline mutation carriers with ovarian and breast cancer. *F1000 Biol Rep* **2** (2010), doi: 10.3410/B2-10.
7. Drew, Y. & Plummer, R. PARP inhibitors in cancer therapy: two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications. *Drug Resist Updat* **12**, 153–156 (2009).
8. Duffy, M. J., McGowan, P. M. & Crown, J. Targeted therapy for triple-negative breast cancer: where are we? *Int J Cancer* **131**, 2471–2477 (2012).
9. Hoeijmakers, J. H. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* **361**, 1475–1485 (2009).
10. Tutt, A. & Ashworth, A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med* **8**, 571–576 (2002).
11. Lord, C. J. & Ashworth, A. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 363–369 (2008).
12. ClinicalTrials.gov. A service of the U.S. National Institutes of Health. Available at : <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=olaparib&pg=1>. (Accessed: 06th May 2015).
13. Bouwman, P. & Jonkers, J. Molecular pathways: how can BRCA-mutated tumors become resistant to PARP inhibitors? *Clin Cancer Res* **20**, 540–547 (2014).
14. Kathawala, R. J., Gupta, P., Ashby, C. R., Jr. & Chen, Z. S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resist Updat* **18C**, 1–17 (2015).
15. Lord, C. J. & Ashworth, A. Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. *Nat Med* **19**, 1381–1388 (2013).
16. Rottenberg, S. *et al.* High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 17079–17084 (2008).
17. Oplustilova, L. *et al.* Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle* **11**, 3837–3850 (2012).
18. Valton, E., Amblard, C., Wawrzyniak, I., Penault-Llorca, F. & Bamdad, M. P-gp expression in brown trout erythrocytes: evidence of a detoxification mechanism in fish erythrocytes. *Sci Rep* **3**, 3422 (2013).
19. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. & Varadi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG2 transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol Rev* **86**, 1179–1236 (2006).
20. De Laurentiis, M. *et al.* Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev* **36 Suppl 3**, S80–S86 (2010).
21. Pal, S. K. & Mortimer, J. Triple-negative breast cancer: novel therapies and new directions. *Maturitas* **63**, 269–274 (2009).
22. Tangutoori, S., Baldwin, P. & Sridhar, S. PARP inhibitors: A new era of targeted therapy. *Maturitas* **81(1)**, 5–9 (2015).
23. Chekhun, V. F., Zhylchuk, V. E., Lukyanova, N. Y., Vorontsova, A. L. & Kudryavets, Y. I. Expression of drug resistance proteins in triple-receptor-negative tumors as the basis of individualized therapy of the breast cancer patients. *Exp Oncol* **31(2)**, 123–124 (2009).
24. Samanta, S., Pursell, B. & Mercurio, A. M. IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression. *J Biol Chem* **288**, 12569–12573 (2013).
25. Britton, K. M. *et al.* Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. *Cancer Lett* **323**, 97–105 (2012).

26. Durmus, S. *et al.* Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1) restrict oral availability and brain accumulation of the PARP inhibitor rucaparib (AG-014699). *Pharm Res* **32**, 37–46 (2015).
27. Jaspers, J. E. *et al.* Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in Brca1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discov* **3**, 68–81 (2013).
28. Lawlor, D. *et al.* PARP Inhibitors as P-glycoprotein Substrates. *J Pharm Sci* **103**, 1913–1920 (2014).
29. Vichai, V. & Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* **1**, 1112–1116 (2006).

Author Contributions

M.B., P.D., F.P.L. and E.M. conceived and designed the study; R.D., P.D., C.o.A. and C.V. performed the experimental work; R.D., P.D. M.B., C.A. and E.M. analyzed the data; F.K. performed statistical analysis; P.D., M.B. and R.D. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Dufour, R. *et al.* BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: a prospective role in resistance to Olaparib. *Sci. Rep.* **5**, 12670; doi: 10.1038/srep12670 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

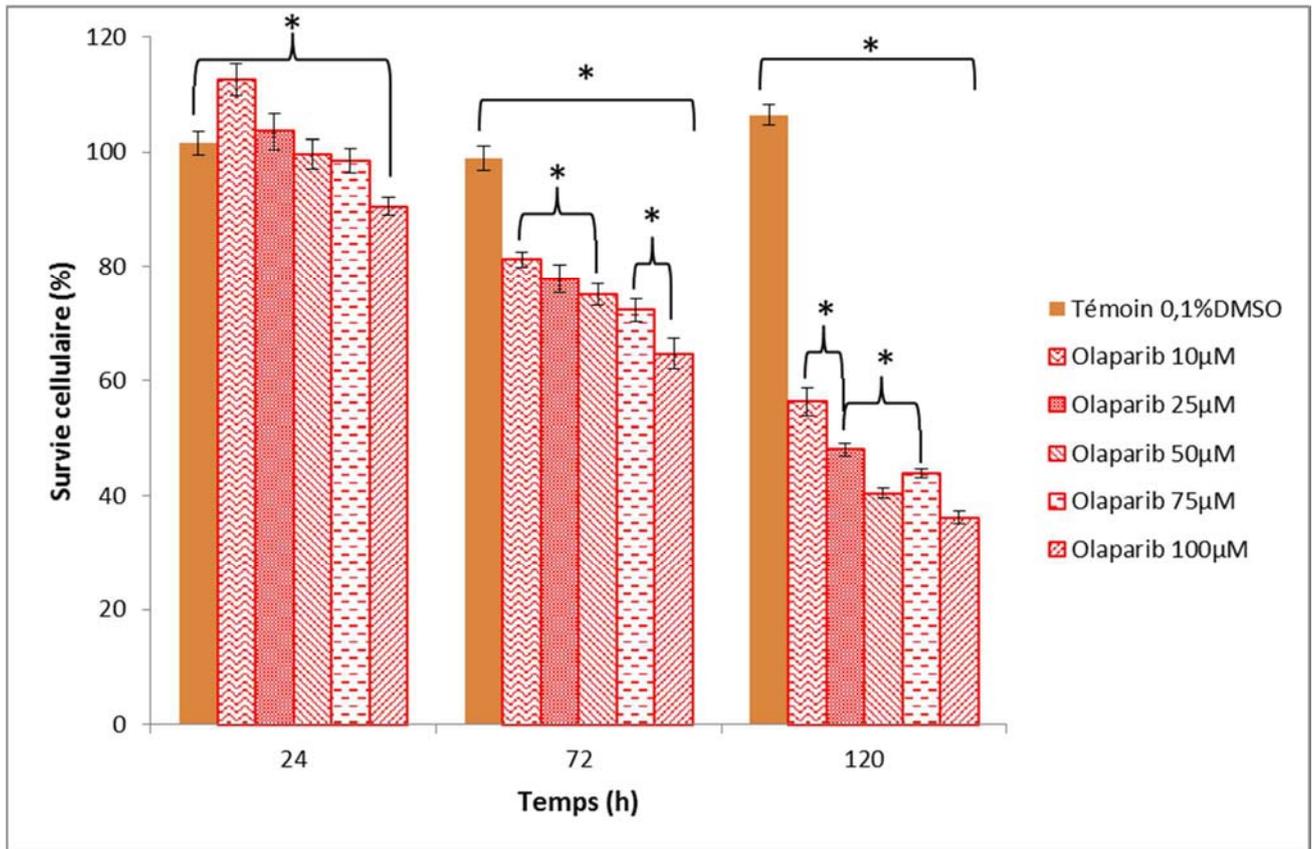


Figure 27 : Taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN en présence de différentes concentrations d'Olaparib

Le taux de survie cellulaire pour chaque concentration d'Olaparib a été déterminé par la méthode au sulforhodamine B après 24, 72 et 120h d'incubation. Le test de student a été appliqué avec un $\alpha=5\%$. * : différence significative de survie cellulaire entre les concentrations en Olaparib.

II - Etude de l'impact d'un traitement combiné par Olaparib et par radiothérapie à hautes et à basses énergies, sur le taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN.

Dans l'objectif de l'optimisation du traitement des tumeurs de phénotype BLTN, en collaboration avec le laboratoire de physique corpusculaire de l'Université Blaise Pascal, nous avons continué nos travaux sur la potentialisation de l'action de l'Olaparib en le combinant à un traitement par irradiation à haute ou à basse énergie. En effet, les irradiations entraînent la mort cellulaire en provoquant des cassures sur l'ADN génomique et les traitements par les anti-PARP tel que l'Olaparib, inhiberaient la réparation de ces cassures. L'utilisation combinée de ces deux traitements devrait donc potentialiser leur effet. Pour vérifier cette hypothèse, des cellules de la lignée SUM1315 ont été traitées avec des concentrations croissantes d'Olaparib puis irradiées pendant cinq jours à raison de 2 Gy par jour. Le taux de survie des cellules ayant reçu un traitement combiné a ensuite été comparé à celui de cellules traitées uniquement avec de l'Olaparib au cours du temps.

a-Taux de survie des cellules SUM1315 en présence de l'Olaparib au cours du temps

Avant d'étudier l'effet combiné de l'Olaparib et d'un traitement par irradiation à haute ou basse énergie, il était nécessaire d'analyser l'effet de l'Olaparib seul, sur les cellules de la lignée SUM1315. Un test de cytotoxicité au Sulforhodamine B, en microplaques à 96 puitsensemencées à raison de 1800 cellules/puits, a alors été mis au point en présence de concentrations croissantes d'Olaparib (10, 25, 50, 75 et 100 μM). Le taux de survie cellulaire a été analysé après 24, 72 et 120h de traitement. Pour chaque temps d'étude, le taux de survie cellulaire témoin a été calculé par le rapport de la DO des cellules traitées avec 0,1% de DMSO sur la DO des cellules témoins. Les résultats présentés dans la Figure (27) montrent un taux de survie d'environ 100% pour les cultures traitées avec 0,1% de DMSO au cours du temps (avec $101,52 \pm 2,09$, $98,87 \pm 2,10$ et $106,36 \pm 1,74$ respectivement après 24h, 72h et 120h d'exposition). Le DMSO à 0,1% ne présente aucune action cytotoxique sur la survie cellulaire des cellules de la lignée SUM1315. De ce fait, les cellules traitées avec le DMSO à 0,1% ont été utilisées par la suite comme des cellules témoins.

Pour les cellules traitées avec différentes concentrations d'Olaparib, le taux de survie cellulaire est calculé par le rapport de la DO des cellules traitées avec l'anti-PARP sur celle des cellules témoins de DMSO à 0,1%. Après 24h de traitement (Figure 27), aucune différence significative n'est observée entre les cellules témoins de DMSO et celles traitées

avec différentes concentrations d'Olaparib, sauf pour la concentration 100 μ M où le taux de survie est de $90,55\% \pm 1,52\%$. Cependant, à partir de 72h de traitement, et quelle que soit la concentration d'Olaparib testée, le taux de survie des cellules traitées est significativement différent de celui des cellules témoins de DMSO ($98,87\% \pm 2,10\%$). De plus, un effet dose-réponse est également observé (Figure 27). En effet, le taux de survie en présence de 10 μ M d'Olaparib est de $81,30\% \pm 1,32\%$ et est significativement différent de celui obtenu avec 50 et 75 μ M d'Olaparib (avec respectivement, $75,04\% \pm 1,94\%$ et $72,31\% \pm 1,92\%$). De même, le taux de survie des cellules SUM1315 avec 100 μ M de cet anti-PARP est de $64,67\% \pm 2,70\%$ et est significativement différent de celui à 75 μ M. Cette diminution du taux de survie s'accroît à 120h d'incubation, le plus haut taux de survie observé étant de $56,27\% \pm 2,5\%$ pour 10 μ M en Olaparib alors que les témoins de DMSO restent à 100% (Figure 27). De plus, un effet dose-réponse est également observé dans ces conditions expérimentales, avec un taux de survie de $56,27\% \pm 2,5\%$ avec 10 μ M d'Olaparib qui est significativement différent des $36,14\% \pm 1,08\%$ obtenus avec 100 μ M de cet anti-PARP. Ces résultats montrent que l'Olaparib seul a donc un effet cytotoxique sur les cellules BLTN de la lignée SUM1315, engendrant une baisse de leur taux de survie. Cet effet serait en relation avec la dose utilisée, mais dépendrait également du temps d'exposition des cellules à cet anti-PARP. Ces résultats laissent ainsi supposer de la nécessité du maintien de l'Olaparib dans les cellules SUM1315 à long terme, afin d'accroître son efficacité. Par la suite, le taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 a été étudié en présence de différentes concentrations d'Olaparib, combinées à une irradiation à haute ou à basse énergie de type fractionnée, à raison de 2 Gy par jour.

b- Taux de survie des cellules SUM1315 après un traitement combiné avec Olaparib et Irradiation à haute énergie par l'accélérateur NOVALIS

L'accélérateur Novalis est localisé au Centre Jean Perrin. Il s'agit d'un appareil qui est utilisé en routine pour le traitement par irradiation des patients atteints de différents types de cancer. Nous avons eu l'opportunité de l'utiliser lors de nos expériences, afin de pouvoir étudier dans des « conditions réelles » l'effet combiné d'un traitement ciblé par l'Olaparib et par irradiation. Nos résultats antérieurs sur le dosage intracellulaire de l'Olaparib dans les cellules SUM1315 par HPLC et dans les mêmes conditions expérimentales, avaient mis en évidence une accumulation maximale d'Olaparib dans les cellules après 3h de traitement. De ce fait, pour ces expériences, les cellules de la lignée SUM1315 ont été traitées dans un premier temps avec différentes concentrations d'Olaparib pendant 3h. Ensuite ces cellules ont été immédiatement irradiées avec une dose de 2 Gy avec l'accélérateur Novalis et incubées

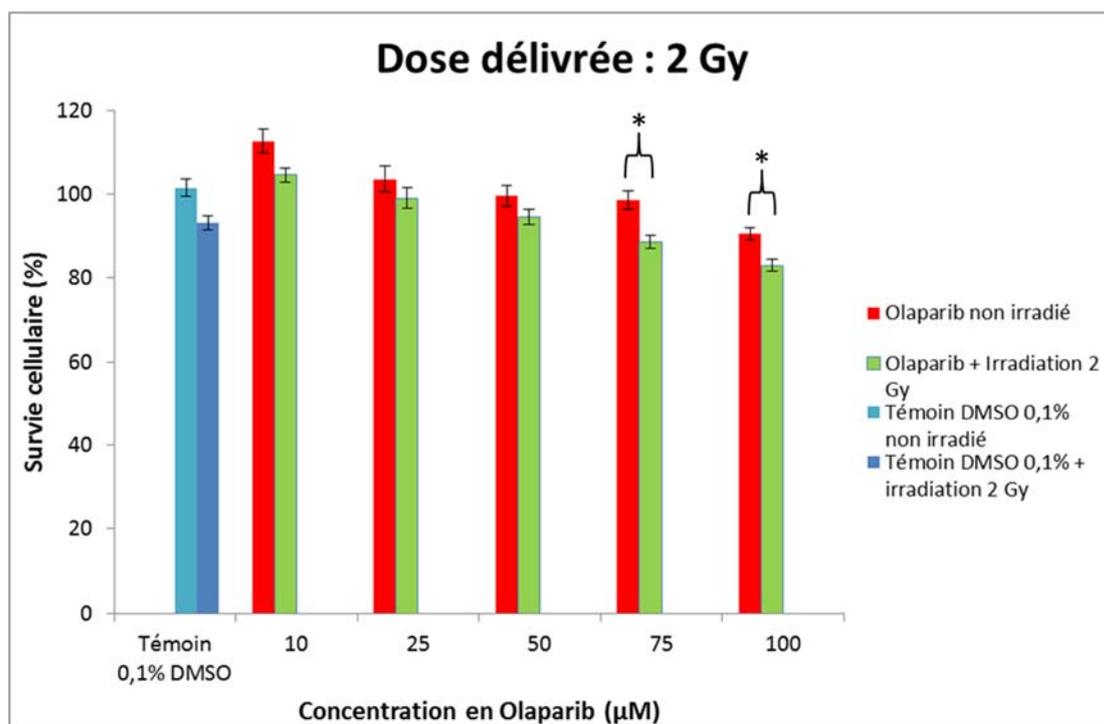


Figure 28 : Taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN après un traitement combiné Olaparib/irradiation à 2 Gy avec l'accélérateur NOVALIS

Les cellules de la lignée SUM1315ensemencées en microplaques à 96 puits ont été traitées avec des concentrations croissantes en Olaparib. 3h après le traitement les cellules sont irradiées pour une dose de 2 Gy avec l'accélérateur NOVALIS. Après 24 d'incubation à 37°C, le taux de survie cellulaire pour chaque concentration en Olaparib a ensuite été déterminé par la méthode au sulforhodamine B. Le test de student a été appliqué avec un $\alpha=5\%$. * : différence significative de la survie cellulaire entre les cellules non irradiées et irradiées, en présence de la même concentration d'Olaparib.

