



HAL
open science

Induction de la voie IFN/STAT1 dans le cancer du sein sous chimiothérapie : étude mécanistique

Julie Gaston

► **To cite this version:**

Julie Gaston. Induction de la voie IFN/STAT1 dans le cancer du sein sous chimiothérapie : étude mécanistique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB041 . tel-01731357

HAL Id: tel-01731357

<https://theses.hal.science/tel-01731357>

Submitted on 14 Mar 2018

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Biologie cellulaire

Induction de la voie IFN/STAT1 dans le cancer du sein sous chimiothérapie. *Etude mécanistique.*

Présentée par

Julie GASTON

Thèse CIFRE dirigée par le Dr Vincent Goffin
Soutenue le 5 Juillet 2016

Devant le jury composé de :

Madame le Professeur Emmanuelle Charafe-Jauffret
Monsieur le Docteur Hichem Mertani
Madame le Docteur Sandra Pellegrini
Monsieur le Docteur Thierry Dubois
Monsieur le Docteur Vincent Goffin
Monsieur le Docteur Stefano Cairo

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Tuteur de thèse

Résumé

Induction de la voie IFN/STAT1 dans le cancer du sein sous chimiothérapie. Etude mécanistique.

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Malgré la chimiothérapie, certaines patientes ont une réponse incomplète et récidivent quelques années plus tard. Le but de ce travail était d'étudier les mécanismes moléculaires mis en place par les cellules tumorales en réponse aux traitements et leur rôle éventuel dans la récurrence. La modélisation de ces événements a d'abord été réalisée grâce à des modèles expérimentaux appelés PDX (pour *patient derived xenograft*) impliquant la greffe de tumeurs de patientes chez la souris immunodéficiente. Une analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence, au sein des PDX qui répondent à la chimiothérapie, la surexpression précoce de gènes cibles de la voie interféron (IFN)/STAT1, suggérant que cette signature moléculaire pourrait être utilisée comme biomarqueur prédictif de la réponse initiale au traitement. Cette signature persiste néanmoins dans les cellules tumorales résiduelles, suggérant qu'elle pourrait également avoir un rôle dans la récurrence observée pour l'ensemble des PDX étudiées. L'analyse fonctionnelle de cette signature IFN/STAT1 a été réalisée *in vitro*, en traitant diverses lignées de cancer du sein par du mafosfamide, principe actif d'une chimiothérapie classique induisant des dommages à l'ADN. Nos résultats montrent que, sous chimiothérapie, certaines lignées (dont les cellules MCF7) sont capables d'exprimer des IFNs de type I conduisant à l'activation autocrine/paracrine de la voie IFN/STAT1. Une étude mécanistique a mis en évidence l'implication du détecteur de l'ADN STING (*stimulator of IFN genes*) en amont de la production d'IFN, comme cela a été bien décrit dans des cellules immunitaires en présence de pathogènes. Nous avons montré que l'inhibition individuelle de l'expression de différents acteurs de la voie STING/IFN/STAT1 potentialise l'effet de la chimiothérapie, impliquant cette cascade dans la résistance au traitement. En résumé, notre travail suggère que l'activation de la voie STING/IFN/STAT1 dans les cellules tumorales mammaires traitées par chimiothérapie pourrait jouer un double rôle : biomarqueur de la réponse dans un premier temps, puis acteur de résistance dans un second temps. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives pronostiques et thérapeutiques pour la prise en charge du cancer du sein.

Mot clés : cancer du sein, PDX, chimiothérapie, récurrence, interféron, STING, STAT1

Abstract

Induction of the IFN/STAT1 pathway in breast cancer after chemotherapy. Mechanistic study.

Breast cancer is the most frequent cancer in women. Despite chemotherapy, tumor response is often incomplete, and relapse is frequently observed. The aim of this work was to analyze the molecular mechanisms triggered in breast cancer cells in response to chemotherapy. These events were modeled using breast cancer patient-derived xenografts (PDXs), i.e. samples of human tumors engrafted into immunodeficient mice. Transcriptomic analysis highlighted precocious induction of the interferon (IFN)/STAT1 pathway in response to chemotherapy only in tumors responding to treatment, suggesting that this molecular signature could be used as a biomarker of the initial response. The activation of this pathway persisted in residual tumor cells, suggesting that it could also play a role in cancer recurrence observed in all PDX models that we investigated. Functional deciphering of the IFN/STAT1 pathway was performed *in vitro* by stimulating breast cancer cell lines with mafosfamide, the active principle of a classical chemotherapy inducing DNA damage. In some cell lines, e.g. MCF-7 cells, this treatment triggered the upregulation of type I IFN expression leading to cell-autonomous activation of the IFN/STAT1 signaling pathway. A mechanistic study revealed the involvement of the DNA sensor STING (*stimulator of IFN genes*) upstream of the IFN production, mimicking what happens in immune cells facing pathogen infection. Individual silencing of various actors of the STING/IFN/STAT1 pathway potentiated genotoxic treatment efficacy, indicating that this cascade may be involved in tumor resistance to treatment. In summary, our study suggests that cell-intrinsic activation of STING/IFN/STAT1 pathway in response to chemotherapy could play a dual role: first, it may be used as a predictive biomarker of initial response; second, it may act as a resistance mechanism to treatment. This work opens new prognostic and therapeutic perspectives for the clinical management of breast cancer.

Keywords: breast cancer, PDX, chemotherapy, recurrence, interferon, STING, STAT1

Remerciements

Au terme de ce travail de thèse, je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux membres de mon jury. Je remercie Madame le Professeur Emmanuelle Charafe-Jauffret et Monsieur le Docteur Hichem Mertani d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mon manuscrit. Je remercie également Madame le Docteur Sandra Pellegrini et Monsieur le Docteur Thierry Dubois, mes examinateurs, qui je l'espère, prendront plaisir à lire ce travail.

Je tiens vraiment à remercier toutes les personnes qui ont participé à ce projet de thèse que j'ai toujours voulu réaliser après mes études d'ingénieur.

Je voudrais remercier tout particulièrement Vincent Goffin, mon directeur de thèse. Grâce à vous, j'ai découvert le monde académique et ses chercheurs passionnés. Vous m'avez donné le réel sentiment d'appartenir à une équipe et nos échanges m'ont toujours énormément apporté sur le domaine scientifique mais aussi personnel. Toujours à l'écoute, vous avez pris le temps de m'expliquer, de discuter pour avancer ensemble, et j'ai beaucoup apprécié cela. Je vous remercie également pour toute la confiance que vous m'avez accordée.

Je remercie XenTech, Jean-Gabriel Judde et Pascal Leuraud pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse en collaboration avec le laboratoire de Vincent Goffin. Ces quatre années à Xentech m'ont permis de découvrir différentes phases que peut vivre une entreprise. Je remercie Stefano Cairo pour m'avoir encadrée à XenTech. Tu m'as permis de développer un esprit critique sur l'analyse des résultats et tu as aussi contribué à forger ma personnalité. Merci aussi à Olivier Deas pour ces nombreux conseils scientifiques. Je tiens aussi à remercier Marie-France Poupon qui m'a toujours donné des conseils scientifiques judicieux et pertinents tout au long de ma thèse et qui m'a fait de précieuses remarques dans la relecture de ce manuscrit.

Aux « Xentech-iens » :

Vanessa, merci pour tous ces fous rires au labo, pour ton soutien moral aussi, lorsque je me suis rendu-compte que « le monde des bisounours » n'existait pas. Vivement les prochains afterworks ! Combien de paille dans le prochain mojito ? Et ne t'inquiète pas, ta « fashion coach » continue de surveiller ton style ! Et celui de mon futur filleul !! ;)

Laura, je te décerne le titre de la meilleure stagiaire. Merci pour l'implication que tu as donnée dans ton travail, en espérant que les Western Blot ne te jouent plus de mauvais tours !! ;)

Sophie, Bénédicte et Enora, petite équipe de R&D mais solide, j'espère que nous continuerons à former une belle équipe !

Léa et Delphine, j'ai beaucoup apprécié le trio de choc que nous avons formé lors des congrès. Léa, j'espère que tu viendras me montrer des recettes thermomix à la maison!

Myriam et Delphine, merci pour vos conseils et votre implication pour mes études *in vivo*.

Marianna et Valeria, vous ne voudriez pas rester à XenTech plus longtemps ? J'adore ce nouveau bureau !

Merci à « mon bureau des plaintes » (Josi, Léa et Vanessa) qui se transforme toujours en « bureau des rires » !!!

Enfin, je remercie tous les autres Xentech-iens pour votre bonne humeur. Qui d'entre nous gagnera l'Euro ?

Aux EX- Xentech-iens :

Marie-Emmanuelle, ton départ a vraiment laissé un vide. Tu as été une excellente maitre de stage et tu as su me transmettre ta passion. Tu es un exemple pour moi. Merci pour ton soutien, ta rigueur scientifique, ta patience. Grâce à toi, je n'ai que des compliments sur mes western blot ! ;)

Arnaud, mon souvenir le plus fort est la qPCR et ces plaques 384 puits... traumatisée à jamais... merci !!! Et pour finir : MIAOUUUUU !!!!

Evgeniya, ton calme à toute épreuve est impressionnant. J'espère que l'on aura l'occasion d'aller danser les sévillanes ensemble très vite!

Gaël, je crois que c'est grâce à toi que mon CV est apparu dans les bureaux de Xentech donc un GRAND merci !!

Ludovic, merci pour ta bonne humeur, j'espère que l'on redansera le rock à la Nouvelle-Orléans ou ailleurs !

A la pépinière :

Merci à Nathalie, pour ta bonne humeur et nos midis potin en compagnie de Pauline, Maud, Céline, Fabien, Estelle (Pipiche), Carole, Didier, Marie-Noëlle, Erwan.

Pauline, quelle chance tu as eu de pouvoir faire le tour du monde, nos discussions dans le rer me manquent !

A l'équipe de Vincent :

Lucila, merci de m'avoir accueillie dans ton bureau calme pour écrire ma thèse. Merci aussi pour tes nombreux conseils en statistiques et pour le temps passé devant le microscope avec moi. J'espère pouvoir remanger des spécialités argentines très vite ! Et la danse du labo ? Tu t'en souviens ?

Natascha, tu as toujours une énergie débordante qui fait envie ! Garde cette motivation, elle te fera décrocher la lune ou du calcium! ;) Petit bisous à Vitali !

Marie, ton départ à laisser une place vide ! La phrase de fin de journée qui me restera toujours en tête est « je me sens vidée de ma vie » !!

Jacques-Emmanuel, merci pour tes conseils lors des lab meetings et en dehors, tu as toujours de très bonnes idées !

Thierry, LE râleur mais t'es cool en fait ! Bon courage pour la gestion de la culture cellulaire !! ahah

Nicolas (le moins jeune), quand est-ce que l'on danse un mambo N°5 ?

Nicolas (le plus jeune), merci pour tes connaissances cliniques sur les chimiothérapies.

Florence, merci de ton aide au labo ; Mylène, Guilia et Eléonore bon courage pour les nouvelles !

Victoria Beckham, Sandra Bullock, Selena Gomez, Anne Hathaway, Julia Roberts, Shakira, Marion Cotillard, Jennifer Anniston, Mathilde Seigner, **Kate Moss** vous embrasse !! ;)

A l'INEM :

Participer aux séminaires de l'INEM deux fois par semaine a aussi été très riche en connaissances. L'énergie et les idées dégagées lors de ces réunions m'ont toujours énormément surprises et données de l'élan pour mon projet. Merci à tous.

L'équipe Edelman

Mélanie (encore désolée d'avoir pourri ton blot) et Myriam, de belles rencontres récentes mais indispensables pour finir ma thèse dans la bonne humeur ! A quand le prochain lavomatic ? et Vivement Amsterdam et Céiiiiiiiiine !!!! ☺

Aux nouveaux docteurs :

Yassmina, merci pour tous les fous rires que nous avons eu et le soutien lors des mauvais jours. La prochaine fois 5 mojitos ? ;)

Aurélien, le mec qui a un diplôme de vétérinaire, un MBA et un PhD, normal quoi.... Fais gaffe je commence à m'habituer à tes « JULIE PRESIDENTE » !! ;) Merci pour tes corrections !!

Enfin, je remercie mes futurs témoins Julie, Gwen, Coco, Hélène : mes confidentes, celles avec qui j'ai passé les meilleurs moments de ma vie, celles qui connaissent mes nombreuses qualités et supportent mes « quelques » défauts (ahah) et qui sans nul doute continueront à être à mes côtés FOR EVER ! ☺

Je remercie tous mes amis, Mili, Mymy, Manon, Marion, Elsa, Aurore, Cécile, Gigi, Toto et tous les autres qui m'ont soutenue durant ces 4 longues années ainsi que pour tous les moments de joies, de rires que nous avons eu ensemble.

Un grand merci à ma famille, mes super cousines, Nanou et Lolo, qui me conseillent et chez qui j'ai toujours pu me réfugier, ma filleule que j'adore. A ma tatie, mes grands-parents, mon frère et mes parents (les meilleurs) un immense merci pour leur aide, et leurs encouragements. Votre soutien, dans tout ce que j'entreprends, m'a toujours aidé à réussir.

Et pour finir, un immense merci à mon fiancé, celui qui est toujours là pour moi, qui m'a soutenue et me soutient encore les jours de faiblesses, m'encouragent et me poussent à aller toujours de l'avant. Merci de me redonner confiance en moi lorsque je la perds, de m'aimer même quand je râle et d'avoir supporté ces quelques mois où je n'ai absolument pas touché à l'aspirateur et où parfois le son de la télé était interdit pour que je puisse me concentrer... Tu me rends chaque jour plus forte !
Merci mon Maxou !

Abréviations

5-FU	5-Fluorouracile
A/C	Adriamycine/cyclophosphamide
AGT	Alkylguanine alkyltransférase
AIM-2	Absent in melanoma-2
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ALR	AIM2-like réceptors
APC	Cellules présentatrices d'antigène
AR	Androgen receptor
ARNm	ARN messenger
ARTD	ADP-ribosyl transferase diphtheria-toxin-like
ATG	Autophagy protein
ATRIP	ATR Interacting protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B-cell receptor
BER	Base excision repair (Réparation par excision de bases)
BRCA1	Breast cancer 1
BST2	Bone marrow stromal antigen 2
CAR	Chimeric antigen receptors
CBD	c-di-GMP binding domain
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
Cdk	Kinase cycline dépendante
CDN	Dinuléotides cyclique
cGAS	Cyclic AMP-GMP synthase
Chk1	Checkpoint kinase 1, Chek1
Chk2	Checkpoint kinase 2, Chek2
CK	Cytokératine
CLDN	Claudines
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DEFA	α -defensin
DD :	Death domain
DISC	Death Inducing Signalling complex
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Déoxyribonucléosides triphosphates
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 60
EGF	Facteur de croissance de l'épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'épidermique

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER+	Récepteur aux œstrogènes positifs
ER α	Récepteur aux œstrogènes alpha
ERIS	Endoplasmic reticulum interferon stimulator
FAC	5-FU, adriamycine, cyclophosphamide
FEC	5-FU, épirubicine, cyclophosphamide
FFPE	Formalin-fixed and paraffin-embedded
GAS	Gamma-activated sequences
GEMM	Genetically engineered mouse models
HSV	Herpès simplex virus
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IFI16	Interferon, Gamma-Inducible Protein 16
IFIT	IFN-induced protein with tetratricopeptide
IFITM	IFN-inducible transmembrane
IFN	Interféron
IFN α	IFN alpha
IFN β	IFN beta
IHC	Immunohistochimie
IL	Interleukine
INCa	Institut national du Cancer
IRDS	IFN-related DNA-damage resistance
IRF	Interferon regulatory factor
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISG	Interferon stimulated genes
ISGF3	Interferon stimulated gene factor 3
ISRE	IFN-stimulated response element
IM	Immunomodulateur
JAK	Janus kinase A
LB	Lymphocyte B
LOE	Levels of Evidence
M	Mésenchymateux
M1	Macrophages de type I
M2	Macrophages de type II
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
miRNA	micro-RNA
MITA	Mediator of IRF3 activation
MPYS	Plasma membrane tetra-spanner
MRP	MITA-related protein
MRN	Mre11, Rad51, Nbs1
MSL	Mesenchymal stem like
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MX1	MX dynamin like GTPase 1

NER	Nucleotide excision repair (Réparation par excision de nucléotides)
NET23	Nuclear envelope transmembrane protein 23
NFκB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
NLS	Signal de localisation nucléaire
OAS	Oligoadenylate synthetase
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PARP	Poly(ADP)ribosyl polymerase
pCR	réponse pathologique complète
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein -1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PDX	Patient-derived xenograft
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
pRb	Protéine du rétinoblastome
PRR	Pattern recognition receptor
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
qRT-PCR	Quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction
RAG	Recombination activating gene
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1
RLR	Rig like receptor
RS	Score de récurrence
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
siRNA	Small interfering RNA
SNPs	Single nucleotide polymorphism
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SSEA4	Stage-specific embryonic antigen-4
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STING	Stimulator of IFN genes
TBK1	TANK binding kinase 1
TCR	T-cell receptor
T/FAC	Paclitaxel, fluorouracile, adrimaycine, cyclophosphamide
TGF	Facteur de croissance de transformation
Th	Lymphocyte T helper
TLR	Toll-like receptor
TMA	Tissue macro-array
TMEM173	Protéine transmembranaire 173
TN	Triple négatif
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TREX1	Three prime repair exonuclease

TYK2	Tyrosine kinase 2
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18
U-STAT1	Homodimère de STAT1 non phosphorylé
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZBP1	Z-DNA binding protein
ZNFX1	Zinc finger Nuclear transcription Factor X box binding protein 1

Table des matières

INTRODUCTION.....	10
1. PREAMBULE.....	11
2. LA GLANDE MAMMAIRE	11
3. LE CANCER DU SEIN.....	12
3.1 LES DIFFERENTS TYPES DE CANCER DU SEIN	13
3.2 LES DIFFERENTES CLASSIFICATIONS DU CANCER DU SEIN	14
3.2.1 Classification selon le degré d'extension	14
3.2.2 Classification selon le grade	14
3.2.3 Classification selon le profil d'expression de récepteurs hormonaux et le statut HER2	15
3.2.4 Classification selon le profil d'expression multigénique	15
3.2.5 Nouvelle classification du sous-type triple négatif.....	17
3.3 THERAPEUTIQUE DES CANCERS DU SEIN	19
3.3.1 La chimiothérapie conventionnelle.....	19
3.3.2 Hormonothérapie et thérapies ciblées	22
3.3.3 L'immunothérapie	23
3.4 LES FACTEURS PRONOSTIQUES	24
3.5 LES MODELES DE PDX (PATIENT DERIVED XENOGRAFT).....	26
3.5.1 Historique des PDX	26
3.5.2 PDX versus xénogreffes cellulaires	26
3.5.3 Etablissement des PDX	29
3.5.4 Modélisation de la maladie cancéreuse par les PDX.....	30
3.5.5 Utilisation des PDX en thérapeutique clinique.....	31
3.5.6 Limitation	32
3.6 CHIMIOTHERAPIE : DOMMAGES DE L'ADN ET REPONSE THERAPEUTIQUE	33
3.6.1 Détection et signalisation des lésions de l'ADN.....	33
3.6.2 Arrêt du cycle cellulaire et réparation de l'ADN	36
3.6.3 Les différentes formes de mort cellulaire	39
3.6.4 Conclusion	41
4. LE SYSTEME IFN.....	42
4.1 LES ACTEURS MOLECULAIRES DE LA SIGNALISATION IFN	42
4.1.1 Les récepteurs de cytokines hématopoïétiques.....	43
4.1.2 Les kinases JAK et facteurs de transcription STAT	45
4.2 SIGNALISATION DES INTERFERONS : DES LIGANDS AUX ISG	49
4.2.1 Le système IFN de type I	49
4.2.2 Le système IFN type II	51
4.2.3 Induction des ISG par les IFN	52
4.3 LA VOIE STING, REGULATRICE DE LA PRODUCTION D'IFN	54
4.3.1 Origine des acides nucléiques cytosoliques	55
4.3.2 Activation de STING.....	55
4.4 IFN, SYSTEME IMMUNITAIRE ET REPONSE TUMORALE	59
4.4.1 Les IFN et la stimulation du système immunitaire.....	60
4.4.2 IFN et immunosuppression	62

4.4.3 Influence de l'IFN sur la tumeur et la réponse au traitement.....	63
CONTEXTE DE LA THESE ET OBJECTIFS	65
RESULTATS	67
<p>Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer. Legrier et al. Br J Cancer 114: 177-87 (2016).</p> <p>Intracellular STING inactivation sensitizes breast cancer cells to genotoxic agents. Gaston et al. soumis</p>	
DISCUSSION	73
1. LA SIGNATURE IFN/STAT1 COMME BIOMARQUEUR PREDICTIF DE REPONSE A LA CHIMIOTHERAPIE DANS LE CANCER DU SEIN	75
1.1 LES TESTS ACTUELS : ETAT DES LIEUX	75
1.2 INTERET POTENTIEL D'UN TEST BASE SUR LA SIGNATURE IFN	80
2. VERS L'IDENTIFICATION DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES POUR LIMITER LA RECIDIVE DU CANCER DU SEIN	84
2.1 LES MECANISMES DE RESISTANCE	84
2.2 CRIBLAGE FONCTIONNEL DE LA SIGNATURE IFN/STAT1	90
2.2.1 Etude de PARP12	91
2.2.2 Etude d'autres cibles de la voie IFN/STAT1.....	94
3. L'INFLAMMATION : LE ROLE DES CYTOKINES	96
3.1 LES DETECTEURS D'ADN CYTOSOLIQUES	97
3.2 LES DETECTEURS D'ARN CYTOSOLIQUES	101
3.3 EXPRESSION D'AUTRES CYTOKINES QUE LES IFN ET IL-8	102
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
BIBLIOGRAPHIE	108

INTRODUCTION

1. Préambule

La chimiothérapie est un outil thérapeutique majeur pour le traitement des cancers du sein agressifs, invasifs ou métastasés. Son efficacité est incontestée, conduisant à des réponses objectives importantes, ou complètes. Cependant, les récurrences post-chimiothérapie sont fréquentes dans les cinq années suivant l'arrêt du traitement. Elles témoignent de la résistance et de la survie de cellules tumorales résiduelles. Les mécanismes qui contrôlent les voies de résistance sont encore mal connus. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la survie des cellules résiduelles permettrait de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le département R&D de la société XenTech, une CRO (Contract Research Organization) spécialisée dans l'évaluation préclinique des médicaments en oncologie, a développé un axe de recherche visant à étudier les mécanismes de résistance mis en place après chimiothérapie dans les cancers du sein. Dans le cadre d'un financement CIFRE soutenu par cette entreprise et le ministère de la recherche et de la technologie (ANRT), j'ai eu l'opportunité de participer à ce projet durant ma thèse, en collaboration étroite avec le Laboratoire du Dr Vincent GOFFIN qui s'intéresse de longue date à la régulation hormonale du cancer du sein.

2. La glande mammaire

Le sein est essentiellement composé d'un compartiment adipeux, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, et d'un compartiment glandulaire constitué de canaux galactophores et de lobes, eux-mêmes ramifiées en de nombreux lobules ou alvéoles (Figure 1A). Les alvéoles sont tapissées d'un épithélium comprenant une à plusieurs couches de cellules épithéliales bordées par des cellules myoépithéliales (ou basales) (Figure 1B). Les vaisseaux lymphatiques sont connectés aux ganglions se situant à proximité du sein : au niveau des aisselles, au-dessus de la clavicule et au niveau du sternum.

Le rôle physiologique de la glande mammaire est de produire du lait. Ainsi, lors du cycle de gestation/lactation, la glande mammaire va subir de profondes modifications morphologiques résultant de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Ces phénomènes conduisant à la fonction sécrétoire ultime de la glande sont contrôlés par de nombreux facteurs systémiques et locaux, dont les œstrogènes, la progestérone et la prolactine (Briskin and O'Malley, 2010).

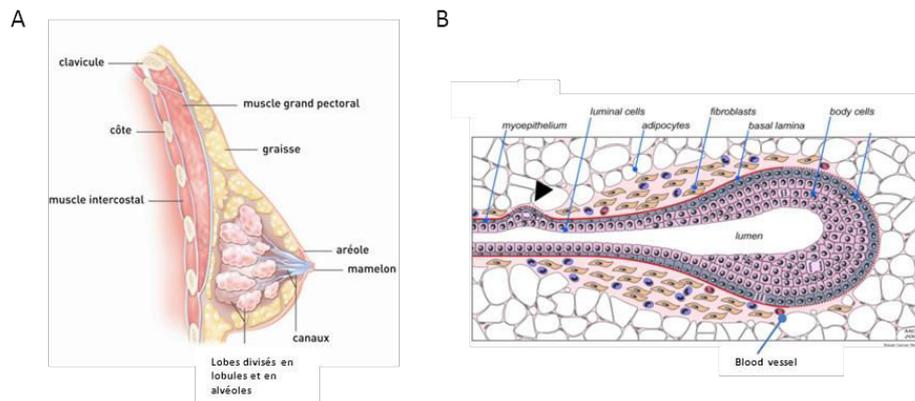


Figure 1 : A. Coupe d'un sein. Le tissu glandulaire est majoritairement situé au niveau du mamelon et représente 62% du volume du sein. Un sein possède 15 à 20 lobes (1,5 à 3 cm de long pour 1 à 2 cm de diamètre), eux même composés de 20 à 40 lobules (0,1 et 1 mm), lesquels sont constitués de 10 à 100 alvéoles (image adaptée de <http://www.e-cancer.fr/>). **B. Coupe d'une alvéole.** Les cellules épithéliales (luminales) forment plusieurs couches de cellules pour permettre à l'alvéole de produire du lait. Sous ces cellules se trouvent les cellules myoépithéliales en contact avec la matrice extracellulaire composée de fibroblastes et de vaisseaux sanguins. Les alvéoles sont entourées de cellules adipeuses.

3. Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement (Jemal et al., 2011), avec environ 54 000 nouveaux cas détectés chaque année et presque 12 000 cas de décès annuels en France d'après les estimations de 2015 (source : Institut National du Cancer, <http://www.e-cancer.fr/>). A l'échelle mondiale, le taux d'incidence annuel en 2012 du cancer du sein s'élève à 1,7 million (source : World Cancer Research Fund International, <http://www.wcrf.org>). La plupart des cancers du sein se déclare à partir de l'âge de 50 ans. Grâce aux moyens de prévention mis en œuvre, les femmes atteintes de cancer du sein sont aujourd'hui prises en charge à des stades plus précoces de la maladie, ce qui augmente ainsi leurs chances de survie.

Un certain nombre de facteurs peuvent influencer l'apparition du cancer du sein. On distinguera les facteurs de risque environnementaux (exposition au soleil, mode de vie, contraception, nutrition, surpoids) des facteurs de risque propres à l'individu (âge, genre, durée d'exposition aux hormones de la puberté à la ménopause, histoires familiales et mutations génétiques). Ainsi, le risque de développer un cancer du sein augmente avec l'âge : 10 % des cancers sont diagnostiqués avant 35 ans, 20% avant 50 ans, 50% entre 50 et 69 ans et 20% au-delà. De plus, ce risque augmente chez les femmes dont un parent proche a développé un cancer du sein. Il augmente également avec la consommation de tabac, le surpoids ou l'alcool. Ce dernier augmente les taux d'œstrogènes qui jouent un rôle prépondérant dans le développement de certains sous-types de cancer du sein.

Les grossesses induisent une élévation du taux d'œstrogènes ainsi que celui de la prolactine qui sont deux facteurs mitogènes des cellules mammaires (Bernichtein et al., 2010). Néanmoins, il est généralement considéré que la différenciation de la glande mammaire lors de la grossesse est un facteur protecteur contre le cancer du sein (Russo et al., 2005). Au contraire, plus l'âge de la mère à la première naissance est élevé, plus le risque de développer un cancer augmentent (Ewertz et al., 1990).

Certaines mutations génétiques prédisposent au cancer du sein et peuvent expliquer leur survenue dans 5 à 10 % des cas. C'est le cas des mutations de BRCA1 (breast cancer 1) et de BRCA2 (Graeser et al., 2009). Ces protéines, comme nous le verrons plus tard, sont impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN. La mutation de ces gènes augmente considérablement le risque d'accumuler d'autres mutations pouvant entraîner le développement d'un cancer du sein. Maintenir l'intégrité du génome est en effet crucial pour éviter le développement tumoral.

D'autres mutations, plus rares, augmentent aussi le risque de cancer du sein. Elles concernent les gènes suivants (Cancer Genome Atlas, 2012):

- TP53, qui joue un rôle important dans la signalisation de réparation de l'ADN ou de mort cellulaire,
- CHEK2 (checkpoint kinase 2), codant pour la protéine Chk2, kinase active lors de cassures d'ADN qui induit l'arrêt du cycle cellulaire lors de ces cassures,
- ATM (ataxia telangectasia mutated), kinase qui s'active aussi lors de cassures d'ADN et permet d'activer des voies impliquées dans la réparation de l'ADN,
- PI3K (phosphoinositide-3 kinase) qui régule le cycle cellulaire,
- PTEN (phosphatase and tensin homolog), qui inhibe la voie PI3K/AKT/mTOR,
- BRAF et KRAS qui font parties de la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) régulant la prolifération cellulaire,
- STK11, kinase qui régule de nombreuses protéines impliquées notamment dans le contrôle de l'apoptose.

Ces mutations, maintenant bien connues, font l'objet de dépistages. Afin de diminuer les risques de développer un cancer du sein, certaines des patientes, présentant une de ces altérations génétiques reçoivent une hormonothérapie préventive. Cependant, il est encore difficile d'appréhender la balance bénéfice-risque (Senechal et al., 2016).

3.1 Les différents types de cancer du sein

Une fois le cancer suspecté par palpation et mammographie, des ponctions et examens histologiques permettent d'en affirmer le caractère malin. Une évaluation est alors réalisée sur la tumeur permettant de définir son type histologique, son étendue, son agressivité et sa positivité à la présence de récepteurs des œstrogènes (ER, pour estrogen receptor), de la progestérone (PR, pour progesterone receptor) et à la surexpression de HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) comme nous le verrons dans les paragraphes suivants. La palpation des aires ganglionnaires permet de rechercher un envahissement ganglionnaire. Ces analyses permettent de caractériser le cancer du sein et son étendu afin d'adapter au mieux le traitement à administrer au patient.

On décrit principalement deux types de cancer du sein : lobulaire et canalaire, ce dernier étant le plus fréquent. La tumeur peut être contenue *in situ* : 25% des cas de cancer du sein sont non invasif au diagnostic. Plus généralement, dans 75% des cas, la tumeur infiltre le tissu environnant et est alors dite invasive (figure 2).

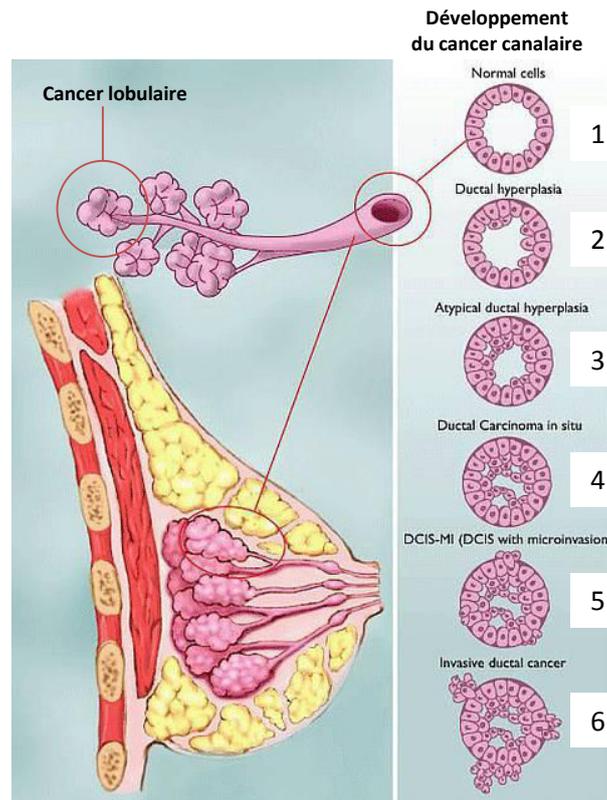


Figure 2 : Coupe schématisique d'un sein, localisation des tumeurs lobulaire et canalaire ainsi que le développement tumoral de ce dernier: 1 : cellules normales, 2 : hyperplasie canalaire, 3 : hyperplasie canalaire atypique, 4 : carcinome canalaire in situ (CCIS), 5 : CCIS avec micro-invasion, 6. cancer canalaire invasif.

3.2 Les différentes classifications du cancer du sein

3.2.1 Classification selon le degré d'extension

Les différents stades d'un cancer du sein sont définis par trois critères :

- la taille et l'infiltration de la tumeur : T0 à T4 selon la taille de la tumeur
- l'atteinte ou non de ganglions lymphatiques : de N0 à N3 selon l'importance de l'atteinte des ganglions.
- la présence (M1) ou l'absence (M0) de métastases.

Cette classification est appelée TNM pour « Tumor, Nodes, Metastasis ».

3.2.2 Classification selon le grade

L'agressivité d'une tumeur est définie par l'étude de trois paramètres, notés de 1 à 3 chacun : la forme de la cellule, la forme du noyau et son activité mitotique. Plus une tumeur est agressive, plus les cellules qui la composent sont de types indifférenciés et perdent leurs caractéristiques d'origine. Leurs noyaux changent de forme et sont de tailles variables. De plus, ces cellules ont une activité mitotique plus importante. La somme des notes donnent le grade :

- de 3 à 5 : le grade I correspond aux tumeurs les moins agressives,
- de 6 et 7 : le grade II correspond aux tumeurs intermédiaires,
- 8 et 9 : grade III correspond aux tumeurs les plus agressives.

3.2.3 Classification selon le profil d'expression de récepteurs hormonaux et le statut HER2

Ces résultats sont obtenus après analyse au microscope de coupes de tumeurs marquées avec différents anticorps pour distinguer les sous-types suivants :

- **Les tumeurs positives pour les récepteurs hormonaux** : ces tumeurs expriment des récepteurs des œstrogènes (ER+) et/ou à la progestérone (PR+). Elles représentent environ 70% des cancers du sein.
- **Les tumeurs positives pour HER2** : la protéine HER2, aussi appelée ERBB2 ou HER2/neu est transmembranaire. Elle fait partie de la famille des récepteurs de facteurs de croissance épidermiques (EGF). Aucun ligand n'est à ce jour connu pour activer l'homodimère HER2. Les tumeurs dites HER2+ ont une activité constitutive de HER2 ce qui induit une forte prolifération cellulaire (via l'activation des voies comme MAPK ou PI3K/AKT) et une surexpression de la protéine. Elles représentent 11 à 20% des cancers du sein.
- **Les tumeurs triple négatives (TN)** : ces tumeurs n'expriment ni les récepteurs des œstrogènes ni ceux de la progestérone et ne surexpriment pas la protéine HER2. Elles représentent 10 à 17% des cancers du sein.

3.2.4 Classification selon le profil d'expression multigénique

Dès le début des années 2000, une nouvelle classification des cancers du sein a été reconnue. Cette classification stratifie différents sous-types de cancer selon des critères moléculaires, c'est-à-dire le niveau d'expression de leurs gènes, et non plus seulement des critères anatomo-pathologiques. Les comparaisons sont faites à partir d'ADN complémentaires (ADNc) déposés sur des microarrays (Cancer Genome Atlas, 2012; Sorlie et al., 2001). Ce type d'analyse a permis de distinguer les sous-types moléculaires suivants (Figure 3):

- **Luminaux A et B** : ces sous-types ont une forte expression de ER-alpha. Le profil d'expression des gènes correspond à des cellules normales de type luminal qui tapissent les canaux et les glandes mammaires face à la lumière (lumen) car elles produisent les cytokératines 8, 18 et 19. Ces cellules surexpriment aussi trois facteurs de transcription : GATA-binding protein 3 (GATA3), X-box binding protein 1 (XBP1) et le facteur nucléaire hépatocyte 3α (HNF-3α). Pour distinguer le type luminal A du type luminal B, le niveau d'expression du marqueur de prolifération Ki-67 est utilisé : le sous-type luminal A étant moins agressif que le B, le marquage est moins prononcé dans le sous-type luminal A que dans le B. De plus, le niveau d'expression des récepteurs des œstrogènes du sous-type luminal A est plus élevé que dans le sous-type luminal B (Inic et al., 2014).
- **HER2+** : il est caractérisé par une forte expression des protéines HER2 et GRB7 (Growth Factor Receptor Bound protein 7), toutes deux positionnées à proximité sur le bras long du chromosome 17. Cette surexpression est souvent associée à une augmentation du nombre de copies de ces gènes.

- **Basal (ou « basal-like »)** : le profil d'expression des gènes correspond à celui des cellules basales (couches profondes) de canaux ou de glandes. Plusieurs définitions permettent de définir ce sous-type : i) absence d'expression de ER, PR et pas de surexpression de HER2 avec surexpression d'au moins une des cytokératines (CK) suivantes : CK5, CK6, CK14, CK17 ; ii) absence d'expression de ER, pas de surexpression de HER2 associée à l'expression de CK5, CK6 et/ou le récepteur du facteur de croissance de l'épidermique (EGFR) (Nielsen et al., 2004) ; iii) absence d'expression de ER, PR et pas de surexpression de HER2 associée à l'expression de CK5, CK6 et/ou de EGFR (Cheang et al., 2008). Cependant, ces caractérisations restent imprécises : en effet, d'autres équipes ajoutent la surexpression de cytokératines 8 et 18 qui sont plutôt caractéristiques des cellules myoépithéliales (Livasy et al., 2006). Comme nous venons de le voir, les caractéristiques de ce sous-type sont très controversées et il n'existe à ce jour pas de consensus pour le définir. De ce fait, dans la suite de ce manuscrit, le terme triple négatif sera utilisé plutôt que celui de « basal-like ».
- **« Normal-like »** : le profil d'expression est proche de celui des cellules mammaires normales : il est caractérisé par l'expression de nombreux gènes exprimés par des cellules adipeuses et des cellules non-épithéliales. La définition de ce sous-type est soumise à controverse car il se pourrait que les données soient le résultat d'un artefact dû à une contamination de cellules stromales et de cellules épithéliales mammaires non tumorales (Badve et al., 2011).
- **« Claudin-Low »** : ces tumeurs ont une faible expression de gènes de la famille des Claudines (CLDN), dont les CLDN3, 4 et 7. Leurs caractéristiques suggèrent un passage de type épithélial à mésenchymateux et une forte proportion en cellules souches cancéreuses.