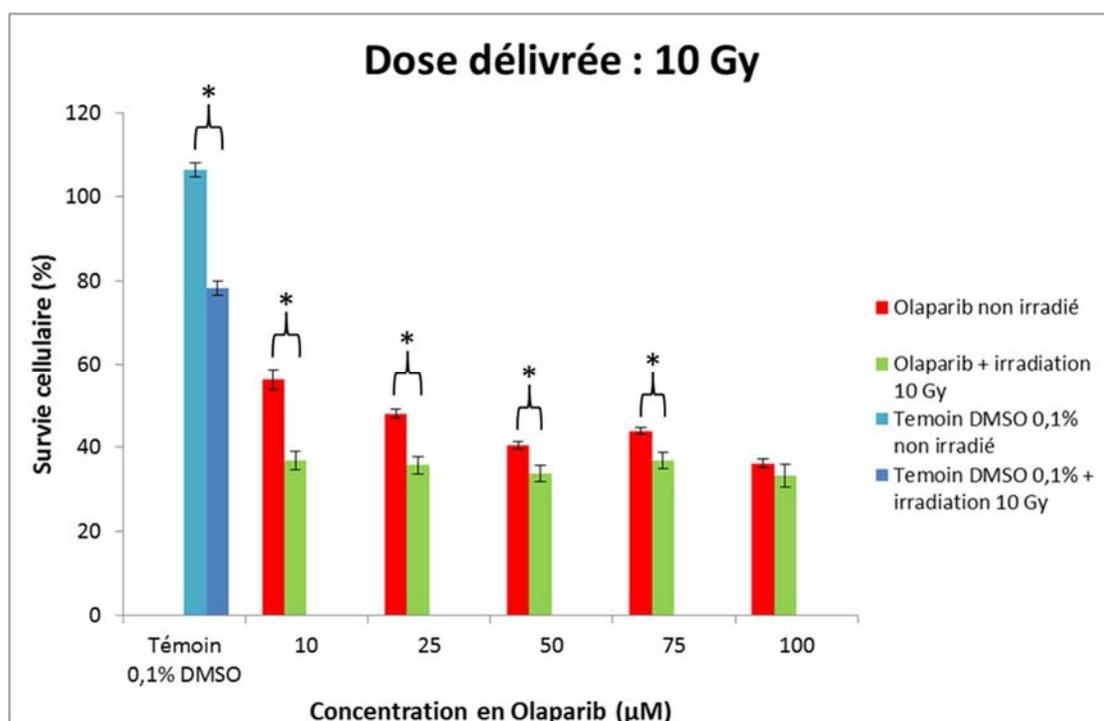


Figure 29 : Taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN après un traitement combiné Olaparib/irradiation à 10 Gy avec l'accélérateur NOVALIS

Les cellules de la lignée SUM1315ensemencées en microplaques à 96 puits ont été traitées avec des concentrations croissantes en Olaparib. 3h après le traitement les cellules sont irradiées pour une dose de 2Gy avec l'accélérateur NOVALIS. Les cellules sont ensuite irradiées sur le même accélérateur à raison de 2 Gy par jour afin d'atteindre la dose de 10 Gy (120h après la première irradiation). Ensuite après 24 d'incubation à 37°C, le taux de survie cellulaire pour chaque concentration en Olaparib a été déterminé par la méthode au sulforhodamine B. Le test de student a été appliqué avec un $\alpha=5\%$. * : différence significative de la survie cellulaire entre les cellules non irradiées et irradiées, en présence de la même concentration d'Olaparib.

pendant 24h à 37°C sous 5% de CO₂. Pour des doses d'irradiation plus élevées, les plaques contenant les cellules SUM1315 précédemment irradiées sont à nouveau exposées à une dose de 2 Gy toutes les 24h. Les tests de survie cellulaire pour les doses de 2 et 10 Gy sont réalisés systématiquement 24h après la dernière irradiation correspondante. En parallèle, des cultures témoins de DMSO à 0,1% non irradiées et irradiées ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales. Dans ce cadre, le taux de survie cellulaire a été calculé par le rapport de la DO des cellules ayant reçu un traitement combiné Olaparib-Irradiation sur la DO des cellules témoins de DMSO à 0,1% non irradiées.

1- Olaparib/Irradiation à 2 Gy

Les cellules de la lignée SUM1315 traitées avec du DMSO à 0,1% et irradiées ensuite avec une dose à 2 Gy présentent un taux de survie cellulaire de $93,10\% \pm 1,85\%$, similaire aux cellules témoins de DMSO à 0,1% non irradiées (Figure 28). Pour les cellules traitées avec les différentes concentrations d'Olaparib (10 à 100 μM) combinées avec une dose de 2 Gy (temps 24h), (Figure 28), une diminution significative du taux de survie des cellules SUM1315 entre les cultures ayant reçu un traitement combiné et les témoins Olaparib, n'a été détecté que pour les concentrations 75 et 100 μM (Figure 28). En effet, à ces deux concentrations, l'irradiation à 2 Gy semble faiblement potentialiser l'effet de l'Olaparib, avec une baisse significative du taux de survie. Les valeurs de survie cellulaire sont respectivement de $88,69\% \pm 1,59\%$, $82,97\% \pm 1,47\%$ pour les cultures irradiées et $98,52\% \pm 2,18\%$ et $90,56\% \pm 1,53\%$ pour les témoins Olaparib.

2- Olaparib/Irradiation à 10 Gy

Pour une dose totale de 10 Gy (temps 120h), le taux de survie des cellules témoins de DMSO à 0,1% non irradiées est de $106,36\% \pm 1,73\%$, alors que pour celles qui ont reçu une irradiation, il est de $78,20\% \pm 1,72\%$. Une irradiation à 10 Gy seule entraîne donc une diminution significative de la survie des cellules de la lignée SUM1315 (Figure 29).

Pour la comparaison du taux de survie cellulaire entre les cellules traitées avec Olaparib seul ou ayant reçu un traitement combiné Olaparib/irradiation à 10 Gy (Figure 29), des valeurs de $56,27\% \pm 2,49\%$, $48,08\% \pm 1,14\%$, $40,37 \pm 0,88\%$ et $43,83\% \pm 0,77\%$, sont relevées respectivement pour les concentrations en Olaparib de 10, 25, 50 et 75 μM non combinées à des radiations. Cependant, pour les cultures ayant subi un traitement combiné Olaparib/irradiation 10 Gy, une légère diminution significative du taux de survie cellulaire est

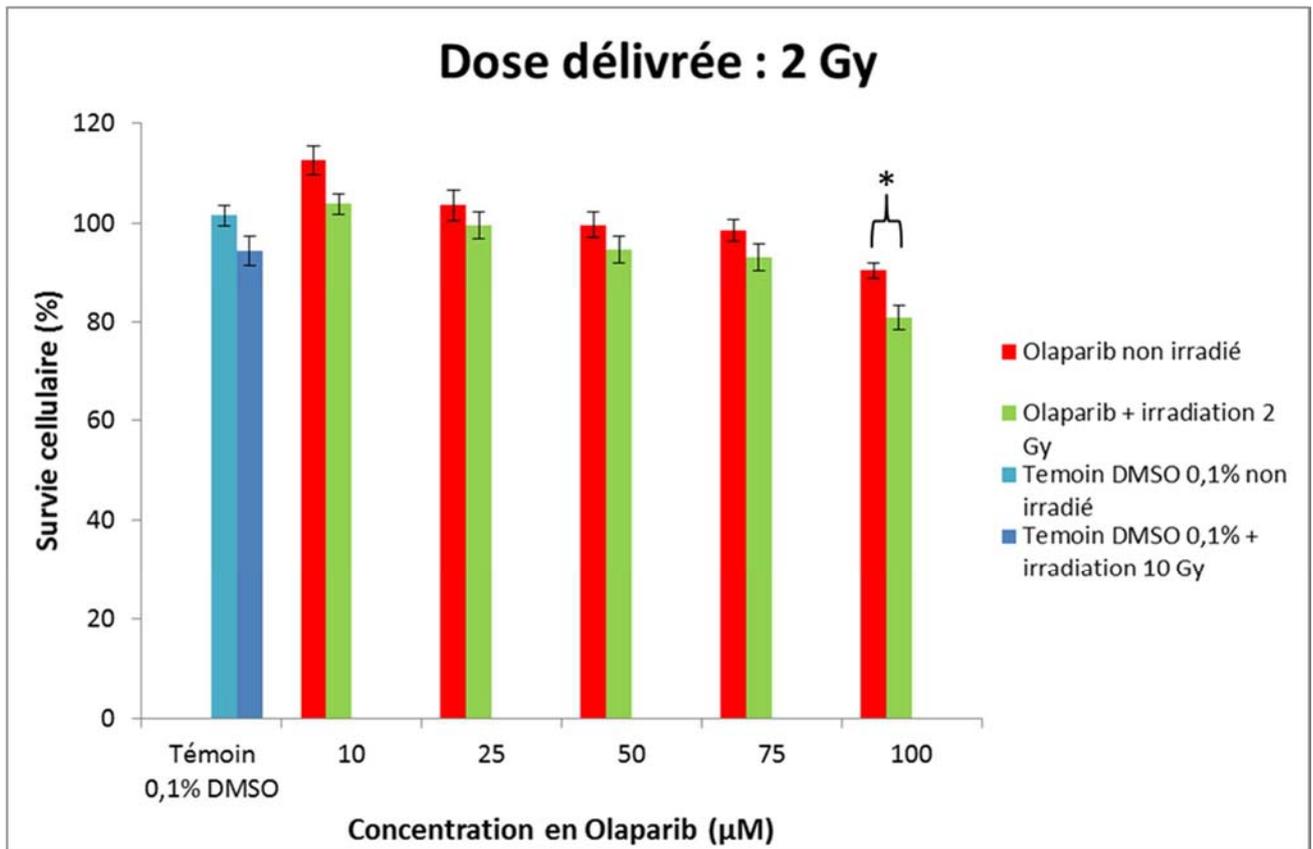


Figure 30 : Taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN après un traitement combiné Olaparib/irradiation à 2 Gy avec l'accélérateur X-RAD 320

Les cellules de la lignée SUM1315ensemencées en microplaques à 96 puits ont été traitées avec des concentrations croissantes en Olaparib. 3h après le traitement les cellules sont irradiées pour une dose de 2 Gy avec l'accélérateur PAVIRMA. Après 24 d'incubation à 37°C, le taux de survie cellulaire pour chaque concentration en Olaparib a ensuite été déterminé par la méthode au sulforhodamine B. Le test de student a été appliqué avec un $\alpha=5\%$. * : différence significative de la survie cellulaire entre les cellules non irradiées et irradiées, en présence de la même concentration d'Olaparib.

détectée pour ces mêmes concentrations en anti-PARP ($36,84\% \pm 2,12\%$, $35,75\% \pm 2,07\%$, $33,64\% \pm 1,93\%$ et $36,95\% \pm 1,95\%$).

De plus, la différence de survie, entre les cellules irradiées et celles qui ne le sont pas, est inversement proportionnelle à la concentration en Olaparib utilisée. Ainsi, à $10\ \mu\text{M}$, le taux de survie cellulaire des cellules avec Olaparib seul est de $56,27\% \pm 2,49\%$ tandis que celui des cellules avec traitement combiné est de $36,84\% \pm 2,12\%$, alors qu'à $75\ \mu\text{M}$ il est de $43,83\% \pm 0,77\%$ et $36,95\% \pm 1,95\%$ (Figure 29). Seule la concentration $100\ \mu\text{M}$ ne présente aucune différence significative entre les cellules irradiées et non irradiées.

c- Taux de survie des cellules SUM1315 après un traitement combiné avec Olaparib et Irradiation à basse énergie par l'accélérateur X-RAD 320

L'accélérateur X-RAD 320 est localisé sur la plateforme PAVIRMA localisé au campus des Ceseaux. Il s'agit d'un appareil qui est utilisé en recherche pour l'étude de l'effet de rayonnement de basse énergie sur des matériaux d'origine biologique. Nous avons eu l'opportunité de l'utiliser lors de nos expériences, afin de pouvoir étudier l'effet d'un traitement ciblé par l'Olaparib combiné à des radiations de basse énergie sur les cellules de la lignée SUM1315. Le protocole utilisé est le même que pour l'étude avec les radiations à haute énergie, décrit ci-dessus.

1- Olaparib/Irradiation à 2 Gy

Des cellules de la lignée SUM1315 traitées avec du DMSO à $0,1\%$ et irradiées ensuite avec une dose à $2\ \text{Gy}$ présentent un taux de survie cellulaire de $94,34\% \pm 2,93\%$, similaire aux cellules témoins de DMSO à $0,1\%$ non irradiées (Figure 30). Pour les cellules traitées avec les différentes concentrations d'Olaparib (10 à $100\ \mu\text{M}$) combinées avec une dose de $2\ \text{Gy}$ (temps $24\ \text{h}$), (Figure 30), une diminution significative du taux de survie des cellules SUM1315 entre les cultures ayant reçu un traitement combiné et les témoins Olaparib, n'est détectée que pour la concentration $100\ \mu\text{M}$ (Figure 30). En effet, à cette concentration, l'irradiation à $2\ \text{Gy}$ semble faiblement potentialiser l'effet de l'Olaparib, avec une baisse significative du taux de survie. Les valeurs de survie cellulaire sont respectivement de $80,81\% \pm 2,35\%$ pour les cultures irradiées et $90,56\% \pm 1,53\%$ pour les témoins Olaparib.

2- Olaparib/Irradiation à 10 Gy

Pour une dose totale de $10\ \text{Gy}$ (temps $120\ \text{h}$), le taux de survie des cellules témoins de DMSO à $0,1\%$ et irradiées est significativement inférieur ($72,95\% \pm 1,26\%$) à celles non

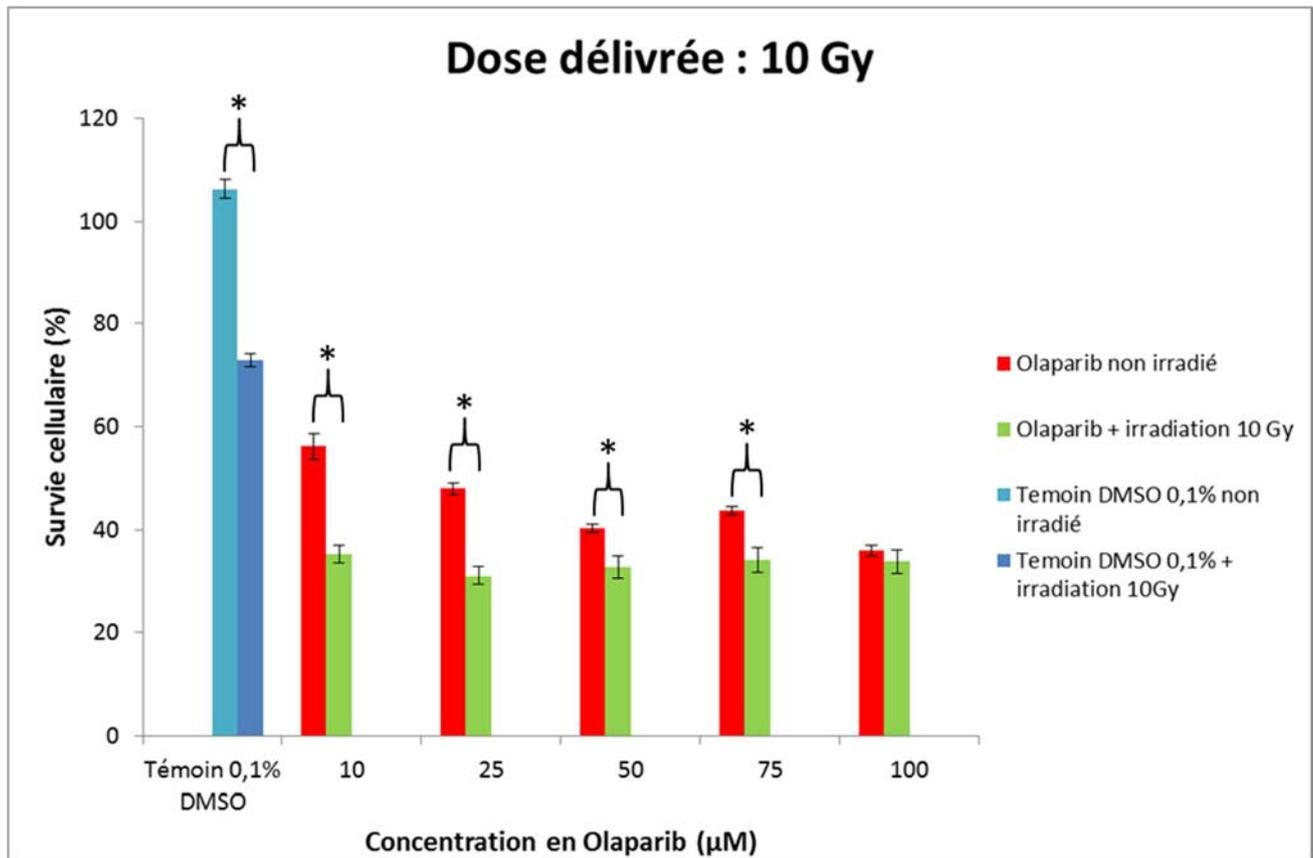


Figure 31 : Taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN après un traitement combiné Olaparib/irradiation à 10 Gy avec l'accélérateur X-RAD 320

Les cellules de la lignée SUM1315 ensemencées en microplaques à 96 puits ont été traitées avec des concentrations croissantes en Olaparib. 3h après le traitement les cellules sont irradiées pour une dose de 2 Gy avec l'accélérateur PAVIRMA. Les cellules sont ensuite irradiées sur le même accélérateur à raison de 2 Gy par jour afin d'atteindre la dose de 10 Gy (120h après la première irradiation). Ensuite après 24 d'incubation à 37°C, le taux de survie cellulaire pour chaque concentration en Olaparib a été déterminé par la méthode au sulforhodamine B. Le test de student a été appliqué avec un $\alpha=5\%$. * : différence significative de la survie cellulaire entre les cellules non irradiées et irradiées, en présence de la même concentration d'Olaparib.

irradiées ($106,35\% \pm 1,74\%$) (Figure 31). Les radiations seules entraînent donc une diminution significative de la survie cellulaire. De plus, le taux de survie des cellules témoins de DMSO à 0,1% irradiées ($72,95\% \pm 1,26\%$) reste significativement plus élevé que celui des cellules traitées avec différentes concentrations d'Olaparib et avec (valeur moyenne de $33,54 \pm 0,74$) ou sans irradiation (valeur moyenne de $44,93 \pm 3,45$) (Figure 31). Cependant, des différences du taux de survie sont détectées entre les cellules traitées avec l'Olaparib seul et celles ayant reçu un traitement combiné Olaparib/10Gy (Figure 31). En effet, le taux de survie cellulaire pour les concentrations croissantes en Olaparib de 10, 25, 50 et 75 μM sont respectivement de $56,27\% \pm 2,49\%$, $48,08\% \pm 1,14\%$, $40,37 \pm 0,88\%$ et $43,83\% \pm 0,77\%$ pour les cellules non irradiées. Alors que pour les cultures ayant reçu un traitement combiné avec les mêmes concentrations d'Olaparib, ils sont respectivement de $35,38\% \pm 1,64\%$, $31,12\% \pm 1,81\%$, $32,84\% \pm 2,25\%$ et $34,33\% \pm 2,34\%$. Ainsi, une diminution significative du taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 semble être détectée pour ces concentrations en anti-PARP, lors d'un traitement combiné (Figure 31).

Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, plus la concentration en Olaparib est faible, plus la potentialisation Olaparib/irradiation semble efficace (Figure 31). En effet, avec 10 μM d'Olaparib, le taux de survie cellulaire est de $56,27\% \pm 2,49\%$ tandis que celui des cellules avec traitement combiné est de $35,38\% \pm 1,64\%$. Alors qu'avec 75 μM d'anti-PARP, il est de $43,83\% \pm 0,77\%$ et de $34,33\% \pm 2,34\%$ lors d'un traitement combiné. Seule la concentration de 100 μM d'Olaparib ne présente aucune différence significative entre les cellules irradiées et non irradiées.

L'ensemble de ces résultats montre dans un premier temps une action cytotoxique à long terme très marquée de l'Olaparib sur les cellules de la lignée SUM1315. En effet, plus le temps d'exposition à l'Olaparib est long, plus la baisse du taux de survie cellulaire est importante (18,71% de mortalité cellulaire avec 10 μM d'Olaparib et 35,33 % avec 100 μM à 72h, contre 43,73% de mortalité cellulaire avec 10 μM d'anti-PARP et 63,86 % avec 100 μM , à 120h). En effet, les cellules de la lignée SUM1315 ayant une mutation sur le gène BRCA1, cette mortalité cellulaire pourrait être expliquée par le mécanisme de létalité synthétique, propriété de cette classe de thérapie ciblée (Fang B., 2014).

L'analyse de l'effet de l'irradiation de type fractionné à raison de 2 Gy par jour a ensuite été réalisée sur la survie des cellules de lignée SUM1315. Dans ces conditions, aucune différence significative n'a été détectée avec une dose de 2 Gy, appliquée à haute ou à basse énergie. Par contre l'application d'une dose fractionnée de 10 Gy, à haute ou à basse énergie engendre une hausse du taux de la mortalité cellulaire de 28,16%.

Par la suite, la comparaison des résultats obtenus entre les cultures traitées uniquement avec Olaparib et celles ayant reçu un traitement combiné Olaparib/rayonnements à haute ou à faible énergie semble montrer une potentialisation lors d'un traitement combiné Olaparib/irradiation à 10 Gy. En effet, une diminution du taux de survie des cellules de la lignée SUM1315 est détectée. Ces résultats suggèrent donc qu'un traitement fractionné par irradiation à 10 Gy potentialiserait l'effet de l'Olaparib sur ces cellules. De plus, pour les deux types de radiations, l'efficacité de la potentialisation semble comparable. En effet, pour les deux types de radiations, haute et basse énergie, une nette potentialisation est observée avec de faibles concentrations en Olaparib (10 et 25 μM). Avec 10 μM d'Olaparib/10 Gy irradiation, la potentialisation est de 19,43% et avec 25 μM d'Olaparib/10 Gy irradiation, elle est de 12,33%. Pour des concentrations supérieures en Olaparib, la potentialisation serait négligeable, voire absente dans nos conditions expérimentales.

Un autre aspect intéressant de ce phénomène est le fait que la potentialisation est observée même avec de faibles concentrations en Olaparib. En effet, en traitement combiné, une dose de 10 μM en Olaparib a le même effet sur la survie cellulaire qu'une dose de 100 μM sans irradiation. La combinaison de traitements par Olaparib et par irradiation est donc une voie intéressante à explorer pour améliorer la prise en charge des patientes tout en diminuant les quantités d'Olaparib utilisées.

Cependant ces résultats de potentialisation encourageants ont été obtenus dans nos conditions expérimentales. Aussi, afin d'optimiser cet effet, d'autres conditions devraient être explorées (i) le traitement des cellules SUM1315 avec des concentrations d'anti-PARP plus faibles (ii) inversion de l'ordre du traitement (Irradiation et ensuite traitement à l'Olaparib) et (iii), tester des doses plus importantes de radiations de haute énergie. En effet, chez les patientes des doses plus importantes de l'ordre de 40 à 50 Gy sont habituellement utilisées (Rutqvist LE *et al.*, 2003). Enfin, (iv) modélisation sur les cultures en 3D.

III - Mise au point d'un modèle de culture cellulaire en trois dimensions à partir de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN.

Nos travaux de recherche ciblent la modélisation *in vitro* de l'effet de thérapies ciblées par les anti-PARP, en l'occurrence Olaparib, dans un but d'optimisation des traitements des tumeurs du sein de phénotype BLTN. Les modèles de cultures cellulaires en trois dimensions (3D) dont la configuration est plus proche de celle des tumeurs, semble être plus adéquat et pourrait améliorer le pouvoir prédictif de nos analyses. De ce fait, dans la troisième partie de

ces travaux, nous avons développé, à partir de la lignée cellulaire SUM1315, un modèle de culture en 3D. Pour cela, nous avons sélectionné et comparé deux techniques de culture en trois dimensions, (i) la technique « hanging drop » sur plaque Perfecta 3D (Biomatrix®) et (ii) la technique « liquid overlay » en matrice d'agarose.

Dans un premier temps nous avons mis au point deux paramètres indispensables pour la formation de sphéroïdes compacts et adéquats : la concentration en Matrigel® et le nombre de cellules. Suite à ces expériences, des sphéroïdes compacts et homogènes ont été obtenus avec les concentrations 2% en Matrigel et 6000 cellules. Ces deux concentrations ont donc été retenues pour la suite des expériences.

Ensuite, une analyse de la structure intracellulaire des sphéroïdes a été effectuée par microscopie électronique à transmission. Ces observations ont permis de confirmer, pour les deux techniques, que les cellules gardaient leur intégrité, s'organisaient en se juxtaposant les unes à côté des autres et formaient des jonctions cellulaires. Les organites intracellulaires étaient également bien présents. Cependant, les membranes plasmiques des cellules des sphéroïdes obtenus par la technique « Hanging drop » étaient plus irrégulières que celles observées chez les sphéroïdes obtenus par la technique « liquid overlay ». Ainsi, seule cette dernière technique a été retenue pour la suite des expériences. L'analyse de la conformation des sphéroïdes, obtenus par la technique « liquid overlay » par microscopie électronique à balayage, confirme l'obtention de sphéroïdes compacts avec des jonctions intercellulaires.

Un test de cytotoxicité a ensuite été adapté pour les cultures en 3D à partir du kit AlamarBlue® cytotoxicity test (Life Technologies®, Invitrogen®) et a été testé avec plusieurs concentrations de Doxorubicine, un anticancéreux modèle dans le traitement du cancer du sein. Cette technologie pourrait être adaptée à d'autres lignées cellulaires de phénotype BLTN. L'ensemble de ces travaux sont exposés dans la publication ci-dessous, intitulée : « *Development of a three-dimensional (3D) cell culture model from triple-negative basal-like breast cancer SUM1315 cell-line* ».

Development of a three-dimensional (3D) cell culture from triple-negative basal-like breast cancer SUM1315 cells.

Clémence Dubois^{1‡}, *Robin Dufour*^{1‡}, *Pierre Daumar*^{1£}, *Corinne Aubel*^{3£}, *Emmanuelle Mounetou*⁴, *Marie-Ange Civiale*¹, *Claire Szczepaniak*⁵, *Christelle Blavignac*⁵, *Frédérique Penault-Llorca*² and *Mahchid Bamdad*^{1,*}

1 - Clermont Université - Université d'Auvergne - ERTICa – EA 4677. Institut Universitaire de Technologie, Département Génie Biologique, Ensemble universitaire des Cézeaux, B.P. 86 - 63172 Aubière Cedex, France.

2 - Clermont Université - Université d'Auvergne - ERTICa – EA 4677. Centre Jean Perrin, 58 Rue Montalembert, BP 392 - 63011 Clermont-Ferrand cedex France.

3 - Clermont Université - Université d'Auvergne - ERTICa – EA 4677. Faculté de médecine, 28 place Henri Dunant, BP 38 - 63001 Clermont-Ferrand, France.

4 - UMR 990 INSERM - Université d'Auvergne, BP 184, 63005 CLERMONT-FERRAND CEDEX, France.

5 - Clermont Université - Université d'Auvergne - Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (CICS)- Faculté de Médecine Pharmacie – 28, place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France.

***Corresponding Author**

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.B. (mahchid.bamdad@udamail.fr)

Current address: Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand – Université d'Auvergne, Département Génie Biologique, Ensemble Universitaire des Cézeaux, 5 avenue Blaise Pascal, CS 30086- 63172 AUBIERE CEDEX France. Phone: +33-4 73 17 70 75. FAX: +33-4 73 17 70 23.

‡ and £: These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Triple-Negative Basal-like (TNBL) breast cancer is a particularly aggressive type of tumour associated with poor prognosis and resistance to current therapies. Among *in vitro* modelling, the three-dimensional (3D) cell culture, which mimics the 3D organization of tumours, presents a great interest for cytotoxicity study of anticancer drugs. Thus, these works were focused on the development of 3D cell culture from the TNBL SUM1315 cell line model and also its associated cytotoxicity assay. The comparison of liquid overlay in agarose matrix and hanging drop technologies showed the formation of compact and homogeneous spheroids in presence of 2% Matrigel® and 1500 to 12 000 cells per well, with diameters of 250 to 900 µm, respectively. The cell ultrastructure analysis of these spheroids by Transmission Electron Microscopy (TEM) showed for both techniques the presence of juxtaposed cells containing intact nuclei, intracellular organelles and cell membranes with the presence of tight cell junctions and desmosomes. However, the liquid overlay in agarose matrix technique was selected because it displayed better integrity and cellular interactions within the spheroids. The Scanning Electron Microscopy (SEM) then confirmed the formation of compact and homogeneous spheroids with this selected technology. The AlamarBlue® cytotoxicity test developed from SUM1315 3D cell cultures in the presence of various concentrations of doxorubicin, a selected anticancer drug, showed an IC₅₀ of 1.012 ± 0.028 µM. All these methodologies could be adapted to other triple-negative breast cancer (TNBC) cell lines and become a standard technique to study the efficacy of targeted therapies and the associated mechanisms of chemo resistance.

KEYWORDS: SUM1315, Triple Negative Basal-Like breast cancer, 3D cell culture, liquid overlay in agarose matrix, hanging drop, AlamarBlue®.

INTRODUCTION

Triple-negative basal-like (TNBL) tumours comprise 70% of the basal-like tumour subtype and 15% of all breast cancers. They are characterized by the non-expression of the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR) and HER 2 on cell surfaces.¹ This phenotype appears to be related to the presence of certain mutations (BRCA, PTEN).^{2,3,4} TNBL tumours mainly affect young women aged around thirty, and are often associated with a hereditary predisposition (BRCA1/2 gene mutation). These tumours are aggressive with a very poor prognosis.⁵ Indeed, TNBL tumours have a high proliferative capacity and so respond well to neoadjuvant treatments such as chemotherapy, but the cancer is rarely eradicated. Rapid and almost systematic relapse, associated with metastases then occurs.⁶ Moreover, the tumours are not sensitive to targeted hormone therapy, since they do not express the relevant receptors. Therefore, the therapeutic strategy for this type of cancer is extremely complex.⁷ Because of the limited efficacy of conventional treatment on TNBL tumours, many efforts have been made to improve the prognosis of patients with this type of cancer, such as the optimization of treatment protocols and the development of new-targeted therapies.⁸

Preclinical *in vitro* studies that evaluate the efficacy of chemotherapeutics are mainly performed on two-dimensional (2D) cell cultures. However, this type of culture does not reproduce the structural properties of tumours. In fact, these tumours are biochemically and structurally characterized by the generation of hypoxic regions, intercellular interactions, nutrient and growth factors exchanges, and production of extracellular matrix that is essential to tumour stability and regulation of cellular functions^{9,10,11}. These characteristics are not encountered in 2D cell cultures because of the monolayer conformation of cells.

Therefore, over the last decade, three-dimensional (3D) cell culture, which mimics the 3D organization of tumours, has regained interest. This innovative technique consists in forming aggregated and compact cell clusters also called spheroids. Two methods are commonly used to form spheroids in which the cells form intercellular connections. With the first, the cells are

deposited on non-adherent surfaces (liquid overlay in agarose matrix) or in suspension (hanging drop) which causes aggregation by gravity or by rotation. With the second method, the cells are sealed in hydrogels to increase the formation of aggregates and cell/matrix bonds (collagen, hyaluronic acid etc...).¹² Whatever the technique used, studies have shown that, over time, the cells form a spheroid and gain different characteristics depending on their position and size.⁹ Indeed, the easily accessible peripheral cells are metabolically active, unlike those of the center. With this cell configuration, various gradients would develop, for (i) oxygen, (ii) nutrients, (iii) lactate accumulation, and (iv) pH. Because of their position within the spheroid, the cells at the center have unfavorable conditions and ultimately form a necrotic core or become quiescent, while cells on the periphery continue to proliferate^{13, 14}. Thus, 3D cell culture appears to be an accurate model to study the impact of chemotherapeutics on tumours¹⁵. This is why this innovative technology is increasingly being integrated into the drug development process. In fact, in terms of drug efficacy potential of prediction, it is positioned before *in vivo* experiments and after 2D cell culture.⁹

In this context, these works were focused on the development of 3D cell culture from the SUM1315 TNBL breast cancer cell line using the hanging drop and the liquid overlay in agarose matrix techniques, and the adaptation of the cytotoxicity test AlamarBlue® to this 3D cell culture.

RESULTS

Development of 3D cell culture from SUM1315 cell line

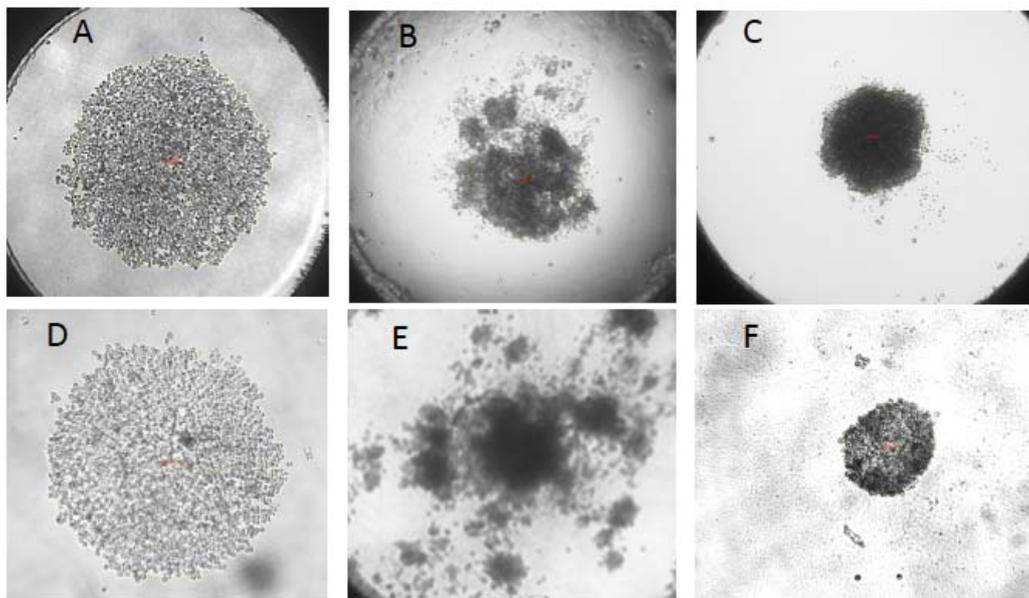
For the development of 3D culture from SUM1315 cell line with both techniques, two parameters were analyzed, i.e. the concentration of Matrigel® and the number of cells.