Bien que les sous-types triple négatifs et basal-like soient souvent assimilés, une distinction doit être faite (Bertucci et al., 2008). En effet, ces deux termes ne sont pas totalement synonymes. Il a été démontré que seulement 71% des cancers de sous-types triple négatifs étaient de type basal-like et que seulement 77% des basal-like étaient triple négatifs (Bertucci et al., 2008). Certaines tumeurs triple négatives, qui ne correspondent pas aux basal-like, sont reclassées comme « normal-like » ou « Claudin low ». Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes (de Ronde et al., 2010; Parker et al., 2009).

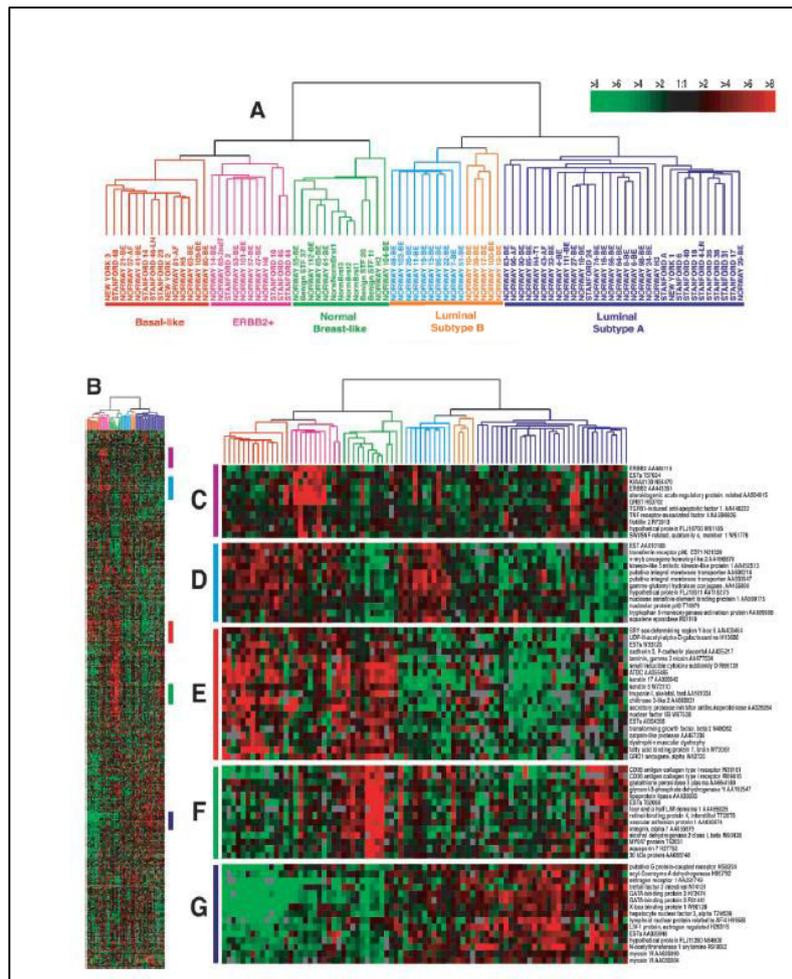


Figure 3: Profil d'expression multigénique selon les différents sous-types de cancer du sein. A. En rouge, les cellules « basal-like », en rose, les HER2+, en vert les « normal-like », en bleu et jaune les luminales B, en violet les luminales A. B. Résultat de 78 échantillons de cancer du sein différents dont certaines parties sont zoomées dans la figure à droite. C. Cluster de gènes où la protéine HER2 est surexprimée. D. Cluster aux fonctions inconnues. E. Cluster enrichi en protéines caractéristiques de cellules basales. F. Cluster de cellules du sein « normales ». G. Cluster de gènes contenant les caractéristiques des cellules luminales contenant le gène ER (Sorlie et al., 2001).

Les sous-types triple négatifs ou basal-like restent des catégories très hétérogènes. La fréquence de ces types de cancer est relativement élevée (10-17%), ils sont de pronostics défavorables en dépit des traitements, et ont une tendance à atteindre surtout des femmes jeunes. Il apparaît donc important de mieux comprendre la biologie de ces types de cancer pour identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. De nouvelles études moléculaires plus poussées ont permis une nouvelle classification de ces sous-types particuliers.

3.2.5 Nouvelle classification du sous-type triple négatif

Cette classification se base sur l'analyse plus approfondie du sous-type basal-like ou triple négatif. Lehmann et ses collègues ont rassemblé les données de 21 bases de données différentes et ont analysé le profil génomique de 587 cancers du sein de sous-type triple négatif. Ils ont alors mis en évidence 6 catégories dans ce sous-type (voir figure 4) (Lehmann et al., 2011) et sont notamment soutenus par l'équipe de Perou (Prat et al., 2013). Ces 6 catégories sont présentées ci-dessous.

- **Basal-like 1 (BL1)**, enrichie dans des voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, la division et la prolifération (ex : forte expression de l'ARN messenger (ARNm) Ki-67). De plus, dans cette catégorie, la sous-expression de gènes impliqués dans le contrôle des cycles cellulaires s'accompagne d'une surexpression de la voie de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN.
- **Basal-like 2 (BL2)**, enrichie dans l'expression de facteurs de croissance (voies de signalisation EGF, WNT β -caténine...). Cette catégorie exprime aussi de nombreux récepteurs à ces facteurs de croissance.
- **Immunomodulateur (IM)**, enrichie dans des voies de signalisation utilisées par les cellules immunitaires : les voies de signalisation des cytokines, des antigènes, et des cellules « Natural killer » (NK).
- **Mésenchymateux (M)**, enrichie dans les voies de signalisation impliquées dans la mobilité cellulaire et dans la différenciation.
- **Mesenchymal stem-like (MSL)**, enrichie dans les mêmes voies de signalisation que le sous-type M mais avec l'expression de gènes impliqués dans des voies contrôlant la signalisation des facteurs de croissance (EGFR, PDGF (Platelet-derived growth factor), TGF β (Transforming growth factor beta), etc.), dans la différenciation (avec des gènes associés à l'EMT – transition épithélio-mésenchymateuse) et dans l'angiogenèse. Cette catégorie surexprime aussi des gènes liés au statut de cellules souches. Elle est aussi connue pour sa faible expression des claudines.
- **Luminal**, exprimant des récepteurs des androgènes (LAR – luminal androgen receptor). Bien que n'exprimant pas ER (en accord avec son statut de triple négatif), cette catégorie surexprime des gènes impliqués dans la régulation des hormones incluant la synthèse des stéroïdes et le métabolisme des androgènes et des œstrogènes.

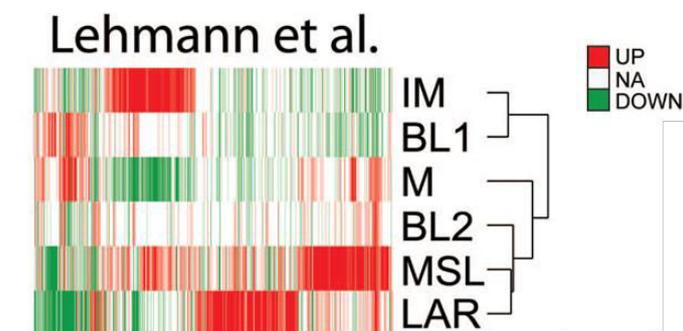


Figure 4 : Classification d'échantillons de cancers du sein de sous-type triple négatif selon la classification de Lehmann. Voir texte pour abréviation. Adapté de (Prat et al., 2013).

3.3 Thérapeutique des cancers du sein

Différents traitements sont disponibles : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, d'autres thérapies ciblées ou plus récemment l'immunothérapie. Le choix du traitement dépend de nombreux paramètres : le stade, le grade, l'origine du cancer (lobulaire ou canalaire), le statut de ses récepteurs hormonaux, et donc, du sous-type de cancer mais aussi des facteurs de risque. Des référentiels thérapeutiques sont mis au point et corrigés annuellement pour adapter au mieux la prise en charge des patients à la diversité particulière des cancers du sein.

Le plus souvent, la chirurgie intervient en premier lieu, notamment dans les cancers du sein *in situ*. La chirurgie peut être conservatrice (tumorectomie) ou non conservatrice (mastectomie partielle ou complète) si la tumeur est plus étendue. Le type de chirurgie est adapté selon les caractéristiques de la tumeur, du volume mammaire et du choix de la patiente. Pour les cancers invasifs, une chimiothérapie néoadjuvante peut parfois être administrée avant chirurgie pour diminuer la taille de la tumeur et faciliter l'exérèse. De plus, les ganglions axillaires peuvent aussi être retirés. Très schématiquement, la chirurgie peut être complétée par une radiothérapie, une hormonothérapie pour les cancers ER+, une thérapie ciblée pour les cancers HER2+, une chimiothérapie en l'absence de récepteurs aux hormones et de surexpression de HER2, ou plus récemment par de l'immunothérapie.

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants qui induisent des cassures de l'ADN sur la zone irradiée contenant des cellules tumorales mais aussi normales. Dans le cas du cancer du sein, la radiothérapie est externe, les rayonnements provenant de l'extérieur sont dirigés vers la zone tumorale, et rarement interne avec l'utilisation de la curiethérapie, source radioactive placée sur la tumeur. Après chirurgie des cancers du sein *in situ* ou invasifs, la radiothérapie peut être utilisée pour éliminer les cellules tumorales qui n'auraient pas été retirées. Dans le cas des cancers du sein métastatiques, une radiothérapie du sein peut être envisagée pour freiner l'évolution de la tumeur.

Dans cette introduction, un accent sera donné sur les chimiothérapies, et particulièrement sur le cyclophosphamide et le mafosfamide, qui sont les principes actifs utilisés dans nos expériences.

3.3.1 La chimiothérapie conventionnelle

Les inhibiteurs de la topoisomérase

Les topoisomérase I et II sont des enzymes qui coupent l'ADN de façon transitoire pour faciliter l'accès aux enzymes lors de la réplication et de la transcription de l'ADN et participent à sa re-ligation. Il existe deux types d'inhibiteurs de topoisomérases.

Les inhibiteurs de topoisomérase II s'intercalent dans la double hélice d'ADN, consolident le complexe topoisomérase II-ADN et permettent ainsi la stabilisation des coupures d'ADN double brin, empêchant alors la réplication, la transcription et la ligation de l'ADN d'avoir lieu. L'adriamycine (aussi appelée doxorubicine) ainsi que des composés de nouvelles générations dont l'épirubicine (Farmorubicine™), entre dans les protocoles de chimiothérapie les plus fréquemment prescrits.

Les inhibiteurs de topoisomérase de type I inhibent l'action de soudure des brins d'ADN par la topoisomérase I. En empêchant la re-ligation des brins, ils induisent l'arrêt de la réplication ou de la transcription. La camptothécine, l'irinotecan, et le topotecan sont des composés de la même famille qui sont peu prescrits dans le cancer du sein.

Les agents alkylants

Les agents alkylants interagissent avec l'ADN ou l'ARN d'une cellule par fixation de groupes alkyles (exemple : le groupe méthyle CH₃) par liaison covalente sur les bases azotées. Ils entraînent l'inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN et créent des lésions létales. Ils peuvent être monofonctionnels et ne fixer qu'un groupe méthyle sur une base azotée (temozolomide, dacarbazine) ou bifonctionnels et fixer un groupe méthyle sur deux bases azotées différentes de manière à former des liaisons intra- ou inter-brins dans l'ADN de façon covalente, comme les composés de moutarde à l'azote (cyclophosphamide, chlorambucil, mitomycine C).

Synthétisé pour la première fois en 1958, le cyclophosphamide est aujourd'hui encore l'un des plus utilisés et des plus efficaces. Le cyclophosphamide est une pro-drogue qui doit être métabolisée dans le foie par le cytochrome P450 pour former le 4-hydroxycyclophosphamide, qui coexiste avec son tautomère l'aldophosphamide (Figure 5). Ce dernier diffuse alors dans les cellules où il forme de l'acroléine, composé toxique, et la forme active de la drogue appelée « phosphoramidate moutarde » pour moutarde phosphoramidée. Pour se passer de l'étape de métabolisation par le foie, ce qui est notamment utile pour les études *in vitro*, un autre composé appelé mafosfamide permet aussi de créer la molécule active.

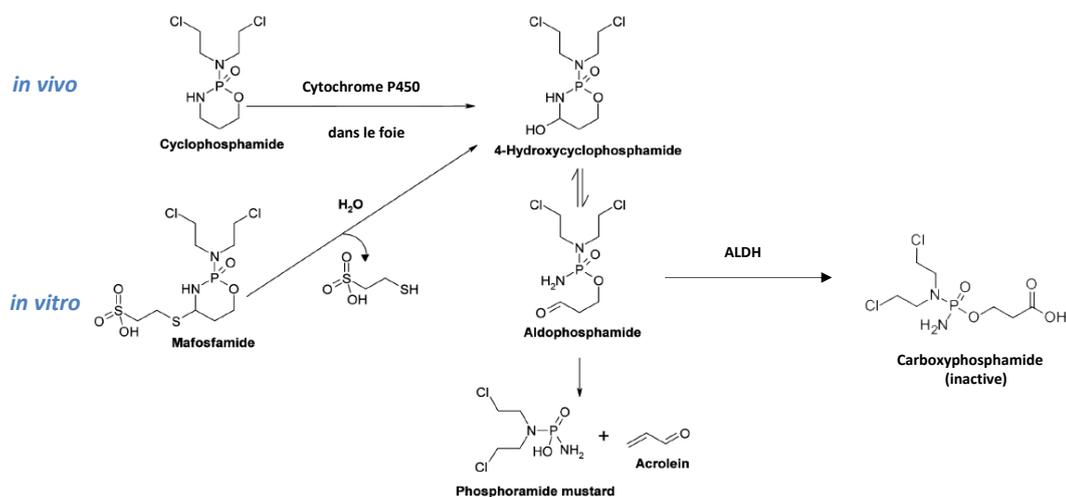


Figure 5 : Métabolisation du composé actif de moutarde azoté à partir de cyclophosphamide ou de mafosfamide. Le cyclophosphamide et le mafosfamide sont métabolisés en 4-hydroxycyclophosphamide ou aldophosphamide. Ce dernier peut soit se transformer en composé inactif appelé carboxyphosphamide par l'intermédiaire de l'ALDH (l'aldéhyde déshydrogénase) soit en composé actif moutarde phosphoramidée avec l'acroléine. Adapté de (Heylmann et al., 2013)

La moutarde phosphoramidée élimine un à un ses groupes chlorures entraînant la formation d'un cation très instable, le cation aziridinium, qui a une forte affinité pour les nucléotides, notamment les résidus de guanine (Dong et al., 1995). Ce composé crée alors des liens intra- ou inter-brins d'ADN

qui aboutissent à des cassures double brin (Kondo et al., 2009; Kondo et al., 2010; Quiros et al., 2010; Roos et al., 2009). Ce mécanisme est schématisé dans la figure 6. La mitose étant bloquée, les cellules s'accumulent en phase G2 du cycle cellulaire.

Le cyclophosphamide est utilisé pour traiter le cancer du sein mais aussi le cancer des ovaires, des os, les sarcomes et les lymphomes (Emadi et al., 2009). Ces agents sont le plus souvent combinés à d'autres molécules.

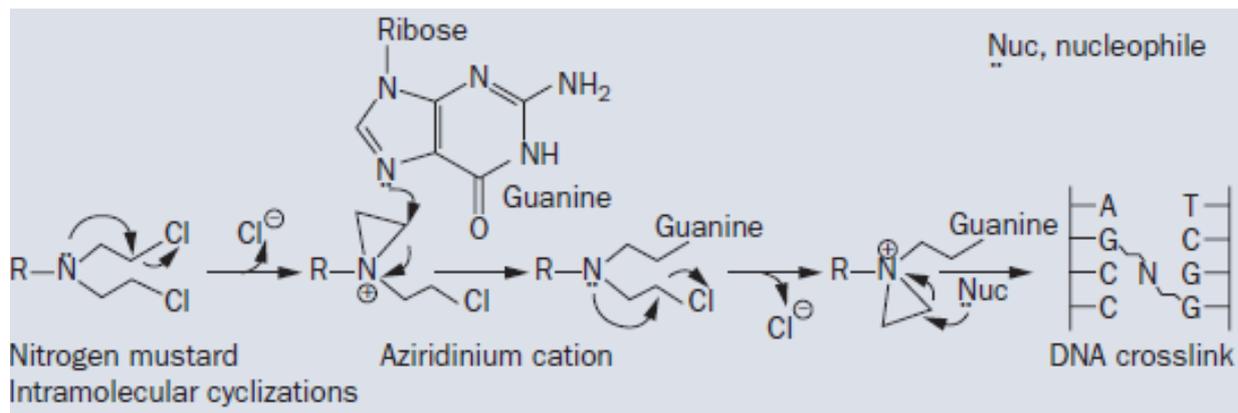


Figure 6: Réaction en chaîne depuis le composé de moutarde azotée jusqu'à la formation de liaisons inter-brins d'ADN. Le composé de moutarde azotée libère un atome de chlore formant un cation aziridinium très instable. Il réagit donc facilement avec les nucléophiles (composé chimique attiré par les atomes chargés positivement). Par exemple, la guanine est alkylée par l'aziridinium sur un azote (numéro 7) très nucléophile. Cette réaction se répète lorsque le composé de moutarde azotée libère son deuxième atome de chlore ; le cation formé est alors capable de se lier à une autre guanine située à proximité. Ici une liaison inter-brin d'ADN est illustrée (Di Nicolantonio et al., 2010; Emadi et al., 2009).

Le cisplatine est un sel de platine qui, bien que n'étant pas un agent alkylant, possède le même mode d'action : il est capable de se fixer sur l'ADN, mais aussi à l'ARN et aux protéines. En milieu aqueux, deux atomes de chlore sont libérés, créant un cation avec deux valences libres qui peuvent se fixer sur des macromolécules. Ces traitements sont prescrits dans les sous-types agressifs, notamment dans les cancers du sein BRCA mutés (autres exemples : carboplatine, oxaliplatine).

Les taxanes

Les taxanes sont des agents qui interfèrent avec la tubuline, inhibent sa synthèse, dépolymérisent un fuseau déjà constitué ou stabilisent les microtubules (exemple : paclitaxel (Taxol™ ou Paxene™), docetaxel (Taxotère®)). Les taxanes font partie des protocoles thérapeutiques de première ligne.

Les anti-métabolites

Les anti-métabolites sont des analogues des bases puriques et pyrimidiques qui, de par leur nature, inhibent la synthèse de l'ADN en bloquant l'activité enzymatique. Il existe des anti-purines, des anti-pyrimidines comme le 5-Fluorouracile (5-FU) et des anti-foliques comme le méthotrexate. La capecitabine, qui est une prodrogue du 5-FU, est indiquée aux USA et en Europe en combinaison avec du docetaxel pour le traitement des cancers du sein métastatiques.

La chimiothérapie est un traitement systémique qui agit sur l'ensemble des cellules de l'organisme et s'utilisent en combinant plusieurs traitements. Les combinaisons les plus fréquentes sont le FEC (5-FU, épirubicine, cyclophosphamide), le FAC (5-FU, adriamycine, cyclophosphamide) et l'A/C (adriamycine, cyclophosphamide). De par leurs mécanismes d'action intrinsèques, ils visent, et affectent particulièrement les cellules qui se divisent rapidement, dont les cellules cancéreuses. La chimiothérapie est donc un traitement dit « non ciblé » qui vise à déstabiliser le génome de la cellule tumorale pour entraîner sa mort. Au contraire de certains cancers du sein qui peuvent bénéficier de thérapies ciblées (voir paragraphe suivant), les cancers triple négatifs n'expriment aucun des récepteurs qui peuvent être ciblés par des molécules spécifiques. Ils sont donc traités uniquement par chimiothérapie.

3.3.2 Hormonothérapie et thérapies ciblées

Les œstrogènes ont une action mitogène sur les cellules tumorales : plus elles expriment de récepteurs des œstrogènes, plus elles en dépendent. La stratégie consiste donc à administrer des antagonistes de ces récepteurs pour diminuer la prolifération des cellules. Les cancers luminaux (ER+) sont traités par hormonothérapie, le plus souvent en adjuvant sur une durée de 5 ans, parfois en combinaison avec ou après une chimiothérapie. Avant la ménopause, les œstrogènes sont principalement produits par les ovaires. Le traitement consiste à retirer les ovaires ou à injecter des agonistes LH-RH (luteinizing hormone releasing hormone). Après la ménopause, il existe principalement deux traitements : le tamoxifène, un antagoniste partiel des récepteurs aux œstrogènes et le fulvestrant qui est un antagoniste compétitif. Il existe aussi des inhibiteurs de l'aromatase, car après la ménopause, l'aromatase est une enzyme qui assure la conversion d'hormones androgènes produites par les glandes surrénales en œstrogènes.

D'autres thérapies ciblées existent comme le trastuzumab, plus connu sous le nom d'Herceptin®. Cet anticorps monoclonal est administré lorsque les cellules surexpriment le récepteur transmembranaire HER2. En bloquant HER2, le processus de prolifération cellulaire est diminué.

La protéine VEGF (vascular endothelial growth factor) est un facteur pro-angiogénique circulant qui favorise la formation de vaisseaux sanguins. Pour bloquer l'angiogenèse tumorale, des anticorps monoclonaux anti-VEGF appelés bevacizumab (Avastin®) ont été développés. Ce traitement empêche la genèse de nouveaux vaisseaux privant les cellules tumorales d'oxygène et de nutriments, celles-ci ont alors une croissance ralentie.

Le lapatinib (Tyverb®) inhibe diverses protéine-kinases intracellulaires comme par exemple EGFR ainsi que l'activité enzymatique de HER2. Ce traitement limite les divisions des cellules tumorales et par conséquent le développement de la tumeur. Le mécanisme est semblable pour l'évérolimus (Afinitor®), inhibiteur de mTOR (mammalian target of rapamycin) impliqué dans la voie de signalisation PI3K/AKT.

Les thérapies ciblées listées ci-dessus sont actuellement utilisées pour traiter les patients. Un dernier type de thérapie, qui semble très prometteur est l'immunothérapie, décrite ci-dessous, dont la plupart des molécules sont en cours de développement (étude préclinique ou en essai clinique).

3.3.3 L'immunothérapie

La croissance d'un cancer en présence d'un système immunologique compétent, indique que celui-ci est défaillant à l'égard des cellules tumorales. En effet, le système immunitaire chargé de surveiller et de détecter la présence de cellules tumorales n'est parfois pas suffisamment efficace. Les cellules cancéreuses étant des cellules « du soi », notre système immunitaire possède une tolérance immunologique qui, malgré la présence d'antigènes à la surface des tumeurs n'enclenche pas de réponse immunitaire.

De nombreux scientifiques s'affairent aujourd'hui pour déverrouiller ce système immunitaire en utilisant l'immunothérapie. Plusieurs stratégies existent dont les plus importantes sont décrites ici.

- La création d'anticorps monoclonaux permet de bloquer la croissance des cellules tumorales, en utilisant le même principe que l'Herceptin®, ou en amenant une chimiothérapie dans la cellule tumorale par l'intermédiaire de cet anticorps. Par exemple, un anticorps couplé à un agent chimiothérapeutique va se fixer sur une cellule tumorale et délivrer alors la molécule dans celle-ci.
- Les points de contrôles du système immunitaire comme CTLA-4, PD-1 (programmed cell death protein -1) et PD-L1 (programmed death ligand 1) inhibent l'activation des lymphocytes T. Des anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-PD-L1 sont en développement pour maintenir un système immunitaire actif, capable de tuer les cellules tumorales. Les cancers triple négatifs présentent fréquemment ces déterminants moléculaires. L'utilisation thérapeutique d'anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 est actuellement testée (Mittendorf et al., 2014).
- L'injection de cytokines pro-inflammatoires comme les interférons (IFN) ou les interleukines 2 (IL-2) active le système immunitaire. Cela peut fonctionner dans certains types de cancers mais la réponse n'est pas spécifique et l'efficacité n'est pas toujours satisfaisante. De plus les effets secondaires sont souvent très importants.
- La vaccination préventive est utilisée si l'origine de la tumeur vient de la contamination par un virus. C'est par exemple le cas, du cancer du col de l'utérus qui résulte d'une infection par le papillomavirus. Enfin, une autre méthode actuellement en essai clinique est l'utilisation des néo-antigènes. Le principe repose sur la comparaison génomique entre des cellules normales et des cellules tumorales. Les différences mises en avant permettent de sélectionner les antigènes spécifiques de la tumeur. Une fois ces antigènes synthétisés, ils sont injectés au patient. Le résultat espéré est que ces néo-antigènes stimulent le système immunitaire pour tuer les cellules tumorales (Schumacher and Schreiber, 2015).
- Une dernière méthode est le transfert de lymphocytes T. Une des technologies les plus en vogue aujourd'hui sont les CAR pour « chimeric antigen receptors ». Ce sont des récepteurs construits pour reconnaître un antigène précis et transmettre le signal permettant d'induire l'activation des lymphocytes T. Le principe consiste à récupérer les lymphocytes T (marqués CD3+) dans le sang du patient, de les transformer de manière à ce qu'ils expriment des CAR spécifiques et de réinjecter ces lymphocytes T modifiés aux patients. Le but étant d'amplifier

l'activation des lymphocytes T pour tuer plus de cellules cancéreuses. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de cette technique (Enblad et al., 2015).

3.4 Les facteurs pronostiques

Après traitements systémiques néoadjuvants ou adjuvants, il est impossible de savoir si toutes les cellules tumorales ont été éradiquées. Le patient est donc surveillé pour une durée pouvant aller jusqu'à 10 ans afin de déceler toute récurrence. Les récurrences peuvent se trouver à l'emplacement de la tumeur d'origine, à proximité de celle-ci (dans le même sein ou dans les ganglions), ou encore à distance, définissant les métastases. Pour le sous-type triple négatif, les métastases sont fréquemment détectables dans les poumons (40%) et le cerveau (30%) et, plus rarement, le foie (20%) et l'os (10%) (Foulkes et al., 2010). Pour les sous-types non triple négatif (Kamangar et al., 2006), le principal site métastatique est l'os (40%), suivi par les poumons (20%), le foie (20%) et plus rarement le cerveau (10%) (Foulkes et al., 2010).

Les facteurs de risques de récurrence sont évalués à partir des caractéristiques de la tumeur initiale (le grade, la taille de la tumeur, le sous-type tumoral, le type histologique), l'âge du patient, la présence de cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques ou encore le degré de l'inflammation du microenvironnement (Kamangar et al., 2006).

Par exemple, en ce qui concerne le grade, le taux de récurrence dans les 5 ans est de 7% pour le grade I, de 11% pour le grade II et de 13% pour le grade III (Brewster et al., 2008). Selon le sous-type de cancer du sein, la survie globale (OS, pour « overall survival ») et le taux de survie sans récurrence (RFS, pour « recurrence free survival ») diffèrent aussi (Sorlie et al., 2001). Une étude comprenant 49 tumeurs, dont la plupart ont été traitées par une monothérapie néoadjuvante (adriamycine) suivie d'une hormonothérapie pour les cancers ER+, montre que, sur un suivi de 8 ans, l'évolution de la survie globale et du taux de survie sans récurrence varient selon les sous-types de cancer (Figure 7 A et B). La croissance des cancers luminaux A étant plus lente que celle des luminaux B, les premiers sont associés à un meilleur pronostic. Les cancers HER2 sont souvent de haut grade, ils progressent rapidement et leur pronostic est plus défavorable. Les cancers de sous-type basal-like sont souvent de haut grade, agressifs, et de pronostic défavorable avec de forts risques d'observer une récurrence.

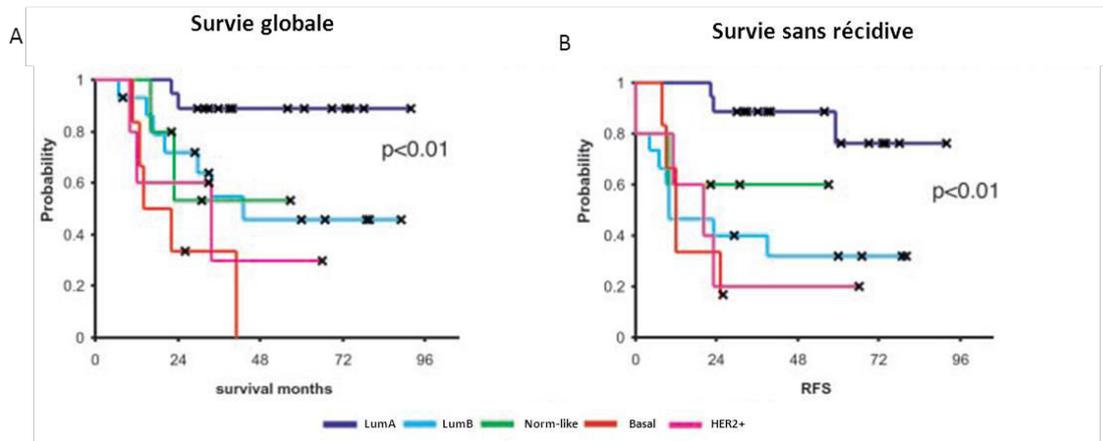


Figure 7: Survie globale (A) et survie sans récurrence (B) selon les différents sous-types de cancer du sein : en violet le sous-type luminal A, en bleu le sous-type luminal B, en vert le sous-type « normal-like », en rouge le sous-type « basale-like » et en rose le sous-type HER2+. Adapté de (Sorlie et al., 2001).

Pour aider le clinicien à évaluer les risques de récurrence, des tests biologiques pronostiques ont été développés. C'est le cas d'Oncotype DX[®]. Ce test analyse l'expression de 21 gènes dans la tumeur primaire et calcule un score de récurrence appelé Recurrence score[®]. L'échantillon est prélevé lors de la chirurgie et aide le médecin à choisir le traitement adjuvant le plus approprié. Plusieurs autres tests similaires existent et leurs intérêts seront développés dans la discussion.

Pour le sous-type « basal-like », de pronostic défavorable, le reclassement suivant les 6 catégories définies par Perou et d'autres collègues pourrait contribuer à mieux choisir le traitement. Des données expérimentales obtenues sur des lignées cellulaires tumorales mammaires suggèrent : i) que les cancers de sous-type basal-like (BL1 et BL2) sont plus efficacement traités avec des agents qui stimulent la voie de signalisation de réponse à l'ADN tels que les taxanes ; ii) que les tumeurs exprimant AR répondent mieux avec du bicalutamide seul ou en combinaison avec des inhibiteurs de PI3K ; iii) que les tumeurs mesenchymal-like sont mieux traitées avec des antagonistes de kinase de la famille Src en combinaison avec des inhibiteurs de PI3K (Dent et al., 2007; Lehmann et al., 2011; Tischkowitz et al., 2007).

En conclusion, pour améliorer les réponses au traitement et prolonger la durée de survie des patients, notamment pour le sous-type triple négatif, il est essentiel de trouver de nouvelles molécules qui préviennent les récurrences. L'origine des récurrences étant les cellules tumorales survivant au traitement, leur prévention implique que toutes ces cellules tumorales soient éradiquées.

Afin de tester les nouveaux traitements chez l'homme, des modèles sont utilisés pour évaluer l'efficacité des principes actifs sur les cellules tumorales. Les modèles de culture cellulaire en deux ou trois dimensions sont utilisés en tests initiaux. Cependant, l'étape ultime des études précliniques est de tester les nouvelles molécules *in vivo*, sur des modèles humains adaptés chez l'animal immunodéprimé; ces modèles sont présentés dans le paragraphe suivant.

3.5 Les modèles de PDX (Patient Derived Xenograft)

De très nombreux modèles sont utilisés en oncologie fondamentale ou préclinique. Des souris génétiquement modifiées, appelées GEMM (genetically engineered mouse models) qui sur- ou sous-expriment une protéine de manière systémique, ou le plus souvent dans un tissu spécifique, permettent d'observer la tumorigenèse et la formation de métastases dans un microenvironnement intact et en présence d'un système immunitaire fonctionnel. Ces souris peuvent aussi être utilisées comme modèle préclinique pour évaluer l'effet de nouvelles molécules sur la réponse tumorale et la résistance (van Miltenburg and Jonkers, 2012) mais leur sensibilité aux chimiothérapies n'est pas comparable à celles des cancers humains. De plus, les gènes impliqués et les mécanismes qui en dépendent sont spécifiques des espèces et différent de ceux impliqués dans les tumeurs humaines (Marangoni and Poupon, 2014). D'autres modèles alternatifs comme par exemple les CAM (chicken embryo chorioallantoic membrane) ou le zebrafish pour poisson-zèbre permettent de cribler à haut débit de nombreux gènes en réduisant les coûts et le temps d'expérimentation (Leong et al., 2012; Mimeault and Batra, 2013; van der Kuip et al., 2006). Cependant, ces modèles sont assez éloignés du système humain. Pour essayer de se rapprocher au plus près de l'Homme, les PDX ont été développées et sont utilisées dans nos expériences.

3.5.1 Historique des PDX

Depuis plus de 50 ans, les chercheurs testent leurs molécules *in vivo* sur des xénogreffes obtenues par injection dans des souris de cellules humaines ou murines cultivées *in vitro*. Cependant, ces modèles ont démontré des limitations importantes, qui ont conduit à mettre au point des modèles plus proches des cancers humains. Cette recherche a abouti à établir des modèles de transplantation de fragment de tumeur humaine sur souris immunodéficientes, appelés PDX. Le premier succès de transplantation de tumeur humaine remonte à 1951 où l'équipe de Toolan a réussi à greffer une tumeur épidermoïde sur des rats irradiés ou traités à la cortisone pour éviter le rejet du greffon (Toolan, 1951). En 1966, la découverte puis l'élevage de souris immunodéficientes ont stimulé les essais de transplantation et, en 1969, une première équipe a décrit la première prise de greffe de tumeur humaine sur ce type de souris (Bailey et al., 1980). Une dizaine d'années plus tard, un premier panel de PDX de cancer du sein a été décrit comme ayant une histologie proche de celle du patient, une capacité à se conserver par transplantation sériée, mais néanmoins un faible taux de prise de greffe (Bailey et al., 1981).

3.5.2 PDX versus xénogreffes cellulaires

Les modèles de xénogreffes créés à partir de lignées cellulaires cultivées *in vitro* sont très utilisés. Cependant, *in vitro*, les lignées se sont adaptées aux conditions de culture: seules les cellules qui supportent le mieux ces conditions, comme les centrifugations, les milieux nutritifs et les digestions enzymatiques, survivent, entraînant ainsi une sélection de la population initiale. Par exemple, il a été démontré que toutes les lignées cellulaires ovariennes établies surexpriment des gènes associés à la résistance à plusieurs principes actifs comparés aux échantillons cliniques. De même, cette perte d'hétérogénéité a aussi été analysée pour des cellules du cancer du sein et du côlon (figure 8) (Gillet et al., 2011).

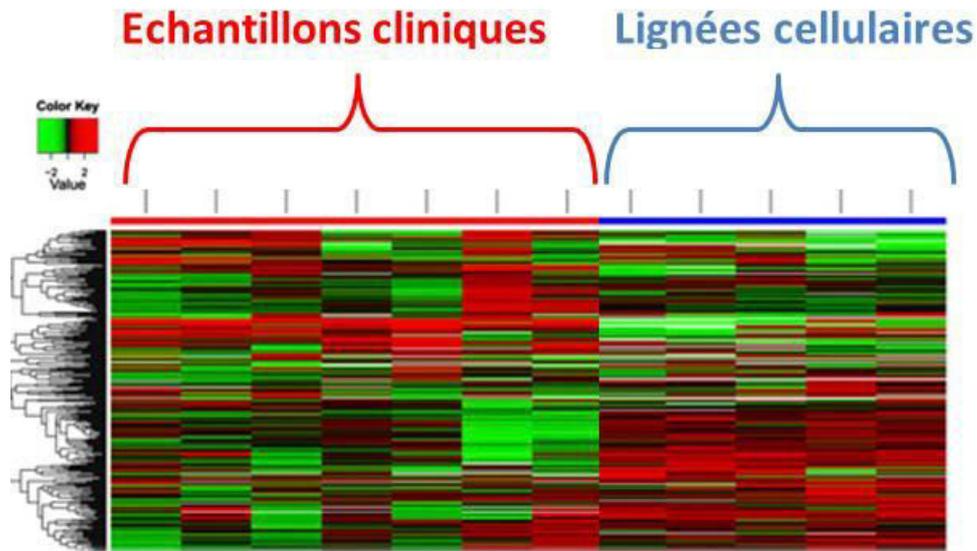


Figure 8: Illustration de la perte d'hétérogénéité des lignées cellulaires du sein comparées aux échantillons cliniques. (Adapté de (Gillet et al., 2011)).

La question qui se pose est de savoir si ces modèles de xéno greffes, qui ne représentent pas l'hétérogénéité tumorale d'un échantillon clinique, sont représentatifs de la réponse clinique. Une étude a comparé les effets de 39 agents thérapeutiques sur des xéno greffes issues de cellules à ceux obtenus en phase II d'études cliniques. Même en analysant des histologies comparables, aucune corrélation fiable n'a pu être démontrée (Johnson et al., 2001). Dans 90 % des cas, les principes actifs validés dans ces modèles précliniques n'ont pas pu être confirmés lors des essais cliniques (Hait, 2010).

De plus, cette perte d'hétérogénéité est irréversible : la réimplantation des cellules *in vitro* dans les souris ne fait pas réapparaître les populations contre-sélectionnées. C'est ce qui a été démontré avec des cellules cancéreuses de poumon « à petites cellules » (SCLC). Une comparaison entre une PDX (tumeur humaine directement greffée dans la souris) et une xéno greffe provenant de cette même tumeur mais issues de cellules maintenues en culture pendant 6 mois puis injectées sur souris, a montré des modifications au niveau des interactions avec le stroma, des changements dans des voies de signalisation importantes, dans la réponse aux chimiothérapies et donc des différences de sensibilité aux mêmes chimiothérapies (Daniel et al., 2009).

Contrairement aux xéno greffes cellulaires, les PDX sont reconnues pour leur similarité avec l'échantillon humain. En effet, dans de nombreux cas, il a été possible de comparer les échantillons cliniques du patient et les PDX qui en dérivent. Cette comparaison n'a pas été possible pour les xéno greffes cellulaires, dont les lignées ont été établies depuis très longtemps.

La première surprise a été de constater la forte similitude histologique entre l'échantillon clinique et la PDX. Comme montrée dans la figure 9 ci-dessous, les profils histologiques de la tumeur du patient et de la PDX développée sont similaires : structure tissulaire et expressions de ER, PR et HER2 sont inchangées.

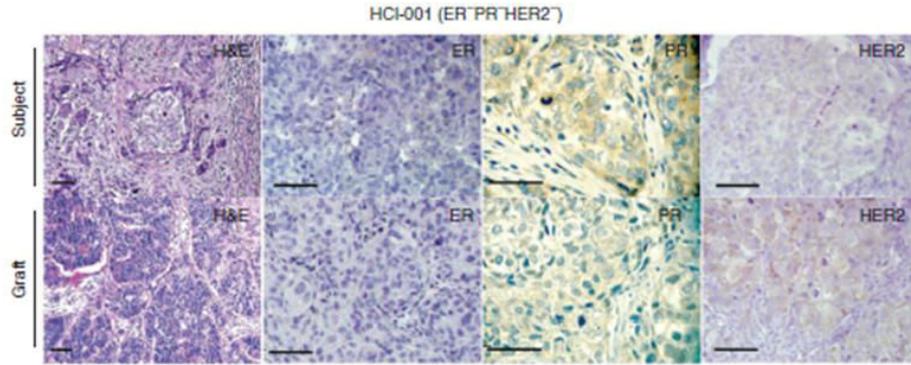


Figure 9: Comparaison de différents marquages par immunohistochimie sur un échantillon clinique triple négatif (ER⁻PR⁻HER2⁻) et la PDX associée. Illustration de la similitude entre les marquages : H&E (hématoxyline et éosine) qui marque respectivement le noyau et le cytoplasme ; ER qui marque les récepteurs aux œstrogènes ; PR qui marque les récepteurs à la progestérone et HER2 qui marque l'expression de la protéine HER2 (DeRose et al., 2011).

Pour poursuivre l'étude comparative avec l'échantillon clinique, une analyse d'expression des gènes par microarray (Marangoni et al., 2007; Zhao et al., 2012), des SNP (single nucleotide polymorphism) et une étude de la variabilité du nombre de copies par gène ont démontré que ces caractéristiques étaient conservées (voir figure 10) (DeRose et al., 2011). De plus, la comparaison entre la tumeur du patient et la PDX associée après un ou plusieurs passages ont montré que le profil d'expression des gènes était conservé (Marangoni et al., 2007; Zhao et al., 2012). Une PDX de cancer de prostate, PAC120, surveillée pendant 11 ans, montre que l'accumulation de mutations au fil du temps est très modeste (Legrier et al., 2009). Les PDX permettent donc de préserver et de maintenir l'hétérogénéité des tumeurs du patient.

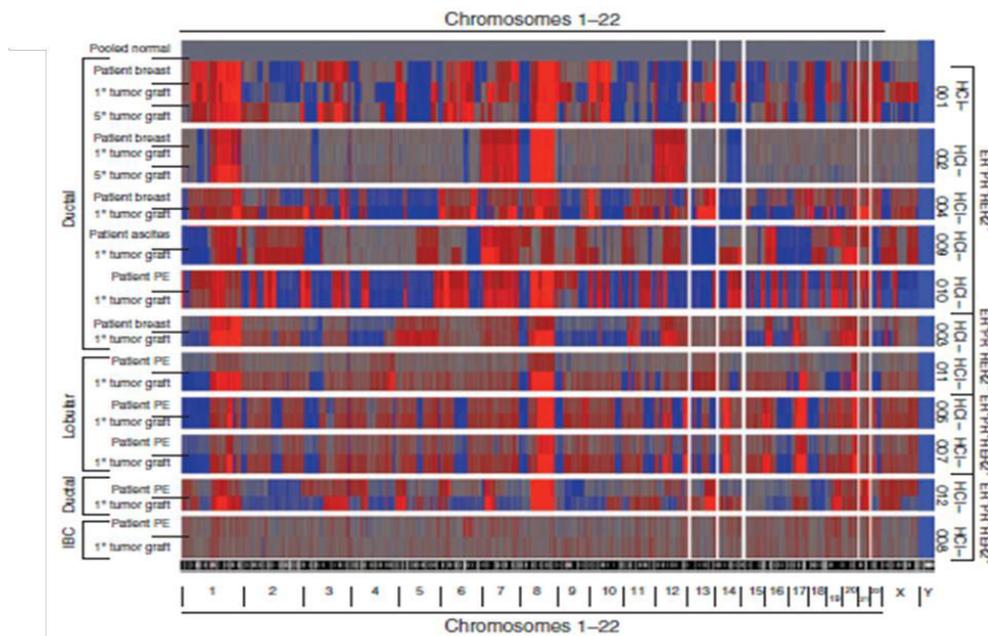


Figure 10 : Etude de la variabilité du nombre de copie par gènes sur le génome entier. A gauche sont indiquées les tumeurs ainsi que les PDX associées après 1 et 5 passages, noté 1^o et 5^o respectivement, avec leur origine lobulaire, canalaire, PE pour « pleural effusion » et IBC pour « inflammatory breast cancer ». A droite, les sous-types tumoraux sont identifiés. En bas, la légende représente les différents chromosomes de 1 à 22, et les chromosomes X et Y. En gris, le nombre de copie par gène est de deux. Au-delà de deux, il y a une amplification du gène qui est représentée en rouge. En dessous de deux, il y a une délétion d'un gène représentée en bleu (DeRose et al., 2011).

Enfin, certaines PDX ont l'avantage d'avoir un très fort taux de prise de greffe pouvant aller jusqu'à 80% pour les cancers du côlon alors que celui des xénogreffes issues de cultures cellulaires *in vitro* est faible, aux alentours de 5%. Cette capacité permet d'avoir plus rapidement accès aux modèles de PDX (Dangles-Marie et al., 2007).

3.5.3 Etablissement des PDX

Les PDX dérivent de fragments de tumeurs de patients prélevés lors de l'exérèse chirurgicale de leur tumeur qui sont implantés sur des souris immunodéficientes. Plusieurs souches de souris possédant différents degrés d'immunodéficiences sont utilisées pour mettre en place des modèles de xénogreffes. Ici nous parlerons essentiellement des souris nude (*nu/nu*), caractérisées par l'absence de thymus et une forte altération de la maturation des lymphocytes T (Flanagan, 1966). Les souris SCID (nonobese diabetic-SCID) sont aussi couramment utilisées. Elles sont caractérisées par une absence de lymphocytes B et de lymphocytes T.

Après avoir séparé les tissus nécrotiques des zones tumorales encore vivantes, deux techniques de greffe sont utilisées. La première consiste à découper la tumeur en petits fragments et à les implanter chez la souris. Dans la deuxième technique, les tissus récupérés sont dissociés de manière à obtenir un mélange homogène de cellules cancéreuses isolées. L'avantage de la première technique est que le microenvironnement tumoral et l'architecture tissulaire sont conservés. Cependant la deuxième permet de générer des populations homogènes et évite de développer des sous-clones de population au fil des passages (DeRose et al., 2013).

Tous les sous-types de tumeurs du sein ont pu aujourd'hui être établis en PDX. Cependant, le pourcentage de prise de greffe varie selon le type de tumeur. Plusieurs publications s'accordent à dire qu'il existe une relation entre le pourcentage de prise de greffe et l'agressivité de la tumeur (DeRose et al., 2011). Par exemple, le sous-type triple négatif, connu pour son agressivité, possède un pourcentage de prise de greffe élevé : autour de 30% selon les publications. Le sous-type luminal, cancer généralement moins agressif possède un pourcentage de prise de greffe aux environs de 4% selon les publications (Marangoni et al., 2007), même après traitement aux œstrogènes (Kabos et al., 2012). Par ailleurs les luminales A sont plus difficiles à obtenir que les luminales B. Cet effet est probablement lié à leurs niveaux de prolifération (marquage Ki-67) : les luminales B, qui prolifèrent plus vite, ont un taux de prise de greffe plus élevé que les luminales A. De plus, les tumeurs métastatiques, qui sont souvent de plus haut grade que les tumeurs primitives, ont un pourcentage de prise de greffe plus important (DeRose et al., 2011).

Une des techniques pour améliorer le pourcentage de prise de greffe est de traiter les souris aux œstrogènes. Cela est même indispensable dans le cas des tumeurs luminales. De façon plus surprenante, il a été démontré que cette technique améliorerait aussi le pourcentage de prise de greffe des tumeurs triple négatives (Zhang et al., 2013). D'autres techniques ont été essayées comme l'humanisation du microenvironnement par injection de fibroblastes immortalisés humains dans les coussinets adipeux (situés entre les omoplates ou dans la région inguinale). Cependant, les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'effet bénéfique significatif (Zhang et al., 2013). L'ajout de cellules souches humaines mésenchymateuses avec la tumeur au moment de la greffe n'a pas non plus réussi à améliorer significativement le taux de prise de greffe. En revanche, ceci contribuerait à maintenir le phénotype de la tumeur, sa densité vasculaire et à réduire la nécrose (DeRose et al., 2013).

La vitesse de croissance tumorale varie de façon conséquente entre les différents types de tumeurs. Lorsque le volume atteint 2000 mm³ (limite éthiquement acceptable en France), les tumeurs sont excisées, coupées en petits fragments et réimplantées dans une autre souris, ou congelées. Cette nouvelle transplantation appelée « passage », ainsi que la congélation, permettent de perpétuer les tumeurs de façon indéfinie. Si la tumeur initiale prend, elle est définie comme P0. Il faut généralement attendre jusqu'à P3 pour confirmer l'établissement des PDX et commencer les expériences de sensibilité aux drogues.

La greffe peut être faite de façon orthotopique, le greffon est alors implanté dans la zone anatomique qui correspond à celle de la tumeur d'origine chez l'Homme, ou hétérotopique, le greffon étant alors implanté en sous-cutané ou dans des coussinets adipeux.

3.5.4 Modélisation de la maladie cancéreuse par les PDX

Comme décrit ci-après, les PDX permettent de reconstituer expérimentalement les étapes critiques du cancer. Elles permettent de former une tumeur primitive localisée, capable d'envahir les tissus avoisinants, et de métastaser à distance. Comme chez le patient, les PDX reproduisent la réponse ou la résistance innée ou acquise au traitement. Les PDX ont aussi démontré leurs utilités dans la recherche sur les cellules souches présentes dans les tumeurs ainsi que sur le microenvironnement (étude du développement de la vascularisation et influence du système immunitaire).

Les PDX sont utilisées pour évaluer l'efficacité anti-tumorale des principes actifs. Le traitement peut avoir pour effet une régression de la masse tumorale, partielle ou complète, une stabilisation de la taille de la tumeur ou une résistance totale au traitement. Cette dernière est caractérisée par l'absence d'effet de la molécule sur la croissance de la tumeur. La régression des tumeurs lors du traitement peut être suivie d'une récurrence, essentiellement locale. Ainsi, les PDX modélisent les différents types de réponse aux traitements observés en clinique.

Les PDX permettent l'étude des mécanismes de résistance *de novo* ou acquise. Par exemple, des tumeurs luminales initialement sensibles au tamoxifène sont greffées sur dix souris. Certaines de ces tumeurs développent une résistance au traitement. Leur transcriptome est comparé à celui des tumeurs sensibles. Cette étude comparative a permis de mettre en évidence le rôle de la voie PI3K dans la résistance. Ainsi, la combinaison de fulvestrant et de l'évérolimus, inhibiteur de PI3K, a permis la régression de ces tumeurs résistantes au tamoxifène (Cottu et al., 2014).

Les PDX peuvent aussi être utilisées pour reproduire la dissémination métastatique. Il a été démontré que suite à l'implantation d'une tumeur dans une souris immunodéficiente, celle-ci pouvait développer ou non des métastases dans les ganglions lymphatiques, thoraciques et mésentériques mais aussi dans les poumons, les os, le thymus et le péritoine (DeRose et al., 2011). Le but est de trouver des molécules capables de bloquer leur formation. Par ailleurs, chez l'Homme, la similarité entre la tumeur d'origine et les métastases est globalement forte mais des mutations peuvent s'ajouter et changer la réponse au traitement (Bertucci et al., 2016). Les PDX permettent de suivre l'évolution clonale des métastases, de les comparer à la tumeur d'origine et de tester les différences de sensibilité au traitement. Pour suivre le développement des métastases mais aussi la vascularisation des tumeurs, des techniques d'imagerie *in vivo* ont été développées.

Les PDX peuvent servir à identifier les cellules souches cancéreuses qui seraient à l'origine de la résistance et de la récurrence. Ces cellules souches cancéreuses sont caractérisées par une forte expression de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) (Charafe-Jauffret et al., 2009) et un phénotype CD44+CD24- (de Beca et al., 2013). Par exemple, de manière à suivre les cellules souches du cancer du sein *in vivo*, des cellules CD44+ ont été transformées de manière à exprimer une protéine fluorescente ou luminescente (la luciférase). Un suivi des tumeurs plus ou moins riches en CD44+ a permis de mettre en évidence que les tumeurs riches en CD44+ sont capables de former plus de métastases (Liu et al., 2010). De plus, les PDX permettent l'identification de nouveaux marqueurs de cellules souches résistantes à l'A/C comme SSEA4 (stage-specific embryonic antigen-4) (Aloia et al., 2015).

Dans certains cas, les PDX permettent l'étude du métabolisme de la tumeur, qui est similaire à celui de la tumeur d'origine. Par exemple, le métabolisme de la choline étant conservé entre la PDX et l'échantillon du patient, une étude a permis de mettre en évidence que la choline était métabolisée de façons différentes selon les différents types de cancer (Moestue et al., 2010).

Enfin, l'existence de différentes souches de souris immunodéficientes permet aussi d'étudier l'impact du système immunitaire sur sa participation dans la réponse au traitement comme nous le verrons plus tard dans le paragraphe 4.4.

3.5.5 Utilisation des PDX en thérapeutique clinique

La pertinence de l'utilisation de ce modèle à visée préclinique réside dans la similitude des PDX avec les tumeurs d'origine, notamment dans leur réponse aux agents thérapeutiques. De telles données existent mais leur nombre reste limité : quelques équipes ont présenté des données montrant une concordance. Par exemple, douze PDX sur treize ont montré une résistance aux traitements comme en clinique (Zhang et al., 2013). Sur des modèles triple-négatifs, une correspondance a pu être retrouvée chez 5 tumeurs sur 7 (Marangoni et al., 2007). Ces résultats étant aussi valables sur d'autres types de tumeurs (Topp et al., 2014), les PDX peuvent donc être utilisées comme modèle préclinique. La difficulté d'évaluer correctement cette corrélation tient à la complexité des traitements en clinique, associant chimiothérapie-chirurgie et radiothérapie, de sorte qu'il est parfois difficile de savoir lequel d'entre eux a agi et a entraîné la réponse au traitement.

Néanmoins, la caractérisation des PDX (mutations, nombre copie d'un gène, SNP) permet d'établir le degré de similitude entre le profil moléculaire et le type de réponse à une molécule donnée. Ainsi, les voies responsables d'une réponse ou d'une résistance au traitement peuvent être identifiées. Cette méthode permet de découvrir des biomarqueurs qui permettraient de définir les populations qui pourraient bénéficier d'un traitement donné.

De plus, les analyses comparatives de transcriptomes avant et après traitements peuvent aussi être menées sur des PDX et permettre d'identifier des voies de signalisation altérées, sur- et sous-exprimées (Legrier et al., 2016). Ces études aident à la compréhension des mécanismes de réponse ou de résistance au traitement mis en place dans la tumeur. Ces résultats peuvent conduire à la découverte de nouvelles stratégies de ciblage et au développement de nouvelles molécules.

Les PDX sont aussi utilisées pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules en monothérapie ou en combinaison avec des chimiothérapies utilisées en clinique pour accompagner leur développement en pharmaco-oncologie. Ces modèles peuvent servir à identifier la molécule la plus efficace dans la régression tumorale ou à étudier les effets de dose et de protocole d'administration. Cette molécule peut être comparée à celles utilisées dans les chimiothérapies plus courantes.

Les PDX étant chacune caractérisées par des mutations qui leurs sont propres, elles peuvent aussi servir de base pour le screening d'une drogue (mouse trial). Ainsi, des mutations associées à une bonne réponse au traitement peuvent être mises en évidence et avoir une influence sur le recrutement des patients lors de la mise en place des essais cliniques par la suite.

Ainsi, les informations apportées par les PDX ainsi que par les échantillons cliniques permettent des échanges d'informations considérables dont le but est de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques ou de nouveaux biomarqueurs comme illustré dans la figure 11.

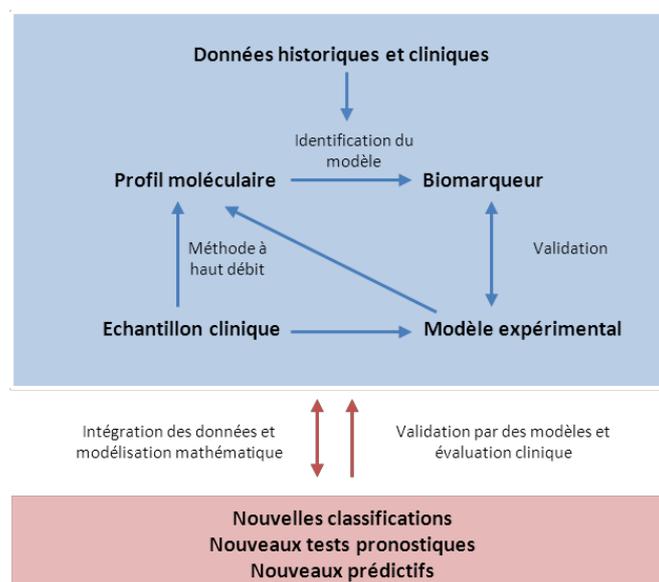


Figure 11 : Illustration des différentes interactions entre les échantillons cliniques et les modèles expérimentaux. Adapté de (Podo et al., 2010).

3.5.6 Limitation

Le taux de prise de greffe étant très variable (de 1 à 80% selon le type de tumeur), les panels de PDX ne représentent que partiellement l'ensemble des cancers. Par exemple, les tumeurs luminales, qui représentent 80% des cancers du sein chez la femme, sont mal représentées en raison de leur faible taux de prise de greffe (Siolas and Hannon, 2013). Dans le côlon, par contre, les tumeurs sont très bien représentées car leur taux de prise de greffe est de 80%.

Concernant les métastases des PDX, il est difficile de corréliser leur localisation chez la souris et chez le patient. En effet, les souris peuvent présenter plus de métastases que le patient, avec la même tumeur. Cela a été le cas pour une tumeur primaire du sein qui a formé des métastases dans les ganglions lymphatiques chez la patiente alors que chez la souris des métastases se sont développés

dans le thymus, les poumons, les os et le péritoine (DeRose et al., 2011). Plus fréquemment, les PDX sont moins métastatiques que la tumeur du patient. Il est possible que cette difficulté soit liée au temps de survie de la souris qui est très inférieur au temps d'apparition des métastases chez l'humain.

De plus, le remplacement progressif du stroma humain par du stroma d'origine murine, phénomène qui se produit au cours de la croissance de la xénogreffe, pourrait générer des changements encore peu connus (DeRose et al., 2011). En effet, le stroma murin sécrète des cytokines qui peuvent être différentes de celles sécrétées par le stroma humain.

Comme nous le verrons plus bas, le système immunitaire joue un rôle important dans la réponse au traitement. Or les souris utilisées pour les PDX sont immunodéficientes pour éviter le rejet du greffon (Finak et al., 2008). Ce système immunitaire incomplet peut engendrer des différences de réponse entre le patient et le modèle. Les souris NSG (*NOD/SCID/IL2Rγ^{-/-}*), les plus immunodéficientes (absence de lymphocyte T, lymphocyte B et de NK) ne sont donc pas utilisées pour prédire la réponse aux traitements.

Par ailleurs, le métabolisme de la souris étant différent de celui de l'Homme cela peut changer l'activité d'un principe actif qui a besoin d'être métabolisé par l'organisme.

Enfin, un dernier argument est le coût : les PDX sont maintenues sur des souris coûteuses. De plus, les techniques de passages demandent plus de temps et de matériel qu'un simple passage de cellules *in vitro*.

3.6 Chimiothérapie : dommages de l'ADN et réponse thérapeutique

La chimiothérapie induit de nombreux dommages notamment des cassures simple brin ou double brin d'ADN. Une réponse adaptée face à ces altérations est indispensable au maintien de l'intégrité du génome. Elle implique la détection et la signalisation des lésions ainsi que l'enclenchement de trois mécanismes : l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et/ou la mort cellulaire. En effet, si les dommages de l'ADN sont trop importants, ou les mécanismes de réparation trop peu efficaces, des voies alternatives se mettent en place et entraînent la mort de la cellule.

3.6.1 Détection et signalisation des lésions de l'ADN

La protéine ATM se présente sous forme de dimère lorsqu'elle est inactive. Après l'induction de cassures double brin d'ADN, celle-ci s'autophosphoryle sur le résidu sérine en position 1981, entraînant la séparation du dimère (Bakkenist and Kastan, 2003). Le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) détecte les cassures double brin d'ADN et permet la phosphorylation de ATM. Rad50 se fixe à l'ADN ; Nbs1 recrute les protéines de réparations aux cassures double brin d'ADN tels que 53BP1 (p53 binding protein), BRCA1 et MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint) ; et Mre11 coupe l'ADN de manière à créer des extrémités 3' protubérantes et commencer la réparation de l'ADN. Comme nous le verrons par la suite, Mre11 fait aussi partie des détecteurs d'ADN cytoplasmique capable d'induire l'expression des IFN de type I en plus de son implication dans les mécanismes de réparation

de l'ADN. Lorsque ATM est activée, elle phosphoryle Chk2 sur le résidu 68 qui est une thréonine (voir figure 12). Chk2 est un point de contrôle important pour l'initiation des réparations des dommages de l'ADN et pour le contrôle du cycle cellulaire.

La protéine ATR (ataxia telangectasia and Rad3-related protein) s'active lorsqu'elle détecte des cassures simple brin d'ADN. Elle est recrutée et activée lorsqu'elle est associée à son partenaire ATRIP (ATR Interacting protein) qui se lie directement à l'ADN simple brin (Zou and Elledge, 2003). La protéine ATR phosphoryle alors Chk1 (checkpoint kinase 1, Chk1) sur les résidus sérine 317 et sérine 345 (voir figure 12). Comme Chk2, Chk1 est aussi un point de contrôle pour l'activation des réparations de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. Il est à noter que lors de cassures double brin d'ADN, la voie de signalisation ATR-Chk1 peut aussi s'activer car la réparation de ces cassures passe par la création d'ADN simple brin. Dans ce cas, les deux voies de signalisation ATR-Chk1 et ATM-Chk2 sont souvent actives au même moment (Huang et al., 2008).

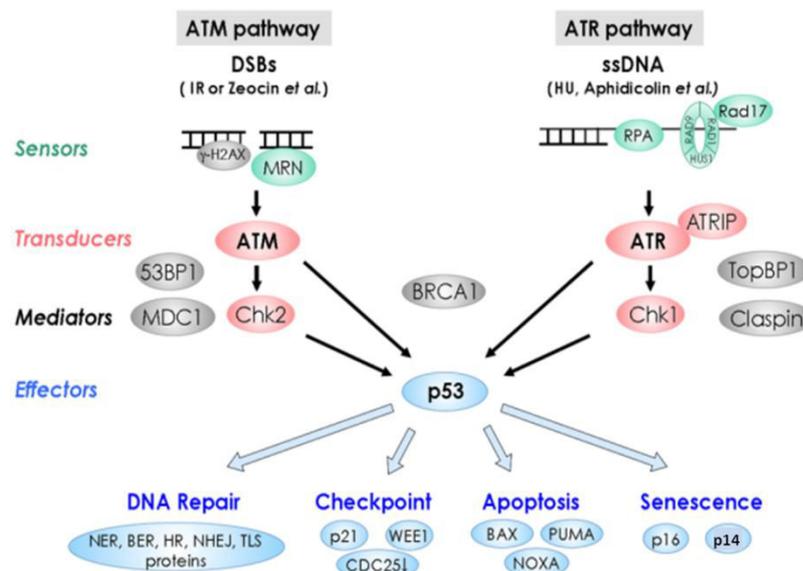


Figure 12 : Mécanismes mis en place après cassures de l'ADN. Lors des cassures double brin d'ADN (DSB), le complexe MRN, composé de MRE11, RAD50 et NBS1, reconnaît les sites de lésions et permet la phosphorylation de la protéine ATM. Cette dernière phosphoryle ensuite i) H2AX qui recrute alors des protéines (53BP1 et MDC1) pour maintenir le complexe et ii) Chk2. Lors de cassures simple brin (ssDNA), l'ADN est protégé par les protéines RPA (replication protein A) ce qui attire ATRIP qui active ATR qui phosphoryle Chk1. ATM/Chk2 et ATR/Chk1 activent p53 qui induit des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire, de réparation de l'ADN ou de mort cellulaire (Meek, 2009).

Un élément clé permettant l'activation de ces voies de signalisation de dommages de l'ADN est la présence de la protéine H2AX phosphorylée : γ H2AX. H2AX fait partie des histones qui, enroulé par de l'ADN forme un nucléosome (figure 13). Chaque nucléosome est composé de quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Plusieurs variantes de la protéine H2A existent, dont H2AX qui est caractérisée par une partie C-terminale très conservée entre les espèces, notamment la sérine en position 139 et la glutamine en 140. La phosphorylation de cette sérine est caractéristique du variant γ H2AX (Rogakou et al., 1998). H2AX a aussi la particularité d'être répartie de façon aléatoire dans toutes les histones de l'ADN et sa phosphorylation entraîne un remodelage de la chromatine permettant l'interaction avec de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Rogakou et al., 1998).

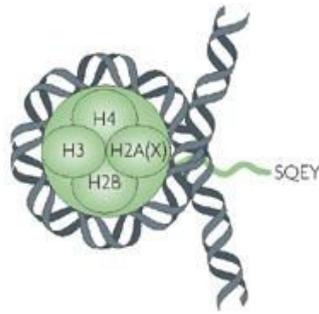


Figure 13 : Schéma d'un nucléosome composé d'un groupe d'histones (H2AX, H2B, H3 et H4) enroulé par de l'ADN. La queue carboxy-terminale SQEY (Serine, Glutamine, Acide glutamique, Tyrosine) contient la sérine 139 qui se phosphoryle suite à l'induction de cassures double brin d'ADN (Rogakou et al., 1998).

Les protéines ATM et ATR ainsi que la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) sont responsables de la phosphorylation de l'histone H2AX (Burma et al., 2001; Kobayashi et al., 2002; Ward and Chen, 2001). De nombreuses protéines de réparation de l'ADN ou de contrôle du cycle cellulaire se fixent à γ H2AX. L'importance de γ H2AX a notamment été mise en évidence par des expériences de *knockout* chez la souris *H2AX*^{-/-} dont les cellules ne sont plus capables de recruter aux sites de cassures de l'ADN les protéines Nbs1, 53BP1 et BRCA1. Par conséquent, elles présentent une instabilité chromosomique et des défauts dans la réparation de l'ADN (Celeste et al., 2002). Sa présence apparaît être un élément indispensable pour enclencher le mécanisme de réparation de l'ADN si bien que l'histone γ H2AX est reconnu comme indicateur de cassures simple ou double brin d'ADN et est utilisé ici (partie résultat) pour vérifier l'effet des drogues (Burma et al., 2001; Kuo and Yang, 2008; Ward et al., 2004). Il est à noter que les foci observés dans le noyau d'une cellule par immunofluorescence correspondent à autant de cassures d'ADN dans ce noyau (Sedelnikova et al., 2002). La protéine 53BP1 est par ailleurs utilisée pour identifier de façon spécifique les cassures double brin d'ADN car il ne contribue qu'au mécanisme de réparation de celles-ci (Morales et al., 2003).

ATM, ATR, Chk1 et Chk2 induisent l'activation de p53. Le gène Tp53 est un gène suppresseur de tumeurs très impliqué dans la biologie des cancers. Les mutations de ce gène sont fréquentes et ne dépendent pas d'un sous-type de cancer du sein particulier. Par exemple, comme illustré dans la figure 14 ci-dessous, parmi les luminales A, 13% sont mutées, alors que pour les tumeurs HER2+, le pourcentage monte à 71% et à 82% pour les basal-like.

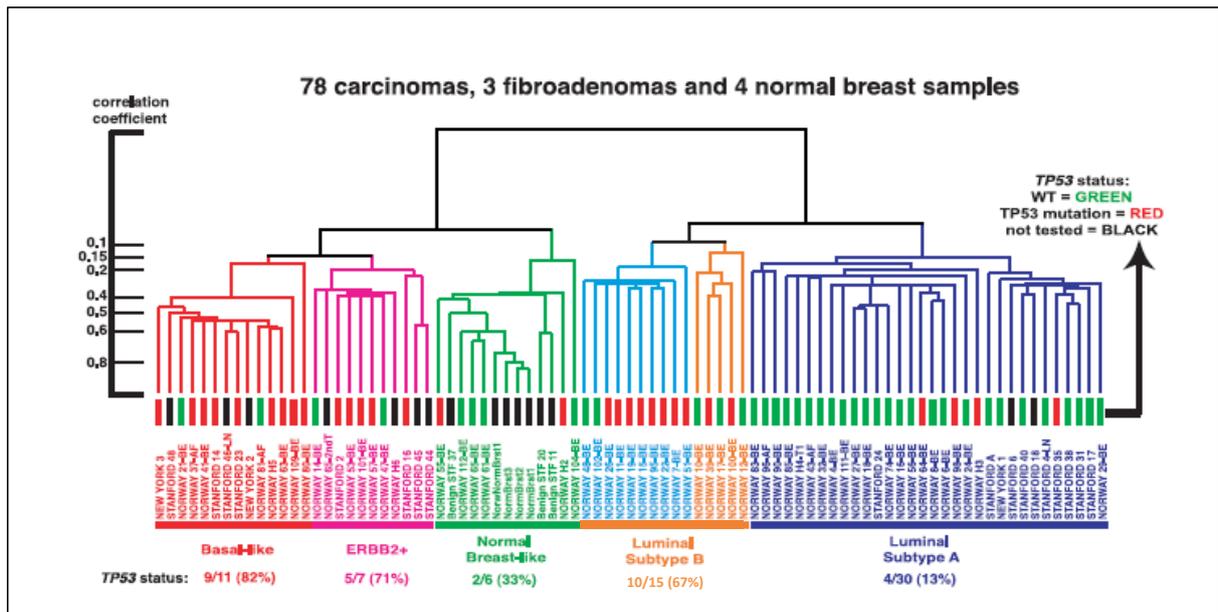


Figure 14: Répartition du statut de p53 selon les sous-types de cancer du sein. En rouge, p53 muté, en vert p53 sauvage, en noir non testé.

Les phosphorylations de p53 mais aussi d'autres modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, l'ubiquitination, la méthylation, la sumoylation et la neddylation qui régulent son activité et sa stabilité, influencent son rôle dans la cellule (Maclaine and Hupp, 2009). Suite aux dommages de l'ADN, p53 induit la transcription d'un certain nombre de gènes qui jouent un rôle important dans la signalisation des voies d'arrêt du cycle cellulaire, de réparation de l'ADN mais aussi d'apoptose ou de sénescence (Lavin and Kozlov, 2007; Shieh et al., 2000). Par exemple, p53 peut induire la transcription de protéines pro-apoptotiques comme BAX, BID, PUMA et NOXA ou peut se lier aux protéines anti-apoptotiques BCL-2 (B-cell lymphoma 2) et BCL-XL dans la membrane externe mitochondriale, contribuant aux mécanismes d'apoptose comme nous le verrons plus loin.

Après avoir revu succinctement les mécanismes du cycle cellulaire et de réparation de l'ADN, nous nous attarderons sur les différentes morts cellulaires induites par la chimiothérapie.

3.6.2 Arrêt du cycle cellulaire et réparation de l'ADN

Il existe quatre points de contrôles lors d'un cycle cellulaire normal qui permettent de passer de l'interphase (G1, S et G2) à la mitose. Pour contrôler le passage dans les différentes phases, des protéines appelées Cdk (kinase cycline dépendante) se lient à des cyclines spécifiques pour être fonctionnelles. La protéine p21, induite par p53 est par exemple impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par inhibition de l'activité de Cdk2 et de Cdk4 (He et al., 2005). De plus, le rôle de p21 a aussi été démontré dans l'arrêt en phase G2 par inhibition de Cdk1 (Smits et al., 2000).

Pendant l'arrêt du cycle cellulaire, des mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place. Les lésions induites par les agents alkylants (type cyclophosphamide) sont des méthylations des bases azotées, des liaisons intra ou inter-brins d'ADN et des cassures double brin. Les inhibiteurs de topoisomérase (type adriamycine) induisent des cassures simple ou double brin.

Pour réparer les cassures simple brin, deux mécanismes existent :

- **Réparation par excision de bases (BER)** : il consiste à enlever la base méthylée créant une cassure simple brin. PARP1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1) et PARP2, accompagnées d'autres protéines permettent de déphosphoryler l'extrémité 3' et de phosphoryler l'extrémité 5' de manière à pouvoir synthétiser le nouveau brin d'ADN soit par ajout d'une simple base, soit par la synthèse de deux à six nucléotides qui vont se chevaucher à l'ADN d'origine (Kutuzov et al., 2014).
- **Réparation par excision de nucléotides (NER)** : ce mécanisme renouvelle entre 17 et 29 oligonucléotides. Il permet surtout de se débarrasser des liaisons intra-brin faites par les agents alkylants bifonctionnels ou le cisplatine.

Si la cellule ne parvient pas à réparer les cassures simple brin causées par les agents alkylants, elles peuvent devenir des cassures double brin (Podhorecka et al., 2010). De plus, les inhibiteurs de topoisomérase II causent directement des cassures double brin. Elles sont réparées par deux mécanismes de recombinaison :

- **Recombinaison homologue (HRR)** : ce mécanisme de réparation est lent car il permet de conserver l'information génétique en s'appuyant sur le brin d'ADN non endommagé. Ce type de réparation n'est donc utilisé qu'en phase S et G2 où les chromosomes possèdent deux chromatides. Suite à la détection des lésions par le complexe MRN, ATM et H2AX se phosphorylent et attirent de nombreuses protéines participant à la réparation. Rad51 et d'autres partenaires sous la dépendance de BRCA1 et BRCA2 se déplacent sur l'ADN. C'est Rad51 qui permet de reconnaître la séquence homologue sur l'autre brin d'ADN. Une fois la chromatide sœur trouvée, l'élongation par complémentarité se fait grâce à une ADN polymérase (figure 15) (Pourquier, 2006).
- **Recombinaison non homologue de l'ADN (NHEJ : non homologous end-joining)** : ce mécanisme permet de réparer rapidement les cassures double brin d'ADN sans conserver l'information génétique. Il peut agir lors de toutes les phases du cycle cellulaire.

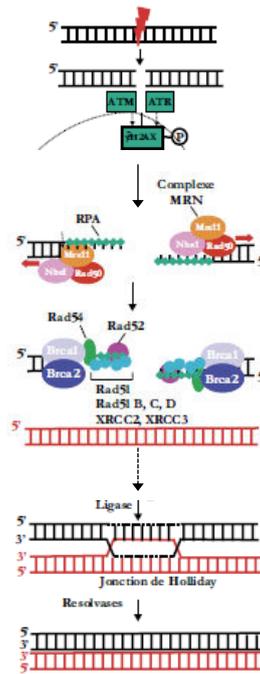


Figure 15: Schéma illustrant les différentes étapes pour la réparation de cassures double brin d'ADN dans les cas d'une recombinaison homologue. Voir texte pour explication (Pourquier, 2006).

La connaissance des mécanismes de réparation de l'ADN aide à mieux évaluer l'impact des drogues sur les cellules ou sur la réponse au traitement d'une tumeur. Par exemple, les inhibiteurs de PARP sont plus efficaces sur des tumeurs BRCA1/BRCA2 mutées. En effet, dans ces tumeurs, les cassures double brin de l'ADN causées par la chimiothérapie ou la radiothérapie ne peuvent pas être réparées par recombinaison homologue à cause de ces mutations. Comme nous l'avons vu auparavant, PARP1 permet la réparation des cassures simple brin. L'ajout d'inhibiteurs de PARP1 aux cellules déjà déficientes dans la réparation des cassures double brin entraîne une accumulation trop importante de lésions et mènent à la mort cellulaire (voir figure 16).

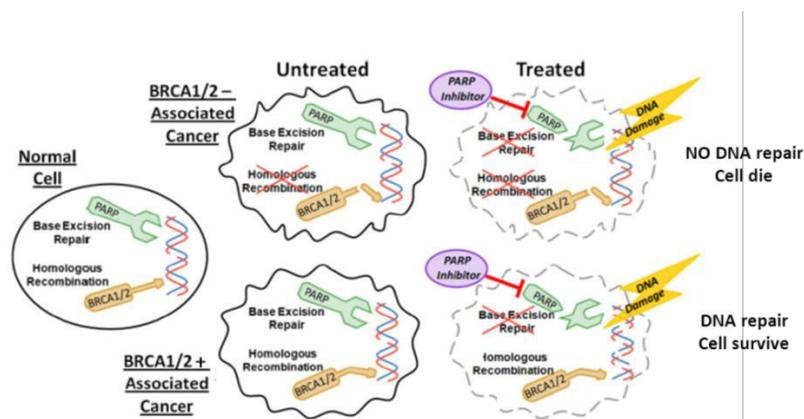


Figure 16 : Devenir des cellules BRCA1/BRCA2 mutées ou non traitées aux inhibiteurs de PARP. Les cellules non tumorales ont la capacité de réparer les cassures simple et double brin d'ADN car leurs mécanismes de réparation BER et HRR sont fonctionnels. Dans une cellule tumorale BRCA1 ou BRCA2 mutée, la HRR n'est plus possible. L'ajout d'inhibiteur de PARP dans ces cellules inhibe le mécanisme de réparation BER. La cellule accumule alors de nombreuses cassures et meurent. Dans le cas de cellules tumorales non BRCA1 ou BRCA2 mutée, l'effet des inhibiteurs de PARP est plus délicat (Ellisen, 2011).