Table 1**Appropriate Matrigel® concentration and conditions of addition.**

Percentage of Matrigel in the culture medium	Conditions of Matrigel adding		
	Adding to the suspension tube before cell seeding	Adding just after cell seeding	Adding once aggregates formed
0	Unique loose aggregate	Unique loose aggregate	Unique loose aggregate
0.25	(/)	Unique loose aggregate	Unique loose aggregate
0.5	(/)	Unique loose aggregate	Unique loose aggregate
1	(/)	(/)	Spheroid
2	(/)	(/)	Spheroid
3	(/)	(/)	(/)
4	(/)	(/)	(/)
5	(/)	(/)	(/)
6	(/)	(/)	(/)

(/) scattered cell clusters

Experiments were performed in triplicate and for a concentration of 10 000 cells per well. Spheroid formation was detected only when Matrigel® was added once the cell aggregates were formed and for concentrations between 1 and 2%. Observations were made at day three.

**Figure 1 - SUM1315 cells aggregation profiles under light microscopy.**

Images were recorded seven days after seeding of 10 000 cells per well using a light microscope (Realux, COFEMO®) coupled to a camera (Industrial Digital Camera, UCMOS®) associated to its software (ToupView®) (Magnification = 40X). **A, B, and C** are aggregation profiles obtained with the hanging drop technique, **D, E and F** are aggregation profiles obtained with the liquid overlay in agarose matrix technique. **(A, D)** Loose aggregates in the absence of Matrigel® in the culture medium. **(B, E)** Small-scattered cell aggregates in the presence of 6% Matrigel®. **(C, F)** Compact spheroid in the presence of 2% Matrigel® added once the aggregates were formed at day two. Observations were made at day three.

Appropriate Matrigel® concentration

To determine the appropriate Matrigel® concentration for both techniques, several conditions were tested and the compaction level of cells was assessed by light microscopy. The Matrigel® was diluted following three methods: either (i) in a tube containing the cell suspension and subsequently seeded in the culture wells, or (ii) deposited directly onto the cells immediately after seeding or (iii) added to the culture medium after the formation of cell aggregates (Table 1).

Hanging drop technique: In absence of Matrigel®, the cells aggregated spontaneously but no spheroid was formed (Fig. 1A, Table 1). However, small aggregates were formed when Matrigel® at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6% was added directly to the tube containing the cell suspension, but they were scattered in the wells and did not form a unique spheroid (Fig. 1B, Table 1). When Matrigel® (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6%) was deposited just after cell seeding, the cells remained scattered in the wells with concentration over 1%, while with concentrations lower than 1% the cells aggregated uniformly but did not compact (Fig. 1A, Table 1). Under conditions where the Matrigel® was deposited on the already-formed aggregates at less than 1% or more than 2% concentrations, the cells aggregated but did not compact (Matrigel® <1%, Fig 1A) or remained scattered in the wells (Matrigel >2%, Fig. 1B). Hence, only concentrations of Matrigel® between 1% and 2% induced the formation of compact spheroids (Fig. 1C, Table 1).

Liquid overlay in agarose matrix technique: The results presented in Fig. 1D, and Table 1 showed that in the absence of Matrigel®, the cells aggregated spontaneously but did not form spheroids. Under conditions where the Matrigel® was added directly to the tube containing the cell suspension before cell seeding, whatever the Matrigel® concentrations tested (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6%), only small-scattered aggregates were detected (Fig. 1E, Table 1). However, when the Matrigel® was deposited onto the cells just after seeding, cells aggregated uniformly

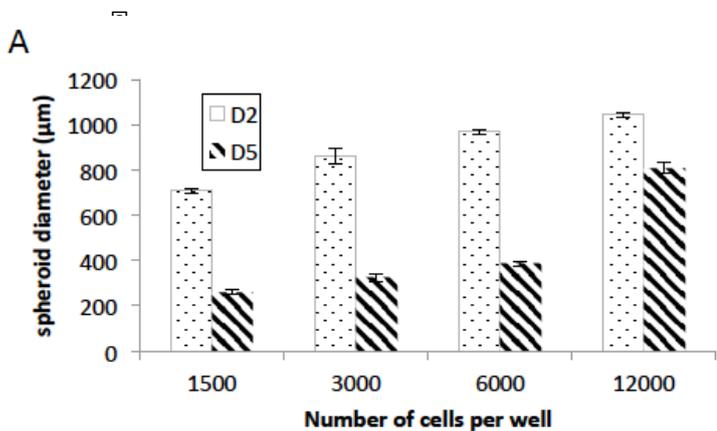


Figure 2 - Appropriate SUM1315 cell line concentration for spheroid formation with hanging drop technique.

Cells were cultured with 2% Matrigel added once the aggregates were formed at day two and every day, for five days. Experiments and observations (M =40X) were performed in triplicate. (A) Diameter of cell aggregates at day two (D2) and of spheroids at day five (D5) according to the number of cells at seeding. (B) Spheroid profiles under light microscopy after five days (a, 1500 cells per well; b, 3000 cells per well; c, 5000 cells per well; d, 10000 cells per well). Scale bar: 200 µm. (C) Spheroid diameter according to the number of cells per well at seeding.

□

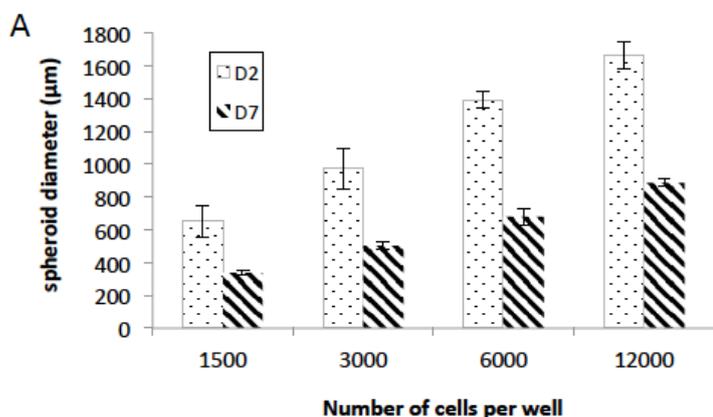
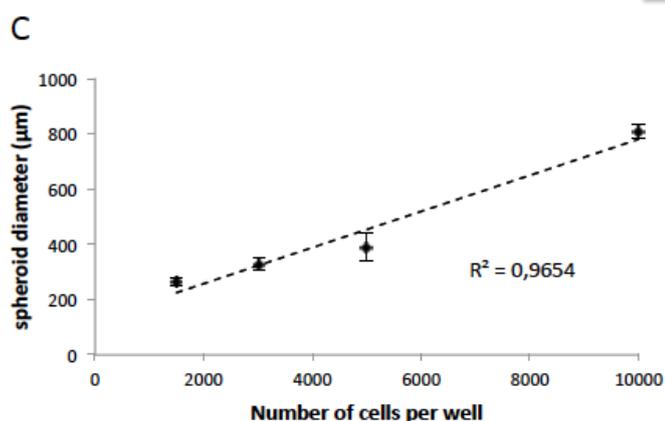
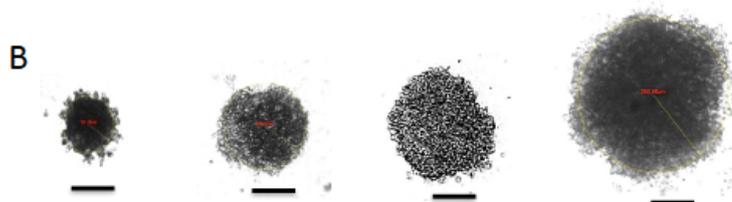
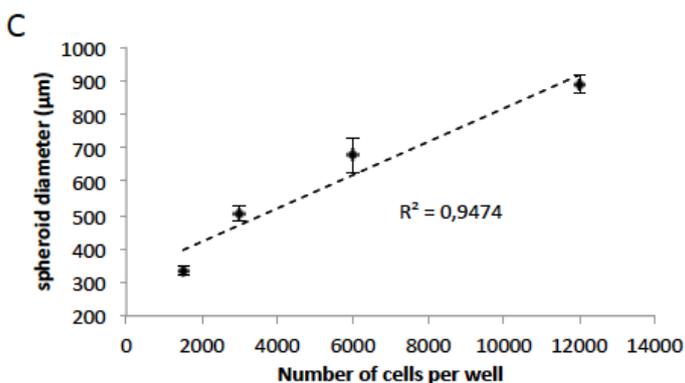
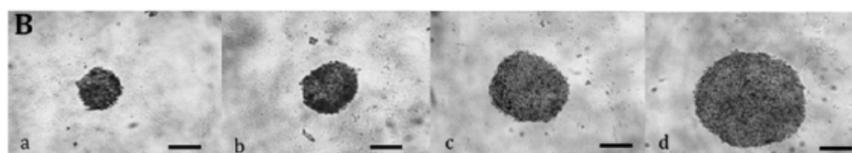


Figure 3 - Appropriate SUM1315 cell line concentration for spheroid formation with liquid overlay in agarose matrix technique.

Cells were cultured with 2% Matrigel added once the aggregates were formed at day two and every day, for seven days. Experiments and observations (M =40X) were performed in triplicate. (A) Diameter of cell aggregates at day two (D2) and of spheroids at day seven (D7) according to the number of cells at seeding. (B) Spheroid profiles under light microscopy after five days (a, 1500 cells per well; b, 3000 cells per well; c, 6000 cells per well; d, 12000 cells per well). Scale bar: 200 µm. (C) Spheroid diameter according to the number of cells per well at seeding.

□



but did not compact with concentrations lower than 1% (Fig 1D), or formed small-scattered aggregates in wells containing a concentration of Matrigel® over 1% (Fig. 1E, Table 1). Under conditions where the Matrigel® was deposited on the already-formed aggregates at less than 1% and more than 2% concentrations, the cells aggregated but did not compact (Matrigel® <1%, Fig 1D) or remained scattered in the wells (Matrigel® >2%, Fig. 1E). Hence, only concentrations of Matrigel® between 1% and 2% induced the formation of compact spheroids (Fig. 1F, Table 1).

Appropriate cell concentration

Considering both techniques, several cell concentrations from 1500 to 50000 cells per well were tested in the presence or absence of Matrigel® at a concentration of 2%. Matrigel® was added in the wells once a day for seven days, from the formation of a cell aggregate in the wells. For each condition, aggregate formation was monitored daily and the diameter of the aggregate (compact or not) was measured using ToupView software (Fig. 2, Fig. 3).

Hanging drop technique: in absence of Matrigel®, SUM1315 cell line form uniform but loose aggregates, regardless of the cell concentration used (diameter of $710 \pm 10 \mu\text{m}$ with 1500 cells and $1043 \pm 11 \mu\text{m}$ for 10000 cells, Fig. 2A). In contrast, when Matrigel® was added when cells were clustered, aggregates formed with 1500 to 10000 cells became compact and unique spheroids. Indeed, after five days of culture, the aggregate diameters measured for 1500, 3000, 5000 and 10 000 cells per well were: $260 \pm 10 \mu\text{m}$, $327 \pm 18 \mu\text{m}$, 387 ± 11 and $806 \pm 23 \mu\text{m}$ respectively (n=4) (Fig. 2A, B). Furthermore, the mean diameters of the spheroids for each concentration were proportional to the number of cells in the wells at seeding (Fig. 2C). For the concentrations above 10 000 cells per well, no compact spheroids were detected (data not shown).

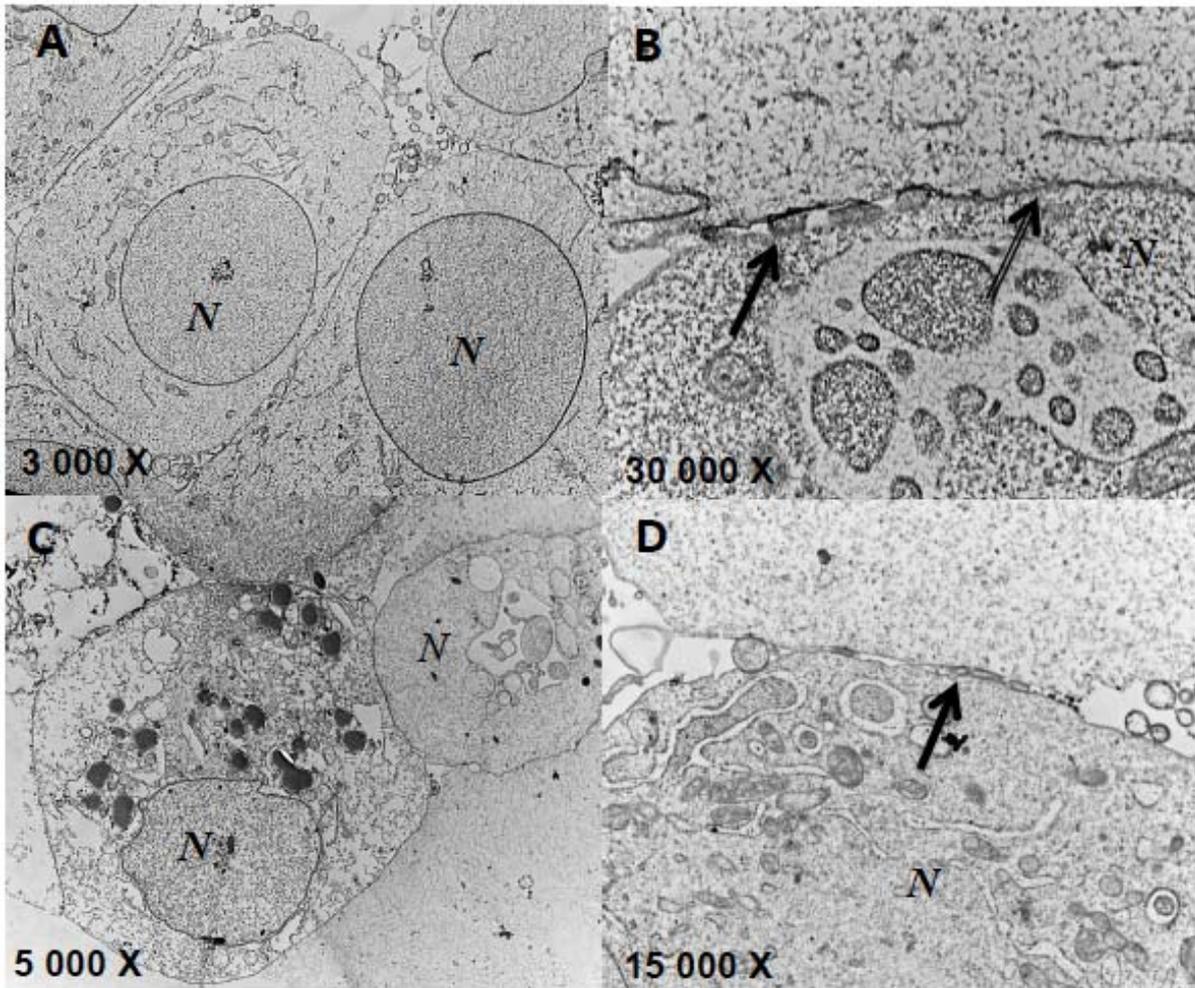


Figure 4 - Liquid overlay in agarose matrix and hanging drop spheroid profiles under Transmission Electron Microscopy (TEM)

(Full arrow= desmosome, dashed arrow= tight junction, *N* = nucleus)

Spheroids were formed using 6 000 cells per well.

Cell organization (**A**, Magnification =3 000X) and ultrastructure and cellular junctions within liquid overlay in agarose matrix spheroids (**B**, M=30 000X).

Cell organization (**C**, M=5 000X) and ultrastructure and cellular junctions within hanging drop spheroids (**D**, M=15 000X).

Liquid overlay in agarose matrix: Experiments without Matrigel® confirmed that SUM1315 cells had the ability to form uniform, but loose aggregates, regardless of the cell concentrations used (diameter of $650 \pm 95 \mu\text{m}$ with 1500 cells and $1664 \pm 83 \mu\text{m}$ for 12000 cells) (Fig. 3A). In contrast, after the addition of Matrigel®, compact spheroids were detected with cell concentrations of 1500 to 12 000 cells per well. Indeed, with 1500, 3000, 6000 and 12000 cells per well, the aggregate diameters measured after seven days were: $336 \pm 13 \mu\text{m}$, $501 \pm 22 \mu\text{m}$, $677 \pm 51 \mu\text{m}$ and $887 \pm 26 \mu\text{m}$, respectively (n=6) (Fig. 3A, B). Furthermore, analysis of the mean diameters of the spheroids showed proportional relationship between the number of cells in the wells at seeding and the size of spheroids (Fig. 3C). However, cell concentrations greater than 12000 cells did not form compact spheroids (data not shown).

Ultrastructural study of SUM1315 spheroids by Transmission Electron Microscopy (TEM)

The integrity and ultrastructure of SUM1315 cells in the spheroids formed with 6000 cells and 2% Matrigel® were then compared for hanging drop and liquid overlay in agarose matrix techniques, by Transmission Electron Microscopy (Fig. 4). The ultra structural organization of spheroids was studied via the analysis of the general appearance of the cells i.e. the integrity of nuclear and plasma membranes, the presence of cell organelles and the nature of cell junctions involved in the formation of these masses.

Hanging drop technique: Spheroids from the hanging drop technology analyzed by TEM at 5000X showed juxtaposed cells containing distorted nuclei but intact plasma membranes (Fig. 4C). Furthermore, the ultra structural analysis of cells at a higher magnification i.e. 15 000X revealed the presence of ribosomes, many lysosomes and other intracellular organelles as well as cellular junctions like desmosomes (Fig. 4D).

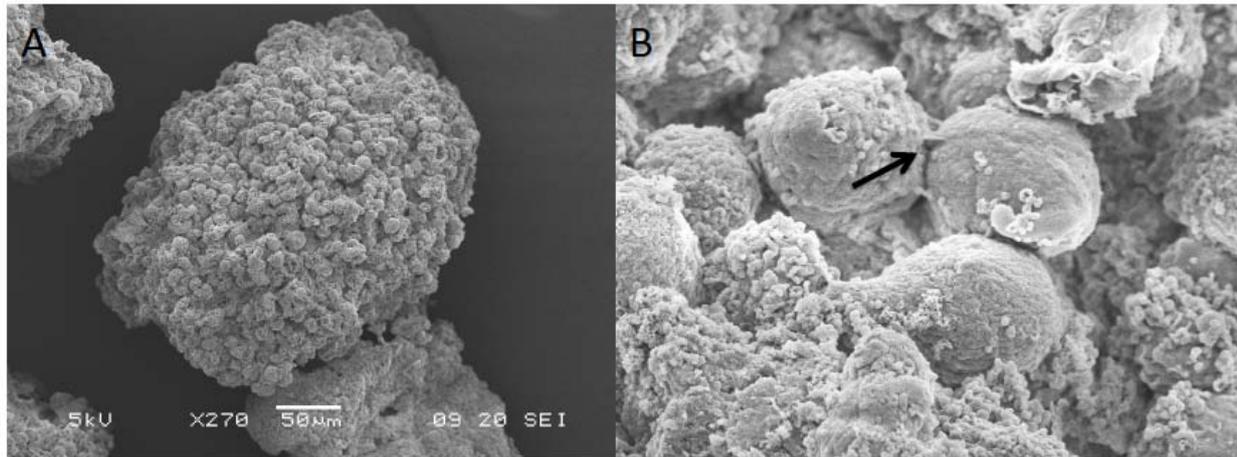


Figure 5 - Liquid overlay in agarose matrix spheroid profile under Scanning Electron Microscopy (SEM)

Spheroids were formed using 6 000 cells per well. (A) Overall conformation (M= 270 X) and (B) intercellular junctions (full black arrow, M= 2 500 X).

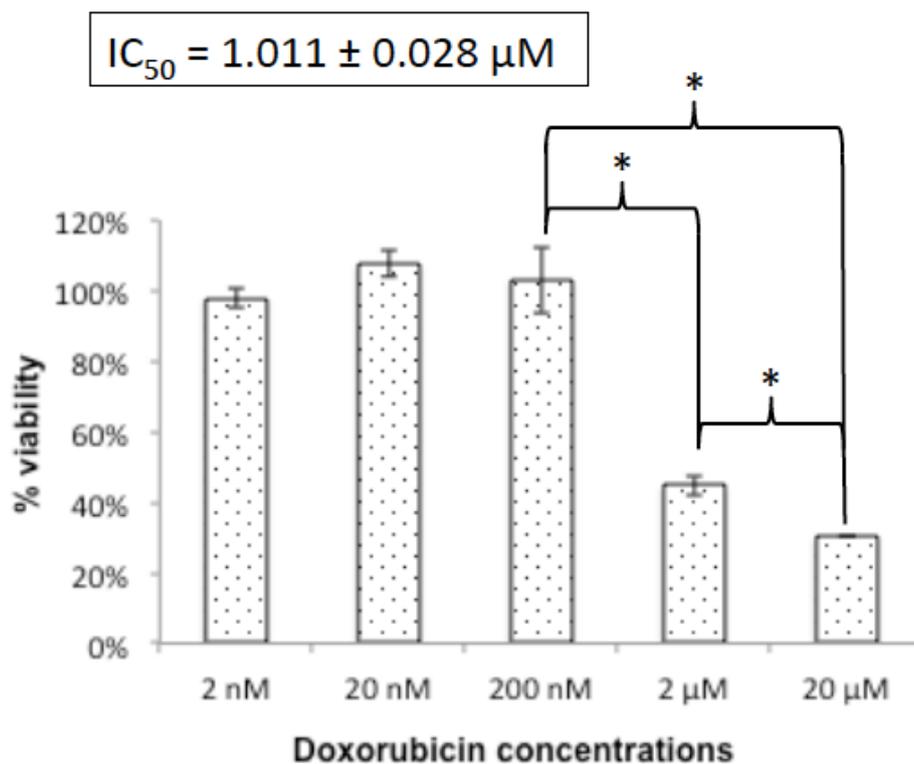


Figure 6 – 3D cell culture sensibility to doxorubicin

Liquid overlay spheroids of 6000 cells and 2% Matrigel® (n=12) were treated with increasing concentrations of doxorubicin (2nM to 20 µM) for 72h. Cell viability was measured after 3h incubation with AlamarBlue® cytotoxicity reagent (10%), at 570 and 620nm. Survival rate was calculated with the formula (OD_{570-620nm} treated wells/ OD_{570-620nm} negative control) x100. IC₅₀ calculation was performed using www.changebioscience.com/stat/ec50.html

*p<0,05

Liquid overlay in agarose matrix technique: Spheroids obtained by liquid overlay in agarose matrix technique observed under TEM at 3000 X showed juxtaposed cells containing homogeneous nuclei. The integrity of the cell membranes was also well preserved (Fig. 4A). Moreover, the ultrastructural analysis of cells at a higher magnification i.e. 30 000 X showed intact intracellular organelles such as ribosomes, tight cell junctions and desmosomes (Fig. 4B).

The two techniques allowed the formation of spheroids with cells distributed homogeneously and forming intercellular junctions. However, since more regularity in cells morphology was detected in the spheroids obtained with the liquid overlay technique, this methodology was chosen for further experiments.

Ultrastructural study of SUM1315 spheroids by Scanning Electron Microscopy (SEM)

In order to confirm the integrity of the SUM1315 cells in spheroids formed with the liquid overlay technique, their overall conformation was studied by SEM (Fig 5A). Cell distribution on the surface of the spheroids was homogeneous and intercellular junctions were also detected on the surface (Fig. 5B), demonstrating cell cohesion. Furthermore, Matrigel® appeared to be distributed all over the spheroid, giving it a particular granular aspect.

3D cell culture sensibility to doxorubicin

Cytotoxicity assays were performed in 3D conditions using AlamarBlue® cytotoxicity test (Life Technologies®, Invitrogen®). For SUM1315 cell cytotoxicity analysis, doxorubicin, a common anti-cancer treatment used for TNBL breast cancers was tested. SUM1315 spheroids at a concentration of 6000 cells per well cultured in liquid overlay in agarose matrix were treated with increasing concentrations of doxorubicin (2 nM to 20 µM), for 72 h. The rate of cell viability was about 100% from 2 to 200 nM doxorubicin ($98 \pm 3\%$ and $103 \pm 9\%$, respectively) (Fig. 6). In contrast, from 2 µM to 20 µM doxorubicin, SUM1315 cell viability decreased

significantly from $45 \pm 3\%$ for $2 \mu\text{M}$ to $30 \pm 0,2\%$ for $20 \mu\text{M}$ of this drug. Sigmoidal calculation of the half maximal effective concentration (EC_{50}) of doxorubicin on 3D cell cultures (www.changbioscience.com/stat/ec50.html) showed an EC_{50} of $1.011 \pm 0.028 \mu\text{M}$.

DISCUSSION

Breast cancer is a complex disease which is heterogeneous in terms of morphological, genetical and phenotypical characteristics, and response to treatment¹⁶. Among the different molecular subtypes identified, the Triple-Negative Basal-like (TNBL) phenotype is particularly aggressive with poor prognosis and responsible for many deaths especially amongst young women aged around thirty. This phenotype is characterised by (i) the absence of expression of estrogen (ER), progesterone (PR) and HER2 receptors at the surface of tumour cells, (ii) the low expression of E-cadherin, (iii) the expression of cytokeratins 5/17, and (iv) in various cases the presence of mutations in the BRCA1/2 genes^{2, 5, 7, 17}.

Conventional chemotherapy is generally used to treat these tumours but, due to their characteristics, they are of very limited efficacy.⁷ For this reason, many efforts are being made to improve the prognosis of patients. Indeed, preclinical approaches via *in vitro* assays and clinical research are currently developing new drugs targeted against these tumours.

For *in vitro* assays, 2D cell culture remains the gold standard in Cell Biology. However, other methods of cell culture, particularly those in three dimensions (3D) are increasingly developing. Indeed, 3D cell cultures mimic more accurately the conditions of *in vivo* tumours, resulting in the formation of compact cell aggregates that may include one or more cell types. By this conformation, cancer cells would be able (i) to develop interactions with the intercellular matrix and exchange nutrients, and (ii) to introduce gradients, such as gradients of pH or hypoxia.⁹ Furthermore, the sensitivity of tumour cells in response to anti-cancer drugs may be different depending on their location within a compact mass, and this may impact drug

distribution. All these features make the 3D cell culture model a great tool to study the sensitivity of tumour cells to anti-cancer drugs. Currently, different 3D cell culture technologies such as (i) the liquid overlay in agarose matrix, (ii) hanging drop and (iii) cell sealing in hydrogels are already available. The first two techniques use the property of cells to aggregate naturally by gravity and have been validated for a large number of breast cancer cell lines^{12, 18, 19}.

In this context, our studies were first focused on the development of a 3D cell culture from TNBL SUM1315 cell line by comparing two techniques, (i) the hanging drop technique in Perfecta 3D plates (Biomatrix[®]) and (ii) the liquid overlay in agarose matrix. Secondly, a 3D cytotoxicity test was developed from this cell line.

The first objective of this study was to select the most appropriate technique for the formation of compact and homogeneous spheroids from the SUM1315 cell line. However, for the development of a 3D cell culture, the relationship of two parameters is essential to be determined, i.e. (i) the concentration of Matrigel[®] and (ii) the adequate number of cells. Indeed, for the formation of compact spheroids, some cell lines require specific matrix in their culture medium, i.e. a mixture of specific components of the extracellular matrix (ECM), such as laminin or collagen IV. These components are responsible for the cell/extracellular matrix connections, and are able to generate an environment leading to the formation of intercellular connections^{11, 20, 21}. The Triple-Negative Basal-Like SUM1315 cell line expresses low protein intercellular junctions such as E-cadherin, which limits the ability of cells to organize themselves spontaneously into compact spheroids²². For the SUM1315 cell model cell line, Matrigel[®] (Geltrex[™] LDEV-Free, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, GIBCO[®]), was used for the formation of compact cell masses^{18, 20, 23}. Moreover, the development of optimal culture conditions for the 3D SUM1315 cell line also required adapting (i) the addition conditions of Matrigel[®] to the culture medium and (ii) the number of cells forming spheroids. For this, the appearance and diameter of the spheroids were analyzed for each experimental condition under light microscopy^{18,19}. With both techniques, optimal conditions for the formation

of compact and homogeneous spheroids from SUM1315 cell lines were obtained when Matrigel® was added to the culture wells only after cell aggregate formation at a final concentration of 2%, considering cells concentrations between 1500 and 10 000 (Hanging drop technique) or 12 000 (Liquid overlay in agarose matrix). These conditions resulted in the formation of a single compact spheroid per well, exhibiting approximately the same diameters (with 1500 cells, $260 \pm 10 \mu\text{m}$ and $336 \pm 13 \mu\text{m}$ for hanging drop and liquid overlay, respectively). Similar Matrigel® concentration and conditions of adding were required to form spheroids with another BLTN breast cancer cell line, MDA-MB-231^{10, 21}.

The cohesion, integrity and ultrastructure of SUM1315 cells, as well as the 3D conformation of spheroids obtained with 6000 cells/well and 2% Matrigel from the two techniques were then confirmed and compared by Transmission Electron Microscopy (TEM) technology. TEM profiles clearly demonstrated that SUM1315 cells remained intact and presented intracellular organelles. Moreover, intercellular junctions such as desmosomes and tight junctions were also detected. All these results suggest that liquid overlay in agarose matrix technology and hanging drop technique are suitable for spheroid formation with the SUM1315 cell line. However, more regularity in cells morphology including intact nuclei and intracellular organite repartition was observed in the spheroid obtained with the liquid overlay technique. In addition, this method appeared to be easier to handle. Therefore, the liquid overlay in agarose matrix technology was selected as the most appropriate 3D cell culture model for further experiments.

Furthermore, Scanning Electron Microscopy (SEM) profiles of spheroids obtained in the same 3D culture conditions, with liquid overlay confirmed similar results. Indeed, a homogeneous repartition of cells and matrigel was detected all over the spheroids. Moreover, intercellular junctions were also clearly present. In addition, the liquid overlay technology had already been validated for others breast cancer cell lines such as MCF-7, MDA-MB-231 and other cell lines difficult to handle such as the lung cancer cell line A549.¹⁰

The second objective of this work was to develop the AlamarBlue® cytotoxicity test with SUM1315 cells cultured in liquid overlay 3D conditions. This cytotoxicity test has been already validated for a large number of 3D cell culture models and has the advantage of not being lethal to cells²⁴. For SUM1315 cell line, the optimal incubation time and the appropriate scale of cell concentrations for the AlamarBlue® assay were determined in order to measure the viability of cells in 3D conformation after drug treatments. For these experiments, doxorubicin a highly cytotoxic intercalating DNA agent currently used to treat breast cancer²⁶, was selected. In our experimental condition (i.e. 6000 cells/wells and 2% Matrigel), the EC₅₀ of doxorubicin on SUM1315 3D spheroids was $1.012 \pm 0.028 \mu\text{M}$. For now, there are no IC₅₀ reported for doxorubicin on 3D breast cancer cell lines. However, the 50% inhibitory concentration of doxorubicin has been already indexed for different breast cancer cell lines in 2D cell culture conditions^{25, 26}. Indeed, the IC₅₀ of doxorubicin was $0.012 \mu\text{M}$ for MCF/7 cells sensitive to doxorubicin²⁷, against $5 \mu\text{M}$ for MDA-MB-231 cells, which are known to be relatively resistant to doxorubicin²⁸.

Overall, our results showed that the liquid overlay in agarose matrix technology constitutes the most appropriate 3D cell culture model for TNBL SUM1315 cell line. The development of the AlamarBlue® cytotoxicity test with SUM1315 cells cultured in liquid overlay 3D conditions might provide a more efficient approach to model the effectiveness of treatments including new targeted therapies on these very resistant and aggressive tumours. For validation of this technology, the cytotoxicity of different classes of drugs on SUM1315 3D cell culture is currently underway.

METHODS

SUM1315 Cell Culture in 2D

The SUM 1315 cell line of phenotype BLTN was obtained from the Asterand Company. The cells were seeded at 25,000 cells/ml in a 75 cm² culture dish (Falcon ®) at 37 °C under 5%

CO₂, in 15 ml Ham's F12 medium (GIBCO®) supplemented with 5% decompemented fetal calf serum, 10 mM HEPES buffer, 20 mg/ml gentamycin, 10 ng/ml EGF and 4 g/ml of insulin, according to the supplier's instructions²⁹. SUM1315 cells having reached confluence were initially washed with PBS (1X, Sigma®) and then trypsinized (Trypsin 1X, Sigma®) for 5 min at 37 °C. The cells were then taken up in 12 ml of culture medium and centrifuged for 10 minutes at 250 G. The pellet was then taken up in 5 ml of culture medium. The number of cells per ml was determined by a cell count using a vital stain Trypan Blue. This allowed for counting the cell dilutions necessary for seeding cells in varying concentrations, and defined for each experiment.

3D cell culture development

Matrigel® solubilisation. Matrigel® (Geltrex™ LDEV-Free, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, GIBCO®) inducing compaction of cells within the spheroid is liquid at 4 °C and gel at 37 °C. For this, Matrigel® was pre-diluted at a concentration of 10% in culture medium maintained at 4 °C to prevent its caking before its addition to cell suspensions or wells.

Agarose solubilisation and plate preparation for liquid overlay in agarose matrix technique. Plate preparation was performed using a solution of 1.5% (weight/volume) agarose (Sigma®), dissolved in sterile distilled water and heated at 60 °C for 20 min. This agarose solution was then deposited in sterile conditions in the wells of a 96 rounded bottom wells microplate (Nunc®), at 70 µl per well, to form a meniscus.

Cell culture concentration and Matrigel® treatment with the hanging drop technique. For development of SUM1315 3D cell culture by the hanging drop technique, the Perfecta 3D plates (Biomatrix®) were used. In order to determine the best concentration for spheroid formation, 500, 1500, 5000, 6000, 10000, 20000, 30000 or 50000 cells were seeded in each well of the

microplate, in a final volume of 25 μ l culture medium. The tank surrounding the wells was filled with sterile water. The cell culture was then maintained by the addition of 5 μ l of culture medium to each well, per day. For each culture condition, different Matrigel® concentrations (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6%) were tested. Matrigel® was added to cell culture before or after cell seeding and/or during 3D cell culture achievement.

Cell culture concentration and Matrigel® treatment with the liquid overlay in agarose matrix technique. For development of SUM1315 3D cell culture by liquid overlay in agarose matrix, 500, 1500, 5000, 6000, 10000, 12000, 20000, 30000 or 50000 cells were seeded in each well of the microplate, in a final volume of 70 μ l culture medium. The cell culture was then maintained by the addition of 14 μ l of culture medium to each well, per day. For each culture condition, different Matrigel® concentrations (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6%) were tested. Matrigel® was added to cell culture before or after cell seeding and/or during 3D cell culture achievement.