3.6.3 Les différentes formes de mort cellulaire

Après chimiothérapie ou radiothérapie, la cellule ne pouvant réparer son ADN meurt. Cependant selon le degré de détérioration de l'ADN et les mécanismes de réponse mis en place, la cellule peut mourir de différentes façons. Les principaux mécanismes sont exposés ci-dessous : apoptose, nécrose, nécroptose, senescence, et autophagie.

Mort cellulaire par apoptose

La mort cellulaire par apoptose est une mort cellulaire programmée qui est déclenchée par différents stimuli conduisant à l'activation de caspases. Différentes caspases sont mises en jeu. Il existe des caspases initiatrices (caspases 1, 2, 5, 8 à 12), et les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7). Ces caspases sont dans le cytoplasme sous formes inactives. Lorsque les caspases initiatrices s'auto-activent suite à un stimulus apoptotique, elles clivent les caspases effectrices, les rendant ainsi actives et entraînent la mort de la cellule.

Deux voies peuvent activer l'apoptose. La voie extrinsèque (figure 17) est déclenchée par la fixation de ligands (TRAIL, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, CD95L, FasL) appartenant à la superfamille des TNF (tumor necrosis factor) aux récepteurs de mort associés. Ces récepteurs possèdent du côté cytoplasmique un domaine de mort appelé DD (death domain). Ce domaine interagit alors avec le domaine DD aussi présent sur la protéine adaptatrice appelée FADD (Fas Associated Death Domain). Cette dernière possède de plus un domaine DED (death effector domain) qui permet de faire le lien avec la caspase 8 initiatrice via la formation du complexe DISC (Death Inducing Signalling complex).

La voie intrinsèque (figure 17) est activée en réponse à des signaux intracellulaires : dommages de l'ADN, présence de cytokines, hypoxie liée à un stress, ou dérégulation de signaux contrôlant le cycle cellulaire. Cette voie passe par un déséquilibre de la membrane externe mitochondriale. BCL-2, protéine anti-apoptotique, peut être inhibée par p53 ou des protéines comme BAD possédant un domaine BH3 unique, libérant ainsi BAX et BAK qui peuvent s'homodimériser et permettre le relargage des cytochromes-c dans le cytoplasme. La présence de ces cytochromes-c dans le cytoplasme entraîne l'activation des caspases 9 initiatrices qui activent ensuite les caspases effectrices 3, 6 et 7 et induisent la mort cellulaire. La régulation de l'apoptose par cette voie est finement régulée : BCL-2 peut se lier à BAX et BAK empêchant ainsi le relargage des cytochromes dans le cytoplasme. Les protéines IAP (inhibitor of apoptosis) qui contrôlent l'activation des caspases 3 et 7 permettent aussi de réguler l'apoptose.

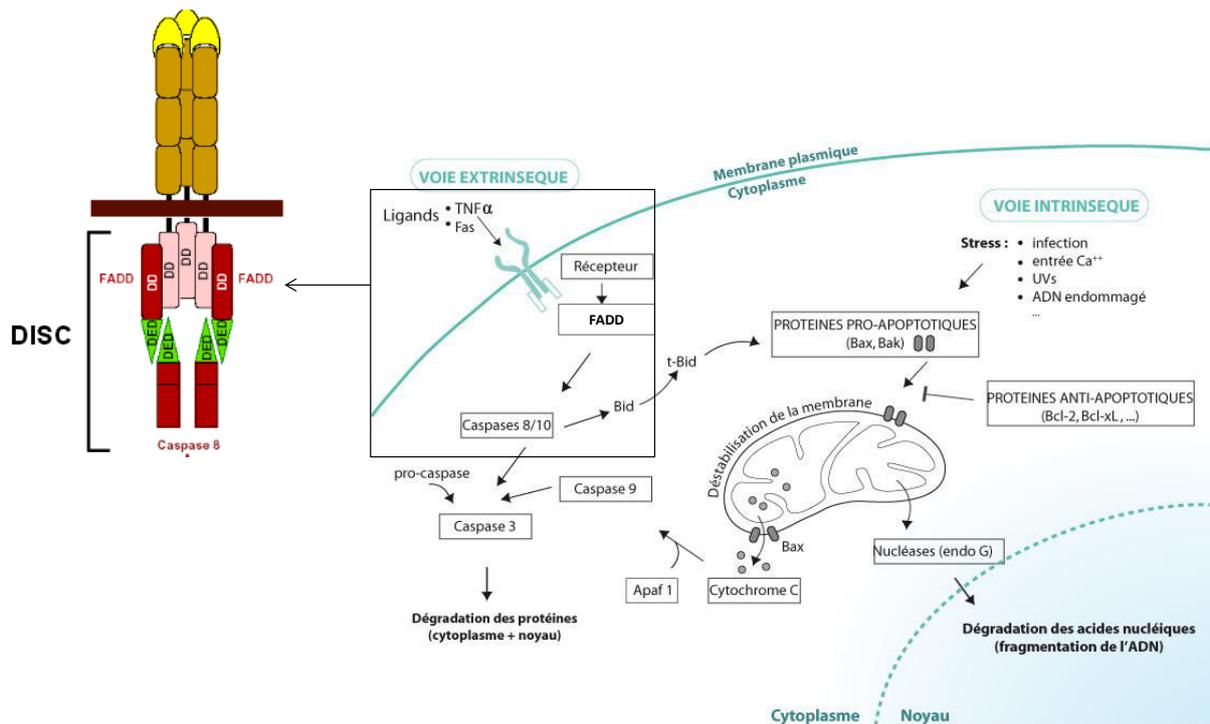


Figure 17 : Mécanisme d'activation de l'apoptose par les voies intrinsèques et extrinsèques. Voir texte pour explication. Adapté de http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction

Lorsque le mécanisme d'apoptose est déclenché, la chromatine est fragmentée à l'aide de DNase. Le noyau et le cytoplasme se condensent puis les cellules commencent à se fragmenter pour créer des corps apoptotiques qui seront ensuite phagocytés par des macrophages. Cette mort cellulaire est typiquement non inflammatoire (Huynh et al., 2002). Cependant, il a récemment été démontré que les cellules apoptotiques peuvent signaler le danger à d'autres cellules voisines. En effet, les corps apoptotiques qui ne sont pas phagocytés peuvent relâcher leurs contenus dans le milieu extracellulaire créant ainsi une inflammation. De plus, l'apoptose peut déclencher une inflammation par l'intermédiaire de BAX et BAK qui permettent le relargage dans le cytoplasme de cytochromes-c mais aussi de l'ADN mitochondrial, capable d'enclencher des mécanismes inflammatoires que nous décrivons par la suite (Kenney et al., 2014).

L'apoptose est un processus qui requiert beaucoup d'énergie sous forme d'ATP, il faut donc une fonction mitochondriale optimale pour fournir l'ATP nécessaire. Si la cellule ne possède pas suffisamment d'ATP, d'autres mécanismes de mort se mettent en place.

Mort cellulaire par sénescence

Les cellules en sénescence sont des cellules viables en arrêt du cycle cellulaire, souvent en phase G1, lié au manque d'acide nucléique. Elles sont caractérisées par un changement morphologique : les cellules sont plus larges, plus plates, et riches en vacuoles. Elles surexpriment un certain nombre de gènes dont p53, p21, p14, p16, p15, pRb (protéine du rétinoblastome) ou des marqueurs de dommages à l'ADN comme H2AX. Elles sont identifiables grâce à un test colorimétrique qui consiste à mesurer le taux d'enzyme lysosomale β -galactosidase qui est plus élevé dans les cellules sénescents, les rendant bleues (Kurz et al., 2000).

Généralement, la sénescence intervient lorsque les cellules vieillissent et que leurs télomères raccourcissent. Lors d'une chimiothérapie, les génotoxiques induisent une sénescence prématurée. Comme nous l'avons vu plus haut, les cassures d'ADN activent ATM/ATR et Chk1/Chk2 qui induisent la phosphorylation et la stabilisation de p53. De plus, p14^{ARF} et p16^{ARF} sont aussi capables de stabiliser p53 en séquestrant HDM2 (MDM2) (Llanos et al., 2001). Lorsque la protéine p53 est activée, elle induit l'expression de p21 qui cause l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant l'action des Cdk. L'origine de l'augmentation de la transcription de p16 est encore mal connue mais son augmentation contribue aussi à l'arrêt du cycle cellulaire par inhibition des Cdk. Les protéines p16 et p21 vont inhiber la phosphorylation de pRb qui contrôle l'entrée en phase S (Li et al., 1994).

Cet état de sénescence prématurée peut aussi se produire lorsque p53 est mutée, sans l'action de p21 (Chang et al., 2002). Selon le type cellulaire, il faudrait inhiber la voie p53-p21-pRb et/ou p16-pRb pour empêcher l'entrée en sénescence des cellules (Kong et al., 2011).

Mort cellulaire par autophagie

L'autophagie se caractérise par la dégradation d'organites présents dans une cellule par l'intermédiaire d'autophagosomes qui fusionnent à des lysosomes. Généralement ce mécanisme intervient lorsque les organites sont défectueux ou pour s'adapter à un nouvel environnement (comme une déprivation en ATP par exemple). Dans le cas des cellules cancéreuses, l'autophagie peut être considérée comme un autre mécanisme de mort cellulaire programmée. Cette conception semble être controversée. Cependant, il apparaît concevable d'imaginer qu'une activation constitutive de l'autophagie entraîne la mort cellulaire. Par exemple, suite à un traitement par de l'étoposide dans une cellule déficiente en BAX ou BAK, la mort cellulaire par apoptose est bloquée. La cellule induit alors la surexpression des protéines ATG5 (autophagy protein) et ATG6 stimulant une mort par autophagie (Shimizu et al., 2004).

Mort cellulaire par nécrose et nécroptose

Au contraire de l'apoptose, la nécrose est une mort cellulaire accidentelle. Suite à la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire, le contenu de la cellule se déverse, attirant le système immunitaire. La nécroptose est une nécrose programmée qui se caractérise par l'ouverture de pores sur la membrane des mitochondries, ce qui perturbe le potentiel membranaire de celles-ci. L'ATP n'est donc plus produit, la cellule n'a pas l'énergie suffisante pour créer des corps apoptotiques. Dans ce cas de figure aussi, une réaction inflammatoire est déclenchée.

Comme nous venons de le voir, les mécanismes de nécrose, nécroptose, sénescence et parfois l'apoptose sont capables d'induire des réactions inflammatoires : on appelle cela une mort immunogène.

3.6.4 Conclusion

Comme nous l'avons vu dans cette première partie de l'introduction, l'essentiel des traitements anti-tumoraux vise à induire des cassures de l'ADN pour déstabiliser l'intégrité du génome. Pour mieux comprendre la réponse à la chimiothérapie, les mécanismes de réparation de l'ADN, de régulation du cycle cellulaire ou de mort cellulaire par les cellules sont des phénomènes qui ont bénéficié d'études

très approfondies. Cela a d'ailleurs permis de mettre au point de nouveaux traitements, comme les inhibiteurs de PARP. Cependant, au cours de ces dernières années, des éléments se sont accumulés en faveur du rôle déterminant joué par le système immunitaire dans la réponse au traitement ou dans le développement de récurrences. Des parallèles entre les mécanismes impliqués dans les réponses anti-infectieuses (bactérienne, virale) et la lutte de l'organisme contre les tumeurs ont été mis en évidence. De manière plus précise, l'implication du système interféron dans l'évolution du cancer du sein en réponse aux traitements est devenue une évidence, même si les mécanismes mis en jeu et les conséquences exactes de l'activation de cette voie de signalisation demeurent mal connus. Mon projet de thèse ayant contribué à mieux comprendre cet aspect de la réponse tumorale, le système interféron va maintenant être présenté.

4. Le système IFN

En 1957, Isaacs et Lindenmann découvrent les IFN dans des embryons de poulet (CAM) infectés par le virus de la grippe (Isaacs and Lindenmann, 1957). Pour produire de l'IFN humain, des globules blancs étaient mis en contact avec des virus. Dès 1978, des progrès conséquents sont réalisés concernant sa purification, mais les quantités obtenues restent souvent très faibles. Grâce aux progrès de la biochimie et de la biologie moléculaire, la production d'IFN humain de différents sous-types par voie recombinante est devenue possible, permettant l'étude approfondie des différents IFN (Pestka, 2007).

Les IFN sont connus pour leurs propriétés antivirales et antibactériennes grâce à leur capacité d'activer le système immunitaire. De façon similaire, il semble que les IFN soient aussi impliqués dans l'activation du système immunitaire dans un contexte tumoral. Grâce à ces diverses capacités, les IFN sont au centre des intérêts scientifiques et sont présentés dans les paragraphes suivants.

4.1 Les acteurs moléculaires de la signalisation IFN

Les IFN font partis de la grande famille des cytokines hématopoïétiques. Ce sont des molécules solubles sécrétées par les cellules du système immunitaire, le plus souvent, suite à une infection virale/bactérienne ou à la présence de cellules cancéreuses ou endommagées. De manière générale, les cytokines permettent la communication entre les cellules immunitaires et non immunitaires. Ces cytokines, qui participent à l'hématopoïèse et à la réponse immunitaire, peuvent agir par des voies autocrines, paracrines ou endocrines. Selon les caractéristiques moléculaires intrinsèques de leurs récepteurs respectifs, on distingue les cytokines hématopoïétiques de type I et de type II ; les IFN appartiennent à cette seconde catégorie (Renauld, 2003). Il en existe de nombreux sous-types qui seront décrits plus loin.

4.1.1 Les récepteurs de cytokines hématopoïétiques

Les récepteurs de cytokines hématopoïétiques ont été identifiés à la fin des années 80 (Bazan, 1989; Bazan, 1990). Ce sont des récepteurs à simple domaine transmembranaire, dont la partie N-terminale est extracellulaire et la partie C-terminale intracellulaire. Sur la base de motifs structuraux conservés, ils ont défini une nouvelle famille qui s'est enrichie jusqu'à compter aujourd'hui près d'une cinquantaine de membres, dont les plus canoniques sont représentés sur la figure 18 (Boulay et al., 2003; Renauld, 2003). Tous partagent un domaine extracellulaire comprenant au moins un motif structural appelé « fibronectine de type III ». Une caractéristique commune de ces récepteurs est de former des complexes protéiques constitués de plusieurs chaînes transmembranaires, identiques ou non, dont certaines peuvent être communes à plusieurs récepteurs, définissant ainsi différentes sous-classes. On distinguera ainsi les récepteurs de cytokine de type I et de type II.

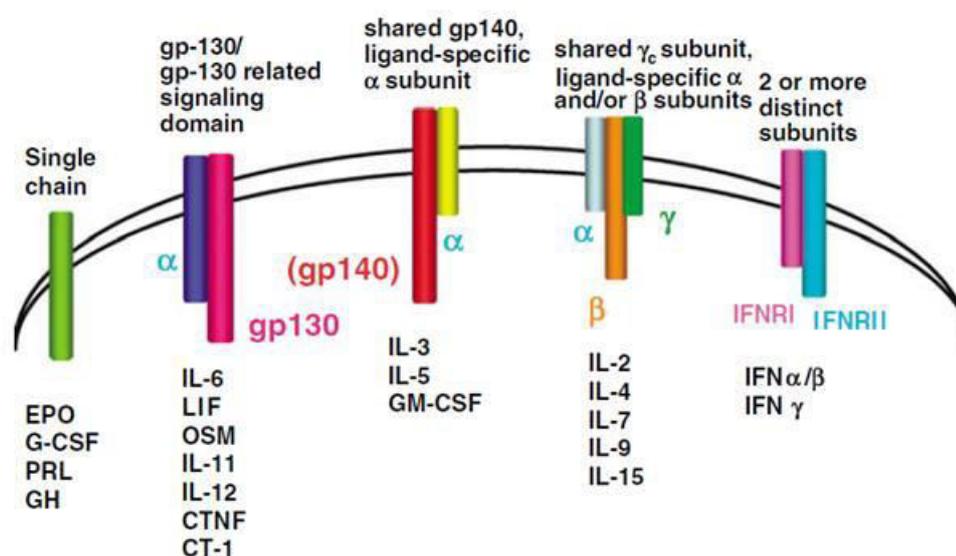


Figure 18: Représentation schématique des différentes familles de récepteurs de cytokines hématopoïétiques. La structure des 5 familles est représentée avec les ligands associés. Adapté de (Baker et al., 2007).

Récepteurs de cytokines hématopoïétiques de type I

Ils se caractérisent notamment par la présence de deux paires de cystéines, d'un motif Trp-Ser-X-Trp-Ser (ou motif WS) dans le domaine extracellulaire, et de boîtes d'homologie dans le domaine intracellulaire, dont la boîte 1, région riche en prolines essentielles pour la transmission du signal. Quatre familles appartiennent à ce type de récepteurs :

- **La famille des récepteurs à chaîne unique** comprend les récepteurs de l'hormone de croissance (GH), de l'érythropoïétine (EPO), de la prolactine, du granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) et de la thrombopoïétine (TPO). Ces récepteurs s'homodimérisent, et leur signal est transmis principalement par JAK2 et STAT5 (voir plus loin pour la description de la voie JAK/STAT).
- **La famille gp130**, dont les récepteurs sont composés de la chaîne β, commune à cette famille, appelée gp130 (glycoprotéine de 130 kDa) et d'une chaîne α spécifique de chaque

ligand. Elle comprend les récepteurs aux IL-6, -11, -12, -13 ainsi que les récepteurs des cytokines oncostatine (OSM), leukemia-inhibitory factor (LIF) et la leptine. Ils sont le plus souvent associés avec JAK1 et JAK2 et activent principalement STAT3, mais aussi STAT4 et STAT1.

- **La famille du récepteur de l'IL-3**, dont les récepteurs utilisent la sous-unité β commune dénommée gp140 (glycoprotéine de 140 kDa) pour transmettre le signal et une sous-unité alpha pour fixer le ligand. Elle comprend les récepteurs des IL-3, IL-5 et GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Ils interagissent avec JAK2 et phosphorylent essentiellement STAT5 (Itoh et al., 1990).
- **La famille du récepteur de l'IL-2**, dont les récepteurs possèdent trois sous-unités, α , β et γ . La chaîne α permet la fixation du ligand alors que les chaînes β et γ servent à transmettre le signal dans la cellule. Les récepteurs des IL-2, -4, -7, -9, -15, et -21 sont associés à JAK1 et JAK3 et activent STAT5, STAT6 ou STAT3.

Récepteurs de cytokines hématopoïétiques de type II

La famille des récepteurs des IFN transmet le signal via un minimum de deux sous-unités. Elle comprend :

- le récepteur des IFN de type I (IFNAR, récepteur aux IFN alpha): IFN α (IFN alpha), IFN β (IFN beta), IFN ω ;
- le récepteur des IFN de type II (IFNGR, récepteur aux IFN gamma): IFN γ (IFN gamma);
- le récepteur des IFN de type III (IL28R, composé de la sous-unité IL-28R1 et IL-10R β) : IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), et IFN- λ 3 (IL-28B).

Les récepteurs des cytokines de type II comprennent aussi le récepteur de l'IL-10 (IL-10R) ; de l'IL-22 (IL22R) dont une forme soluble ; des IL-19, IL-24, IL-20 (IL20R); et celui du facteur tissulaire (TF). Contrairement aux récepteurs de cytokines de type I décrites ci-dessus, le domaine extracellulaire des récepteurs de type II ne comporte pas le motif WS. Parmi les 12 membres de cette famille, 11 sont des protéines transmembranaires. Les récepteurs s'hétérodimérisent pour être fonctionnels. Le plus souvent ils sont constitués d'une chaîne longue et d'une chaîne courte comme illustré sur la figure 19.

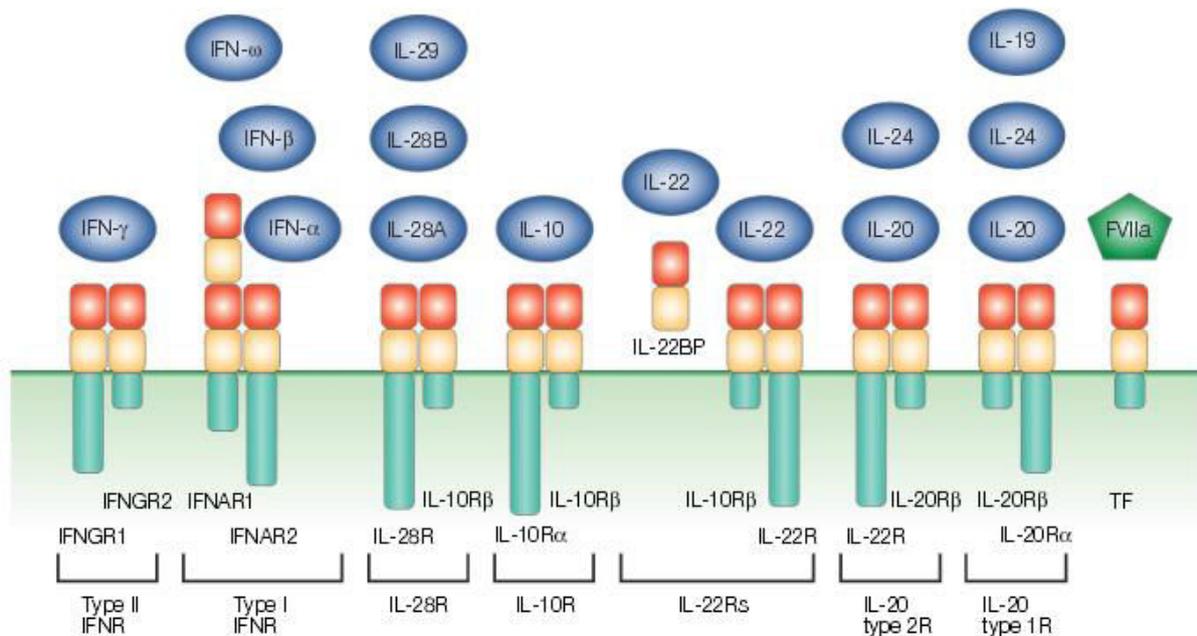


Figure 19 : Représentation schématique des récepteurs des cytokines de type II. En bleu, les ligands au-dessus de leur récepteur respectif. Les deux domaines fibronectines de type III sont en rouge et jaune, la partie cytoplasmique des récepteurs est en vert (Renauld, 2003).

Les IFN jouent un rôle prépondérant dans la réponse aux infections virales et bactériennes. Ils représentent la première ligne de défense active. La réponse aux IFN est médiée par la voie JAK/STAT. Les JAK (Janus kinase) sont des tyrosines kinases capables de phosphoryler les STAT (signal transducers and activators of transcription) qui régulent ensuite l'expression de nombreux gènes, dont les ISG (IFN stimulated genes).

4.1.2 Les kinases JAK et facteurs de transcription STAT

Les protéines de la famille JAK

Pour transmettre l'information, les cytokines se fixent à leurs récepteurs respectifs qui activent des protéines de la famille JAK chargées de propager le signal à l'intérieur de la cellule. Il existe quatre membres dans la famille des protéines JAK : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (tyrosine kinase 2). JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimées de façon ubiquitaire alors que JAK3 est seulement exprimée dans les cellules myéloïdes et les lignées lymphoïdes (Leonard and O'Shea, 1998).

La famille des protéines JAK est constituée de 7 domaines de fortes homologies de JH1 à JH7 (figure 20). JH1 constitue le domaine tyrosine kinase. Les emplacements des tyrosines sont très conservés : pour JAK1 Y1038/Y1039, pour JAK2 Y1007/Y1008, pour JAK3 Y980/Y981, pour TYK2 Y1054/Y1055. Une fois phosphorylées, ces deux tyrosines induisent un changement conformationnel qui facilite la liaison avec le substrat. La partie JH3 à JH7 amino-terminale, détermine la spécificité d'interaction avec le récepteur. Par exemple, l'interaction de la TYK2 avec IFNAR1 nécessite de façon spécifique JH3-4-5 en plus de JH6-7 (Richter et al., 1998). De plus, il a été démontré que cette interaction était importante pour le maintien de l'IFNAR1 dans la membrane plasmique (Gauzzi et al., 1997).

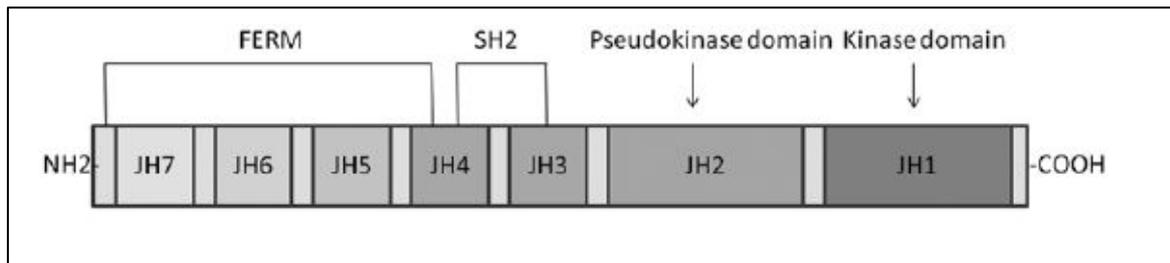


Figure 20: Structure des protéines de la famille JAK. Sept domaines sont de fortes homologues de JH1 à JH7. JAK possède quatre domaines fonctionnels : le domaine FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin) de JH4 à JH7 qui permet l'interaction avec les récepteurs de cytokines ; le domaine SH2 de JH3 à JH4 qui permet l'ancrage et une interaction de forte affinité avec les tyrosines phosphorylées présentes sur d'autres protéines ; le pseudo domaine catalytique (JH2) « kinase-like » possède la même structure que JH1 qui est le domaine tyrosine kinase, mais ne possède pas son activité catalytique. Adapté de (Wang and Sun, 2014).

Suite à la fixation des ligands sur leurs récepteurs, les JAK sont phosphorylées et permettent de transmettre le signal aux STAT.

Les protéines de la famille STAT

La famille des STAT comprend 7 membres : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Les STAT sont à la fois des protéines impliquées dans la transmission de signaux dans le cytoplasme et des facteurs de transcription. Une fois activés, les STAT peuvent s'homodimériser (STAT1-1, STAT3-3, STAT4-4, STAT5-5, STAT6-6), s'hétérodimériser (STAT1-2) ou former des tétramères (STAT1-1/1-1, STAT4-4/4-4, STAT1-2/1-2). Ces homodimères, hétérodimères (ou tétramères) peuvent alors être importés dans le noyau où ils se lient à l'ADN sur des séquences bien spécifiques.

La taille des STAT varie entre 750 et 850 acides aminés et les différents domaines sont illustrés dans la figure 21. La partie amino-terminale est très conservée. Elle favorise l'interaction avec l'ADN (Vinkemeier et al., 1996), avec les récepteurs (Murphy et al., 2000) et participe à la régulation de la translocation des STAT dans le noyau (Strehlow and Schindler, 1998a). Le domaine de la superhélice (coiled-coil domaine CCD), possède quatre hélices alpha enroulées. Cette zone est hydrophile et permet notamment l'interaction avec la protéine IRF9 dans le cas de STAT1 (Horvath et al., 1996). Le domaine de liaison à l'ADN des STAT reconnaît des séquences GAS (gamma-activated sequences) ainsi que d'autres séquences spécifiques des dimères. Le « linker » fait la liaison entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine SH2 de STAT et interagit avec chacun d'eux. Le domaine SH2, extrêmement conservé, permet trois actions : le recrutement des STAT par les récepteurs de cytokines qui possèdent une tyrosine phosphorylée; l'association avec JAK (Gupta et al., 1996); et une interaction de type homo- ou hétéro-dimère avec un autre STAT (Gupta et al., 1996). Enfin, le domaine TAD (transcriptional activation domain), peu conservé, est chargé de la spécificité de la réponse en régulant l'activité transcriptionnelle. Par exemple, il a été démontré qu'une phosphorylation des STAT en sérine améliore l'activité transcriptionnelle de certains gènes. Son rôle sera décrit plus loin.

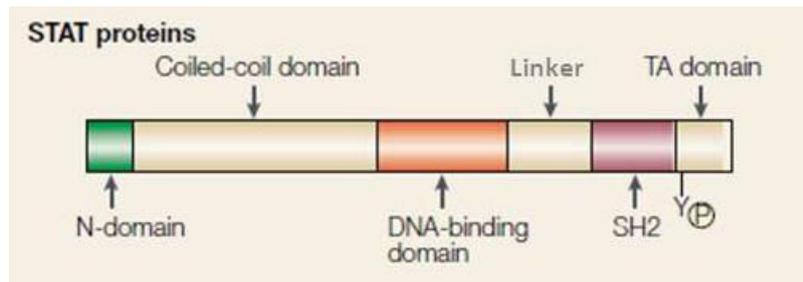


Figure 21: Structure des STAT. « N domain » représente la partie N-terminale (composé de 130 acides aminés), le « coiled-coil domain » est la superhélice (acides aminés 135 à 315 environs), le « linker » (qui se situe approximativement entre les acides aminés 480 et 580) fait la liaison entre le domaine de liaison à l'ADN (DNA-binding domain, acides aminés 320 à 480 environs) et le domaine SH2 (acides aminés 580 à 680 environ), « TA domain » est le domaine d'activation de la transcription . Adapté de (Leonard, 2001).

Les dimères de STAT migrent vers le noyau. Les pores nucléaires permettent une régulation des protéines qui entrent et qui sortent du noyau. Ce sont des nucléoporines qui interagissent avec des protéines transporteurs (importine- β pour entrer dans le noyau et exportine pour en sortir). Ces protéines ont la capacité de se lier directement aux protéines possédant soit la séquence de signal de localisation nucléaire (NLS) pour entrer dans le noyau, soit la séquence signal d'export du noyau pour en sortir. Cependant, un intermédiaire est parfois nécessaire. Les importines- α jouent ce rôle et se lient à la séquence NLS de la protéine et aux transporteurs du pore nucléaire. Les STAT ne possèdent pas de séquence NLS conventionnelle car l'ajout de cette séquence à une protéine ne pouvant entrer dans le noyau, ne permet pas sa translocation dans le noyau (McBride et al., 2002). Leur mécanisme de translocation est illustré plus loin avec l'exemple de STAT1, principal acteur de la signalisation JAK/STAT en aval des IFN.

Pour posséder une activité transcriptionnelle STAT1 doit s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec STAT2. Lors de la dimérisation, le SH2 d'un STAT se lie à la tyrosine phosphorylée d'une autre STAT. Suite à un épissage alternatif différent, STAT1 existe sous 2 formes, STAT1a (91kDa) et STAT1b (84 kDa), plus court à qui il manque les 38 derniers acides aminés. Ces deux isoformes possèdent un site de phosphorylation en tyrosine position 701.

Suite à sa phosphorylation, STAT1 change de conformation, laissant apparaître son domaine de liaison à l'ADN. Des mutations de ce domaine et dans la partie N-terminale ont mis en évidence leur implication dans l'interaction avec l'importine- $\alpha 5$ et la translocation dans le noyau (Melen et al., 2001) (Strehlow and Schindler, 1998b). La séquence NLS de la protéine STAT1 semble être masquée lorsque celle-ci n'est pas phosphorylée. Pourtant STAT1 non phosphorylée a été observée dans le noyau des cellules. Pouvant expliquer cette observation, le contact direct entre STAT1 non phosphorylée et les nucléoporines a été observé (Marg et al., 2004). Une autre hypothèse est l'implication de l'intermédiaire IRF1 qui possède un domaine NLS conventionnel (Chatterjee-Kishore et al., 2000). A l'intérieur du noyau, des phosphatases déphosphorylent STAT1. STAT1 non phosphorylée mais aussi STAT1 phosphorylée non accrochée à l'ADN sont reconnues par les protéines CRM1 (Chromosomal Maintenance 1 ou Exportin 1), via leur séquence d'export nucléaire présente dans le domaine de liaison à l'ADN, et sont expulsées en dehors du noyau (McBride et al., 2000).

Contrairement à STAT1b, STAT1a possède un deuxième site de phosphorylation en sérine position 727 qui peut être induit par les IFN de type I et de type II de façon indépendante de la phosphorylation en tyrosine (Zhu et al., 1997). Cette phosphorylation n'est pas nécessaire pour la translocation des dimères de STAT1 dans le noyau. Cependant, elle apparaît importante pour l'induction complète des ISG. En effet, des souris génétiquement modifiées, exprimant une protéine STAT1 dont la sérine 727 a été remplacée par une alanine, ne peuvent se défendre aussi bien que les souris sauvages contre l'infection par *Listeria monocytogenes* : un taux de mortalité plus élevé a été observé et l'induction des ISG est comparativement plus faible (Varinou et al., 2003). De plus, cette phosphorylation change l'affinité par rapport à d'autres régulateurs de facteurs de transcription comme BRCA1 et MCM5 par exemple (Goh et al., 1999). L'induction de la phosphorylation en sérine 727 pourrait se produire dans le cytoplasme grâce à la kinase PKC- δ (Uddin et al., 2002).

En plus des STAT1 phosphorylées, des homodimères de STAT1 non phosphorylées (U-STAT1) ont montré leur capacité à se lier à l'ADN et à stimuler l'expression d'une sous-partie des ISG (voir discussion). En effet, les homodimères U-STAT1 se lient à des éléments de réponse ISRE (IFN-stimulated response element) dont la séquence est légèrement différente de celle où se lient les homodimères de STAT1 phosphorylées (Cheon et al., 2013).

Régulation négative des STAT

Des protéine-phosphatases régulent le degré de phosphorylation de cette voie de signalisation. Les protéines de la famille SOCS (suppressor of cytokine signalling), CIS, SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, sont des antagonistes directs des STAT. Ils agissent en se fixant sur les résidus tyrosines phosphorylés des protéines JAK ou sur les récepteurs eux-mêmes. Dans des cellules HeLa et MCF7, il a été démontré que SOCS-1 et SOCS-3 sont capables d'inhiber la phosphorylation de STAT1 et sa translocation dans le noyau (Song and Shuai, 1998).

La protéine SHP2, présente dans tous les types de cellules, inhibe la phosphorylation de STAT1 dans le cytoplasme et dans le noyau. En effet, des souris déficientes pour SHP2 ont une phosphorylation en tyrosine de STAT1 plus forte et durable (You et al., 1999). SHP1, qui n'est présente que dans les cellules hématopoïétiques est aussi impliquée dans la régulation de la voie JAK/STAT car elle régule notamment la phosphorylation de JAK1. Des macrophages *SHP1*^{-/-}, ont une phosphorylation de JAK1 plus importante que des cellules sauvages (David et al., 1995). La protéine TC45, un des variants des tyrosines phosphatases des lymphocytes T, aide aussi à la régulation de la phosphorylation de STAT1 dans le noyau (ten Hoeve et al., 2002).

Les protéines de la famille des PIAS (protein inhibitor of activated STAT) comprennent PIAS1, PIAS3, PIASy, PIASx α , PIASx β , qui sont aussi capables de réguler négativement la voie JAK/STAT en fixant par liaison covalente la protéine SUMO-1 (Ungureanu et al., 2003).

4.2 Signalisation des interférons : des ligands aux ISG

4.2.1 Le système IFN de type I

Il existe de nombreux IFN de type I. Les IFN alpha ($IFN\alpha$) se décomposent en 13 sous-types $IFN\alpha_1$, $IFN\alpha_2$, $IFN\alpha_4$, $IFN\alpha_5$, $IFN\alpha_6$, $IFN\alpha_7$, $IFN\alpha_8$, $IFN\alpha_{10}$, $IFN\alpha_{13}$, $IFN\alpha_{14}$, $IFN\alpha_{16}$, $IFN\alpha_{17}$, $IFN\alpha_{21}$. Pour les IFN beta ($IFN\beta$) seuls 2 types sont connus $IFN\beta_1$ et $IFN\beta_3$ ($IFN\beta_2$ étant en fait l'interleukine 6). Il existe d'autres IFN de type I dont le rôle est moins étudié $IFN-\epsilon$, $IFN-\kappa$, $IFN-\omega$, $IFN-\nu$ qui sont humains et $IFN-\delta$, $IFN-\tau$, $IFN-\zeta$ non-humains.

Les IFN se lient aux récepteurs IFNAR qui sont composés de deux chaînes : IFNAR1 et IFNAR2 respectivement lié à TYK2 et JAK1 sur leur partie cytosolique (figure 22). L'IFNAR1 est indispensable pour former un IFNAR fonctionnel. En effet, il a été démontré que des souris ne possédant pas cette chaîne n'étaient plus capables de transmettre de signal suite à une stimulation par les $IFN\alpha$ (Muller et al., 1994). A ce jour, seule une isoforme de l'IFNAR1 a été identifiée. Par contre, il existe 3 isoformes de l'IFNAR2 qui ont des fonctions différentes : l'IFNAR2a, soluble, peut être sécrété mais son rôle est mal connu, l'IFNAR2b qui est transmembranaire mais tronqué et qui n'est pas capable de transmettre le signal, et la forme IFNAR2c qui s'hétérodimérise avec l'IFNAR1 pour transduire le signal (Lutfalla et al., 1995). Tous les tissus, organes et la plupart des lignées cellulaires expriment les IFNAR.

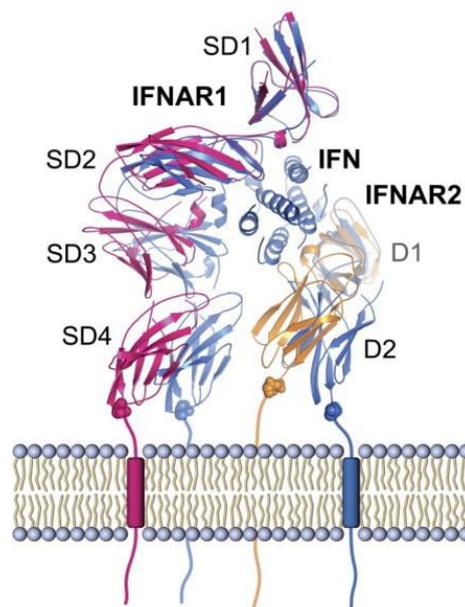


Figure 22 : Structure de l'IFNAR avec son ligand IFN. En rose et jaune, les positions initiales de l'IFNAR1 et de l'IFNAR2 respectivement. En bleu, la position de ces sous-unités en présence de l'IFN illustre le changement de conformation. SD : « subdomain » (sous-domaine) (Piehler et al., 2012).

De façon surprenante, les IFN de type I induisent l'expression de différents gènes par l'intermédiaire du même récepteur. La concentration d'IFNAR sur la membrane d'une cellule influence son affinité avec les ligands. En effet, moins il y a de récepteurs, plus l'affinité est importante avec les IFN de type I. De plus, peu d'IFNAR semblent suffisants pour déclencher une réponse antivirale. Par contre, une forte concentration d'IFNAR est indispensable pour induire un effet antiprolifératif (Levin et al.,

2011). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les IFN de type I n'ont pas tous la même affinité pour les IFNAR1 et IFNAR2. Les IFN de type I ont plus d'affinité pour l'IFNAR2 essentiellement responsable de l'activité antivirale. Malgré leurs affinités plus faibles pour les IFNAR1, une corrélation a été mise en évidence entre l'affinité pour l'IFNAR1 et l'activité antiproliférative (Jaks et al., 2007).

Transmission du signal par les IFN de type I

Comme illustré dans la figure 23, lorsqu'un IFN de type I vient se fixer sur une des sous-unités du récepteur, un changement de conformation a lieu menant à la dimérisation du récepteur ainsi qu'à l'autophosphorylation de TYK2 et JAK1. Ces kinases induisent la phosphorylation des chaînes de récepteurs, l'IFNAR1 attire alors STAT2 qui est à son tour phosphorylée par la TYK2. STAT2 phosphorylée permet le recrutement de STAT1 et sa phosphorylation par JAK1. En effet, il a été démontré que sous stimulation par les IFN de type I, les cellules n'exprimant pas STAT1 étaient capables d'activer STAT2. De plus, l'inhibition de STAT2 bloque la phosphorylation de STAT1. STAT1 et STAT2 phosphorylées s'hétérodimérisent via leur domaine SH2, se lient à IRF9 ce qui forme un complexe ISGF3 (interferon stimulated gene factor 3) et migrent jusque dans le noyau pour se fixer à la séquence consensus en tandem ISRE : AGTTTN₃TTTCC (Heim et al., 1995), présente dans les promoteurs des gènes cibles des IFN (Decker et al., 1991; Fu et al., 1990; Levy et al., 1989; Shuai et al., 1992).

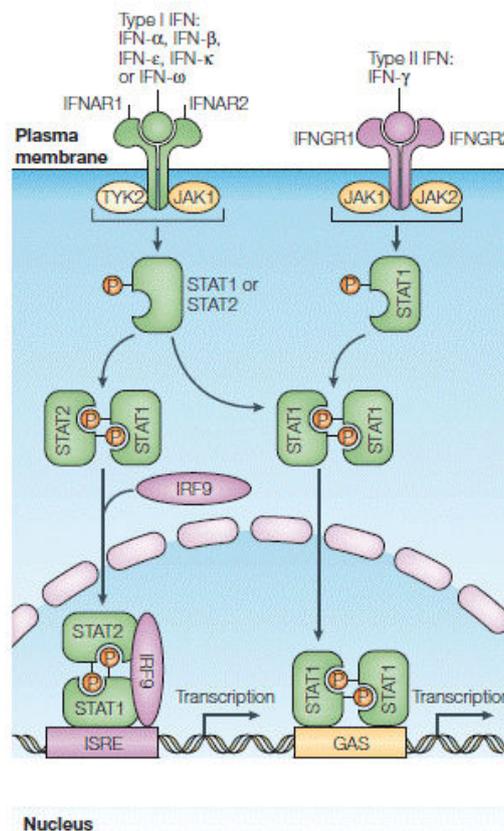


Figure 23 : Activation de la voie IFN/JAK/STAT par les IFN de type I et II. Les IFN de type I se fixent sur l'IFNAR induisant l'activation de la TYK2 et de JAK1 qui phosphorylent STAT1 ou STAT2. Les IFN de type II se fixent sur l'IFNGR activant JAK1 et JAK2 qui phosphorylent STAT1. Les hétérodimères STAT1/STAT2 s'associent à IRF9, rentrent dans le noyau et activent l'expression d'ISG via l'élément de réponse ISRE. Les homodimères STAT1, rentrent dans le noyau et se lient à l'élément de réponse GAS pour induire l'expression des ISG (Platanias, 2005) .

Les IFN de type I sont produits par les cellules du système immunitaire inné comme les macrophages, capables de phagocyter les corps apoptotiques, nécrotiques et les agents pathogènes. De manière à activer les lymphocytes, les macrophages sécrètent des cytokines et présentent les antigènes phagocytés à leur surface ; ils font partie des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les cellules dendritiques participent aussi à la production d'IFN. Elles sont attirées par les cytokines produites par les macrophages. Les cellules dendritiques immatures phagocytent des cellules, libèrent des cytokines et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Lors de leur migration, les cellules dendritiques deviennent matures, elles ne sont alors plus capables de phagocyter. Par contre, elles présentent à leur surface les antigènes pour activer les lymphocytes ; elles font donc aussi partie des APC. Les IFN de type I sont aussi produits par les cellules tueuses naturelles « natural killer » (NK). Les lymphocytes T, responsables de l'immunité cellulaire et les lymphocytes B, responsables de l'immunité humorale produisent aussi des IFN de type I lorsqu'ils sont activés. Enfin, les cellules résidentes du microenvironnement jouent un rôle minime, mais elles possèdent le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et les récepteurs capables d'induire la production d'IFN et de cytokines. Les fibroblastes et les cellules endothéliales par exemple ont montré des capacités à sécréter des IFN de type I (Hess et al., 1989).

4.2.2 Le système IFN type II

L'IFN de type II est l'IFN γ . Il est le ligand d'un récepteur composé de deux chaînes IFNGR1 et de deux chaînes IFNGR2, respectivement liées à JAK1 et JAK2 sur leur partie cytosolique.

Transmission du signal par les IFN de type II

La fixation de l'IFN γ induit un changement de conformation et une dimérisation du récepteur activant par autophosphorylation JAK1 et JAK2. L'implication de JAK1 a été démontrée dans des cellules *JAK1*^{-/-} qui ne répondent plus aux effets de l'IFN γ . JAK1 est donc un intermédiaire clé dans la transduction du signal médié par l'IFN γ (Sexl et al., 2003). Son activation ainsi que celle de JAK2 entraînent la phosphorylation des deux sous-unités du récepteur, l'ancrage des protéines STAT1 et leurs phosphorylations. L'homodimère de STAT1 phosphorylé (appelé GAF pour « gamma activated factor ») est ensuite transféré dans le noyau où il se fixe à la séquence consensus GAS : TTCCNGGAAA (Decker et al., 1991; Fu et al., 1990; Levy et al., 1989; Shuai et al., 1992) (voir figure 23).

L'IFN γ est principalement produit par les cellules NK, qui font parties du système immunitaire inné. Ces cellules ont la capacité de tuer les cellules présentant un antigène à leur surface sauf si le CMH-I, présent sur la quasi-totalité des cellules de l'hôte, exerce un contrôle négatif, empêchant ainsi que les cellules saines ne soient tuées. Les IFN de type II sont aussi produits par les lymphocytes « natural killer » T (NKT) qui possèdent des caractéristiques des lymphocytes T et des NK. Le système immunitaire adaptatif peut aussi produire des IFN de type II grâce aux lymphocytes Th1 (LT helper 1), lymphocytes T différenciés en lymphocytes T CD4⁺ dont le but est de réguler la réponse immunitaire en activant d'autres cellules immunitaires.

Les signalisations des IFN de type I et de type II sont liées. En effet, des cellules déficientes en IFNAR stimulées avec de l'IFN γ , induisent moins d'ISG ; et inversement, des cellules déficientes en IFNGR stimulées avec de l'IFN de type I, expriment aussi moins d'ISG. La présence des deux voies de

signalisation est importante pour une réponse complète. La présence de l'une des voies permet un meilleur amorçage et une meilleure amplification de l'autre (Lasfar et al., 2014).

Autres voies de signalisation activées par les IFN

En plus de l'activation de la voie JAK/STAT, d'autres voies sont stimulées par les IFN. La famille des protéines CRK (CT10 (chicken tumor virus number 10) regulator of kinase) joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire notamment l'isoforme CRKL qui interagit avec la TYK2 présente sur les IFNAR (Ahmad et al., 1997). La phosphorylation de la protéine p38 par les IFN de type I ou par la voie de signalisation MAPK, induit l'expression d'ISG indépendamment de la voie JAK/STAT (Uddin et al., 1999). Comme mentionné plus haut, la voie PI3K est activée suite à l'ajout des IFN et contrôle la phosphorylation en sérine 727 de STAT1. Enfin, il a été démontré que la protéine mTOR est activée par les IFN de type I et II et entraîne des modifications sur des protéines ribosomales (Lekmine et al., 2004).

Les IFN participent à de nombreuses activités biologiques grâce à l'expression des nombreux ISG qu'ils induisent. Les plus connues sont ses fonctions antivirales. De plus, les IFN régulent l'activation du système immunitaire. Ces points seront abordés par la suite.

4.2.3 Induction des ISG par les IFN

Après la fixation des ISGF3 et GAF sur les éléments de réponse ISRE et GAS respectivement, de nombreux ISG sont produits. Découverts il y a plus de 30 ans (Knight and Korant, 1979; Taylor, 1964), on dénombre aujourd'hui entre 50 et 1000 ISG selon le type cellulaire grâce à la technologie des « microarrays ». Les ISG qualifiés de classiques sont MX1 (MX dynamin like GTPase 1) et OAS1 (oligo adénylate synthétase), avec plus récemment ISG15, ADAR (adenosine deaminase, RNA-specific), IFITM1/2/3 (IFN-inducible transmembrane), et BST2 (bone marrow stromal antigen 2, aussi appelé tétherine) (Hornung et al., 2014).

Implication des ISG dans l'amplification de la signalisation JAK/STAT

Parmi les ISG induits, certains servent à amplifier le signal car ils induisent la production de nouveaux ISG. Parmi eux, on retrouve JAK2, STAT1, STAT2, IRF9 et IRF1. STAT1, STAT2 et IRF9 forment le complexe ISGF3 qui permet l'induction de l'expression des ISG eux même créant ainsi un système d'auto-amplification. IRF1 est aussi un ISG capable d'induire directement l'expression de nouveaux ISG.

Un autre type d'ISG, capable d'amplifier la voie JAK/STAT, sont les PRR pour « pattern recognition receptors ». Les PRR sont des protéines membranaires ou cytoplasmiques qui détectent la présence de pathogènes ou d'acides nucléiques dans le cytosol ou à l'extérieur de la cellule. Ils induisent la production d'IFN pour signaler l'infection au système immunitaire. En temps normal, ces PRR sont exprimées de façon constitutive mais à de très faible niveau d'expression ce qui permet de maintenir un système de surveillance sans entraîner d'inflammation incontrôlée. Cependant, en présence de bactéries ou de virus, les PRR détectent les PAMP (pathogen-associated molecular patterns) : les

acides nucléiques, les toxines, les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides provenant de pathogènes. Dans ce contexte, certains PRR activent la production d'IFN par l'intermédiaire de deux ISG, IRF3 et IRF7 (interferon regulatory factor), qui se fixent sur les éléments de réponse du promoteur des IFN. Elles contribuent ainsi à amplifier, via la voie JAK/STAT, l'expression des ISG, dont celle des PRR pour amplifier le signal inflammatoire et l'activité antivirale.

Les premières PRR à avoir été caractérisées sont les TLR (Toll-like receptors) qui sont des protéines transmembranaires exprimées à la fois à la surface de la cellule mais aussi dans les membranes des endosomes. Chez l'Homme, il existe 10 TLR différents dont les fonctions sont bien spécifiques. Par exemple, TLR3 est stimulé par des ARN double brin viraux, TLR7 et TLR8 sont activés par des ARN simple brin viraux et TLR9 est stimulé par de l'ADN simple brin contenant des séquences spécifiques de deux nucléotides non méthylés : une cytosine suivie d'une guanine (CpG). Lorsqu'un TLR est activé, il recrute une protéine kinase adaptatrice (MYD88, TIRAP, TRIF ou TRAM) qui amplifie le signal et permet l'expression de gènes de la voie inflammatoire via JAK/STAT ou via d'autres voies comme la voie NFκB (nuclear factor κB) qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6 et IL-8. (Medzhitov et al., 1997; Sandig and Bulfone-Paus, 2012).

En plus des TLR, de nombreux autres détecteurs d'ARN et d'ADN font partie des ISG. Par exemple, les protéines de la famille ALR, comme AIM-2 (absent in melanoma-2), sont activées par de l'ADN simple brin. La famille de protéines RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1), appelée RLR (Rig like receptor), et les protéines OAS permettent la détection d'ARN double brin. Cependant, nous nous attarderons plus loin sur le principal détecteur d'ADN : STING (stimulator of interferon genes).

Implication des ISG dans la régulation de l'infection virale

L'importance de la signalisation IFN et de l'expression des ISG dans la régulation de l'infection virale a été démontrée de nombreuses fois. Pour exemple, des souris génétiquement déficientes *IFNAR1*^{-/-}, ont une infection virale plus rapide et plus meurtrière car le signal IFN n'est pas transmis et l'expression des ISG pas suffisante pour stopper l'infection virale (Hwang et al., 1995).

A chaque étape du cycle de vie du virus, les ISG induits par l'infection interviennent pour stopper la prolifération du virus. Certains ISG peuvent inhiber l'entrée du virus dans la cellule. C'est le cas de MX1 qui est capable de retenir les composés viraux dans des nucléocapsides et ainsi d'empêcher que le virus atteigne sa cible cellulaire (Gao et al., 2010). La protéine Mx2 empêche la capsid de pénétrer dans le noyau en jouant sur les capacités de celle-ci à fusionner avec la membrane nucléaire (Goujon et al., 2013). La famille des IFITM se compose de quatre membres : IFITM1, IFITM2, IFITM3 et IFITM5 qui participent aussi à l'inhibition de l'entrée du virus dans la cellule. Ces protéines sont particulièrement présentes dans les endosomes ou les lysosomes. Les virus les plus affectés par ces ISG sont donc des virus dont le processus d'amplification implique un passage dans ces compartiments.

D'autres ISG ont un rôle dans l'inhibition de la réplication et de la traduction des protéines virales. La famille des IFIT (IFN-induced protein with tetratricopeptide) est composée de quatre membres : IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54), IFIT3 (ISG60) et IFIT4 (ISG58). IFIT1 et IFIT2 sont capables de se fixer au complexe d'initiation de la traduction et empêcher ainsi l'expression des protéines virales (Hui et al.,

2003). De plus, IFIT1 reconnaît et se fixe aux ARNm ne possédant pas de coiffe à l'extrémité 5', IFIT2 et IFT3 viennent se rajouter au complexe séquestrant ainsi l'ARN viral dans le cytoplasme. Ce mécanisme permet d'empêcher sa réplication (Pichlmair et al., 2011). Les protéines de la famille des OAS reconnaissent aussi l'ARN et synthétisent des 2'-5'oligoadenylate qui activent la protéine RNaseL qui digère les ARN.

Enfin, quelques ISG sont connus pour inhiber l'export des virus néoformés. C'est le cas de BST2 qui ancre le virus dans la membrane plasmique (Perez-Caballero et al., 2009).

Implication des ISG dans l'inactivation de la signalisation JAK/STAT

Après activation des IFN, des mécanismes de régulations se mettent en place pour diminuer l'inflammation. Des ISG font partie de ces mécanismes : les protéines régulatrices SOCS et USP18 (ubiquitin specific peptidase 18). Comme décrit plus haut (paragraphe 4.1.2), les SOCS inhibent la signalisation de la voie JAK/STAT. Les IFN γ induisent notamment l'expression de SOCS-1, SOCS-2 et SOCS-3 (Song and Shuai, 1998).

La protéine USP18 est un ISG capable de réguler l'activation des IFN de type I et de type III (Francois-Newton et al., 2011). USP18 est fixée à l'IFNAR2 et inhibe le signal médié par l'IFN α (Makowska et al., 2011). Des souris *USP18*^{-/-} induisent une très forte expression des ISG sous stimulation par des IFN de type I et sont plus résistantes aux infections virales (Francois-Newton et al., 2011). Le mécanisme d'action de USP18 sur le récepteur des IFN de type III est encore inconnu. En effet, même si des ressemblances structurales existent entre IL28R1 et IFNAR2, des expériences de co-immunoprécipitation n'ont pas démontré d'interaction directe entre IL28R1 et USP18 (Burkart et al., 2013).

En plus des ISG, d'autres mécanismes sont induits par la cellule pour inhiber la signalisation JAK/STAT comme les protéines PIAS (voir paragraphe 4.1.2).

4.3 La voie STING, régulatrice de la production d'IFN

Comme nous l'avons décrit ci-dessus (paragraphe 4.2.1 et 4.2.2), les IFN sont principalement produits par les cellules du système immunitaire et jouent de ce fait un rôle primordial dans la lutte contre les pathogènes. Les mécanismes impliqués dans ce processus ne nécessitent pas d'interaction antigène-anticorps. Ils sont déclenchés grâce à la capacité du système immunitaire inné à détecter des produits étrangers à la cellule, appelés PAMP, qu'ils soient d'origine virale ou bactérienne. Grâce à ces mécanismes, les cellules immunitaires peuvent aussi reconnaître les DAMP, pour Damage-associated molecular patterns, qui sont des molécules produites par les cellules endommagées et relâchées dans le milieu extracellulaire ou présentes dans le cytosol des cellules. Pour reconnaître les DAMP ou les PAMP, les cellules immunitaires utilisent les PRR comme vu précédemment (paragraphe 4.2.3). Les DAMP les plus fréquents sont les acides nucléiques (ADN ou ARN endommagés) présents dans le cytoplasme, la protéine calréticuline présente à la surface de la membrane cellulaire, ou l'excrétion d'une protéine qui se fixe à la chromatine, HMGB1 (high-mobility group box 1). Dans la

suite de ce chapitre, nous nous focaliserons sur la détection de l'ADN cytosolique, phénomène en lien direct avec les effets de la chimiothérapie et abordé dans mon projet expérimental.

4.3.1 Origine des acides nucléiques cytosoliques

L'ADN cytosolique peut avoir plusieurs origines cellulaires et résulter de divers mécanismes moléculaires.

Une première cause est un défaut de dégradation des ADN double brin par la cellule. Les macrophages éliminent l'ADN de cellules mortes par la DNase II (désoxyribonucléase) dans les lysosomes. Si cette digestion enzymatique est défectueuse, de l'ADN peut fuir dans le cytosol (Sharma et al., 2011). TREX1 (three prime repair exonuclease) est une autre DNase utilisée par la cellule dans des conditions homéostatiques pour éliminer l'ADN cellulaire accumulé dans le cytoplasme. Ainsi, des cellules déficientes en TREX1 n'éliminent plus les polynucléotides cytoplasmiques dérivés de la réplication de l'ADN, activant alors une réponse immunitaire (Stetson et al., 2008).

L'accumulation d'ADN cytosolique peut aussi résulter d'un défaut de réparation de l'ADN. Comme décrit plus haut, la kinase ATM joue un rôle essentiel dans la réparation des cassures d'ADN. Ainsi, en présence de mutations perte-de-fonction sur le gène codant pour ATM, des fragments d'ADN double brin s'accumulent dans le cytoplasme et activent une réponse immunitaire (Hartlova et al., 2015).

Une autre origine d'ADN cytoplasmique est l'ADN mitochondrial. En effet, suite à un stress, si la voie apoptotique intrinsèque est impliquée, les protéines BAX et BAK permettent de libérer l'ADN mitochondrial dans le cytoplasme (West et al., 2015).

L'ADN cytoplasmique peut aussi provenir de bactéries dont l'ADN endogène fuit du phagosome. Enfin, l'ADN peut être d'origine virale. Il a été démontré dans des macrophages que la capsid de virus de l'herpès (herpès simplex virus, HSV) était ubiquitinée puis dégradée par des protéasomes, ceci permettant la libération de l'ADN viral dans le cytosol de la cellule infectée (Horan et al., 2013). Ce même mécanisme a aussi été observé avec des adénovirus (Yan et al., 2002).

Pour détecter l'ADN cytosolique, un PRR a particulièrement été étudié dans le système immunitaire, il s'agit de STING. Ayant eu, lors de ma thèse, l'opportunité d'étudier cette protéine dans un contexte tumoral, la structure, les mécanismes d'activation et le rôle de STING sont exposés dans le paragraphe qui suit.

4.3.2 Activation de STING

La protéine STING a été décrite sous d'autres noms, comme ERIS (pour « endoplasmic reticulum interferon stimulator »), MITA (pour « mediator of IRF3 activation »), NET23 (pour « nuclear envelope transmembrane protein »), MPYS (pour « plasma membrane tetra-spanner ») ou encore TMEM173 pour (« transmembrane protein 173 »). Stimulée par des ADN double brin et simple brin, STING se complexe avec la kinase TBK1 (TANK binding kinase 1) et IRF3, ce qui conduit à la phosphorylation de ce dernier, et à l'activation de la transcription des gènes IFN de type I, alpha et

beta (Ishikawa and Barber, 2008; Sun et al., 2009; Zhong et al., 2008) comme nous le verrons ci-dessous.

Structure de STING

STING est une protéine transmembranaire de la membrane du réticulum endoplasmique. Chez l'Homme, elle est composée de 379 acides aminés (Figure 24). Dans les 130 acides aminés de sa partie N-terminale se trouvent quatre domaines transmembranaires qui ancrent STING dans la membrane. Du côté C-terminal, les 249 acides aminés restants sont supposés être du côté cytosolique. Le domaine de dimérisation (DD) et l'extrémité carboxy-terminale (CTT) sont impliqués dans l'homodimérisation de STING. Le domaine de liaison aux dinucléotides cycliques (CDN), appelé CBD, commence au début de DD et se termine avant le début de CTT. STING est exprimée dans les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les macrophages, mais aussi dans toutes les cellules endothéliales et épithéliales (Burdette and Vance, 2013).

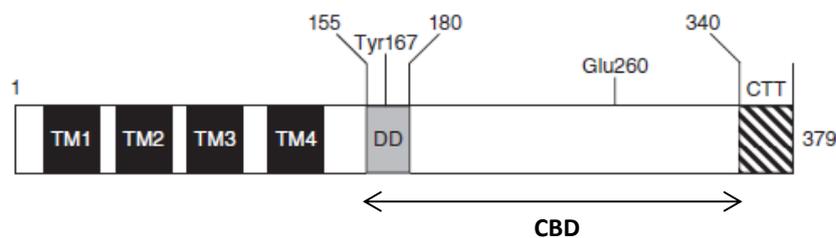


Figure 24: Structure de la protéine STING. STING possède quatre domaines transmembranaires (TM1 à TM4), une région de dimérisation avec une autre protéine STING (DD), et une extrémité carboxy-terminale (CTT). CBD (c-di-GMP binding domain) comprend le domaine DD et s'arrête avant le début de CTT. Adapté de (Burdette and Vance, 2013) (Yin et al., 2012).

Fonction de STING

L'importance du rôle de STING a été mise en évidence par des souris *Sting*^{-/-} suite à l'observation d'une dérégulation du système immunitaire face à des agents pathogènes d'origine virale ou bactérienne. En effet, ces souris ne sont plus capables d'induire des IFN de type I sous contamination virale de type HSV-1. Il en résulte une infection plus importante que dans les souris sauvages, pouvant mener à la mort de l'animal due à l'incapacité d'induire l'activation de cellules T (Ishikawa et al., 2009). De même, il a été démontré que STING jouait un rôle tout aussi important face à la bactérie *Listeria monocytogenes* (Sauer et al., 2011).

Activateurs de STING

La protéine STING peut être activée par différents CDN : cdA (cyclic-diAMP), cdG (cyclic-diGMP), 3'-5',3'-5' cAMP-GMP (cGAMP) qui sont amenés dans la cellule par des bactéries. Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien élucidés, STING pourrait aussi être stimulée directement par de petits fragments d'ADN double brin provenant de cellules apoptotiques ou nécrotiques, ou encore de pathogènes (Abe et al., 2013). En effet, l'analyse transcriptionnelle de cellules stimulées par cdG ou par des ADN double brin est la même (McWhirter et al., 2009). Néanmoins, la nécessité d'intermédiaires moléculaires entre l'ADN double brin et STING a été suggérée à la lumière d'expériences *in vitro*. En effet, l'expression ectopique de STING dans des cellules HEK293T (qui n'en

produisent normalement pas) leur confère la capacité de répondre à la présence de CDN mais pas à celle de l'ADN double brin cytosolique (Shu et al., 2012).

Il a récemment été démontré que l'ADN double brin viral présent dans le cytosol était transformé par l'enzyme cGAS (cyclic AMP-GMP synthase) en un CDN appelé 2'-5',3'-5' cGAMP capable d'activer l'expression d'IFN (Lahaye et al., 2013). L'enzyme cGAS est un membre de la famille des nucléotidyle-transférases comme le détecteur d'ARN OAS1 qui permet de digérer les résidus de nucléotides (Hornung et al., 2014).

En plus de son interaction avec cGAS, il a été démontré que STING pouvait aussi interagir avec des protéines intermédiaires comme IFI16 (Interferon, Gamma-Inducible Protein 16). Cette protéine contient une séquence NLS ainsi qu'un domaine PYHIN défini par la présence d'un domaine pyrimidique (PY) lui permettant d'interagir avec d'autres protéines et deux séquences de liaison à l'ADN (HIN). Sous infection virale, IFI16, activée par la présence d'ADN double brin, se lie à STING et active les voies IRF3 et NFκB qui induisent l'expression des IFN de type I. En effet, l'inhibition d'IFI16 par siRNA (small interfering RNA) réduit l'activation d'IRF3 et de NFκB (Unterholzner et al., 2010).

En plus de l'ADN double brin, STING est aussi capable de détecter l'ADN simple brin et d'induire une réponse immunitaire via la voie STING-TBK1-IRF3-IRF7 (Sharma et al., 2011).

Mécanisme d'activation de STING

Bien que le mécanisme d'activation de STING ne soit pas encore complètement connu, des mutations ponctuelles touchant des résidus impliqués dans la dimérisation de STING ont montré l'importance de cette dimérisation pour l'induction d'IFN (Ouyang et al., 2012). Le mécanisme de formation d'homodimère reste, quant à lui, non élucidé à ce jour. D'après des expériences de cristallisation, il semble que même sans stimulation par des CDN, STING se trouve sous forme d'homodimère. La transduction du signal ne se ferait donc pas par la dimérisation de STING (Shang et al., 2012). Les changements de conformation du dimère suite à la fixation d'un ligand ne sont pas non plus formellement établis. Une hypothèse suggère que STING s'auto-inhibe par une interaction entre les domaines CBD et CTT. Suite à la fixation d'un CDN, STING change de conformation permettant de libérer le domaine CTT qui peut alors interagir avec TBK1 et IRF3 (Yin et al., 2012).

En utilisant un système *in vitro*, il a été démontré que STING est nécessaire et suffisant pour l'activation de TBK1 et la phosphorylation de IRF3. Des mutations sur STING ont permis de constater qu'une moins bonne interaction avec IRF3 bloque la phosphorylation de celui-ci mais n'empêche pas la phosphorylation de TBK1, (Tanaka and Chen, 2012). Sous stimulation par de l'ADN bactérien cytosolique, la protéine IRF3 apparaît être un intermédiaire clé dans la production d'IFN de type I (Stetson and Medzhitov, 2006). La formation du complexe STING-TBK1-IRF3 est donc indispensable au déclenchement d'une réaction immunitaire en présence d'ADN double ou simple brin cytosolique (figure 25). STING est aussi capable d'activer la voie NFκB grâce à une protéine intermédiaire appelée TRAF6, entraînant l'homodimérisation de IRF7 qui induit alors l'expression d'IFNα (Abe and Barber, 2014). Enfin, STING est capable d'interagir avec STAT6 et d'induire sa phosphorylation, par un mécanisme encore inconnu mais indépendant des kinases JAK. L'activation de STAT6 n'a pas d'influence sur la production d'IFN de type I ni sur les ISG induits par cette voie, mais elle permet l'induction d'autres chimiokines comme CCL2 et CCL20 (Chen et al., 2011).

D'autres modifications post-traductionnelles peuvent influencer l'activité de STING. Une phosphorylation sur le résidu sérine 366 empêche STING de phosphoryler IRF3. Cette phosphorylation, impliquée dans la régulation négative de STING, est induite par la kinase ULK1 activée en présence de CDN (Konno et al., 2013). D'autres phosphorylations existent mais leurs rôles sont encore mal connus. STING peut aussi être régulée par ubiquitination. Les ubiquitines ligases TRIM32 et TRIM36 seraient impliquées dans le processus de dimérisation de STING ou dans le recrutement de TBK1 (Tsuchida et al., 2010; Zhang et al., 2012).

L'expression d'une isoforme de STING, appelée MRP (pour MITA-related protein), peut aussi réguler son activité. MRP est issu d'un épissage alternatif où l'exon 7 n'est pas conservé. Cette isoforme ne possède pas le domaine de liaison CTT qui permet à TBK1 et à IRF3 d'interagir avec STING. De plus, MRP est capable d'interagir avec STING empêchant la liaison avec TBK1 et inhibe donc l'expression d'IFN de type I. Toutefois, l'activation de NFκB reste inchangée (Chen et al., 2014).

La protéine STING a été retrouvée dans la membrane du réticulum endoplasmique, dans celle de l'appareil de Golgi ou dans des vésicules qui communiquent d'un organite à l'autre (Ishikawa and Barber, 2008; Ishikawa et al., 2009; Saitoh et al., 2009). En l'absence de ligands, STING est ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Sous activation par de l'ADN et après fixation de TBK1 sur STING, ce complexe forme des foyers et se situe dans divers compartiments cellulaires qui sont encore mal définis. L'importance de sa mobilité intracellulaire a été mise en évidence par une protéine STING mutée bloquée dans la membrane du réticulum endoplasmique et qui, sous stimulation, n'a pas permis de déclencher une réponse immunitaire (Saitoh et al., 2009). D'autres études situent STING dans des vésicules périnucléaires (Ishikawa et al., 2009), ou dans des vésicules autophagiques. En effet, ATG9 et LC3, protéines impliquées dans la formation d'autophagosomes ont été colocalisées avec STING après stimulation. ATG9 semble par ailleurs contrôler l'inflammation induite par STING car sa perte induit une augmentation de la formation des complexes STING/TBK1/IRF3 (Saitoh et al., 2009).

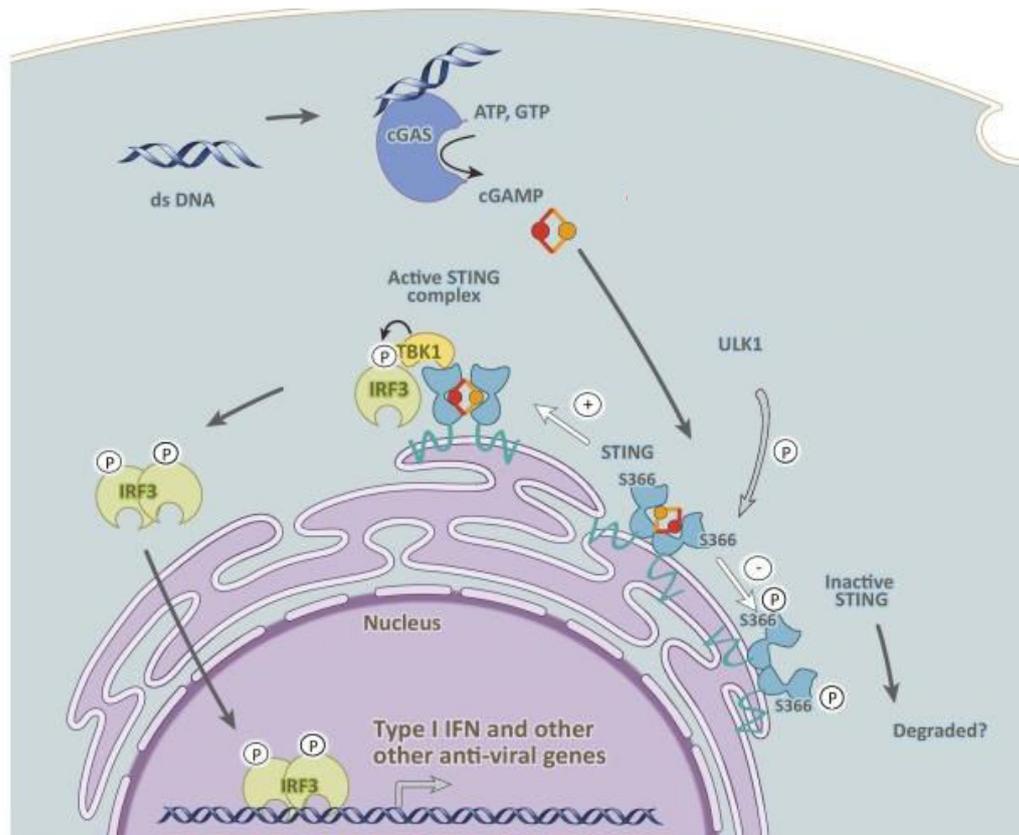


Figure 25 : Régulation de l'activation de STING par les ADN double brin cytoplasmiques. L'enzyme cGAS détecte les ADN double brin, produit des dinucléotides cycliques appelés cGAMP qui viennent se fixer à STING, présent sur la membrane du réticulum endoplasmique. STING recrute alors la kinase TBK1 qui phosphoryle IRF3. Les dimères de IRF3 phosphorylés entrent ensuite dans le noyau et induisent l'expression des IFN de type I (Diner and Vance, 2014). La kinase ULK1, activée par la présence de CDN, inhibe l'action de STING en la phosphorylant en sérine 366. dsDNA : ADN double brin.

L'étude de STING chez des patients qui ont un dérèglement de leur système immunitaire a permis de mettre en évidence, en plus de la mutation donnant l'isoforme MRP, divers polymorphismes de cette protéine. STING possède normalement une arginine à la position 232. Lorsque ce résidu est muté pour être remplacé par une histidine, STING ne répond plus avec la même affinité aux CDN d'origine bactérienne. Si l'arginine est remplacée par de la glutamine, STING ne reconnaît que le cGAMP métabolisé par cGAS. Il existe d'autres variants de STING R71H, G230A et R293Q qui sont bien activés par tous les types de CDN mais qui induisent la voie IFN de type I à des niveaux médiocres. Ces mutations ont pour conséquences des réponses immunitaires inflammatoires trop faibles pour protéger l'organisme contre les infections (Yi et al., 2013). Les mutations peuvent aussi entraîner une surexpression de STING et donc une inflammation constitutive responsable de maladies comme le lupus (Jeremiah et al., 2014).

4.4 IFN, système immunitaire et réponse tumorale

De manière analogue à la réponse immunitaire induite par les agents pathogènes, certains traitements du cancer, comme la chimiothérapie ou la radiothérapie, entraînent une mort cellulaire immunogène (comme introduit au paragraphe 3.6.3). L'inflammation est médiée par l'expression de protéines solubles appelées cytokines. Ci-dessus, nous avons décrit la famille des IFN. A celle-ci

s'ajoutent des interleukines et des chimiokines qui jouent un rôle important dans l'activation et la signalisation du système immunitaire inné et adaptatif dans le contexte tumoral. Notre compréhension du rôle des cellules immunitaires dans la lutte de l'organisme contre les tumeurs est à la base du concept d'immunothérapie, qui obtient des résultats cliniques impressionnants.

Les IFN jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation des cellules du système immunitaire. Les cellules du système immunitaire participant à l'élimination des cellules tumorales sont les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les cellules dendritiques, les NK, les macrophages de type I (M1), les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+), les Th1, et les lymphocytes B. Les IFN de type II activent par exemple la différenciation des monocytes, cellules précurseurs des phagocytes qui comprennent les macrophages, les cellules dendritiques et les granulocytes. Avec l'aide d'autres cytokines, l'IFN γ permet la différenciation des monocytes en macrophages de type M1 qui permettent de recruter les cellules NK et Th1 aux sites tumoraux pour tuer un maximum de cellules endommagées. Les IFN de type I sont aussi capables d'activer les cellules NK (Ortaldo et al., 1983).

Selon les cytokines présentes dans le microenvironnement, d'autres cellules du système immunitaire peuvent être recrutées au niveau de la tumeur et inhiber l'activité cytotoxique des cellules tueuses par un mécanisme d'immunosuppression. Ces cellules, pro-tumorales sont les cellules myéloïdes suppressives, les lymphocytes T régulateurs, les macrophages de type II (M2) et les Th2. Ces derniers proviennent de lymphocytes T CD4+ qui se différencie en Th2 en présence d'IL-4. Les Th2 sécrètent des IL-4, 6 et 10 qui permettent de recruter des macrophages associés à la tumeur (TAM), aussi appelés M2. Ils existent différents types de M2 : les M2a, M2b et M2c dont le rôle est très différent de celui des macrophages de type M1. Ils induisent une régénération des tissus endommagés en inhibant l'activation des cellules immunitaires pour diminuer l'inflammation (Gundra et al., 2014).

Récemment, des expériences de greffes réalisées dans des souris syngéniques, immunocompétentes, ont permis de montrer que les IFN de type I n'étaient pas seulement produits par les cellules du système immunitaire, mais aussi par les cellules tumorales. En effet, les tumeurs ont été récupérées après chimiothérapie et les cellules triées de manière à séparer les cellules immunitaires des cellules tumorales. Ensuite, un transcriptome a été réalisé sur les cellules tumorales et les résultats ont été confirmés par PCR quantitative. Ces expériences ont permis de révéler que la surexpression d'ISG et d'IFN β était retrouvée dans les cellules tumorales elles-mêmes (Sistigu et al., 2014) montrant ainsi que les cellules du système immunitaire ne sont pas les seules à contribuer à la production d'IFN.