Tracking spheroid formation. The monitoring of spheroid formation was performed using a light microscope (Microscope Realux, COFEMO®) coupled to a camera (Industrial Digital Camera, UCMOS®) and its associated software (ToupView®). Depending on the size of cell clusters, observations were made at a magnification of 40X or 100X. This equipment allowed for control of spheroid formation and measurement of spheroid diameters (according to the manufacturer's instructions).

Transmission Electron Microscopy

The ultrastructural study of spheroids was achieved by Transmission Electron Microscopy (TEM). Spheroids obtained with both techniques were washed with 0.2M sodium cacodylate buffer, prefixed in 3.2% glutaraldehyde for 24 hours at 4°C and fixed with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 hour. In order to visualize the spheroids, a solution

of 0.15% ruthenium red in water was added to the buffer and pre-fixative solutions. Fixed spheroids were then progressively dehydrated in ethanol (70%, 95%, 100%) and acetone, impregnated in EPON resin for two days at 60°C. Spheroids included in resin were then cut in ultrathin slides (80 nm) and finally stained with a contrasting color (uranyl acetate and lead citrate). Observation of the ultra structural organization of cells within the spheroids was then conducted with the Hitachi® H77650 transmission electron microscope.

Scanning Electron Microscopy

Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to assess the organization of cells forming the spheroid. To do this, spheroids obtained with the liquid overlay in agarose matrix were firstly transferred in a new plate and then washed with 0.2M sodium cacodylate buffer, prefixed in 3.2% glutaraldehyde for 24 hours at 4 °C and fixed with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 1 hour. For spheroid visualization, a solution of 0.15% ruthenium red in water was added to the buffer and pre-fixative solutions. Fixed spheroids were then progressively dehydrated in ethanol at 30%, 50%, 95%, 100% and ethanol 100%/HMDS, respectively. The samples were then metallized with a mixture of gold and palladium (60-40%) and observed with the Jeol 6060 LV scanning electron microscope.

Doxorubicin solubilisation and SUM1315 3D cell culture exposure

Doxorubicin (Sigma®) was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma®), to a final concentration of 20 mM, constituting the stock solution. For each experiment, 6000 cells/well in microplates were used, according to the conditions described above. The SUM1315 cells were exposed to concentrations of 2 nM, 20 nM, 200 nM, 2 μ M and/or 20 μ M of doxorubicin during 72 h. The final DMSO concentration in each culture well was still 0.1%. In parallel, control cell cultures and control cultures in the presence of 0.1% DMSO were also performed. The cytotoxicity of doxorubicin was then analysed using a cell viability test.

Cell viability analysis using the AlamarBlue® assay

The AlamarBlue® assay (Life Technologies®, Invitrogen®) is a colorimetric assay for cell viability, which involves the reduction of resazurin to resorufin by the metabolically active mitochondria of cells. Resorufin is a fluorescent compound that exhibits a pink coloring. Thus, after a time of incubation, the amount of resorufin formed is directly proportional to the number of living cells. Cells cultured in 3D conditions were treated with the drug for 72 h at 37°C. The AlamarBlue® reagent was then added to the wells, to a final dilution of 10%, and optical densities were measured at 570 and 620 nm after 3h incubation. The amount of reduced compound (resorufin) corresponding to the number of living cells per well was calculated for each condition (5 conditions, n = 12). The survival rate was determined considering the ratio $(OD_{570-620nm} \text{ treated well} / OD_{570-620nm} \text{ negative control}) \times 100$.

Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard deviation of *n* independent experiments. All experiments were performed at least in triplicate and then statistically compared using a Student's t-test. Tests were two-sided and the nominal level of significance was $p < 0.05$ unless otherwise specified.

REFERENCES

1. Guiu S. *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol* **23**, 2997-3006 (2012).
2. Anders C.K. & Carey L.A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* **9 Suppl 2**, S73-81 (2009).
3. Banda M. *et al.* Metabotropic glutamate receptor-1 contributes to progression in triple negative breast cancer. *PLoS One* **9**, e81126 (2014).
4. Prat A. & Perou, C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* **5**, 5-23 (2011).
5. De Ruijter T.C., Veeck J., de Hoon J.P., van Engeland M. & Tjan-Heijnen V.C. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 183-92 (2011).
6. Haupt B., Ro J.Y. & Schwartz M.R. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. *Arch Pathol Lab Med* **134**, 130-3 (2010).
7. Ismail-Khan R. & Bui M.M. A review of triple-negative breast cancer. *Cancer Control* **17**, 173-6 (2010).
8. Fang L., Barekati Z., Zhang B., Liu Z. & Zhong X. Targeted therapy in breast cancer: what's new? *Swiss Med Wkly* **141**, w13231 (2011).
9. Hirschhaeuser F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* **148**, 3-15 (2010).
10. Lama R. *et al.* Development, validation and pilot screening of an in vitro multi-cellular three-dimensional cancer spheroid assay for anti-cancer drug testing. *Bioorg Med Chem* **21**, 922-31 (2013).
11. Nyga A., Cheema, U. & Loizidou, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal* **5**, 239-48 (2011).

12. Charoen K.M., Fallica, B., Colson, Y.L., Zaman, M.H. & Grinstaff, M.W. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. *Biomaterials* **35**, 2264-71 (2014).
13. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* **3**, 1172-1184 (2008).
14. Chitcholtan K., Sykes P.H., Evans J.J. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *J Transl Med.*, **10** :38 (2012).
15. Jaganathan H. *et al.* Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci Rep* **4**, 6468 (2014).
16. Kobayashi S. Basal-like subtype of breast cancer: a review of its unique characteristics and their clinical significance. *Breast Cancer* **15**, 153-8 (2008).
17. Carey L.A. Novel targets for triple-negative breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* **9**, 678-80 (2011).
18. Costa E.C., Gaspar V.M., Coutinho P. & Correia I.J. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnol Bioeng* **111**, 1672-85 (2014).
19. Tung Y.C. *et al.* High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* **136**, 473-8 (2011).
20. Kleinman H.K. & Martin G.R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* **15**, 378-86 (2005).
21. Shin C.S., Kwak B., Han B. & Park K. Development of an in vitro 3D tumor model to study therapeutic efficiency of an anticancer drug. *Mol Pharm* **10**, 2167-75 (2013).
22. Neve R.M. *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**, 515-27 (2006).

23. Wenzel C. *et al.* 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res* **323**, 131-43 (2014).
24. O'Brien J., Wilson I., Orton T. & Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421-6 (2000).
25. Shen F. *et al.* Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 95-102 (2008).
26. Smith L. *et al.* The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol Cancer Ther* **5**, 2115-20 (2006).
27. Panusci L. *et al.* Sensitization to doxorubicin resistance in breast cancer cell lines by tamoxifen and megestrol acetate. *Biochemical Pharmacology* **52**, 1097-1102 (1996).
28. Oluwaseun O.A. *et al.* Ovatodiolide sensitizes aggressive breast cancer cells to doxorubicin, eliminates their cancer stem cell-like phenotype, and reduces doxorubicin-associated toxicity. *Cancer Letters* **364**, 125–134 (2015).
29. Privat M. *et al.* Breast cancer cell response to genistein is conditioned by BRCA1 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 785-9 (2009).

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks to Fabrice Kwiatkowski for his advice with the statistical analysis and to Lorraine Gameiro for her assistance with SEM and TEM technologies at the Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (Université d'Auvergne).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.D., R.D., M.B., P.D., E.M., F.P.L. conceived and designed the study; C.D., R.D., C.B., C.S. performed the experimental work; C.D., R.D., P.D., C.B. E.M. and M.B. analyzed the data; C.D. and R.D. performed statistical analysis; C.D., R.D., P.D. C.A., E.M., and M.B. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing financial interests: the authors declare no competing financial interests.

**DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Le cancer du sein, avec 1,7 millions de cas à travers le monde en 2012, soit un cancer féminin sur quatre, et 552 000 décès en 2014, représente l'une des principales causes du décès des femmes (World Health Organization., 2013). En effet, malgré les efforts et les avancées réalisés en termes de prévention et de dépistage, le cancer du sein reste une maladie complexe, très hétérogène et encore peu connue. Cependant, des études transcriptomiques menées ces dernières années ont permis de caractériser six sous types moléculaires différents du cancer du sein: (i) « Luminal A », (ii) « Luminal B », (iii) « HER2 surexprimé », (iv) « Normal Breast-Like », (v) « Claudin-Low » et (vi) « Basal-Like » (Perou CM *et al.*, 2000 ; Herschkowitz JI *et al.*, 2007 ; Sørlie T *et al.*, 2001 ; Sotiriou C *et al.*, 2003).

Parmi ces sous types, le phénotype « Basal-like » triple négatif (BLTN) est l'une des formes les plus agressives et présente un pronostic défavorable. Il représente 10 à 20% des tumeurs du sein et apparaît préférentiellement chez les jeunes femmes non ménopausées, plus spécifiquement d'origine afro-américaines et hispanique (Leidy J *et al.*, 2014). Ces tumeurs agressives sont caractérisées principalement par une faible, voire absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et HER2/neu, une forte expression des récepteurs EGFR et/ou c-kit et de fréquentes mutations sur le gène BRCA1 (de Ruijter TC *et al.*, 2011 ; Leidy J *et al.*, 2014 ; Perou CM *et al.*, 2000 ; Sørlie T *et al.*, 2001). Etant insensible aux traitements hormonaux actuellement utilisés en clinique, le seul traitement disponible contre ces tumeurs est la chimiothérapie conventionnelle qui est souvent associée à de lourds effets secondaires. Cependant, bien que réagissant aux traitements dans un premier temps, ces tumeurs présentent un fort taux de rechute avec formation de métastases au niveau des tissus mous et des viscères. De plus, ces métastases agressives se développent rapidement et résistent aux traitements utilisés, ce qui se traduit par un faible taux de survie des patientes après rechute (Ismail-Khan R et Bui MM., 2010 ; Kennecke H *et al.*, 2010 ; Luck AA *et al.*, 2008).

Du fait de l'absence de traitement ciblé pour des tumeurs «Basal-like » triple négatives (BLTN) et leur agressivité, de nombreuses démarches ont été entreprises afin de développer de nouvelles stratégies de traitement. De fait, la mise au point de nouveaux protocoles de traitement (calendrier d'administration des traitements, chimiothérapie néoadjuvante,...) et le développement de nouvelles thérapies ciblées ont été mis en place. Plusieurs classes de nouvelles molécules ont ainsi été développées afin de contrer les tumeurs BLTN. Parmi celles-ci, on peut distinguer les anti-EGFR, en effet, le récepteur EGFR représenterait une cible intéressante du fait qu'il est surexprimé chez ces tumeurs (Lehmann BD *et al.*, 2015 ; Yadav BS *et al.*, 2014). Une autre classe d'intérêt est celle des inhibiteurs de tyrosine kinase

ciblant les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui sont fréquemment suractivées chez les cellules tumorales BLTN. Ces voies de signalisations jouent un rôle prépondérant dans de nombreux mécanismes cellulaires (survie cellulaire, métabolisme, prolifération, ...) et leur inhibition serait préjudiciable pour ces cellules, ce qui en fait des cibles de choix (Lehmann BD *et al.*, 2015 ; Yadav BS *et al.*, 2014). Une autre approche est l'inhibition des récepteurs VEGF, empêchant ainsi le phénomène d'angiogenèse au niveau des tumeurs, qui ne recevront plus alors les nutriments nécessaires à leur croissance (Lehmann BD *et al.*, 2015 ; Yadav BS *et al.*, 2014). Enfin, une autre classe de thérapie ciblée est celle des anti-PARPs qui inhibent la voie de réparation d'ADN BER. Les anti-PARP semblent être particulièrement prometteurs pour le traitement des tumeurs «Basal-like » triple négatives. En effet, ces molécules ont la propriété de cibler spécifiquement les cellules BRCA déficientes dont font partie une grande majorité des tumeurs « Basal-like » triple négatives (Annunziata CM et Bates SE., 2010). Chez les cellules saines, les cassures de l'ADN sont réparées par les mécanismes de réparation d'ADN de type BER et HR, or chez les cellules BRCA mutées, la voie HR est inactivée. Dans ce cas, si la voie BER est également inactivée par un anti PARP, les cassures d'ADN vont s'accumuler sur le génome et entraîner la mort cellulaire. Ce mécanisme intitulé « létalité synthétique » est très intéressant pour cibler le traitement des cellules tumorales BLTN, tout en épargnant les cellules saines non mutées sur BRCA (Carey LA., 2011; Fang B., 2014; Lee JM *et al.*, 2014; Menear KA *et al.*, 2008). Parmi ces anti-PARPs, l'Olaparib, qui a reçu récemment une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des tumeurs ovariennes, est actuellement en phase de recherche clinique pour le cancer du sein BLTN. Nous l'avons donc choisi comme molécule modèle, pour le développement de nos travaux de recherche.

Cependant, différents mécanismes de résistance, présents et/ou développés chez les cellules cibles traitées par les anti-PARP, peuvent limiter leur efficacité. En effet, l'apparition de mutations reverses sur les gènes *brca* peut rétablir l'activité de la voie HR et ainsi annuler le mécanisme de la létalité synthétique. Il est aussi possible que la mutation de *brca* n'inhibe que partiellement l'activité de la protéine, permettant ainsi de maintenir les mécanismes de recombinaison. La voie HR peut aussi être réactivée, même si *brca* est inactif, grâce à des mutations sur d'autres gènes, notamment sur celui de la protéine 53BP1 (p53-binding protein 1). En effet, cette protéine est un répresseur de la voie HR, et il a été observé *in vitro* que son inhibition entraînait la réactivation des mécanismes de recombinaison et ceux même si BRCA est inactivé. Enfin, une autre possibilité est l'intervention de transporteurs « Multidrug

Resistance» (MDR) dont l'action va limiter l'accumulation de l'anti PARP dans les cellules cibles (Bouwman P et Jonkers J., 2013 ; Oplustilova L *et al.*, 2015).

Parmi ces mécanismes de résistance, les transporteurs MDR représentent l'une des causes majeures de la chimiorésistance ou la résistance croisée des cellules tumorales face aux chimiothérapies. Il s'agit de pompes d'efflux membranaires de type ATPasique et à rôle détoxificateur. Les protéines MDR reconnaissent de nombreuses molécules de propriétés et de structures très variées dont notamment des médicaments anticancéreux tel les anthracyclines, les anthracènes, les vinca-alcaloïdes ou le Paclitaxel, des inhibiteurs de tyrosine kinase mais aussi des anions organiques conjugués, des flavonoïdes, des pesticides ou encore des composés inorganiques (Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Sarkadi B *et al.*, 2006). Lors de traitement des cellules tumorales, les médicaments anticancéreux sont pris en charge par les protéines MDR et expulsés hors des cellules, limitant ainsi leur accumulation/efficacité dans les cellules cibles (Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Leslie EM *et al.*, 2005 ; Raaijmakers MH., 2007 ; Sarkadi B *et al.*, 2006). Cette action de résistance est renforcée par le fait que les protéines MDR sont souvent surexprimées chez les cellules tumorales (Kathawala RJ *et al.*, 2015 ; Sarkadi B *et al.*, 2006). Récemment, trois protéines MDR ont été citées comme ayant un intérêt majeur en clinique (Kathawala RJ *et al.*, 2015). Il s'agit de (i) la P-gp codée par ABCB1 ou MDR1, (ii) la MRP7 codée par ABCC10 et (iii) BCRP codée par ABCG2. Leurs intérêts ont été mis en évidence chez de nombreux types de tumeurs, notamment chez celles ayant développé une résistance, suite aux traitements (Kathawala RJ *et al.*, 2015).

L'objectif de nos travaux de recherche est l'optimisation du traitement cancer du sein de phénotype BLTN par les inhibiteurs de PARP. Dans ce contexte, la première partie de ce travail a été orientée sur l'étude de l'implication de deux protéines MDR majeures, la «Breast Cancer Resistance protein» (BCRP) et la « Permeability-glycoprotein » (P-gp), chez la lignée SUM1315 de phénotype BLTN en réponse à un anti-PARP modèle, l'Olaparib. Ce dernier est déjà homologué pour le traitement du cancer de l'ovaire en clinique depuis le 16 décembre 2014 sous le nom de Lynparza (European Medicines Agency (EMA), 2014), et dans le cas du cancer du sein, de nombreux travaux sont actuellement en cours de recherche clinique (clinicaltrials.gov).

Nos travaux ont mis en évidence par la technique de western blot, une expression basale de la BCRP et de la P-gp chez les cellules BLTN de la lignée SUM1315. Le taux d'expression est de $0,54 \pm 0,05$ u.a pour la P-gp et de $0,34 \pm 0,03$ u.a pour la BCRP. Ces

résultats suggèrent que le mécanisme de résistance *via* les protéines MDR est déjà présent chez les cellules de cette lignée BLTN. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, l'agressivité des tumeurs BLTN ainsi que la faible efficacité des traitements en clinique. Cependant, il existe encore peu de données cliniques sur l'implication des protéines MDR dans les tumeurs de phénotype TN mais la recherche de leur expression sur les biopsies de patientes pourraient servir de marqueur de résistance aux traitements (Chekhun VF *et al.*, 2009).