Les IFN ont un rôle complexe et peuvent, selon les conditions, stimuler ou inhiber alternativement la réponse immunitaire. En plus d'influencer le système immunitaire, la signalisation médiée par les IFN agit aussi sur les cellules tumorales et là encore, son rôle peut être polyvalent.

4.4.1 Les IFN et la stimulation du système immunitaire

L'influence du système immunitaire sur le développement tumoral a été initialement observée chez l'Homme. Par exemple, une régression tumorale a été observée sur le foyer tumoral irradié mais aussi les foyers tumoraux non irradiés chez des patients présentant des métastases soumis à une radiothérapie ciblée sur un site métastatique (Postow et al., 2012). Un effet similaire a été observé

avec une chimiothérapie. Malgré le fait que ce traitement soit systémique, la preuve de l'activation du système immunitaire a été faite par l'observation d'une infiltration de la tumeur par les lymphocytes T. Pour le cancer du sein, la forte présence d'infiltrats lymphocytaires est même devenue un élément prédictif de la réponse au traitement (Denkert et al., 2010; Loi et al., 2013; Andre et al., 2013; Lee et al., 2006; McCoy et al., 2000).

Des modèles animaux sont aussi venus confirmer l'influence du système immunitaire dans la réponse globale au traitement. Pour illustrer ce point, des cellules de mélanome injectées dans des souris sont soumises à une forte irradiation : seules les souris immunocompétentes répondent au traitement par une régression tumorale ; les tumeurs transplantées dans les souris nude ou d'autres souris déplétées en lymphocyte CD8+ ne répondent pas aux radiations (Lee et al., 2009). L'action du système immunitaire a aussi été décrite dans ces modèles sous chimiothérapie. Des souris génétiquement modifiées *TLR4*^{-/-} ne sont plus capables d'activer correctement le système immunitaire, menant à une inefficacité de la chimiothérapie (Apetoh et al., 2007). Des inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité ont récemment été développés pour améliorer la réponse immunitaire. Lorsque PD-1 (présent sur les cellules lymphocytes T) et son ligand PD-L1 (présent sur les cellules tumorales et immunitaires) forment un complexe, la reconnaissance et fonction des lymphocytes CD8+ est inhibée. Des anti-PD-1 et anti-PD-L1 ont été développés et réussissent à améliorer la réponse immunitaire. Ainsi en combinaison avec une radiothérapie, la réponse anti-tumorale est potentialisée (Deng et al., 2014a; Postow et al., 2012).

Le système immunitaire joue donc un rôle prépondérant dans la réponse aux traitements anti-tumoraux. Cependant, il est actuellement difficile d'établir la contribution individuelle des différents compartiments de la tumeur (cellules tumorales, stroma, cellules immunitaires) dans les mécanismes conduisant à la réaction immunitaire et à la réduction tumorale. Par exemple, la présence d'ISG est souvent décrite dans les transcriptomes de tumeurs, et cela s'avère vrai dans plusieurs types de cancer, sans pour autant que le compartiment cellulaire qui les exprime soit identifié (Magbanua et al., 2015; Perou et al., 2000; Weichselbaum et al., 2008; Wolf et al., 2014).

Afin d'établir le rôle des IFN dans la réponse au traitement, dans l'induction des ISG et dans l'activation du système immunitaire, différentes études ont été entreprises. Après radiothérapie, des IFN de type I sont retrouvés dans le microenvironnement de cellules de mélanome. Ces cellules, implantées dans une souris génétiquement modifiée *IFNAR*^{-/-}, ne répondent pas à la radiothérapie à cause d'un défaut d'activation des cellules dendritiques qui perdent la capacité d'induire l'activation des lymphocytes T. Dans ce contexte, le simple ajout d'IFN β dans une souris sauvage sans radiothérapie permet d'activer la réponse immunitaire et de réduire le volume tumoral. Sachant que les IFN de type II sont produits une fois les lymphocytes T activés, il semble que les IFN de type I soient les premiers IFN impliqués dans la réponse au traitement (Burnette et al., 2011 ; Ma et al., 2011). De même, des souris déficientes pour STING, ne répondent pas à la radiothérapie car le système immunitaire n'est pas activé. La présence de STING permet l'expression des IFN de type I, nécessaire pour activer les cellules dendritiques et lymphocytes T (Deng et al., 2014b). STING étant activé par des PRR, ceci suggère que le microenvironnement tumoral détecte les PRR relâchées par des cellules tumorales lysées et induit ensuite la sécrétion d'IFN capables d'activer le système immunitaire. C'est en ce sens que l'industrie pharmaceutique (dont Novartis) s'est investie dans le

développement d'agonistes de STING, dans le but de stimuler le système immunitaire pour favoriser l'éradication des cellules tumorales (Fu et al., 2015).

Les IFN de type II, produits par les lymphocytes T suite à une chimiothérapie ou à une radiothérapie, jouent aussi un rôle important dans la réponse tumorale. Ils permettent l'activation des cellules NK, l'augmentation de la production des CMH et des immunoprotéasomes qui favorisent la présence d'antigènes à la surface des cellules. De plus, ils permettent une différenciation vers les cellules Th1 plutôt que Th2, capables de tuer les cellules par sécrétion de cytokines qui se fixent à leurs récepteurs de mort (Haabeth et al., 2014).

Grâce à la capacité d'activer le système immunitaire, les IFN ont aussi un rôle dans l'immunosurveillance. En effet, des modèles de souris génétiquement modifiées ont permis de mettre en évidence l'importance de la signalisation IFN dans le contrôle de la tumorigénèse. Sous l'action d'agents carcinogènes (méthylcholanthrène), des souris déficientes en IFN ou en STAT1, son effecteur principal, développent plus rapidement des tumeurs et en plus grand nombre. De plus, des souris *RAG2/STAT1*^{-/-} ont aussi une fréquence d'apparition des tumeurs plus élevée comparativement à des *RAG2*^{-/-}, souris ne pouvant plus créer de lymphocytes B ou lymphocytes T matures (Shankaran et al., 2001).

Les IFN, de type I et de type II, s'imposent donc comme régulateurs de l'activité du système immunitaire. Les DAMP présents dans le microenvironnement tumoral permettent la production des IFN qui activent le système immunitaire. Cette inflammation paraît nécessaire pour induire une réduction du volume tumoral. Les IFN ont donc ici un rôle anti-tumoral.

4.4.2 IFN et immunosuppression

Bien que dans le paragraphe précédent, nous ayons mis en évidence l'effet bénéfique des IFN dans la réponse tumorale, on relève un certain nombre de données contradictoires. En effet, l'inflammation apparaît être un terrain propice au développement tumoral (Mantovani et al., 2008) et à la récurrence (Magbanua et al., 2015; Teijaro et al., 2013; Weichselbaum et al., 2008; Wilson et al., 2013). Lors d'une inflammation marquée par une forte présence d'ISG, l'action du système immunitaire diminue. Ce phénomène est appelé immunosuppression.

En plus de leurs propriétés anti-tumorales, les IFN de type I et de type II ont démontré leur implication dans des effets pro-tumoraux. Des cellules tumorales mammaires de souris, exposées à de faible dose d'IFN γ , ne sont pas tuées par les cellules NK ni les lymphocytes T (Lollini et al., 1993). En effet, l'IFN γ joue aussi un rôle dans la résistance adaptative. Il induit la perte d'expression d'antigène et l'induction de ligand diminuant l'action du système immunitaire (Morel et al., 2000). Par exemple, les IFN de type I et II stimulent l'expression de l'immunosuppresseur PD-L1 par la cellule tumorale qui se fixe sur PD-1 présent sur les lymphocytes T et réduit leur activation. De plus, PD-L1 peut aussi être produit par les cellules immunitaires elles-mêmes. Ces cellules s'inhibant entre elles, cela entraîne une suppression de l'activité du système immunitaire (Pardoll, 2012). Comme PD-L1, d'autres ISG sont immunosuppresseurs : IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase), USP18 et les SOCS contribuent à l'inhibition de la voie JAK/STAT et donc de l'inflammation (Song and Shuai, 1998; Spranger et al., 2013). En conclusion, les ISG eux-mêmes sont donc capables d'induire une résistance au traitement comme nous l'avons vu dans le paragraphe 4.2.3.

D'autres cellules comme les fibroblastes peuvent être associées à la résistance. En effet, les cellules stromales sont riches en ARN non codants qui peuvent être sécrétés dans des exosomes et transférés dans les cellules cancéreuses. RIG-1 est alors activée et entraîne la co-phosphorylation de STAT1 et de NOTCH3 dont le rôle dans la résistance de cellules initiatrices de tumeur et dans la récurrence a été démontré (Boelens et al., 2014).

Enfin, comme vu plus haut, certains types de cellules du système immunitaire, comme cellules myéloïdes suppressives, les lymphocytes T régulateurs, les M2 et les Th2 diminuent l'activité des cellules cytotoxiques laissant les cellules tumorales proliférer. Cet aspect sera plus détaillé en discussion.

4.4.3 Influence de l'IFN sur la tumeur et la réponse au traitement

Contrairement aux résultats exposés au paragraphe 4.4.1, montrant l'importance des IFN dans l'activation des cellules du système immunitaire pour induire une régression tumorale (Burnette et al., 2011), d'autres données suggèrent que la régression tumorale n'est pas dépendante de l'action des IFN sur le système immunitaire mais serait dépendante de l'action des IFN sur les cellules tumorales. En effet, des fibrosarcomes greffés sur des souris *IFNAR*^{-/-}, répondent de la même manière à la chimiothérapie que les souris sauvages. Cependant, des greffes de fibrosarcomes *IFNAR*^{-/-} sur des souris sauvages deviennent résistantes au traitement. L'activation de la voie IFN dans les cellules tumorales semble donc importante dans les mécanismes de réponse au traitement. De plus, l'ajout de CXCL10 dans les souris sauvages greffées avec les fibrosarcomes *IFNAR*^{-/-} permet de rétablir la sensibilité à la chimiothérapie. Les résultats suggèrent que la production des IFN de type I est importante pour induire la production de CXCL10 par les cellules tumorales (Sistigu et al., 2014). Cette expérience met en avant l'importance de la signalisation IFN dans les cellules tumorales sur la réponse au traitement.

Les IFN ont des effets anti-tumoraux sur les cellules cancéreuses. Tout d'abord, les IFN ont des propriétés antiprolifératives. En effet, ils sont connus pour arrêter la prolifération des cellules en phase G1 du cycle cellulaire par différents mécanismes. Par exemple, la surexpression d'inhibiteurs de Cdk comme p19 ou p21 induite par les IFN permet de stopper la prolifération (Matsuoka et al., 1998; Roos et al., 1984).

De plus, ils induisent ou activent des gènes pro-apoptotiques comme BAX, BAK, TRAIL, les caspases, et inhibent l'expression des gènes anti-apoptotiques BCL-2 et IAP. Par exemple, les IFN α induisent l'apoptose par la voie mitochondriale : la perte du potentiel membranaire et le relargage de cytochromes-c dans le cytoplasme entraînent l'activation des caspases 9 et 8 puis les caspases 1, 2 et 3 (Thyrell et al., 2002).

Les IFN de type I sont aussi connus pour augmenter l'expression des antigènes à la surface des cellules et ainsi faciliter la détection par les cellules cytotoxiques du système immunitaire. En effet dans un modèle de souris portant une xélogreffe de cellules tumorales humaines du colon, l'ajout d'IFN α montre que des anticorps monoclonaux radioactifs se fixent mieux à la tumeur grâce à l'expression des antigènes induits (Greiner et al., 1987). Il en est de même pour les CMH-I, dont

l'expression induite par les IFN à la surface des cellules, permet aux lymphocytes T de tuer les cellules du soi infectées ou abimées.

Cependant, les cellules tumorales elles-mêmes semblent contribuer à la résistance intrinsèque : suite à une chimiothérapie ou une radiothérapie, des cellules tumorales meurent tandis que d'autres survivent au traitement. Après plusieurs cycles de traitements, des cellules résistantes ont été sélectionnées. Elles ont la particularité de surexprimer STAT1 et certains ISG, les IRDS (pour « IFN – related DNA-damage resistance ») (Khodarev et al., 2004). Les mécanismes permettant de comprendre les rôles de ces ISG dans la résistance ne sont pas encore élucidés. Seule une hypothèse a été formulée pour ISG15 qui contribuerait aux mécanismes de réparations de l'ADN (Efimova et al., 2009).

Le rôle des IFN dans le contexte tumoral paraît très complexe. Il pourrait en partie s'expliquer par des effets doses/temps d'exposition des cellules aux cytokines. De plus, les IFN pourraient avoir des effets différents selon la nature de la cible : les cellules tumorales et les cellules immunitaires pourraient activer des ISG partiellement différents. Cela pourrait aussi résulter de modifications post-traductionnelles cellule-spécifiques de STAT1 (homo-/hétérodimérisation, phosphorylation sur différents résidus) pouvant engendrer des activités transcriptionnelles différentes, et donc l'induction de différents ISG. Un exemple est la présence de U-STAT1, qui induit des gènes de la signature IRDS dans les cellules tumorales (Cheon et al., 2013) ; cela sera plus longuement abordé dans la discussion.

Contexte de la thèse et objectifs

Les patients atteints de cancer du sein sont traités par différents traitements : chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, thérapie ciblée. Lorsque cela est possible, la tumeur est retirée par intervention chirurgicale, après traitement néo-adjuvant ou non. Cependant, après quelques années, de nombreux patients rechutent. Pour étudier ce phénomène, la technologie des « microarrays » a permis de caractériser de nombreux transcriptomes sur différents cancers. Bien souvent, de nombreux ISG sont exprimés, et sont interprétés comme le reflet d'une inflammation du microenvironnement tumoral avec la présence de cellules T activées. Comme nous venons de le voir, cette signature peut être le reflet d'un bon pronostic. Cependant, la surexpression des ISG a aussi été associée à un mauvais pronostic. L'expression des IFN dans le microenvironnement tumoral, qui activent STAT1 et déclenchent l'expression des ISG, peut donc être associée à des rôles totalement opposés, ce qui reste très mal compris. De plus, l'origine cellulaire des IFN demeure incertaine, peu d'études ayant réellement tenté de déterminer si les IFN provenaient des cellules cancéreuses, des cellules immunitaires ou des cellules stromales présentes dans le microenvironnement tumoral.

Durant cette thèse CIFRE, réalisée dans le cadre d'un partenariat public-privé, j'ai pu d'abord participer à un projet développé par le département R&D de XenTech visant à utiliser les nombreux modèles de PDX de cancer du sein développés par l'entreprise pour mieux comprendre les mécanismes de réponse/résistance à divers traitements. Après traitement par chimiothérapie, une régression tumorale a été observée pour certains modèles PDX, et pas d'autres. De manière systématique cependant, les tumeurs initialement répondeuses au traitement ont donné lieu à une récurrence. Ces modèles expérimentaux ont donc permis de modéliser deux situations rencontrées chez les patients, à savoir d'une part la réponse initiale au traitement (versus la résistance *de novo*), et d'autre part la récurrence. L'analyse transcriptomique des PDX quelques jours après le début du traitement, ou plus tardivement en phase de tumeurs résiduelles, a permis de mettre en évidence l'activation de la voie IFN spécifiquement dans les cellules tumorales, et surtout, l'association systématique de cette signature avec la régression initiale du volume tumoral. Cette signature pourrait donc être utilisée comme marqueur prédictif précoce de la réponse au traitement. Les résultats de cette première étude sont présentés dans une publication à laquelle j'ai participé en tant que troisième auteure (« **Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer** », *British Journal of Cancer*, 2016).

Pour approfondir les mécanismes responsables de l'activation de la voie IFN observée dans les cellules tumorales de certaines PDX, et les conséquences fonctionnelles sur la cellule elle-même, une étude *in vitro* a ensuite été initiée. Elle a constitué l'essentiel de mon travail expérimental. Dans un premier temps, j'ai criblé de nombreuses lignées cellulaires (ATCC ou issues de PDX dissociées) afin d'identifier des modèles capables (ou non) d'activer la voie IFN, comme cela avait été observé dans les PDX. Ensuite, j'ai analysé les mécanismes impliqués dans l'activation de cette voie. De manière intéressante, nous avons pu montrer que la voie STING, décrite ci-dessus comme étant activée dans les cellules immunitaires en amont de la production d'IFN, était également mobilisée dans la cellule tumorale sous stress génotoxique. Grâce à des approches de criblage fonctionnel par interférence ARN, nous avons accumulé des résultats expérimentaux suggérant que la signature IFN est vraisemblablement associée à la résistance à la chimiothérapie *in vitro*, c'est-à-dire en absence de toute composante immunitaire. Des études plus focalisées sur certains gènes candidats ont permis

d'identifier PARP12 comme un ISG dont l'inhibition diffère significativement la reprise tumorale *in vitro*. Cette seconde partie de mon travail de thèse fait l'objet d'un manuscrit actuellement soumis pour publication et dont je suis première auteure (« **Intracellular STING inactivation sensitizes breast cancer cells to genotoxic agents** »).

RESULTATS

Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer

Marie-Emmanuelle Legrier, Ivan Bièche, [Julie Gaston](#), Arnaud Beurdeley, Vanessa Yvonnet, Olivier Déas, Aurélie Thuleau, Sophie Château-Joubert, Jean-Luc Servely, Sophie Vacher, Myriam Lassalle, Stéphane Depil, Gordon C Tucker, Jean-Jacques Fontaine, Marie-France Poupon, Sergio Roman-Roman, Jean-Gabriel Judde, Didier Decaudin, Stefano Cairo, and Elisabetta Marangoni.

Br J Cancer 114: 177-87 (2016).

Préambule

Dans cet article, nous avons étudié une série de modèles de PDX de cancer du sein triple négatifs. Ceux-ci ont été traités par chimiothérapie, à savoir l'association adriamycine/cyclophosphamide couramment utilisée chez les patientes. Ces PDX nous ont permis de modéliser les différentes réponses au traitement : la résistance *de novo* et la sensibilité au traitement suivie d'une phase de repousse.

Une étude transcriptomique a permis de comparer l'expression des gènes des tumeurs non traitées aux cellules tumorales résiduelles correspondantes présentes dans les nodules après chimiothérapie. Une microdissection laser a permis de focaliser l'analyse sur les gènes exprimés dans les cellules tumorales. Cette étude a mis en évidence la surexpression de nombreux gènes, notamment de gènes appartenant à la voie IFN/STAT1, dans les cellules tumorales. Ces résultats ont été confirmés par qRT-PCR avec des sondes spécifiques humaines. Ces expériences permettent ainsi de démontrer que la surexpression de cette voie IFN/STAT1 provient des cellules tumorales humaines, et non du stroma.

De manière intéressante, cette voie IFN/STAT1 se trouve surexprimée quelques jours seulement après traitement et est étroitement associée à la réponse à la chimiothérapie, car les tumeurs montrant une résistance *de novo* au traitement ne l'expriment pas. De plus, l'augmentation de l'expression de la voie IFN/STAT1 s'accompagne d'un fort marquage de γ H2AX, reflétant des lésions de l'ADN, et de la présence de caspases 3 clivées. Cette signature pourrait donc être utilisée comme biomarqueur prédictif de la réponse.

Afin de comprendre les mécanismes d'induction de la voie IFN/STAT1 *in vivo* sous chimiothérapie, un inhibiteur pharmacologique de JAK, le ruxolitinib, a été combiné à la chimiothérapie. Alors que ce composé est censé inhiber la phosphorylation de STAT1, il n'a pas permis d'empêcher l'induction de la voie. Ce résultat inattendu suggère la mise en place de mécanismes complexes qui sont discutés dans la publication.

Keywords: STAT1; ER-negative breast cancer; IFN; chemotherapy; predictive signature

Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer

Marie-Emmanuelle Legrier¹, Ivan Bièche², Julie Gaston¹, Arnaud Beurdeley¹, Vanessa Yvonnet¹, Olivier Déas¹, Aurélie Thuleau³, Sophie Château-Joubert⁴, Jean-Luc Servely^{4,5}, Sophie Vacher², Myriam Lassalle¹, Stéphane Depil⁶, Gordon C Tucker⁶, Jean-Jacques Fontaine⁴, Marie-France Poupon¹, Sergio Roman-Roman³, Jean-Gabriel Judde¹, Didier Decaudin^{3,7}, Stefano Cairo^{*,1,8,9} and Elisabetta Marangoni^{*,3,9}

¹XenTech, 4 rue Pierre Fontaine, Evry 91000, France; ²Genetics Department, Hospital, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France; ³Translational Research Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France; ⁴Department of Pathology, Veterinary School of Alfort, Maisons-Alfort 94704, France; ⁵INRA, Phase Department, Nouzilly, France; ⁶Institut de Recherches Servier, PIT Oncology, Croissy-sur-Seine 78290, France; ⁷Medical Oncology Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France and ⁸University of Ferrara, LTTA Centre, Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, Ferrara, Italy

Background: Oestrogen receptor-negative (ER⁻) breast cancer is intrinsically sensitive to chemotherapy. However, tumour response is often incomplete, and relapse occurs with high frequency. The aim of this work was to analyse the molecular characteristics of residual tumours and early response to chemotherapy in patient-derived xenografts (PDXs) of breast cancer.

Methods: Gene and protein expression profiles were analysed in a panel of ER⁻ breast cancer PDXs before and after chemotherapy treatment. Tumour and stromal interferon-gamma expression was measured in xenografts lysates by human and mouse cytokine arrays, respectively.

Results: The analysis of residual tumour cells in chemo-responder PDX revealed a strong overexpression of IFN-inducible genes, induced early after AC treatment and associated with increased STAT1 phosphorylation, DNA-damage and apoptosis. No increase in IFN-inducible gene expression was observed in chemo-resistant PDXs upon chemotherapy. Overexpression of IFN-related genes was associated with human IFN- γ secretion by tumour cells.

Conclusions: Treatment-induced activation of the IFN/STAT1 pathway in tumour cells is associated with chemotherapy response in ER⁻ breast cancer. Further validations in prospective clinical trials will aim to evaluate the usefulness of this signature to assist therapeutic strategies in the clinical setting.

Neoadjuvant chemotherapy (NAC) is currently being used in breast cancer patients with locally advanced disease, and it has increasing applications in patients with initially operable breast cancer but aggressive pathological features (high grade, high proliferation, triple-negative or HER2-positive (HER2⁺) breast carcinoma). Several trials have shown that achievement of a pathological complete response (pCR) after chemotherapy strongly

correlates with favourable long-term outcome (von Minckwitz *et al*, 2012). Differences in survival between patients with or without a pCR were largest in patients with HER2⁺/oestrogen receptor-negative (ER⁻) and triple-negative breast cancer (TNBC) (von Minckwitz *et al*, 2012).

Despite initial chemosensitivity, patients with TNBC and HER2⁺/ER⁻ subtypes have worse distant disease-free survival

*Correspondence: Dr E Marangoni; E-mail: elisabetta.marangoni@curie.fr or Dr S Cairo; E-mail: Stefano.Cairo@xentech.eu

[†]These authors contributed equally to this work.

Revised 7 October 2015; accepted 15 October 2015; published online 22 December 2015

© 2016 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/16

and overall survival than those with the luminal subtypes. In HER2+ breast cancer, adding trastuzumab to chemotherapy significantly increases pCR (Buzdar *et al*, 2005). For TNBC, however, about 70% of patients do not achieve pCR after neo-adjuvant chemotherapy and suffer a dramatically worse outcome, with a higher probability of metastatic relapse and a 3-year OS of only 60–70% (Carey *et al*, 2007; Liedtke *et al*, 2008). As a majority of TNBC patients endure the toxicity of cytotoxic chemotherapy (CTX) without benefit, and as valuable time for a potentially more efficient alternative treatment is lost, there is a strong rationale for clinical and experimental research to identify predictive markers of response and more efficient therapies.

Several clinical studies reported gene expression changes during NAC (Hannemann *et al*, 2005; Boidot *et al*, 2009). Hannemann *et al* (2005) showed that response of breast cancer to NAC results in gene expression alterations. Gonzalez-Angulo *et al* (2012) analysed 21 paired tumour samples pre- and post-NAC in basal-like, HER2+ and luminal breast cancer patients. They reported significant changes in several kinase pathways, including PI3K and sonic hedgehog, metabolism and immune-related pathways. More recently, Balko *et al* (2012) profiled formalin-fixed tissues from 49 breast cancers using supervised NanoString gene expression analysis. They found low concentrations of DUSP4 in basal-like breast cancer and demonstrated that its overexpression was associated with CTX-induced apoptosis in cell lines. Korde *et al* (2010) reported changes in gene expression after one cycle of docetaxel and capecitabine NAC. They identified 71 differentially expressed gene sets, including DNA repair and cell proliferation regulation pathways. By analysing residual samples of tumours partially responsive to anthracycline/cyclophosphamide (AC) NAC, Koike Folgueira *et al* (2009) showed that some of them retained their parental molecular signature, whereas others presented significant changes. All studies found biological modifications between pretreatment and posttreatment tumours. However, no common signature or pathway emerged, possibly reflecting patient heterogeneity and/or differences in the neo-adjuvant regimen, the percentage of non-tumour cells (normal, fibrotic and inflammatory tissue), the delay between the biopsy and the last chemotherapy cycle or the technique used for analysis. In addition, no early gene expression changes in post-NAC samples were generally captured in clinical studies.

Transplantable patient-derived xenografts (PDXs) are a valuable preclinical tool to assess drug efficacy, study resistance mechanisms and generate hypotheses that can be tested and translated to the clinic (Hidalgo *et al*, 2014; Marangoni and Poupon, 2014). The panel of breast cancer PDX models used in this study reproduces the phenotypic and molecular heterogeneity of clinical breast cancer, including response to CTX (Marangoni *et al*, 2007; Reyat *et al*, 2012). Several models show very good response to standard CTX that reduces tumours to microscopic residual tumour cell foci, which will eventually fuel local tumour recurrence *in vivo* (Romanelli *et al*, 2012). Analysis of these residual tumour foci can assist the investigation of the biological basis of tumour drug response, survival and recurrence (Marangoni *et al*, 2009; Romanelli *et al*, 2012). In the present study, we analysed gene expression changes upon CTX administration in a panel of ER- PDX models. We identified induction of genes related to interferon (IFN)/STAT1 pathway as a common feature of chemo-sensitive breast cancers linked to the DNA damage-response. IFN/STAT1 pathway-related gene overexpression was induced early after treatment start and persisted in residual tumour cells, whereas no increased expression was observed in genotoxic treatment-resistant PDXs. This suggests that IFN/STAT1-related gene expression induction could be an early predictive marker of tumour response in ER- breast cancers.

METHODS

PDX establishment and *in vivo* efficacy studies. All patients had previously given their verbal informed consent, at the time of first consultation at the Institut Curie, for experimental research on residual tumour tissue available after histopathological analyses. PDX establishments have been performed after approval of the ethics committee of the Institut Curie.

The care and use of animals used here was strictly applying European and National Regulation for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in force. This experiment complies with the procedure number 6 approved by the Ethical Committee CEEA-Ile de France Paris (official registration number 59). Swiss nude mice, 10-week-old female, were purchased from Charles River (Les Arbresles, France). Establishment of PDX models from primary breast cancers and *in vivo* responses to chemotherapies have previously been published (Marangoni *et al*, 2007). Adriamycin (DOX, Doxorubicin, Teva Pharmaceuticals, Paris, France), cisplatin (CDDP, Teva Pharmaceuticals) and cyclophosphamide (Endoxan, Baxter, Maurepas, France) were administered by intra-peritoneal (i.p.) route at the doses of 2, 6 and 100 mg kg⁻¹, respectively, every 3 weeks. Capecitabine (Xeloda, Roche Laboratories, Nutley, NJ, USA) was administered *per os* at the dose of 540 mg kg⁻¹ day⁻¹, q5d × 5 week and Irinotecan (Fresenius Kabi, Sèvres, France) by i.p. route at the dose of 50 mg kg⁻¹ at days 0, 3, 7 and 11. Ruxolitinib (RUX; Novartis, Rueil-Malmaison, France) was given *per os* at the dose of 30 mg kg⁻¹ 3 week⁻¹.

Histological analysis of the inter-scapular fat pad and *in situ* hybridisation of tumour residues. Histological analysis of residual tumours and *in situ* hybridisation of a human *Alu* probe were performed, as previously described (Romanelli *et al*, 2012). Tumours with at least 40% of tumour content, as determined by histology, were included in the study.

Immunohistochemical (IHC) characterisation of xenografted tumours. Xenografted tumours were fixed in 10% neutral buffered formalin, paraffin embedded and haematoxylin-eosin (H&E) stained to differentiate the human tumour components from the murine stroma. Tumour tissues were analysed by IHC for expression of the following biomarkers: P-STAT1^{Tyr701} (1/1000; Cell Signaling Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), P- γ -H2AX^{Ser139} (1/1000; Merck Millipore, Billerica, MA, USA). P-STAT1^{Tyr701}-positive tumour foci were counted in untreated and RUX-treated tumour sections; mean \pm s.d., $n = 5$ per group. Nuclear staining was considered positive for P- γ -H2AX expression. For each tumour, the percentage of P- γ -H2AX staining was evaluated in seven different areas.

Gene expression studies. Before gene expression analysis, tumour samples were microdissected using laser capture microdissection technology, according to the PALM protocol (outsourced to ZEISS, Munich, Germany). RNA was extracted from microdissected areas using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). This approach allowed isolating foci of human tumour cells from the murine stroma. Gene expression analysis was performed with Affymetrix Exon 1.0 ST microarrays. Hybridisation, data normalisation and statistical analysis were outsourced to GenoSplice Technology (Paris, France). Additional statistical analyses were performed using BRB-ArrayTools (developed by Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team at NCI). Microarray data were deposited in the Gene Expression Omnibus database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (GSE58990).

Real-time PCR amplification. Theoretical and practical aspects of real-time quantitative PCR (qPCR) have been previously described (Bieche *et al*, 2001; Reyat *et al*, 2012). For normalisation, averaged

expression of at least two genes among the human *RPL13*, *TBP*, *HPRT* or *GAPDH* housekeeping genes was used in each experiment. Detailed protocols for cDNA synthesis, PCR amplifications and gene normalisation were described elsewhere (Tozlu *et al*, 2006; Romanelli *et al*, 2012). Data were normalised to housekeeping gene expression and untreated tumour samples, mean \pm s.d., $n = 3$ per group. All human primers were tested for human specificity. The list of primers used for SybrGreen and Taqman-mediated assays is available on request.

Western blotting. Protein were extracted in non-denaturing lysis buffer and quantified with the microBCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Lysates were resolved on 4–12% TGX gels (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), transferred into nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and immunoblotted overnight at 4 °C or 1 h at room temperature with the following antibodies: P-STAT1^{Tyr701}, CASP-3 (1/750–1000; Cell Signaling Ozyme), Total STAT1 (1/1000; Santa Cruz antibodies, Nanterre, France), P-STAT1^{Ser727}, P- γ H2AX^{Ser139} (1/1000; Merck Millipore), OAS1, IFI44, LCN2, or Actin, as an internal control loading (1/1000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, directed against the species of primary antibody (Pierce), during 1 h at room temperature before chemoluminescence reading. Western blotting was performed in triplicate, and data show a representative finding of these triplicate analyses. To determine species specificity, antibodies against P-STAT1 and STAT1 were also tested in IHC in the HBCx-10 xenograft: P-STAT1 staining appeared restricted to tumour cells, while STAT1 antibody stained both cancer (human) and fibroblast (murine) cells (data not shown).

Cytokine array analyses. Tumour cytokine levels were measured using mouse and human cytokine array (panel A and B), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Three hundred micrograms of total protein lysates were extracted and pooled from tumours of three mice similarly treated. Horseradish peroxidase substrate (R&D Systems) was used to detect protein expression. Arrays were scanned using Fx7 camera system (Fusion Molecular Imaging Fx7) and optical density measurement was obtained with the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA). Data were obtained in duplicate, mean \pm s.d., $n = 3$ mice per group.

Ex vivo assays for caspase 3/7 activity. Tumour protein extracts were prepared in lysis buffer containing protease inhibitor cocktail tablet (PMSF, aprotinin, leupeptin, pepstain A, Roche Diagnostics, Meylan, France) and incubated during 1 h at 4 °C. Activity was measured on synthetic substrate Ac-DEVD-AFC for caspase-3/7 (AnaSpec, San Jose, CA, USA). Enzymatic reactions were allowed to proceed for 30 min at room temperature. Fluorescence intensity was measured at different time points on a PerkinElmer LS 50B spectrofluorometer (PerkinElmer Life Sciences, Norwalk, CT, USA) ($\delta\text{Ex}/\delta\text{Em} = 380/500$ nm). Specificity of the fluorometric signal was confirmed by adding specific caspase inhibitor to the reaction mixture (CASP-3 inhibitor, z-DEVD-fmk). Caspase 3/7 activity was measured in picomoles of AFC released per minute and milligrams of protein using a standard curve of free AFC.

RESULTS

Gene expression profiling of postchemotherapy residual tumours identifies upregulation of IFN-inducible genes. To characterise molecular changes occurring in residual tumour cells after chemotherapy, we used three TNBC PDX models previously described (Marangoni *et al*, 2007; de Plater *et al*, 2010): HBCx-6, HBCx-8, and HBCx-17. In these models, treatment by AC results in tumour regression, followed by tumour regrowth (Figure 1A).

PDX models were treated by one cycle of AC, and tumours were micro-dissected at three different time points: before chemotherapy, during response (residual stage), and at tumour recurrence. At the residual disease stage, cancer cells could be identified in the inter-scapular fat pad by *in situ* hybridisation with Alu probes that detect human genomic sequences. An example is shown in Figure 1B: two tissue sections of a residual tumour excised from the fat pad during the remission stage have been stained with H&E (top) and hybridised *in situ* with Alu probes (Alu, bottom). Two distinct nodules containing human cancer cells are stained in blue within the mouse stroma.

In order to identify genes commonly deregulated, gene expression analysis was performed by comparing gene expression profile of residual tumours and untreated control tumours from HBCx-6, HBCx-8 and HBCx-17 PDXs. Two hundred and seventy-four genes were differentially expressed at P -value < 0.05 (Supplementary Table S1). Among the most significantly upregulated genes, many were IFN-inducible genes (Table 1). The IFN pathway was activated in post-AC residual tumours of the three models (Table 1 and Supplementary Table S2). A comparison between the list of 274 genes and the IFN-regulated genes database (<http://www.interferome.org>) (Rusinova *et al*, 2013) showed that 83 genes corresponded to genes involved in both type I (a and b) and type II (g) IFN signalling pathways, while only 32 and 25 genes were specifically involved in type I and II pathways, respectively (Figure 1C).

To confirm IFN pathway activation, a selected number of IFN-inducible genes (*IFIT1*, *IFIT3*, *IFI6*, *IFI44*, *MX1*, *STAT1*, *IFI27*, *IFNB1*, *ISG15*) were analysed by qPCR with human-specific primers in untreated and residual tumours samples of these three PDXs, plus HBCx-10, an additional TNBC PDX model highly responsive to AC (Figure 1C). Comparative gene expression analysis of pooled untreated, residual and regrowing tumours from the four experiments confirmed significant upregulation of IFN-inducible genes in residual tumours. We also evaluated whether activation of the IFN-related genes is a transient or constitutive event by measuring the expression of the signature in tumours at relapse. As shown in Figure 1C, IFN-related gene expression intensity in regrowing tumours returns to the levels measured before treatment, indicating that the overexpression observed is a transient event.

To determine whether this activation occurs also in HER2 + breast cancer treated with AC, we measured the expression level of the IFN signature in the HBCx-5 PDX, established from a lymph node HER2 + metastasis (Marangoni *et al*, 2007). As for the TNBC models, we found the IFN genes upregulated after AC treatment at the residual disease stage (Supplementary Figure S1).

As transcription of IFN-inducible genes is dependent on STAT1 phosphorylation (Levy and Darnell, 2002), we analysed the expression of P-STAT1 and total STAT1 levels by western blotting in PDX treated with AC-based chemotherapy. Consistent with the mRNA data, total STAT1 expression was constantly increased in residual tumour foci compared with untreated and regrowing tumours (Figure 1D). P-STAT1 isoforms (P-STAT1^{Tyr701} and P-STAT1^{Ser727}) were also strongly increased in all residues tested. Expression of STAT1-target proteins: IFI44, LCN2, and OAS1 was also increased in residual tumour cells in two out of three models, as compared with untreated or regrowing tumours (Figure 1D). Taken together, these results reveal the existence of an IFN signature in residual cancer cells after treatment by AC, associated with STAT1 phosphorylation.

Upregulation of IFN-inducible genes is not restricted to AC chemotherapy. To investigate whether this upregulation was specifically linked to AC chemotherapy, the same analysis was performed in the HBCx-33 TNBC model, responder to cisplatin and capecitabine chemotherapies (Figure 2A). We found IFN-inducible genes upregulated in residual tumours after both

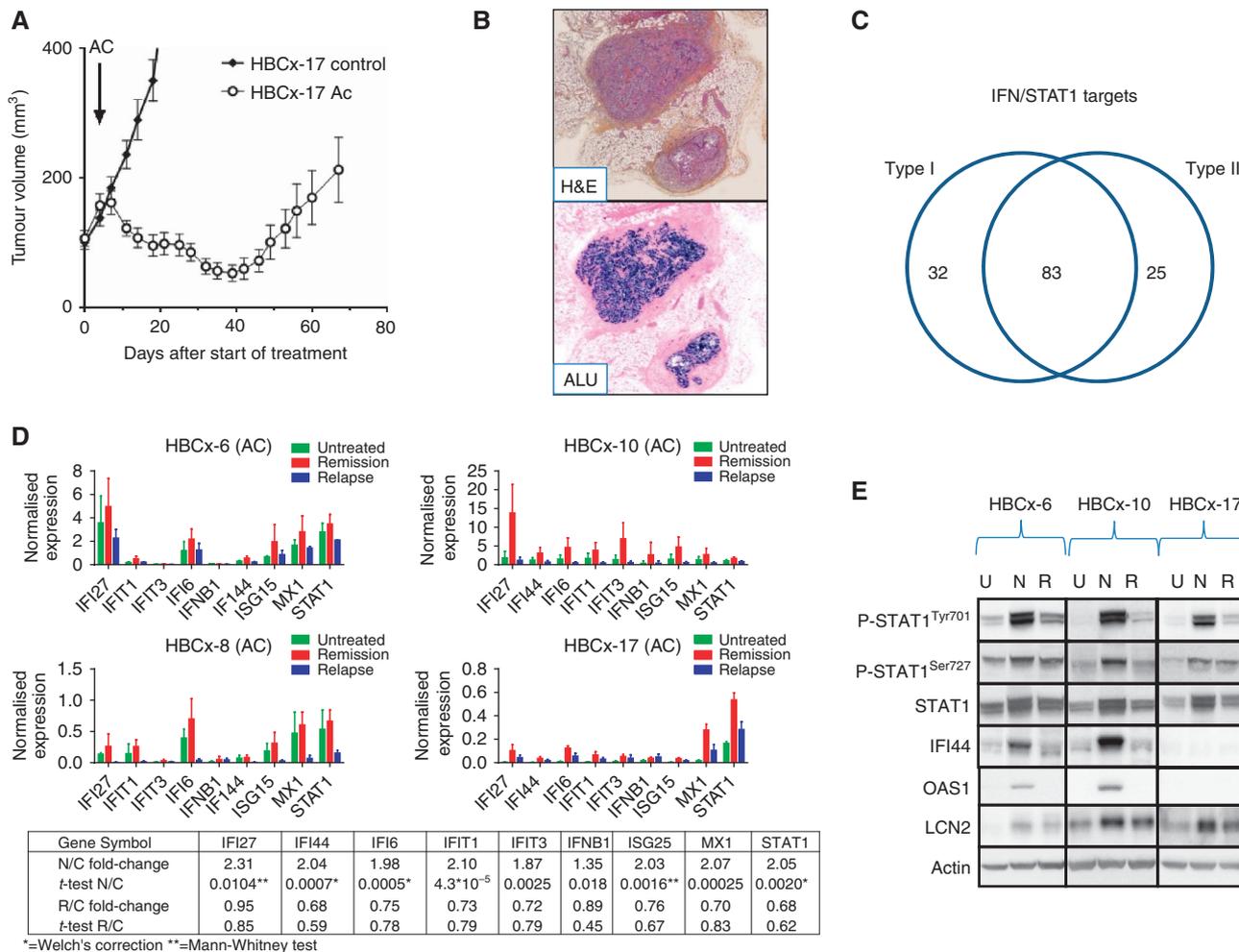


Figure 1. Upregulation of IFN-inducible genes and STAT1 phosphorylation in residual tumour foci after AC treatment. (A) *In vivo* response of HBCx-17 to AC (2/100 mg kg⁻¹) (mean tumour volume ± s.d.) n = 11 per group. (B) H&E analysis and *in situ* hybridisation of Alu probes of one residual tumour foci after chemotherapy response (× 25). (C) Type I and II interferon distribution by ISG Database. (D) qRT-PCR analysis of STAT1 and eight other IFN-inducible genes in untreated samples, residual and regrowing tumours. HBCx-6, HBCx-8 HBCx-10 and HBCx-17 PDX were treated with AC, mean ± s.d., n = 5 per group. Comparative analysis of all samples from the four experiments in different experimental conditions (Rel: relapse; Rem: remission; Untr: untreated); fold-change refers to mean intensity value ratio between the two experimental condition indicated. P-value was calculated by t-test except for results indicated with * = t-test with Welch's correction or ** = Mann-Whitney test. (E) Western blotting of P-STAT1^{Tyr701/Ser727}, STAT1, IFI44, LCN2 and OAS1 in three PDX models responding to AC treatment. Tumours were analysed at the indicated phases: untreated (U), residual (N = nodule) and relapse tumour (R = Relapse).

treatments, indicating that IFN signature upregulation was not specific to AC chemotherapy (Figure 2B). In addition, the analysis of gene expression in individual tumours showed that upregulation of IFN-inducible genes was no longer detectable 30 days after cisplatin treatment (xenograft #5, Figure 2C). Overall, these results indicate that activation of IFN-inducible genes is not chemotherapy dependent and does not persist over time.

Activation of the IFN pathway is an early event following AC chemotherapy in AC-responder tumours *in vivo*. To further analyse the relationship between activation of IFN-inducible genes and response to chemotherapy, the expression of 21 genes (*BST2*, *CLDN1*, *DDX60*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFI6*, *IFIT1*, *IFIT3*, *IFITM1*, *IRF9*, *LAMP3*, *MX1*, *OAS1*, *OAS2*, *PARP9*, *PARP12*, *SAMD9*, *STAT1*, *STAT2*, *UBE2L6*, *ZNFX1*) selected from the IFN/STAT1 signature was measured 3 (D3) and 7 days (D7) following AC treatment in 9 TNBC that respond to AC and 5 TNBC and 1 HER2-positive non-responder PDXs by qPCR (Figure 3). Expression of the majority of the IFN-inducible genes was found increased at D3 and D7 posttreatment only in AC-responder tumours, whereas no over-expression was observed in resistant tumour models (Figure 3A).

Comparative analysis of the IFN-related signature expression level at this two time points in sensitive and resistant models showed that overexpression at D7 was higher for the majority of the genes of the signature in the majority of PDXs analysed, as accounted by a stronger P-value (Supplementary Table S3). We asked whether the lack of IFN/STAT1 pathway activation in AC-resistant tumours was due to an intrinsic tumour cell inability to activate the STAT1 pathway following administration of a drug that induces DNA damage. To answer this question, we analysed the expression of IFN-related genes in a HER2+ PDX (HBCx-13), a model that is resistant to AC but that responds well to irinotecan (Figure 3B). Interestingly, we found that IFN-inducible genes were strongly upregulated 7–14 days after irinotecan treatment but not after AC treatment. This result suggests that IFN/STAT1 activation is tightly associated with drug efficacy and not with intrinsic tumour ability or inability to activate the pathway.

Overall, these results show that upregulation of IFN-inducible genes is associated with response to chemotherapy *in vivo*.

Assessment of caspase-3/7 activity and P-γH2AX expression in AC-treated tumours. A number of studies previously reported an

Table 1. List of interferon-inducible genes differentially expressed ($P < 0.05$) between HBCx-6, HBCx-8 and HBCx-17 in residual tumour cells (Nodule) and untreated tumours (CTRL)

Probeset	Gene symbol	Description	Log intensity, Nodule	Log intensity, CTRL	Fold-change	P-value
2343473	IFI44L	Interferon-induced protein 44-like	8.02	5.76	4.79	2.2356E-08
3432514	OAS2	2'-5'-Oligoadenylate synthetase 2, 69/71 kDa	8.24	5.99	4.77	7.0434E-08
2707876	LAMP3	Lysosomal-associated membrane protein 3	8.62	6.71	3.75	1.0104E-07
3114832	SQLE	Squalene epoxidase	9.19	10.01	1.76	1.1416E-07
2539125	CMPK2	Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	7.48	5.86	3.06	2.9044E-07
3854454	BST2	Bone marrow stromal cell antigen 2	7.99	5.68	4.97	7.4185E-07
3257232; 3257246	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	7.86	5.57	4.9	1.2013E-06
2792800	DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	6.88	5.64	2.36	2.7678E-06
3753860	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	8.13	6.68	2.72	2.9819E-06
3457752; 3457791	STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2, 113 kDa	7.94	7.31	1.54	3.8979E-06
2403261	IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	11.63	9.57	4.18	1.5932E-05
3432438	OAS1	2',5'-Oligoadenylate synthetase 1, 40/46 kDa	8.01	6.3	3.29	1.7783E-05
2531377	SP100	SP100 nuclear antigen	7.57	6.54	2.05	1.8694E-05
2468351	RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	7.21	5.9	2.48	1.8855E-05
2735362	HERC6	Hect domain and RLD 6	7.63	6.38	2.39	1.9415E-05
2343511	IFI44	Interferon-induced protein 44	7.15	5.64	2.85	1.9929E-05
2592268; 2592333; 2592346	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91 kDa	8.93	7.76	2.26	2.05E-05
3257204	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	6.99	5.06	3.81	2.1174E-05
3432467	OAS3	2'-5'-Oligoadenylate synthetase 3, 100 kDa	7.92	6.6	2.49	3.657E-05
3922100	MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	8.41	6.68	3.31	3.7176E-05
3907234	SDC4	Syndecan 4	9.83	9.24	1.5	4.0052E-05
2970532	HDAC2	Histone deacetylase 2	8.63	8.99	1.28	5.8824E-05
2982319	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	8.41	7.69	1.65	6.003E-05
2334602	TSPAN1	Tetraspanin 1	7.27	6.55	1.65	7.896E-05
2699726; 2699770	PLSCR1	Phospholipid scramblase 1	8.62	7.74	1.84	0.0001171
2692060	PARP9	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	7.37	6.21	2.23	0.0001354

implication of STAT1 in the DNA-damage response (DDR) (Townsend *et al.*, 2005; Brzostek-Racine *et al.*, 2011). We therefore assessed the effects of AC administration on markers of DNA damage and apoptosis by measuring phosphorylated- γ H2AX (P- γ H2AX) and caspase-3/7 activity in both chemo-sensitive and chemo-resistant tumours. Cleavage of pro-CASP3 (32 kDa) into 17 and 12 kDa subunits revealed CASP3 activity in responder tumours at D7 post-AC, while no caspase-3 activity was observed in resistant tumours (Figure 4A and B). The percentage of tumour cells with P- γ H2AX foci increased to up to 80–90% in responder tumours at D3–D7 post-AC treatment, while it reached only 40% in non-responder tumours (Figure 4C and D). These results indicate that tumour response and activation of IFN/STAT1 pathway are associated to massive DNA damage induction and apoptosis.

Early induction of INF-related genes is associated with STAT1 phosphorylation and IFN- γ secretion in tumour cells. To determine whether early induction of IFN-related genes was

associated with STAT1 activation, we measured STAT1 phosphorylation at days 3 and 7 after AC treatment in four resistant and four responder PDXs. Time-course western blotting analysis of STAT1 protein expression after AC treatment showed that the amounts of total STAT1, P-STAT1^{Tyr701} and P-STAT1^{Ser727} isoforms were simultaneously increased between 3 and/or 7 days after treatment in responder tumours (Figure 5A), while no increase was observed in AC-resistant tumours.

To determine whether STAT1 phosphorylation could be related to IFN secretion by an autocrine mechanism or by the surrounding environment, the expression of tumour (human) and stromal (mouse) IFN- γ was analysed at different time points after chemotherapy (D3, D7, D14, residual tumour stage and regrowth) in tumour protein lysates from HBCx-10 model, using human- and mouse-specific cytokine arrays. Results showed a small increase in murine IFN- γ detectable at D14 after AC and in residual tumour samples, while the level of human IFN- γ was dramatically increased at D3 and D7 (Figure 5B), indicating that chemotherapy

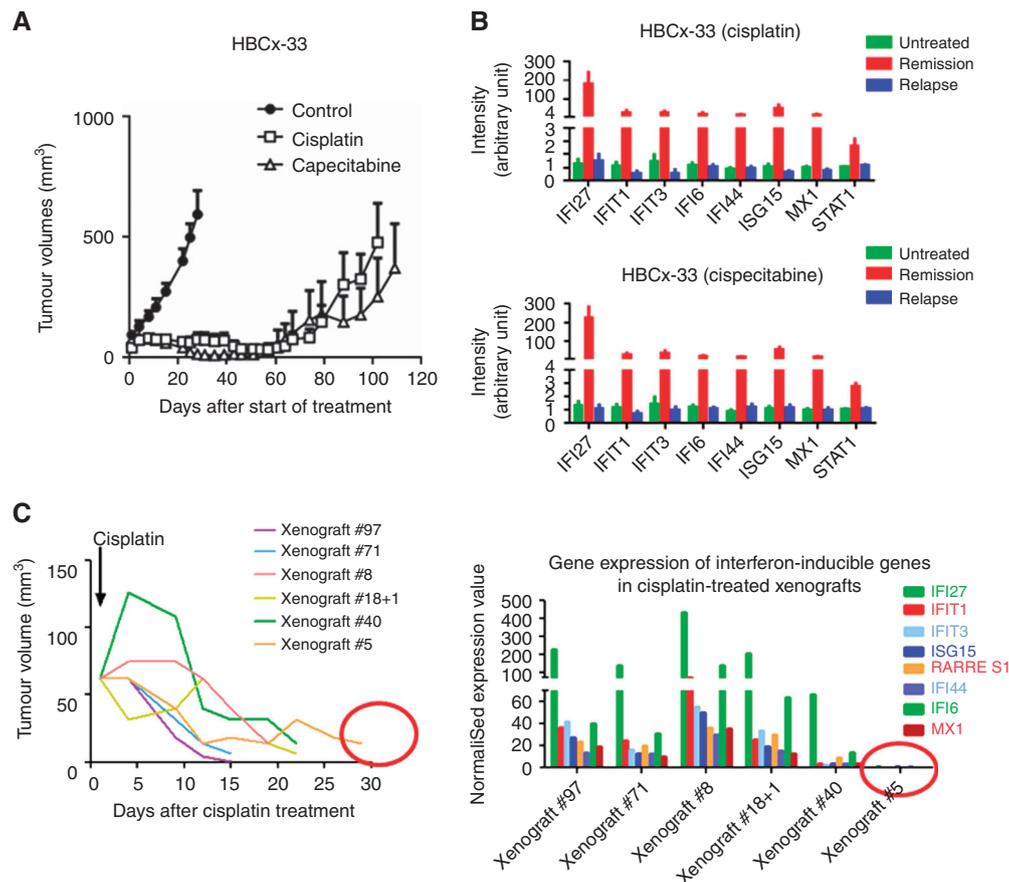


Figure 2. Response to cisplatin and capecitabine treatment and expression analysis of the *IFN*-inducible genes in the HBCx-33 xenograft. (A) *In vivo* response to cisplatin (6 mg kg⁻¹) and capecitabine (540 mg kg⁻¹ day⁻¹) in HBCx-33 xenograft. (B) Expression analysis of *IFN*-inducible genes after capecitabine and cisplatin treatments. Mean \pm s.d., $n = 6$. (C) Individual growth curves after cisplatin treatment in the 'residual tumour group' of HBCx33 xenograft and gene expression analysis of the *IFN*-inducible genes.

stimulates the secretion of *IFN- γ* by the tumour cells at an early stage after treatment. As *IFN- α* and *- β* were not present in the cytokine array, we measured their mRNA expression by RT-PCR in the HBCx-10 and HBCx-33 PDX. *IFN- α* was not detected, while *IFN β* expression was increased in residual tumours of the HBCx-10 tumour after AC treatment ($P = 0.045$) and of the HBCx-33 PDX after capecitabine treatment ($P = 0.015$) (Supplementary Figure S2).

Inhibition of JAK activity by RUX does not change response to chemotherapy. To evaluate whether STAT1 phosphorylation is mediated by the *IFN*/JAK pathway during early response to chemotherapy, and if this effect is causally involved with tumour response, HBCx10 tumour model was treated with the JAK1/JAK2 inhibitor RUX (Mesa *et al*, 2012) prior to AC administration. RUX treatment was started at D1 and AC treatment was given at D8 (concomitant schedule). In addition, to inhibit JAK/STAT pathway during residual tumour stage, RUX treatment was started when tumour had regressed 3 weeks after AC administration (sequential schedule). RUX administered as single agent did not affect tumour growth but induced a significant reduction in the number of P-STAT1^{Tyr701}-positive tumour foci (Figure 5C and D). To analyse the effect of RUX on the expression of *IFN*-related genes upon treatment, qPCR analysis was performed in four groups of mice: untreated, AC treated, RUX treated, and AC + RUX treated. Tumours treated with AC alone or in combination with RUX showed the same response profile, as shown by survival curves (Figure 5E). Despite a decreased expression of *IFN*-related genes in the RUX-treated groups, the increase of *IFN*-related gene

expression in the AC + RUX-treated tumours, compared with RUX-treated group, was identical to the increase measured in the AC-treated group compared with the untreated tumours. (Figure 5F). Also, RUX treatment did not prevent nor delay tumour regrowth when administered in the sequential schedule. These results indicate that tumour response is strongly associated with increased expression of *IFN*-related genes and that it does not depend on the basal expression level of *IFN*-related genes. In addition, they suggest that induction of *IFN*-related gene expression by chemotherapy could be independent of the canonical JAK/STAT pathway.

DISCUSSION

To explore the molecular basis of drug response and residual cancer cell persistence after chemotherapy, we used a panel of TNBC and HER2 + breast cancer PDX models. The analysis of tumour gene expression before and after chemotherapy treatment showed a consistent upregulation in residual tumours of a group of *IFN*-inducible genes, associated with increased STAT1 and P-STAT1 protein levels. More than 50% of upregulated genes corresponded to genes involved in both α/β and γ *IFN* signalling, as suggested by the comparison between the list of genes and the *IFN*-stimulated genes database (Rusinova *et al*, 2013).

Enrichment of JAK/STAT-related genes in residual tumours surviving chemotherapy has been reported in a transgenic murine breast cancer model (Franci *et al*, 2013). Franci *et al* (2013) performed a microarray analysis of MMTV-PyMT residual

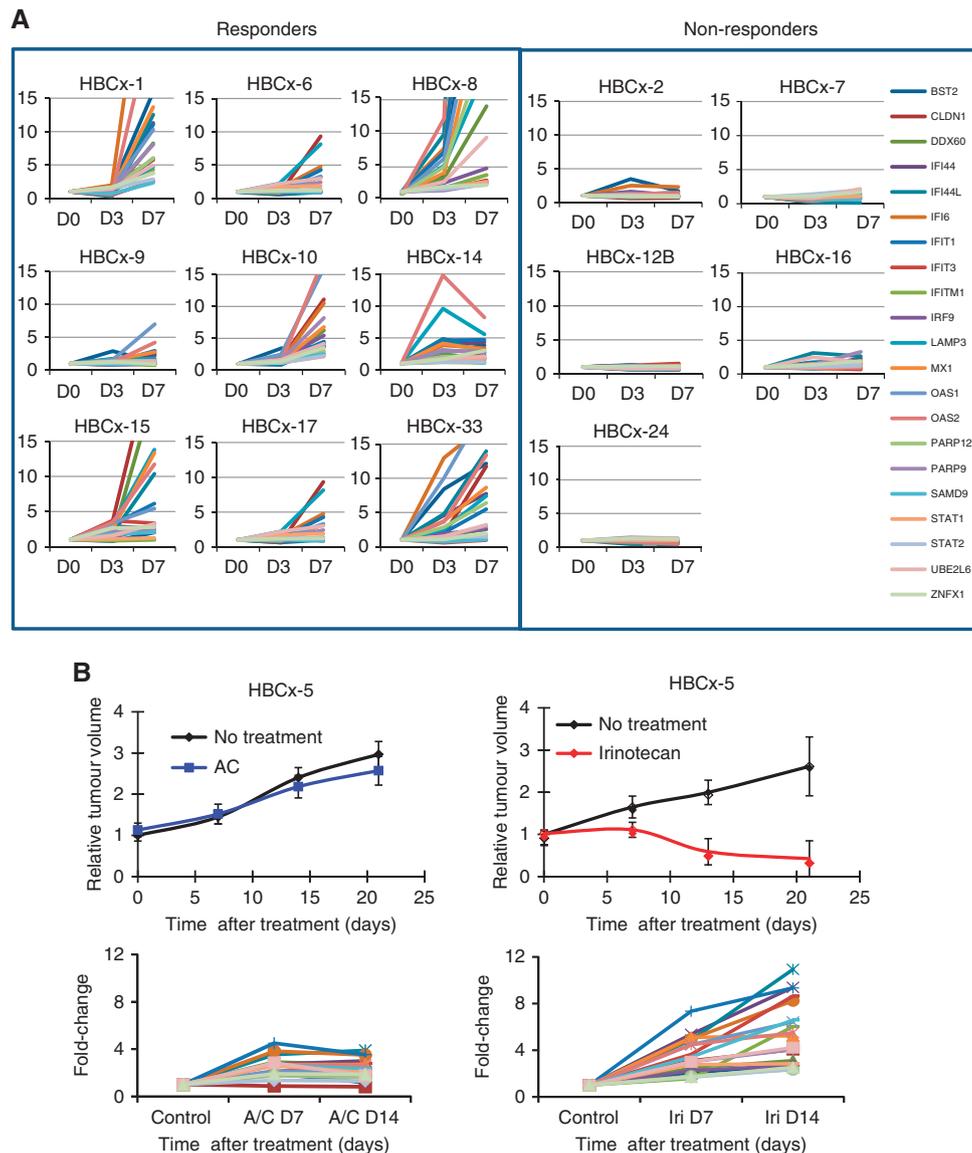


Figure 3. Analysis of IFN/STAT1 pathway activity in chemo-responder and chemo-resistant PDX at early stage after chemotherapy. **(A)** mRNA expression of a 21-gene IFN/STAT1 signature analysed by qPCR at days 0, 3 and 7 post-AC treatment in 9 responders and 5 resistant models. Each curve represents the expression of one gene. **(B)** *In vivo* response to AC and irinotecan in the HER2+ HBCx13 model and analysis of IFN-inducible genes (*BST2*, *CLDN1*, *DDX60*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFI6*, *IFIT1*, *IFIT3*, *IFITM1*, *IRF9*, *MX1*, *OAS1*, *OAS2*, *PARP12*, *PARP9*, *SAMD9*, *STAT1*, *STAT2*, *UBE2L6*, *ZNFX1*) at D7 and D14.

tumours after TAC chemotherapy *in vivo* (docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide) and found enrichment of the JAK/STAT pathway, Notch pathway and epigenetic regulators. Our findings that IFN/STAT pathway activation following AC administration is an early and transient event, which turned off after 3 weeks and returned to pretreatment levels in regrowing tumours (Figure 1C), suggests that this upregulation is a direct consequence of chemotherapy administration rather than an enrichment of cancer cells with an intrinsic pretreatment signature. In support of this hypothesis, upregulation of IFN-inducible genes was no longer detectable in tumours analysed at later time points during the regression phase.

Activation of the IFN/STAT pathway was restricted to PDX models that responded to chemotherapy. One explanation is that IFN/STAT activation is linked to the DDR induced by chemotherapy. This is in line with the findings that both caspase activity and P- γ H2AX, an early marker of DNA damage, also increased significantly in AC-responder tumours. Previous studies reported a

connection between STAT1 and the DDR, such as the role of STAT1 in activation of the ATM-Chk2 checkpoint pathway following gamma ray-irradiation (Townsend *et al*, 2005), and the activation of the IFN/STAT1 pathway in human cells treated with genotoxic agents (Brzostek-Racine *et al*, 2011). In addition, a recent work showed that murine cell lines exhibited overexpression of IFN-related genes when BRCA2 was knocked down (Xu *et al*, 2014).

The absence of induced STAT1 activation observed in AC-resistant tumour may be due either to failure of the drugs to induce sufficient DNA damage or to a lack of functional STAT1 downstream signalling during the DDR. We consider the second possibility as unlikely as STAT1 activation and tumour regression could be induced by irinotecan in the AC-resistant HBCx-13 model. Tumour resistance to cyclophosphamide and alkylating agents has been previously attributed to detoxifying mechanisms upstream of DNA damage, such as elevated aldehyde dehydrogenase, increased glutathione levels and/or glutathione-

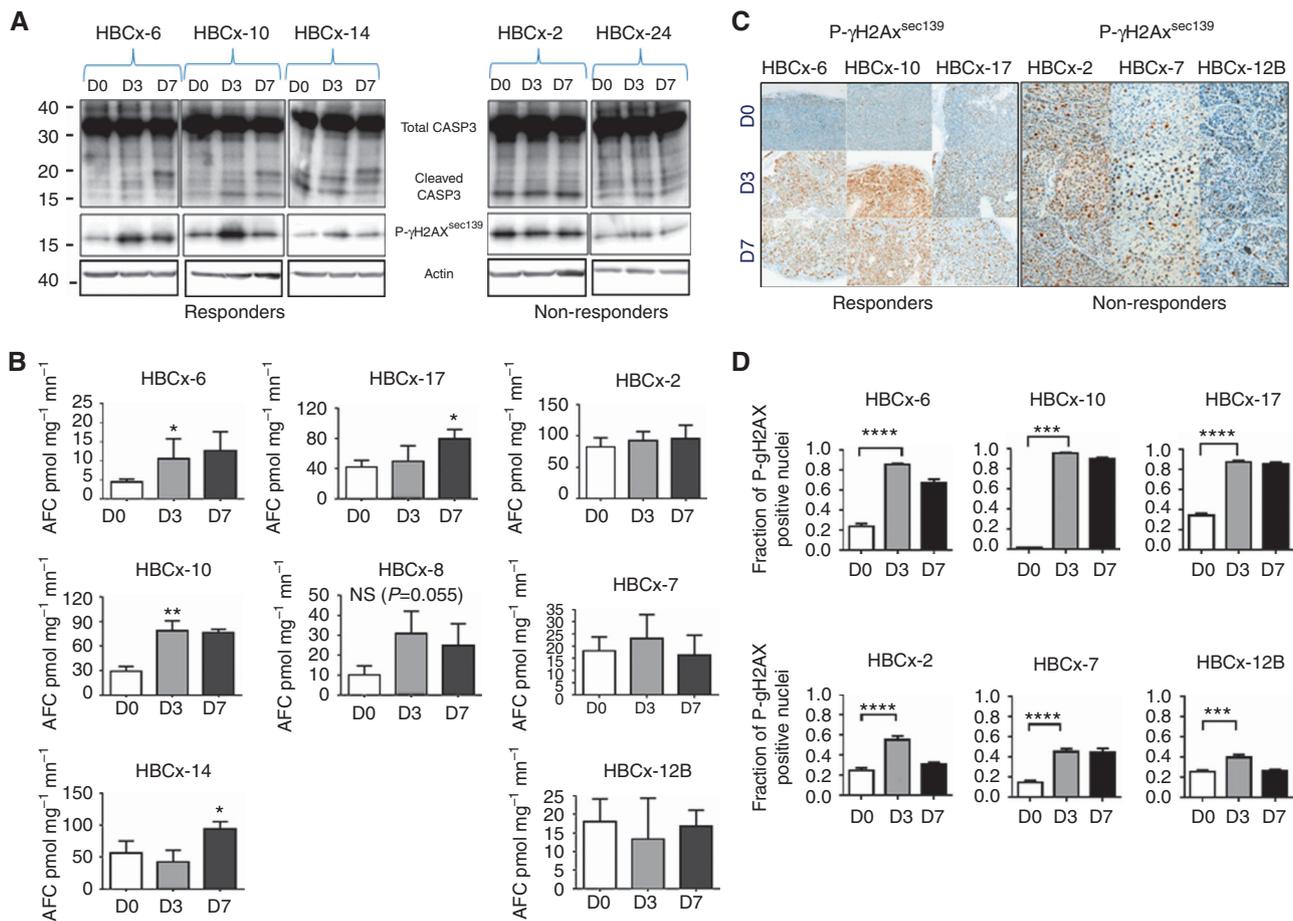


Figure 4. Analysis of Caspase-3/7 activity and P- γ H2AX in TNBC PDX models treated with AC. **(A)** Western blotting analysis of CASP-3 and P- γ H2AX^{Sec139} in 3 AC-responder and 2 AC-non-responder models at 3 and 7 days after AC treatment. **(B)** Caspase-3/7 activity in 5 AC-responder and 3 AC-non-responder tumours at D3 and D7 following AC treatment. **(C)** IHC analysis of P- γ H2AX^{Sec139} in 3 responder and 3 non-responder tumours at D3 and D7 after AC treatment ($\times 200$). **(D)** Fractions of P- γ H2AX-positive nuclei quantified in responder (HBCx-6, HBCx-10 and HBCx-17) and non-responder tumours (HBCx-2, HBCx-7 and HBCx-12B) at D0, D3 and D7 after AC treatment. Mean \pm s.d., $n = 3$. Statistical significance is measured by Student's *t*-test. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$.

S-transferase activity (Andersson *et al*, 1994; Richardson and Siemann, 1995; Miyake *et al*, 2012), and temporal factors related to the efficiency of DNA repair were also suggested (Andersson *et al*, 1994). Further work will be needed to identify the mechanisms mediating resistance to AC in non-responder TNBCs.

We considered the hypothesis that activation of the IFN/STAT1 pathway could be associated with the presence of cytokines secreted by stromal tumour-infiltrating cells in relation to drug-induced cell death and/or inflammation. Indeed, intratumoural infiltration by lymphocytes and IFN response in primary tumour predicts the efficacy of NAC in breast cancer patients (Andre *et al*, 2013). In addition, the fact that STAT1 activation has been previously observed *in vitro* upon exposure of tumour cells to genotoxic insult suggests that it can occur in the absence of stroma or IFN-secreting immune cells (Townsend *et al*, 2005; Brzostek-Racine *et al*, 2011; Hussner *et al*, 2012). As one of the activators of the IFN canonical pathway is IFN- γ , which binds to IFN- γ receptors to activate the JAK/STAT cascade (Platanias, 2005), we measured the level of both human and mouse cytokines in the HBCx-10 xenograft. The finding that expression of human but not murine IFN- γ was increased 3 days after chemotherapy administration suggests that, at least in this xenograft model, early IFN/STAT pathway activation may be related to an autocrine mechanism, where the tumour cells secrete IFN- γ . Although human IFN- α and - β were not included in the cytokine array, the RT-PCR analysis showed an increase of IFN- β mRNA level in

residual tumours after chemotherapy treatment, suggesting possible involvement of type I IFN signalling in these tumours. This hypothesis is further supported by the study recently published by Sistigu *et al* (2014), showing that the therapeutic activity of anthracyclines relies on IFN 1 signalling in neoplastic cells. However, the HBCx-10-relapsing tumours contained high level of human IFN- γ while the IFN signature was absent. This could signify that relapsing tumours could be insensitive to IFN- γ -induced signature or that other cytokines, such as IFN- α and - β , might contribute to the induction of IFN-related genes.

Further studies will clarify whether IFNs secreted by tumour cells exerts a rather paracrine activity on the surrounding stromal component.

Upon exposure to the JAK inhibitor RUX, P-STAT1 levels and the baseline expression level of IFN-inducible genes was clearly reduced in the tumour without impacting growth rate. Also, when administered at residual tumour stage to tumours that had previously received AC treatment, RUX did not prevent nor delayed tumour regrowth, indicating that the JAK/STAT1 signalling is not essential to sustain tumour proliferation in this model. Exposure of untreated or RUX-treated HBCx-10 PDX to AC induced both the same response profile and early increase of IFN/STAT-related gene expression in the two groups, suggesting that the baseline expression level of IFN-inducible genes is not relevant in determining tumour response. The observation that the increase of IFN-related gene expression in the AC + RUX-treated

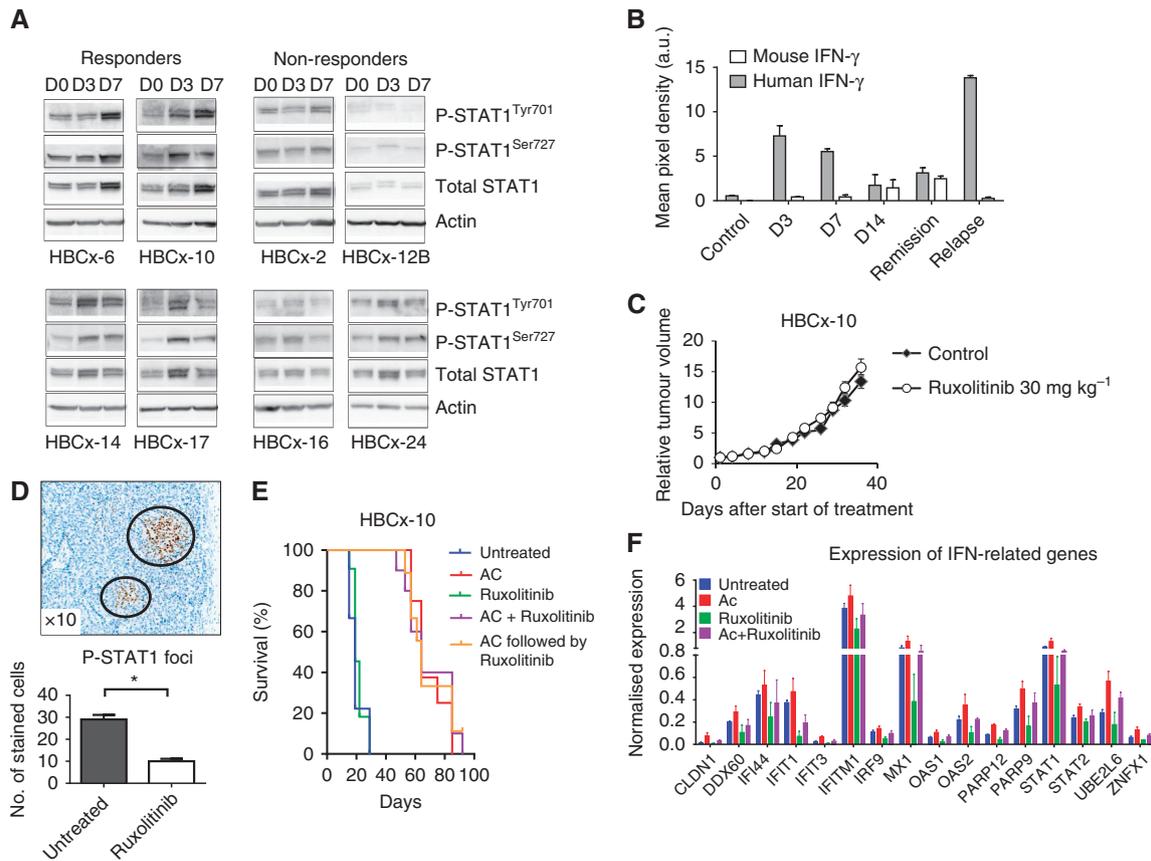


Figure 5. Activation of JAK/STAT1 pathway and expression of IFN- γ in the early response to AC. **(A)** Western blotting analysis of total STAT1 or P-STAT1^{Tyr701/Ser727} in four responders and four resistant models at D0, D3 and D7 post-AC treatment. **(B)** Human and murine soluble IFN- γ expression determined by cytokine array in HBCx-10 tumours at D3, D7 and D14 after AC and during residual and regrowing phases. **(C)** Effect of RUX alone on HBCx-10 tumour growth. Mean RTV \pm s.d., $n = 10$. **(D)** P-STAT1^{Tyr701} foci detected by IHC in one untreated xenograft and the number of P-STAT1^{Tyr701}-positive tumour cells in untreated and RUX-treated tumour samples. * $P \leq 0.05$ (Student's t -test). **(E)** Kaplan–Meier survival analysis of mice treated with chemotherapy alone and with chemotherapy and RUX ($P < 0.0001$, log-rank (Mantel–Cox) test). **(F)** Expression of IFN-inducible genes by qPCR in untreated, AC, RUX alone or RUX/AC groups at 8 days (D8) posttreatment.

tumours was not completely abolished could be due to an incomplete inhibition of JAK activity. Alternatively, activation of IFN signature genes could be independent of JAK1/JAK2 signalling. Various reports show that the IFN/STAT1 pathway can also be upregulated by JAK-independent signals, such as PDGF signalling, ligand-activated EGFR or hypoxia (Pedersen *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005; Jechlinger *et al*, 2006). Thus it is possible that *in vivo* activation of the IFN/STAT1 pathway could result from combined non-canonical factors and cytokines through both autocrine and paracrine mechanisms.

Another hypothesis could be that both phosphorylated and unphosphorylated STAT1 (U-STAT1) are involved in STAT1 target gene activation. Indeed, U-STAT1 is itself able to activate and prolong transcription of IFN-inducible genes, including *IFI27*, *IFI44*, *OAS1* and *BST2*, (Cheon and Stark, 2009), and STAT1 can function as a transcription factor in the absence of tyrosine phosphorylation (Kumar *et al*, 1997). Although the role of U-STAT1 is still partially understood, there is increased evidence that it can drive gene expression by mechanisms distinct from those used by phosphorylated STAT1 dimers (Yang and Stark, 2008).

A two-step model of STAT1 pathway activation has been described where an initial IFN-dependent and P-STAT1-mediated activation of STAT1 target genes, which is short-lived because it induces cell death, is followed by persistent activation of a restricted target gene repertoire by U-STAT1, which is tolerated by cells while affording antiviral and DNA damage resistance functions (Cheon and Stark, 2009; Cheon *et al*, 2013). This model

is also supported by other groups who reported that ionising radiation induce IFN-inducible genes activation, including *STAT1*, *IFIT1*, *OAS1* and *MX1* in several types cancers (glioma, breast, prostate, colon and head and neck cancers) (Khodarev *et al*, 2007; Tsai *et al*, 2007). STAT1 activation is therefore neither restricted to breast cancer nor to chemotherapy-induced genotoxicity. Both P-STAT1 and U-STAT1 could have a role in activating gene transcription of IFN-related genes after chemotherapy *in vivo*. In the clinical setting, patients receive several cycles of genotoxic treatment, whereas in our *in vivo* experiments mice were subjected to only one dose of chemotherapy. It would be interesting to evaluate whether repeated tumour exposure to genotoxic drugs can select for tumour cells that constitutively express IFN-related genes. Given the possibly dual role of this pathway in mediating either tumour suppression or drug resistance, further experiments should aim at dissecting the mechanisms by which the STAT1 pathway may have an active role in initial AC-induced tumour cell death on one hand and in the survival of residual tumour cells on the other hand.

A clinical study reported JAK/STAT pathway activation 3 weeks after doxorubicin administration in breast cancer patients (Lee *et al*, 2009). Although it was not clearly indicated whether this activation was restricted to tumours responding to doxorubicin, this work indicates that such an event also occurs in patients. Finally, activation of *STAT1* and IFN-inducible genes after chemotherapy has been also reported in retinoblastoma tumours from two patients (Nalini *et al*, 2013), suggesting that this activation would be not restricted to breast cancers.