L'efficacité du traitement des cellules tumorales étant en partie liée au maintien du médicament cytotoxique dans les cellules cibles, nous avons ensuite étudié la co-expression de la BCRP et de la P-gp, en corrélation avec la concentration intracellulaire d'Olaparib. La modélisation de la réponse des cellules SUM1315 a été réalisée en présence de 50 μ M d'Olaparib. Cette concentration a été déterminée/choisie suite aux tests de cytotoxicité réalisés avec cet anti-PARP sur cette lignée cellulaire. En effet, à cette concentration, l'Olaparib présenterait une faible cytotoxicité (environ 10% après 24h d'exposition). La cinétique de la co-expression de la BCRP et de la P-gp a été suivie durant les 24 premières heures de traitement. Ces expériences ont mis en évidence qu'une exposition des cellules SUM1315 à 50 μ M d'Olaparib engendrait une augmentation de l'expression de la BCRP et de la P-gp avec une réponse de type relais, au cours du temps. En effet, après seulement 1h30 de traitement avec cet anti-PARP, l'expression de la BCRP augmente fortement (1,8 fois) alors que celui de la P-gp reste à son taux basal (1,1 fois). Le taux d'expression de la BCRP va ensuite diminuer progressivement pour retrouver son taux basal après 6h de traitement. En parallèle, à partir de 3h de traitement, l'expression de la P-gp augmente considérablement (2,2 fois) puis diminue au cours du temps pour retrouver sa valeur basale après 24h de traitement. L'Olaparib induit donc l'expression de ces deux protéines MDR dans la lignée SUM1315. Par ailleurs, il a déjà été reporté que dans les lignée IGROVCDDP et KB-8-5-11 l'Olaparib était une molécule cible de la P-gp (Lawlor D *et al.*, 2014). Ainsi, nos résultats laissent supposer que (i) l'Olaparib serait une molécule cible des deux protéines MDR majeures dans la lignée SUM1315, (ii) la BCRP formerait la première ligne de défense à l'échelle membranaire et, (iii) son action serait renforcée par la P-gp qui prendrait ensuite seule le relais. Par conséquent, dès les premières heures du traitement et durant 24h, ces deux protéines MDR constitueraient un réseau de défense contre l'Olaparib dans les cellules de la lignée SUM1315. Cependant, dans nos conditions expérimentales, après 24h de traitement, ce réseau de résistance disparaîtrait dans les cellules de cette lignée.

Afin de comprendre le mode de réponse de ces deux transporteurs MDR à l'encontre de l'Olaparib, nous avons ensuite analysé l'évolution de la concentration intracellulaire en Olaparib par HPLC, dans les mêmes conditions expérimentales et sur la même période. Nos résultats ont démontré que l'Olaparib pénétrait dès la première heure du traitement dans les cellules SUM1315, pour atteindre son taux maximal dans les cellules à 3 h ($93.9 \pm 10.8\%$). Puis, sa concentration se stabilisait dans les cellules jusqu'à 24 h, sans variations significatives. De plus, aucun produit de dégradation n'a été détecté ni dans le milieu de culture, ni dans les cellules, confirmant ainsi que l'Olaparib restait stable dans nos conditions expérimentales. A l'heure actuelle, aucune donnée dans la littérature ne fait mention de l'évolution de la concentration intracellulaire des anti-PARP dans les cellules tumorales.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'Olaparib pénétrerait très rapidement dans les cellules SUM1315, que sa concentration intracellulaire se stabiliserait après 3h de traitement et resterait ensuite stable durant les 24 h de traitement. L'augmentation de l'expression des protéines MDR serait corrélée avec l'accumulation intracellulaire d'Olaparib dans ces cellules SUM1315. En effet, l'action de la BCRP assurant la première ligne de défense cellulaire serait renforcée par la P-gp à partir de 3 h de traitement, correspondant à l'atteinte de la concentration intracellulaire maximale en Olaparib, dans ces cellules. Ensuite à partir de 6h de traitement, temps correspondant à la stabilisation de la concentration intracellulaire en Olaparib, la BCRP retrouverait son taux d'expression intrinsèque et la P-gp, seule, assurerait la défense cellulaire. Cependant, le taux d'expression de la P-gp diminue également au cours du temps pour atteindre sa valeur basale à partir de 24 h de traitement, et ce malgré la persistance d'Olaparib dans les cellules cibles.

Afin de comprendre ce mécanisme, nous avons continué ces travaux par l'étude de la viabilité des cellules SUM1315 en présence de 50 μ M d'Olaparib, mais à plus long terme. Nos résultats ont montré que la viabilité cellulaire diminuait progressivement au cours du temps, avec environ une baisse de 10% après 24h, de 24% après 72h et de 64% après 120 h d'exposition à cette concentration d'Olaparib. Ces résultats montrent l'efficacité cytotoxique de l'Olaparib sur les cellules de la lignée SUM1315 à long terme, probablement en lien avec ses propriétés d'induction de « létalité synthétique ». Nos résultats montrent également que malgré la surexpression et la réponse relais des deux protéines MDR majeures dans la lignée SUM1315, l'Olaparib, à la concentration testée, était maintenu dans les cellules cibles. Ce maintien intracellulaire d'anti-PARP pourrait être à l'origine de l'inactivation des pompes MDR. Par conséquent, l'ensemble de ces résultats peut suggérer que le maintien d'une concentration stable et peu cytotoxique d'anti-PARP dans les cellules cibles au début du

traitement pourrait engendrer un contournement de la résistance induite par des protéines MDR. Par ailleurs, il serait intéressant d'explorer la cible d'Olaparib dans les cellules SUM1315. En effet, son maintien pourrait être en relation avec sa fixation sur des cibles spécifiques, soit sur la protéine PARP, soit d'autres cibles à définir. Cette approche sera étudiée par l'équipe ultérieurement.

Toujours dans l'objectif de l'optimisation du traitement des tumeurs BLTN par les anti-PARP, dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons modélisé la potentialisation de l'action de l'Olaparib en le combinant à un traitement par radiothérapie. En effet, à l'heure actuelle, aucune thérapie combinant la radiothérapie et les anti-PARPs n'a encore été explorée sur ce type de tumeur. Cependant, leurs mécanismes d'action seraient complémentaires et leur utilisation combinée pourrait aboutir à une optimisation du traitement des tumeurs BLTN. C'est dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de physique corpusculaire - UMR 6533 CNRS/IN2P3 de l'Université Blaise Pascal et le service de radiothérapie du Centre Jean Perrin, que nous avons entamé une étude de modélisation d'un traitement combiné par l'Olaparib et par la radiothérapie à basse et/ou à haute énergie sur la survie des cellules de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN.

Nous avons commencé ces expériences par l'étude de l'effet de l'Olaparib seul sur la survie des cellules de la lignée SUM1315. Pour cela, nous avons traité des cellules SUM1315 avec des concentrations croissantes d'Olaparib (de 10 à 100 μM) pendant 120h. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une forte cytotoxicité de l'Olaparib pour ces cellules qui semble s'instaurer progressivement au cours du temps. En effet, une faible cytotoxicité cellulaire est détectée au temps 24h avec environ 90% de survie cellulaire. Celle-ci diminue ensuite à partir de 72 heures de traitement ($81,30 \pm 1,32$ pour 10 μM et $64,67 \pm 2,70$ pour 100 μM) pour atteindre un taux moyen de 40% à partir de à 120 heures d'exposition. Ces résultats viennent confirmer ceux précédemment obtenus en mettant en évidence que la toxicité de l'Olaparib s'instaure à long terme dans la lignée SUM1315. Ces résultats indiquent également que l'action de l'Olaparib est dose dépendante, quand il est utilisé seul, sur la lignée SUM1315.

Ensuite, nous avons étudié l'action d'un traitement combiné Olaparib/Radiothérapie à basse ou à haute énergie sur les cellules de cette lignée. Pour cela, 3h avant un traitement par irradiation, les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes d'Olaparib allant de 10 à 100 μM . Après les 3h d'exposition avec l'Olaparib, les cellules sont traitées avec une dose fractionnée de 10 Gy à raison de 2 Gy par jours. Les irradiations à basse énergie ont été

réalisées sur la plateforme PAVIRMA tandis que les irradiations à haute énergie ont été effectuées au service de radiothérapie du Centre de Lutte contre le Cancer Jean Perrin. La comparaison des résultats, entre un traitement Olaparib seul ou irradiation seule et ceux des traitements combinés Olaparib/radiothérapie fractionnée, ont alors mis en évidence un effet synergique des deux traitements sur la viabilité cellulaire. En effet, après exposition à une dose de 10 Gy, le taux de survie des cellules irradiées et traitées avec l'Olaparib est significativement inférieur à celui des cellules traitées seulement avec l'Olaparib ou les irradiations seules. Cet effet synergique est observé aussi bien avec les irradiations à basse énergie qu'avec celles à haute énergie. De plus, en traitement combiné, aucune différence significative de survie cellulaire n'est observée entre les différentes concentrations d'Olaparib utilisées (figures 29 et 31), alors qu'en traitement seul, l'effet de l'Olaparib sur la survie cellulaire est proportionnel à la dose employée (figure 27). Ces résultats indiquent que dans nos conditions expérimentales, l'Olaparib à de faible dose, aurait la même capacité de potentialisation de l'effet des radiations que les plus fortes concentrations que nous avons testées, rendant de fait inutile l'utilisation de fortes doses d'Olaparib pendant un traitement combiné. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il serait possible de diminuer encore les doses d'Olaparib utilisées en traitement combiné tout en gardant le même bénéfice du point de vue de l'efficacité du traitement.

Il serait donc pertinent de poursuivre ces travaux en utilisant, d'une part, des concentrations plus faibles d'anti-PARP avec la même dose de radiation, mais aussi en présence de doses plus élevées de radiation à haute énergie. En effet, chez les patients, des doses de l'ordre de 40 à 50 Gy (haute énergie) sont habituellement utilisées lors de la radiothérapie (Rutqvist LE *et al.*, 2003). D'autre part, il serait également pertinent d'analyser la potentialisation du co-traitement en commençant d'abord par une radiothérapie suivi d'un traitement par un anti-PARP. Enfin, l'étude *in vitro* des effets des irradiations étant fortement influencés par les couches de matières qu'ils traversent ainsi que par la conformation des cellules ciblées, il serait intéressant de réaliser ces tests sur des cultures cellulaires en trois dimensions (3D) qui seraient plus proches de la conformation des tumeurs.

De ce fait, nous avons ensuite poursuivi ces travaux de recherche par le développement des cultures cellulaires en trois dimensions (3D) à partir de la lignée SUM1315 de phénotype BLTN. Pour cela, deux techniques de culture en 3D (i) « hanging drop » sur plaque Perfecta 3D (Biomatrix®) et (ii) « liquid overlay » en matrice d'agarose ont été mises au point.

Dans un premier temps, deux paramètres, (i) le nombre de cellules adéquat pour la formation de sphéroïde et (ii) la concentration en Matrigel, ont été déterminés. En effet, la lignée SUM1315 ne forme pas naturellement de sphéroïdes, problème rencontré chez de nombreuses lignées n'exprimant pas des protéines de la matrice extracellulaire. Ce problème peut être contourné en ajoutant du Matrigel au milieu de culture à une concentration variant selon le type de lignée cellulaire utilisée (Benton G *et al.*, 2014). Ainsi, suite à la mise au point de ces deux paramètres pour la lignée SUM1315, des sphéroïdes compacts et homogènes ont été obtenus en présence de 2% de Matrigel® et 6000 cellules par puits. L'ultrastructure des sphéroïdes a ensuite été analysée par microscopie électronique à transmission. Nos observations ont permis de confirmer la présence de jonctions intercellulaires chez les sphéroïdes obtenus avec les deux techniques, ce qui constitue une des étapes importantes de la formation des sphéroïdes. En effet, c'est la formation de jonctions intercellulaires entre les cellules, notamment des liaisons cadhérine-cadhérine, qui permettent de maintenir les cellules associées au sein des sphéroïdes (Lin RZ et Chang HY., 2008). De plus, les cellules gardent leur intégrité, présentent des organites intracellulaires intacts et s'organisent en se juxtaposant les unes à côté des autres. Les sphéroïdes obtenus avec ces deux techniques présentent donc une organisation proche de celle des tumeurs avec des cellules viables qui interagissent entre elles. Cependant nos observations mettent aussi en évidence une plus grande irrégularité des membranes plasmiques et nucléaires des cellules dans les sphéroïdes obtenus par la technique « Hanging drop » en comparaison avec celles obtenues par la technique « liquid overlay ». Ceci pourrait influencer la viabilité des cellules et donc leur réaction face aux traitements par des anticancéreux. Pour cette raison, seule la technique « liquid overlay » a été retenue pour la suite des expériences. L'analyse de la structure conformationnelle des sphéroïdes obtenus par la technique « liquid overlay » a ensuite été effectuée à l'aide de la microscopie électronique à balayage. Cette analyse a permis de mettre en évidence que la conformation des sphéroïdes est bien tridimensionnelle, et l'analyse de leur surface montre clairement la présence de liaisons intercellulaires entre les cellules. Ces résultats confirment ceux obtenus par microscopie électronique par transmission, témoignant de l'intégrité des cellules au sein des sphéroïdes.

Ce modèle de culture cellulaire en 3D présente de nombreux avantages car il permettrait de s'approcher plus fidèlement du comportement des cellules tumorales dans leur environnement originel. Avec ce modèle, il serait notamment possible de suivre par microscopie à fluorescence le degré et la cinétique de pénétration de l'Olaparib ou d'autres anti-PARP à l'intérieur des sphéroïdes, et de les comparer au niveau d'expression des

protéines MDR, par immunohistochimie. Dans cette optique, notre équipe développe actuellement des méthodologies de marquages des anti-PARP à l'aide de fluorochromes. Cette démarche permettrait d'étudier le degré d'efficacité de pénétration du médicament dans les cellules cibles, notamment en fonction de la position des cellules, au sein du sphéroïde. Par ailleurs, ce modèle est aussi adapté à l'étude de l'effet des irradiations. En effet, l'action de celles-ci est dépendante de l'épaisseur et de la nature de la matière qu'elles traversent ainsi que du métabolisme des cellules touchées (Dubessy C *et al.*, 2000 ; Weiswald LB *et al.*, 2015). Or, chez les sphéroïdes, l'agencement tridimensionnel des cellules, ainsi que les différences de métabolismes rencontrés selon la position des cellules dans ces sphéroïdes, les rendent plus adaptés à l'étude des effets des radiations que les cultures 2D. De fait, dans les cultures en 2D, la conformation en monocouche des cellules leur confère la même accessibilité aux radiations et toutes les cellules présentent le même métabolisme (Dubessy C *et al.*, 2000 ; Weiswald LB *et al.*, 2015). Il serait alors possible d'effectuer des expériences de co-administration (drogues/irradiation) dans des conditions plus proches de celles retrouvées chez des tumeurs que lors de nos expériences précédemment effectuées sur des cultures en 2D. Différentes doses d'irradiation et de drogues pourront être alors testées afin de pouvoir optimiser l'utilisation de celles-ci, à terme, chez les patientes.

L'ensemble de ces travaux précliniques rentre dans le cadre des démarches stratégiques permettant d'optimiser le traitement des tumeurs de phénotype BLTN de mauvais pronostic.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2013 De
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-042725.pdf> Consulté le 09 mai 2015

American Cancer Society. Breast Cancer. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2014 De
<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>

Annunziata CM et Bates SE. PARP inhibitors in BRCA1/BRCA2 germline mutation carriers with ovarian and breast cancer. F1000 Biol Rep. 2010 Feb 11;2

Anreddy N, Gupta P, Kathawala RJ, Patel A, Wurpel JN, Chen ZS. Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance. Molecules. 2014 Sep 4;19(9):13848-77

Baillet F, Genestie C, Auclerc G, Blondon J, Votadoro A. Cancérologie De
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/cancero/POLY.Chp.11.html> Consulté le 09 mai 2015

Bamdad M, Reader S, Grolière CA, Bohatier J, Denizeau F. Uptake and efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a resistance mechanism. Cytometry. 1997 Jun 1;28(2):170-5

Bamdad M, Brousseau P, Denizeau F. Identification of a multidrug resistance-like system in *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates. FEBS Lett. 1999 Aug 13;456(3):389-93

Bamdad M, Volle D, Dastugue B, Meiniel A. Alpha1beta1-integrin is an essential signal for neurite outgrowth induced by thrombospondin type 1 repeats of SCO-spondin. Cell Tissue Res. 2004 Jan;315(1):15-25

Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. Adv Drug Deliv Rev. 2014 Dec 15;79-80:3-18

Bertos NR et Park M. Breast cancer - one term, many entities?. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):3789-96

Bingle L, Lewis CE, Corke KP, Reed MW, Brown NJ. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br J Cancer*. 2006 Jan 16;94(1):101-7.

Bottova I, Hehl AB, Stefanić S, Fabriàs G, Casas J, Schraner E, Pieters J, Sonda S. Host cell P-glycoprotein is essential for cholesterol uptake and replication of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26;284(26):17438-48

Bouwman P, Jonkers J. Molecular pathways: how can BRCA-mutated tumors become resistant to PARP inhibitors?. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 1;20(3):540-7

Boyle P et Levin B. World Cancer Report 2008. De : <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php> Consulté le 06 mai 2015

Brady-West DC, McGrowder DA. Triple negative breast cancer: therapeutic and prognostic implications. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011 12(8): 2139-43

Carey LA. Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:71-8

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. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 20;101(10):736-50

Chekhun VF, Zhylchuk VE, Lukyanova NY, Vorontsova AL, Kudryavets YI. Expression of drug resistance proteins in triple-receptor-negative tumors as the basis of individualized therapy of the breast cancer patients. *Exp Oncol*. 2009 Jun;31(2):123-4

Chwalek K, Bray LJ, Werner C. Tissue-engineered 3D tumor angiogenesis models: potential technologies for anti-cancer drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Dec 15;79-80:30-9

clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Olaparib&no_unk=Y consulté le 8 décembre 2015

Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, Guillemin F. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Nov-Dec;36(2-3):179-92.

Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Nov-Dec;36(2-3):193-207

Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, Guillemin F. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Nov-Dec;36(2-3):179-92.

Dudler R et Sidler M. Arabidopsis MDR genes: molecular cloning and protein chemical aspects. *Methods Enzymol*. 1998;292:162-73

Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem*. 2005 Mar;51(3):494-503

Durand RE, Sutherland RM. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp Cell Res*. 1972 Mar;71(1):75-80

Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012 Oct;38(6):698-707

European Medicines Agency (EMA). 2014. De http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003726/human_med_001831.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 consulté le 8 décembre 2015

Fang B. Development of synthetic lethality anticancer therapeutics. *J Med Chem*. 2014 Oct 9;57(19):7859-73

Feeley LP, Mulligan AM, Pinnaduwege D, Bull SB, Andrulis IL. Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Mod Pathol.* 2014 Apr;27(4):554-61

Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1997 Jun 15;57(12):2388-93

Geisler M, Blakeslee J.J, Bouchard R, Lee O.R, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer W.A, Bailly A, Richards E.L, Ejendal K.F, Smith A.P, Baroux C, Grossniklaus U, Müller A, Hrycyna C.A, Dudler R, Murphy A.S and Martinoia E. Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* 2005 Oct;44(2):179-94

Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature.* 1986 Dec 4-10;324(6096):485-9

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv.* 2004 Jan;1(1):27-42

Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel).* 2011;6(2):136-141

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011 Aug;22(8):1736-47

Guinebretière JM, Menet E, Tardivon A, Cherel P, Vanel D. Normal and pathological breast, the histological basis. *Eur J Radiol.* 2005 Apr;54(1):6-14

Harold Ellis. *Anatomy of the breast.* Surgery (Oxford). 2007 jun;25(6): 251–253

Herschkowicz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007;8(5):R76

Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology.* 2010 Jul 1;148(1):3-15

Hoffmann TK, Schirlau K, Sonkoly E, Brandau S, Lang S, Pivarcsi A, Balz V, Müller A, Homey B, Boelke E, Reichert T, Friebe-Hoffmann U, Greve J, Schuler P, Scheckenbach K, Schipper J, Bas M, Whiteside TL, Bier H. A novel mechanism for anti-EGFR antibody action involves chemokine-mediated leukocyte infiltration. *Int J Cancer.* 2009 Jun 1;124(11):2589-96.

Hollenstein K, Dawson RJP, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2007 Aug;17(4):412-8

Ismail-Khan R et Bui MM. A review of triple-negative breast cancer. *Cancer Control.* 2010 Jul;17(3):173-6

Jesinger RA. Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol.* 2014 Mar;17(1):3-9

Jones P.M, O'Mara M.L and George A.M. ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends Biochem Sci.* 2009 Oct;34(10):520-31

Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR Jr, Chen ZS. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat.* 2015 Jan;18:1-17

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3271-7

Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, Sanchez H, Jimenez C, Stewart K, Chew K, Ljung BM, Tlsty TD. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 2010 May 5;102(9):627-37

Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2005 Oct;15(5):365-77.

Konur A, Kreutz M, Knüchel R, Krause SW, Andreesen R. Cytokine repertoire during maturation of monocytes to macrophages within spheroids of malignant and non-malignant urothelial cell lines. *Int J Cancer*. 1998 Nov 23;78(5):648-53.

Krogstad DJ, Gluzman IY, Herwaldt BL, Schlesinger PH, Wellems TE. Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol*. 1992 Jan 9;43(1):57-62

Kunz-Schughart LA, Heyder P, Schroeder J, Knuechel R. A heterologous 3D co-culture model of breast tumour cells and fibroblasts to study tumour-associated fibroblast differentiation. *Exp Cell Res*. 2001 266:74–86.

Kurelec B, Krca S, Pivcevic B, Ugarković D, Bachmann M, Imsiecke G, Müller WE. Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis*. 1992 Jan;13(1):69-76

Lama R, Zhang L, Naim JM, Williams J, Zhou A, Su B. Development, validation and pilot screening of an in vitro multi-cellular three-dimensional cancer spheroid assay for anti-cancer drug testing. *Bioorg Med Chem*. 2013 Feb 15;21(4):922-31.

Lawlor D, Martin P, Busschots S, Thery J, O'Leary JJ, Hennessy BT, Stordal B. PARP Inhibitors as P-glycoprotein Substrates. *J Pharm Sci*. 2014 Jun;103(6):1913-20

Lee JM, Ledermann JA, Kohn EC. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann Oncol*. 2014 Jan;25(1):32-40

Lehmann BD, Pietschmann JA, Tan AR. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015;35:e31-9

Leidy J, Khan A, Kandil D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Jan;138(1):37-43

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 May 1;204(3):216-37

Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 2008 Oct;3(9-10):1172-84

Loncar J, Popović M, Zaja R, Smital T. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2010 Mar;151(2):209-15

Luck AA, Evans AJ, Green AR, Rakha EA, Paish C, Ellis IO. The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008 Feb;20(1):40-5

McManaman JL et Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Apr 29;55(5):629-41

Menear KA, Adcock C, Boulter R, Cockcroft XL, Copsey L, Cranston A, Dillon KJ, Drzewiecki J, Garman S, Gomez S, Javaid H, Kerrigan F, Knights C, Lau A, Loh VM Jr, Matthews IT, Moore S, O'Connor MJ, Smith GC, Martin NM. 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Med Chem*. 2008 Oct 23;51(20):6581-91

Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal*. 2011 Aug;5(3):239-48.

Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, Lenobel R, Bartkova J, Lau A, O'Connor MJ, Lukas J, Bartek J. Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle*. 2012 Oct 15;11(20):3837-50

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68

Prat A et Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5(1):5–23.

Raaijmakers MH. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutic targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007 Oct;21(10):2094-102

Rastelli F et Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori*. 2008 May-Jun;94(3):370-83

Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Kotliansky VE, Bissell MJ. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumour environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995;95:859–73.

Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM,

Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 4;105(44):17079-84

Rutqvist LE, Rose C, Cavallin-Ståhl E. A Systematic Overview of Radiation Therapy Effects in Breast Cancer. *Acta Oncol*. 2003 42(5-6): 532-45

Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG2 transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev*. 2006 Oct;86(4):1179-236

Seeger MA et van Veen HW. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1794(5):725-37

Senra JM, Telfer BA, Cherry KE, McCrudden CM, Hirst DG, O'Connor MJ, Wedge SR, Stratford IJ. Inhibition of PARP-1 by olaparib (AZD2281) increases the radiosensitivity of a lung tumor xenograft. *Mol Cancer Ther*. 2011 10(10): 1949-58

Shi WB, Le VM, Gu CH, Zheng YH, Lang MD, Lu YH, Liu JW. Overcoming multidrug resistance in 2D and 3D culture models by controlled drug chitosan-graft poly(caprolactone)-based nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2014 Apr;103(4):1064-74.

Song HH, Park KM, Gerecht S. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Dec 15;79-80:19-29.

Sørlie 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, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8

Staaf J, Ringnér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Bendahl PO, Holm K, Arason A, Gunnarsson H, Hegardt C, Agnarsson BA, Luts L, Grabau D, Fernö M, Malmström PO, Johannsson OT, Loman N, Barkardottir RB, Borg A. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2--positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1813-20

Stines J et Tristant H. The normal breast and its variations in mammography. *Eur J Radiol*. 2005 Apr;54(1):26-36

Sung P, Krejci L, Van Komen S, Sehorn MG. Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem*. 2003 Oct 31;278(44):42729-32

Tavassoli FA et Devilee P. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, IARC Press. 2003

Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011 Feb 7;136(3):473-8.

Université Médicale Virtuelle Francophone, Anatomie de la glande mammaire. De : <http://campus.cerimes.fr/maieutique/UE-obstetrique/glandemammaire/site/html/cours.pdf>
Consulté le 8 mai 2015

Vaché C, Camares O, Cardoso-Ferreira MC, Dastugue B, Creveaux I, Vaury C, Bamdad M. A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Chem*. 2007 Jul;26(7):1418-24

Valton E, Amblard C, Wawrzyniak I, Penault-Llorca F, Bamdad M. P-gp expression in brown trout erythrocytes: evidence of a detoxification mechanism in fish erythrocytes. *Sci Rep*. 2013 Dec 5;3:3422

Valton E, Amblard C, Desmolles F, Combourieu B, Penault-Llorca F, Bamdad M. Mini-P-gp and P-gp Co-Expression in Brown Trout Erythrocytes: A Prospective Blood Biomarker of Aquatic Pollution. *Diagnostics*. 2015 Jan 12(5);10:26

Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*. 2015 Jan;17(1):1-15

World Health Organization, International Agency for Research on Cancer Latest world cancer statistics: Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. De : www.iarc.fr/en/mediacentre/pr/2013/pdfs/pr223E.pdf
Consulté le 06 mai 2015

World Health Organization. Histological typing of breast tumors : Second edition. *Ann Pathol*. 1982;2(2):91-105

Weigelt B, Mackay A, A'hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2010 Apr;11(4):339-49

Yadav BS, Sharma SC, Chanana P, Jhamb S. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014 5(2): 125-33

Yang Luo, Chaoming Wang, Mainul Hossain, Yong Qiao, Liyuan Ma, Jincui An and Ming Su. Three-Dimensional Microtissue Assay for High-Throughput Cytotoxicity of Nanoparticles. *Anal Chem*. 2012 Aug 7;84(15):6731-8.

Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, Gaudet M, Schmidt MK, Broeks A, Cox A, Fasching PA, Hein R, Spurdle AB, Blows F, Driver K, Flesch-Janys D, Heinz J, Sinn P, Vrieling A, Heikkinen T, Aittomäki K, Heikkilä P, Blomqvist C, Lissowska J, Peplonska B, Chanock S, Figueroa J, Brinton L, Hall P, Czene K, Humphreys K, Darabi H, Liu J, Van 't Veer LJ, van Leeuwen FE, Andrulis IL, Glendon G, Knight JA, Mulligan AM, O'Malley FP, Weerasooriya N, John EM, Beckmann MW, Hartmann A, Weihbrecht SB, Wachter DL, Jud SM, Loehberg CR, Baglietto L, English DR, Giles GG, McLean CA, Severi G, Lambrechts D, Vandrope T, Weltens C, Paridaens R, Smeets A, Neven P, Wildiers H, Wang X, Olson JE, Cafourek V, Fredericksen Z, Kosel M,

Vachon C, Cramp HE, Connley D, Cross SS, Balasubramanian SP, Reed MW, Dörk T, Bremer M, Meyer A, Karstens JH, Ay A, Park-Simon TW, Hillemanns P, Arias Pérez JI, Menéndez Rodríguez P, Zamora P, Benítez J, Ko YD, Fischer HP, Hamann U, Pesch B, Brüning T, Justenhoven C, Brauch H, Eccles DM, Tapper WJ, Gerty SM, Sawyer EJ, Tomlinson IP, Jones A, Kerin M, Miller N, McInerney N, Anton-Culver H, Ziogas A, Shen CY, Hsiung CN, Wu PE, Yang SL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Haiman CA, Henderson BE, Le Marchand L, Kolonel LN, Lindblom A, Margolin S, Jakubowska A, Lubiński J, Huzarski T, Byrski T, Górski B, Gronwald J, Hooning MJ, Hollestelle A, van den Ouweland AM, Jager A, Kriege M, Tilanus-Linthorst MM, Collée M, Wang-Gohrke S, Pylkäs K, Jukkola-Vuorinen A, Mononen K, Grip M, Hirvikoski P, Winqvist R, Mannermaa A, Kosma VM, Kauppinen J, Kataja V, Auvinen P, Soini Y, Sironen R, Bojesen SE, Ørsted DD, Kaur-Knudsen D, Flyger H, Nordestgaard BG, Holland H, Chenevix-Trench G, Manoukian S, Barile M, Radice P, Hankinson SE, Hunter DJ, Tamimi R, Sangrajrang S, Brennan P, McKay J, Odefrey F, Gaborieau V, Devilee P, Huijts PE, Tollenaar RA, Seynaeve C, Dite GS, Apicella C, Hopper JL, Hammet F, Tsimiklis H, Smith LD, Southey MC, Humphreys MK, Easton D, Pharoah P, Sherman ME, Garcia-Closas M. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Feb 2;103(3):250-63

Zaja R, Klobucar RS, Smital T. Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquat Toxicol.* 2007 Mar 30;81(4):365-76

Résumé

Le cancer du sein de phénotype « Basal-like » triple négatif (BLTN) est particulièrement agressif et de mauvais pronostic. Il est insensible aux traitements hormonaux laissant pour seule stratégie de traitement la chimiothérapie conventionnelle. De ce fait, de nouvelles thérapies ciblées sont en développement, tels que les inhibiteurs de la Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP). Dans ce contexte, nos travaux de recherche ont été orientés sur l'optimisation du traitement des cancers du sein BLTN en modélisant l'action d'un anti-PARP modèle, l'Olaparib sur la lignée SUM1315 de phénotype BLTN. Dans un premier temps, l'étude de la coexpression de la BCRP et de la P-gp, deux protéines « Multidrug Resistance » (MDR) majeures en présence de 50 μM d'Olaparib® a montré une induction de leurs expressions chez les cellules SUM1315, avec une réponse de type relais. La BCRP établirait une première ligne de défense cellulaire et son action serait ensuite relayée par la P-gp durant 24h de traitement. Ce mécanisme est en corrélation avec la concentration intracellulaire d'Olaparib mesurée par HPLC. L'ensemble de nos résultats suggère qu'il serait possible de contourner le mécanisme de résistance induit par les protéines MDR si une concentration stable en Olaparib est maintenue dans les cellules à long terme. Nous avons ensuite étudié la potentialisation de l'action de l'Olaparib en le combinant avec un traitement par radiothérapie à basse et haute énergie, sur la viabilité des cellules de la lignée SUM1315. La comparaison des résultats avec un traitement Olaparib seul ou irradiation seule et ceux des traitements combinés Olaparib/radiothérapie a alors mis en évidence un effet synergique des deux traitements sur la viabilité cellulaire. L'effet synergique de cette combinaison fonctionne même avec de faibles doses d'Olaparib. De cette manière, il serait possible de réduire les doses d'anti-PARP utilisées tout en gardant les bénéfices du traitement. Enfin, nous avons développé deux techniques de cultures cellulaires en trois dimensions (i) « hanging drop » et (ii) « liquid overlay », permettant de mimer plus fidèlement les conditions des tumeurs *in vivo*. L'observation en microscopie électronique à transmission et à balayage des sphéroïdes obtenus par ces deux techniques a permis de démontrer l'intégrité des cellules au sein des sphéroïdes ainsi que la formation de jonctions cellulaires. Cependant, les sphéroïdes obtenus en « liquid overlay » ont montré une meilleure intégrité ultra-structurale.

Mots clés : cancer du sein Basal-like triple négatif, P-gp, BCRP, anti-PARP, dosage intracellulaire d'Olaparib®, radiothérapie à basse et haute énergie, culture 3D

Abstract

« Triple Negative Basal-Like » (BLTN) breast cancer is particularly aggressive and of poor prognosis. It is insensitive to hormone-targeted therapies leaving conventional chemotherapy as the only treatment strategy. Therefore, new promising targeted therapies are being developed, such as Poly-ADP-Ribose-Polymerase inhibitors (anti-PARPs). In this context, our research has been directed towards optimizing the treatment of BLTN breast cancer by modelling the action of an anti-PARP model, Olaparib®, on BLTN cell line SUM1315. Firstly, the study of the co-expression of BCRP and P-gp, two major "Multidrug Resistance" proteins (MDR) in the presence of 50 μM Olaparib® showed an induction of their expression in SUM1315 cells, with a relay-type response. BCRP would establish a first line of cellular defense and its action would then be taken over by P-gp, for 24h of treatment. This mechanism is correlated with the intracellular concentration of Olaparib® measured by HPLC. All of our results suggest that it would be possible to circumvent the induced MDR resistance mechanism if a stable concentration of Olaparib® is maintained in cells in the long term. Secondly, we studied the potentiation of the action of Olaparib® on the viability of SUM1315 cells by combining it with low and high-energy radiations. Comparison of the results with single Olaparib®, single irradiation, or the combination of Olaparib®/radiotherapy then demonstrated a synergistic effect of the two treatments on cell viability when delivered concomitantly. The synergistic effect of this combination works even with low doses of Olaparib®. In this way, it would be possible to reduce the anti-PARP doses while maintaining the benefits of this treatment. Finally, we have developed two techniques of cell culture in three dimensions: (i) "hanging drop" and (ii) "liquid overlay", in order to mimic more accurately the conditions of tumours *in vivo*. Observations of spheroids obtained by these two techniques by transmission and scanning electron microscopy demonstrated the integrity of cells within spheroids as well as the formation of cell junctions. However, the spheroids obtained by "liquid overlay" showed better ultra-structural integrity.

Keywords: « Triple Negative Basal-Like » breast cancer, P-gp, BCRP, anti-PARP, Olaparib® intracellular level, low and high energy radiations, 3D cell culture