In summary, we present for the first time evidence that induction of *IFN*-related genes is an early event that discriminates chemo-sensitive from chemo-resistant tumours. This signature is a good surrogate of induced DNA damage and cell death by chemotherapy. Further validations in prospective clinical trials will be necessary to evaluate the possible usefulness of this signature in assisting therapeutic strategies in the neo-adjuvant settings. Particularly, early detection of inefficient administration of a given genotoxic compound could form the basis of a decision to switch patient's treatment to alternative therapies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pierre de la Grange, Justine Biet, Sophie Banis and Enora LeVen for technical assistance and helpful discussions.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Andersson BS, Mroue M, Britten RA, Murray D (1994) The role of DNA damage in the resistance of human chronic myeloid leukemia cells to cyclophosphamide analogues. *Cancer Res* **54**(20): 5394–5400.
- Andre F, Dieci MV, Dubsy P, Sotiriou C, Curigliano G, Denkert C, Loi S (2013) Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* **19**(1): 28–33.
- Balko JM, Cook RS, Vaught DB, Kuba MG, Miller TW, Bhola NE, Sanders ME, Granja-Ingram NM, Smith JJ, Meszoely IM, Salter J, Dowsett M, Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Mills GB, Pinto JA, Gomez HL, Arteaga CL (2012) Profiling of residual breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance. *Nat Med* **18**(7): 1052–1059.
- Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R, Vidaud M (2001) Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* **61**(4): 1652–1658.
- Boidot R, Vegran F, Soubeyrand MS, Fumoleau P, Coudert B, Lizard-Nacol S (2009) Variations in gene expression and response to neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma. *Cancer Invest* **27**(5): 521–528.
- Brzostek-Racine S, Gordon C, Van Scoy S, Reich NC (2011) The DNA damage response induces IFN. *J Immunol* **187**(10): 5336–5345.
- Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, Puztai L, Green MC, Arun BK, Giordano SH, Cristofanilli M, Frye DK, Smith TL, Hunt KK, Singletary SE, Sahin AA, Ewer MS, Buchholz TA, Berry D, Hortobagyi GN (2005) Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* **23**(16): 3676–3685.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM (2007) The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* **13**(8): 2329–2334.
- Cheon H, Holvey-Bates EG, Schoggins JW, Forster S, Hertzog P, Imanaka N, Rice CM, Jackson MW, Junk DJ, Stark GR (2013) IFN β -dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *EMBO J* **32**(20): 2751–2763.
- Cheon H, Stark GR (2009) Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(23): 9373–9378.
- de Plater L, Lauge A, Guyader C, Poupon MF, Assayag F, de Cremoux P, Vincent-Salomon A, Stoppa-Lyonnet D, Sigal-Zafrani B, Fontaine JJ, Brough R, Lord CJ, Ashworth A, Cottu P, Decaudin D, Marangoni E (2010) Establishment and characterisation of a new breast cancer xenograft obtained from a woman carrying a germline BRCA2 mutation. *Br J Cancer* **103**(8): 1192–1200.
- Franci C, Zhou J, Jiang Z, Modrusan Z, Good Z, Jackson E, Kouros-Mehr H (2013) Biomarkers of residual disease, disseminated tumor cells, and metastases in the MMTV-PyMT breast cancer model. *PLoS One* **8**(3): e58183.
- Gonzalez-Angulo AM, Iwamoto T, Liu S, Chen H, Do KA, Hortobagyi GN, Mills GB, Meric-Bernstam F, Symmans WF, Puztai L (2012) Gene expression, molecular class changes, and pathway analysis after neoadjuvant systemic therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res* **18**(4): 1109–1119.
- Hannemann J, Oosterkamp HM, Bosch CA, Velds A, Wessels LF, Loo C, Rutgers EJ, Rodenhuis S, van de Vijver MJ (2005) Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* **23**(15): 3331–3342.
- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Maelandsmo GM, Roman-Roman S, Seoane J, Trusolino L, Villanueva A (2014) Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* **4**(9): 998–1013.
- Hussner J, Ameling S, Hammer E, Herzog S, Steil L, Schwebe M, Niessen J, Schroeder HW, Kroemer HK, Ritter CA, Volker U, Bien S (2012) Regulation of interferon-inducible proteins by doxorubicin via interferon gamma-Janus tyrosine kinase-signal transducer and activator of transcription signaling in tumor cells. *Mol Pharmacol* **81**(5): 679–688.
- Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H, Grunert S (2006) Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **116**(6): 1561–1570.
- Khodarev NN, Minn AJ, Efimova EV, Darga TE, Labay E, Beckett M, Mauceri HJ, Roizman B, Weichselbaum RR (2007) Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumor cells. *Cancer Res* **67**(19): 9214–9220.
- Koike Folgueira MA, Brentani H, Carraro DM, De Camargo Barros Filho M, Hirata Katayama ML, Santana de Abreu AP, Mantovani Barbosa E, De Oliveira CT, Patrao DF, Mota LD, Netto MM, Caldeira JR, Brentani MM (2009) Gene expression profile of residual breast cancer after doxorubicin and cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Rep* **22**(4): 805–813.
- Korde LA, Lusa L, McShane L, Lebowitz PF, Lukes L, Camphausen K, Parker JS, Swain SM, Hunter K, Zujewski JA (2010) Gene expression pathway analysis to predict response to neoadjuvant docetaxel and capecitabine for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **119**(3): 685–699.
- Kumar A, Commune M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR (1997) Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* **278**(5343): 1630–1632.
- Lee SC, Xu X, Lim YW, Iau P, Sukri N, Lim SE, Yap HL, Yeo WL, Tan P, Tan SH, McLeod H, Goh BC (2009) Chemotherapy-induced tumor gene expression changes in human breast cancers. *Pharmacogenet Genomics* **19**(3): 181–192.
- Levy DE, Darnell JE Jr (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 651–662.
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Puztai L (2008) Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* **26**(8): 1275–1281.
- Marangoni E, Lecomte N, Durand L, de Pinieux G, Decaudin D, Chomienne C, Smadja-Joffe F, Poupon MF (2009) CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts. *Br J Cancer* **100**(6): 918–922.
- Marangoni E, Poupon MF (2014) Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Curr Opin Oncol* **26**(6): 556–561.
- Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde JG, Rebutti M, Tran-Perennou C, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Delattre O, Dieras V, Poupon MF (2007) A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* **13**(13): 3989–3998.
- Mesa RA, Yasothan U, Kirkpatrick P (2012) Ruxolitinib. *Nat Rev Drug Discov* **11**(2): 103–104.
- Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, Kim SJ, Shimazu K, Shimomura A, Maruyama N, Tamaki Y, Noguchi S (2012) GSTP1

- expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci* **103**(5): 913–920.
- Nalini V, Segu R, Deepa PR, Khetan V, Vasudevan M, Krishnakumar S (2013) Molecular insights on post-chemotherapy retinoblastoma by microarray gene expression analysis. *Bioinform Biol Insights* **7**: 289–306.
- Pedersen MW, Pedersen N, Damstrup L, Villingshoj M, Sonder SU, Rieneck K, Bovin LF, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (2005) Analysis of the epidermal growth factor receptor specific transcriptome: effect of receptor expression level and an activating mutation. *J Cell Biochem* **96**(2): 412–427.
- Platanias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**(5): 375–386.
- Reyal F, Guyader C, Decraene C, Lucchesi C, Auger N, Assayag F, De Plater L, Gentien D, Poupon MF, Cottu P, De Cremoux P, Gestraud P, Vincent-Salomon A, Fontaine JJ, Roman-Roman S, Delattre O, Decaudin D, Marangoni E (2012) Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* **14**(1): R11.
- Richardson ME, Siemann DW (1995) DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer Res* **55**(8): 1691–1695.
- Romanelli A, Clark A, Assayag F, Chateau-Joubert S, Poupon MF, Servely JL, Fontaine JJ, Liu X, Spooner E, Goodstal S, de Cremoux P, Bieche I, Decaudin D, Marangoni E (2012) Inhibiting aurora kinases reduces tumor growth and suppresses tumor recurrence after chemotherapy in patient-derived triple-negative breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* **11**(12): 2693–2703.
- Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, Chapman R, Hertzog PJ (2013) Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue): D1040–D1046.
- Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remedios C, Fend L, Hannani D, Aymeric L, Ma Y, Niso-Santano M, Kepp O, Schultze JL, Tuting T, Belardelli F, Bracci L, La Sorsa V, Ziccheddu G, Sestili P, Urbani F, Delorenzi M, Lacroix-Triki M, Quidville V, Conforti R, Spano JP, Puszta L, Poirier-Colame V, Delalogue S, Penault-Llorca F, Ladoire S, Arnould L, Cyrsa J, Dessoliers MC, Eggermont A, Bianchi ME, Pittet M, Engblom C, Pfirschke C, Preville X, Uze G, Schreiber RD, Chow MT, Smyth MJ, Proietti E, Andre F, Kroemer G, Zitvogel L (2014) Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* **20**(11): 1301–1309.
- Townsend PA, Cragg MS, Davidson SM, McCormick J, Barry S, Lawrence KM, Knight RA, Hubank M, Chen PL, Latchman DS, Stephanou A (2005) STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci* **118**(Pt 8): 1629–1639.
- Tozlu S, Girault I, Vacher S, Vendrell J, Andrieu C, Spyrtos F, Cohen P, Lidereau R, Bieche I (2006) Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. *Endocr Relat Cancer* **13**(4): 1109–1120.
- Tsai MH, Cook JA, Chandramouli GV, DeGraff W, Yan H, Zhao S, Coleman CN, Mitchell JB, Chuang EY (2007) Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation. *Cancer Res* **67**(8): 3845–3852.
- von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J, Jackisch C, Kaufmann M, Konecny GE, Denkert C, Nekljudova V, Mehta K, Loibl S (2012) Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* **30**(15): 1796–1804.
- Xu H, Xian J, Vire E, McKinney S, Wei V, Wong J, Tong R, Kouzarides T, Caldas C, Aparicio S (2014) Up-regulation of the interferon-related genes in BRCA2 knockout epithelial cells. *J Pathol* **234**(3): 386–397.
- Yang J, Stark GR (2008) Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* **18**(4): 443–451.
- Zhang X, Shan P, Alam J, Fu XY, Lee PJ (2005) Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol Chem* **280**(10): 8714–8721.

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 Unported License.

Supplementary Information accompanies this paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

Supplementary Tables and Figures

Supplementary Table 1: list of 274 genes differentially expressed ($p < 0.05$) between HBCx-6, HBCx-8 and HBCx-17 residual tumor cells (Nodule) and untreated tumors (CTRL).

Supplementary Table 2: singular and gathered pathway analysis of comparative expression of residual cells vs control tumors for 3 triple negative breast cancer PDXs by using panther database (www.pantherdb.org).

Supplementary Table 3: Statistical significance of gene expression differences between HBCx-33 tumors from untreated and remission groups, determined by multiple t test analysis (unpaired).

Supplementary Table 4: Comparative analysis of the IFN-related signature expression level at D3 and D7 time points in sensitive and resistant models

Supplementary Figure 1: RT-PCR analysis of the interferon signature in the HER2+ breast cancer PDX HBCx-5 before and after AC treatment.

Supplementary Figure 2: *IFNB1* mRNA expression in HBCx10 and HBCx33 xenografts (control, remission, relapse)

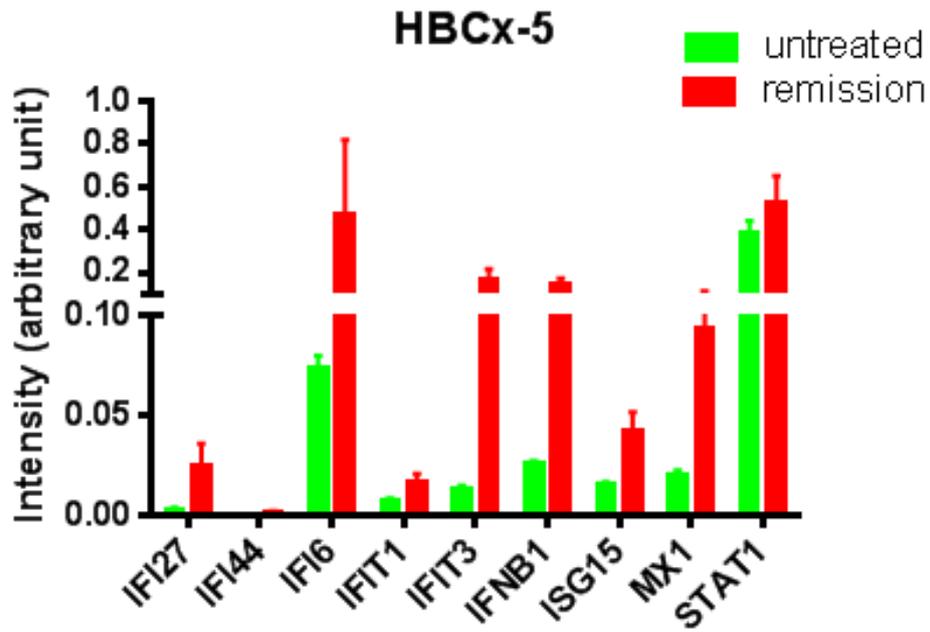


Figure supplemental 1.

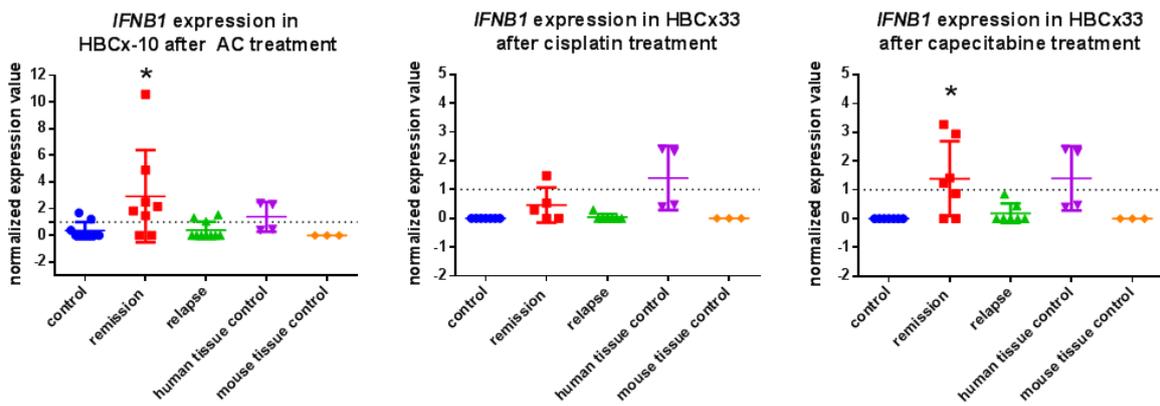


Figure supplemental 2.

Table S1: list of 274 genes differentially expressed (p<0.05) between HBCx-6,HBCx-8 and HBCx-17 residual tumor cells (Nodule) and untreated tumors (CTRL).

Probeset	Gene symbol	Description	log Intensity Nodule	log Intensity CTRL	Fold-Change	P value
2343473	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	8,02	5,76	4,79	2,24E-08
3432514	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/	8,24	5,99	4,77	7,04E-08
2707876	LAMP3	lysosomal-associated membrane pro	8,62	6,71	3,75	1,01E-07
3114832	SQLE	squalene epoxidase	9,19	10,01	1,76	1,14E-07
2539125	CMPK2	cytidine monophosphate (UMP-CMP)	7,48	5,86	3,06	2,90E-07
3854454	BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	7,99	5,68	4,97	7,42E-07
3257232; 32	IFIT1	interferon-induced protein with tetra	7,86	5,57	4,90	1,20E-06
2792800	DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypepti	6,88	5,64	2,36	2,77E-06
3753860	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	8,13	6,68	2,72	2,98E-06
3457752; 34	STAT2	signal transducer and activator of tra	7,94	7,31	1,54	3,90E-06
2403261	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	11,63	9,57	4,18	1,59E-05
3432438	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/	8,01	6,30	3,29	1,78E-05
2531377	SP100	SP100 nuclear antigen	7,57	6,54	2,05	1,87E-05
2468351	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domai	7,21	5,90	2,48	1,89E-05
2735362	HERC6	hect domain and RLD 6	7,63	6,38	2,39	1,94E-05
2343511	IFI44	interferon-induced protein 44	7,15	5,64	2,85	1,99E-05
2592268; 25	STAT1	signal transducer and activator of tra	8,93	7,76	2,26	2,05E-05
3257204	IFIT3	interferon-induced protein with tetra	6,99	5,06	3,81	2,12E-05
3432467	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100	7,92	6,60	2,49	3,66E-05
3922100	MX1	myxovirus (influenza virus) resistanc	8,41	6,68	3,31	3,72E-05
3907234	SDC4	syndecan 4	9,83	9,24	1,50	4,01E-05
2970532	HDAC2	histone deacetylase 2	8,63	8,99	1,28	5,88E-05
2982319	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondri	8,41	7,69	1,65	6,00E-05
2334602	TSPAN1	tetraspanin 1	7,27	6,55	1,65	7,90E-05
2699726; 26	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	8,62	7,74	1,84	1,17E-04
2692060	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family,	7,37	6,21	2,23	1,35E-04
3904691; 39	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	6,99	5,85	2,20	1,36E-04
2639054; 26	PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family,	7,72	6,35	2,59	1,57E-04
3536772	UBE2L3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	10,34	10,85	1,43	1,59E-04
3994710	MAMLD1	mastermind-like domain containing 1	7,26	7,91	1,57	1,85E-04
3203086; 32	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypepti	7,94	6,79	2,23	2,17E-04
3930235; 39	RCAN1	regulator of calcineurin 1	8,59	8,15	1,36	2,21E-04
2899171	HIST1H1E	histone cluster 1, H1e	11,62	12,16	1,46	2,22E-04
2364300; 23	HSD17B7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogen	6,58	7,04	1,38	2,36E-04
3957679	SELM	selenoprotein M	10,25	9,47	1,71	2,55E-04
3936550; 39	USP18	ubiquitin specific peptidase 18	8,21	7,12	2,13	2,98E-04
2735409	HERC5	hect domain and RLD 5	6,75	6,06	1,61	2,99E-04
3740479; 37	PRPF8	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 h	10,03	10,32	1,22	3,42E-04
2494749	CNNM3	cyclin M3	8,75	9,42	1,59	4,00E-04
2831519	C5orf32	chromosome 5 open reading frame 32	8,04	7,65	1,31	4,05E-04
2638962; 26	DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	7,68	6,61	2,10	4,55E-04

Probeset	Gene symbol	Description	log Intensity Nodule	log Intensity CTRL	Fold-Change	P value
2434124	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be	13,28	13,61	1,25	4,57E-04
3529649; 35	RNF31	ring finger protein 31	7,68	7,32	1,28	4,81E-04
2947081	HIST1H4L	histone cluster 1, H4l	11,36	11,94	1,49	5,59E-04
2491686	RNF181	ring finger protein 181	10,21	9,87	1,27	5,64E-04
3557811	PSME2	proteasome (prosome, macropain) ac	8,26	7,76	1,41	6,20E-04
3249886; 32	TET1	tet oncogene 1	6,71	7,24	1,45	6,39E-04
2899194	HIST1H2BE	histone cluster 1, H2be	10,83	11,40	1,48	7,38E-04
3908831	ZNF1	zinc finger, NFX1-type containing 1	8,03	7,35	1,60	7,81E-04
2436754; 24	ADAR	adenosine deaminase, RNA-specific	9,41	8,95	1,37	7,83E-04
3872274	VN1R1	vomer nasal 1 receptor 1	8,36	7,31	2,08	8,37E-04
2901620	HLA-E	major histocompatibility complex, cl	9,10	8,42	1,61	8,44E-04
2855501	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme	7,47	7,98	1,43	8,45E-04
2947077	HIST1H2BN	histone cluster 1, H2bn	11,00	11,63	1,54	1,02E-03
2901913	TUBB	tubulin, beta	12,39	12,66	1,21	1,16E-03
3061456; 30	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing	7,34	5,87	2,76	1,24E-03
3075932	PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family,	8,47	7,41	2,09	1,26E-03
3315675	IFITM1	interferon induced transmembrane pr	11,39	9,09	4,93	1,44E-03
3366903	MUC15	mucin 15, cell surface associated	7,64	6,50	2,21	1,50E-03
2867836	GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	7,09	6,56	1,44	1,60E-03
3902489; 39	BCL2L1	BCL2-like 1	9,14	8,82	1,25	1,76E-03
2359036; 23	SNX27	sorting nexin family member 27	8,19	8,57	1,30	1,90E-03
3458587	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	7,88	7,32	1,48	2,16E-03
2839735	RPL10	ribosomal protein L10	12,68	12,97	1,22	2,16E-03
3075431; 30	KIAA1549	KIAA1549	7,72	8,13	1,33	2,34E-03
3736232	SYNGR2	synaptogyrin 2	9,92	9,58	1,26	2,44E-03
2948713	RDBP	RD RNA binding protein	8,67	8,28	1,32	2,46E-03
3891006	STX16	syntaxin 16	8,02	7,70	1,25	2,50E-03
3956589	XBP1	X-box binding protein 1	9,19	8,84	1,28	2,52E-03
2820865	ARSK	arylsulfatase family, member K	6,67	7,11	1,36	2,74E-03
3075531; 30	ZC3HAV1L	zinc finger CCCH-type, antiviral 1-like	7,59	7,93	1,26	2,80E-03
2603051	SP110	SP110 nuclear body protein	7,04	6,32	1,64	2,88E-03
3226592	WDR34	WD repeat domain 34	8,86	9,17	1,24	2,94E-03
3708858	CD68	CD68 molecule	8,63	7,70	1,91	3,16E-03
2730303	C4orf7	chromosome 4 open reading frame 7	8,01	6,23	3,45	3,38E-03
2946268	HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bc	8,82	9,38	1,48	3,48E-03
2364231	DDR2	discoidin domain receptor tyrosine ki	7,55	6,66	1,86	3,48E-03
2432291	PPIAL4	peptidylprolyl isomerase A (cyclophil	7,51	7,83	1,25	3,54E-03
3848039; 38	C3	complement component 3	8,42	6,95	2,78	3,62E-03
2532480; 25	EFHD1	EF-hand domain family, member D1	10,32	10,66	1,26	3,70E-03
2413907	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	9,92	10,39	1,39	3,96E-03
3062576	ASNS	asparagine synthetase	8,46	8,03	1,35	4,08E-03
3617403	NOLA3	nucleolar protein family A, member 3	10,65	10,31	1,27	4,14E-03
2710599	CLDN1	claudin 1	9,45	8,11	2,52	4,18E-03
4018454; 40	AMOT	angiominin	7,28	7,60	1,24	4,52E-03
4014029	RPS6KA6	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, p	6,14	6,52	1,30	4,52E-03

4014029	RPS6KA6	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, p	6,14	6,52	1,30	4,52E-03
2849415	EEF1AL7	eukaryotic translation elongation fac	12,04	12,31	1,20	4,60E-03
3166844	CHMP5	chromatin modifying protein 5	8,39	7,89	1,42	4,76E-03
3784670	C18orf21	chromosome 18 open reading frame 2	7,76	7,45	1,24	4,90E-03
3707352	RNF167	ring finger protein 167	8,77	8,42	1,28	4,94E-03
2487082; 24	ANTXR1	anthrax toxin receptor 1	8,01	8,36	1,27	5,02E-03
2663350	RPL32	ribosomal protein L32	9,02	8,57	1,36	5,06E-03
3181193	TDRD7	tudor domain containing 7	7,37	6,84	1,45	5,14E-03
3645816; 36	ZNF75A	zinc finger protein 75a	7,39	7,04	1,28	5,18E-03
2732391	CCNG2	cyclin G2	8,64	9,18	1,45	5,18E-03
3592023	B2M	beta-2-microglobulin	10,14	8,50	3,12	5,24E-03
2747961	FHDC1	FH2 domain containing 1	6,76	7,09	1,25	5,28E-03
3107342	PPM2C	protein phosphatase 2C, magnesium-	8,44	8,09	1,28	5,60E-03
2584207	IFIH1	interferon induced with helicase C do	7,15	6,29	1,82	5,74E-03
3719112; 37	ZNHIT3	zinc finger, HIT type 3	8,21	7,78	1,34	5,84E-03
3873874	NOL5A	nucleolar protein 5A (56kDa with KKE	9,19	8,88	1,24	6,40E-03
3895297	C20orf116	chromosome 20 open reading frame 1	7,67	7,41	1,20	6,42E-03
3060994	CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfami	8,31	8,86	1,46	6,56E-03
3887117	CTSA	cathepsin A	10,16	9,79	1,29	6,68E-03
2709062; 27	SFRS10	splicing factor, arginine/serine-rich 1	8,59	8,89	1,23	6,70E-03
2693937	GPR175	G protein-coupled receptor 175	8,96	8,69	1,20	6,76E-03
2319560	UBE4B	ubiquitination factor E4B (UFD2 homc	7,90	8,30	1,32	6,98E-03
2687255; 26	CBLB	Cas-Br-M (murine) ecotropic retrovira	7,57	7,95	1,29	7,10E-03
3851826	DNASE2	deoxyribonuclease II, lysosomal	9,26	8,87	1,32	7,20E-03
2325479	RCAN3	RCAN family member 3	7,88	8,21	1,26	7,32E-03
2773958	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	8,77	6,72	4,15	7,64E-03
2815965	HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme	7,87	8,38	1,42	7,68E-03
3837464	GLTSCR2	glioma tumor suppressor candidate r	8,64	8,97	1,25	8,04E-03
2727587	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcor	7,25	8,06	1,76	8,08E-03
3036924	ACTB	actin, beta	12,50	12,79	1,23	8,14E-03
2554975; 25	BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger	7,28	7,77	1,41	8,36E-03
2443335; 24	SLC19A2	solute carrier family 19 (thiamine tra	7,13	7,44	1,24	8,54E-03
3109191	POLR2K	polymerase (RNA) II (DNA directed) pc	10,45	10,14	1,24	8,56E-03
3907190	SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibito	10,29	8,99	2,45	8,58E-03
3887017; 38	DNTTIP1	deoxynucleotidyltransferase, termina	8,77	8,42	1,27	8,70E-03
2946324	HIST1H2AD	histone cluster 1, H2ad	10,42	10,95	1,44	8,92E-03
3443348	A2M	alpha-2-macroglobulin	7,66	6,60	2,08	9,14E-03
3029030	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine	8,83	9,13	1,23	9,80E-03
3824648; 38	CCDC124	coiled-coil domain containing 124	8,24	8,63	1,32	9,86E-03
2827185; 28	LMNB1	lamin B1	7,17	7,63	1,37	9,86E-03
2451493	CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1	8,00	7,64	1,28	1,12E-02
3292694	DNA2	DNA replication helicase 2 homolog (f	6,31	6,59	1,21	1,16E-02
2720251	NCAPG	non-SMC condensin I complex, subun	7,05	7,46	1,33	1,16E-02
2900974	HLA-F	major histocompatibility complex, cla	9,52	8,38	2,20	1,20E-02

3821015	LDLR	low density lipoprotein receptor (fam	9,16	9,76	1,52	1,22E-02
2676182; 26	NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2	9,19	9,60	1,33	1,24E-02
2350551	SARS	seryl-tRNA synthetase	8,87	8,59	1,21	1,29E-02
3223551	MEGF9	multiple EGF-like-domains 9	7,31	7,57	1,21	1,31E-02
2719481	CC2D2A	coiled-coil and C2 domain containing	6,69	6,98	1,22	1,32E-02
3690597; 36	N4BP1	NEDD4 binding protein 1	8,06	7,67	1,31	1,34E-02
2900074	HIST2H2BA	histone cluster 2, H2ba	8,93	9,28	1,28	1,37E-02
3976930	PQBP1	polyglutamine binding protein 1	7,79	7,48	1,24	1,37E-02
2916759	PM20D2	peptidase M20 domain containing 2	7,02	7,50	1,40	1,40E-02
2900974; 29	HLA-F	major histocompatibility complex, cl	12,80	11,47	2,50	1,40E-02
3688254	PRSS8	protease, serine, 8	9,10	8,58	1,43	1,41E-02
2377229	CD55	CD55 molecule, decay accelerating fa	8,69	8,29	1,31	1,41E-02
2818212; 28	ATG10	ATG10 autophagy related 10 homolog	6,77	7,06	1,22	1,43E-02
3150060; 31	EXT1	exostoses (multiple) 1	8,34	8,02	1,25	1,43E-02
3542207	SFRS5	splicing factor, arginine/serine-rich 5	8,96	8,64	1,25	1,45E-02
2487478	GMCL1L	germ cell-less homolog 1 (Drosophila	7,31	7,75	1,36	1,50E-02
2597010	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), s	8,17	8,45	1,21	1,53E-02
3361116	MRPL17	mitochondrial ribosomal protein L17	9,33	9,03	1,23	1,53E-02
2528620	GMPPA	GDP-mannose pyrophosphorylase A	8,27	7,99	1,22	1,54E-02
2900091	HIST1H2AG	histone cluster 1, H2ag	10,54	11,12	1,50	1,54E-02
2947040	HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj	10,41	10,88	1,39	1,55E-02
3536706	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	9,30	8,82	1,40	1,56E-02
3328520	CD82	CD82 molecule	9,40	8,88	1,43	1,63E-02
3984655	CENPI	centromere protein I	6,59	6,99	1,32	1,63E-02
2696802; 26	STAG1	stromal antigen 1	6,72	7,01	1,22	1,64E-02
2756497	ATP5I	ATP synthase, H+ transporting, mitoch	9,01	8,66	1,28	1,72E-02
2379863	CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mit	7,57	8,01	1,35	1,72E-02
3649277	NPIP	nuclear pore complex interacting pro	9,47	9,12	1,28	1,73E-02
2360468	FLAD1	FAD1 flavin adenine dinucleotide syn	8,57	8,20	1,30	1,74E-02
2435044; 24	POGZ	pogo transposable element with ZNF c	9,74	10,08	1,26	1,82E-02
2675801	PCBP4	poly(rC) binding protein 4	8,02	7,74	1,22	1,84E-02
2680046; 26	ADAMTS9	ADAM metallopeptidase with thrombo	7,46	6,92	1,45	1,87E-02
3118451	CHRAC1	chromatin accessibility complex 1	8,83	9,11	1,22	1,87E-02
2902326	HCP5	HLA complex P5	8,14	6,80	2,53	1,90E-02
2548402	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation facto	8,08	7,38	1,63	1,96E-02
3471704	BRAP	BRCA1 associated protein	7,67	7,38	1,23	1,97E-02
2600068	TUBA4A	tubulin, alpha 4a	9,87	10,45	1,49	1,99E-02
2360850; 23	FDPS	farnesyl diphosphate synthase (farne	8,56	8,97	1,34	2,02E-02
3416977	ORMDL2	ORM1-like 2 (S. cerevisiae)	9,68	9,23	1,36	2,02E-02
2663551; 26	NUP210	nucleoporin 210kDa	9,20	9,68	1,39	2,03E-02
3969422	RAB9A	RAB9A, member RAS oncogene family	9,28	8,91	1,30	2,04E-02
2960903	EEF1A1	eukaryotic translation elongation fac	12,11	12,38	1,20	2,04E-02
2366581	C1orf112	chromosome 1 open reading frame 11	7,33	7,64	1,23	2,05E-02
3243262	HSD17B7P2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogen	6,27	6,54	1,21	2,05E-02

Probeset	Gene symbol	Description	log Intensity Nodule	log Intensity CTRL	Fold-Change	P value
2823326; 28	FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase	6,45	6,76	1,24	2,07E-02
2863885	LHFPL2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	7,06	6,78	1,21	2,09E-02
3010082	PHTF2	putative homeodomain transcription	6,74	7,04	1,23	2,11E-02
3873185; 38	RBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger	8,15	7,83	1,25	2,13E-02
3517793; 35	KLF12	Kruppel-like factor 12	7,29	7,61	1,26	2,13E-02
3718555	SLFN5	schlafen family member 5	8,44	7,45	1,99	2,19E-02
2709402; 27	TBCCD1	TBCC domain containing 1	7,46	7,76	1,23	2,22E-02
2481094	LOC440863	hypothetical gene supported by AK020	6,20	6,60	1,33	2,22E-02
2946215	HIST1H3B	histone cluster 1, H3b	11,07	11,60	1,44	2,24E-02
2730714	DCK	deoxycytidine kinase	7,52	7,91	1,31	2,24E-02
3230490	EDF1	endothelial differentiation-related factor	9,44	9,01	1,35	2,26E-02
3714659; 37	DHRS7B	dehydrogenase/reductase (SDR family)	7,93	7,61	1,26	2,30E-02
3217123; 32	TRIM14	tripartite motif-containing 14	8,20	7,65	1,47	2,30E-02
2364668; 23	PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	8,66	9,11	1,36	2,36E-02
2435218	TDRKH	tudor and KH domain containing	7,78	8,07	1,22	2,38E-02
3883971; 38	C20orf24	chromosome 20 open reading frame 24	10,69	10,35	1,26	2,39E-02
2350237	FAM102B	family with sequence similarity 102, member	7,14	7,50	1,28	2,41E-02
3008676			6,49	6,83	1,26	2,41E-02
2428405	RHOC	ras homolog gene family, member C	9,90	9,62	1,22	2,48E-02
3361531	OR10A3	olfactory receptor, family 10, subfamily	6,74	7,10	1,29	2,55E-02
3513752	CAB39L	calcium binding protein 39-like	6,20	5,91	1,22	2,56E-02
2719361	CPEB2	cytoplasmic polyadenylation element	7,47	7,14	1,26	2,61E-02
2507380; 25	R3HDM1	R3H domain containing 1	7,99	8,38	1,31	2,61E-02
2899206	HIST1H2BF	histone cluster 1, H2bf	9,13	9,73	1,51	2,63E-02
3764002	MRPS23	mitochondrial ribosomal protein S23	7,39	7,09	1,24	2,74E-02
3568963	YBX1	Y box binding protein 1	9,99	10,30	1,24	2,78E-02
3319287	EIF3F	eukaryotic translation initiation factor	9,78	10,09	1,24	2,79E-02
2929168; 29	UTRN	utrophin	7,02	7,31	1,23	2,81E-02
2528347	ANKZF1	ankyrin repeat and zinc finger domain	7,03	7,31	1,21	2,81E-02
3331355; 33	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C	7,90	7,28	1,54	2,87E-02
2934131	ACAT2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	7,01	7,53	1,44	2,89E-02
3529609	PSME1	proteasome (prosome, macropain) activator	8,11	7,64	1,39	2,89E-02
2825733	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase	7,36	7,70	1,27	3,04E-02
3830649	COX6B1	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide	10,71	10,43	1,22	3,06E-02
2863964; 28	ARSB	arylsulfatase B	6,80	7,10	1,22	3,07E-02
3359529	CARS	cysteinyl-tRNA synthetase	7,36	7,10	1,20	3,09E-02
2359483	SPRR4	small proline-rich protein 4	7,30	7,60	1,23	3,11E-02
2923060; 29	NUS1	nuclear undecaprenyl pyrophosphate	10,07	10,40	1,26	3,11E-02
2766456	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	7,08	7,43	1,27	3,12E-02
2922972; 29	DCBLD1	discoidin, CUB and LCCL domain containing	7,01	7,48	1,38	3,13E-02
3662696	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	8,29	7,72	1,49	3,15E-02
2505293	RAB6C	RAB6C, member RAS oncogene family	8,97	9,30	1,26	3,15E-02
3909553; 39	NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic	7,58	7,98	1,31	3,17E-02
3444336	PRR4	proline rich 4 (lacrimal)	9,06	8,06	2,00	3,18E-02
2858592	DEPDC1B	DEP domain containing 1B	6,83	7,20	1,29	3,20E-02
2504766	SFT2D3	SFT2 domain containing 3	7,27	7,59	1,25	3,23E-02

Probeset	Gene symbol	Description	log Intensity Nodule	log Intensity CTRL	Fold-Change	P value
2858592	DEPDC1B	DEP domain containing 1B	6,83	7,20	1,29	3,20E-02
2504766	SFT2D3	SFT2 domain containing 3	7,27	7,59	1,25	3,23E-02
2521446	COQ10B	coenzyme Q10 homolog B (S. cerevisiae)	8,26	7,98	1,21	3,25E-02
2861616	NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	6,75	7,02	1,20	3,43E-02
2434084	HIST2H2AA3	histone cluster 2, H2aa3	10,15	10,55	1,32	3,44E-02
2793441	AADAT	amino adipate aminotransferase	7,41	7,97	1,47	3,44E-02
4023274	TMEM32	transmembrane protein 32	7,95	8,37	1,33	3,52E-02
3474228	RAB35	RAB35, member RAS oncogene family	8,08	7,75	1,26	3,56E-02
3742285	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	8,96	8,53	1,35	3,56E-02
2523478	ALS2CR16	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile)	6,71	6,99	1,22	3,62E-02
3923982	C21orf70	chromosome 21 open reading frame 70	8,15	7,69	1,37	3,62E-02
2947032; 29	HIST1H2BL	histone cluster 1, H2bl	9,95	10,31	1,28	3,67E-02
3911217	PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen	8,00	8,59	1,50	3,73E-02
3903670	GSS	glutathione synthetase	8,42	8,05	1,29	3,77E-02
3190190	LCN2	lipocalin 2	9,44	7,90	2,89	3,78E-02
2326640	ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-III1)	8,50	8,86	1,28	3,80E-02
2806517	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (cell	8,72	9,03	1,24	3,80E-02
3860552; 38	ZNF529	zinc finger protein 529	7,43	7,04	1,31	3,92E-02
3996430; 39	FAM50A	family with sequence similarity 50, member	8,40	8,05	1,28	3,95E-02
2731332	IL8	interleukin 8	7,35	6,83	1,43	3,95E-02
3617230	C15orf24	chromosome 15 open reading frame 24	7,91	7,56	1,28	3,99E-02
3184408; 31	AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	7,72	8,10	1,30	4,03E-02
3721124; 37	TMEM99	transmembrane protein 99	6,43	6,14	1,23	4,04E-02
2948926	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	12,15	10,86	2,45	4,05E-02
3377463	FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus	11,02	10,74	1,21	4,07E-02
3840164; 38	ZNF610	zinc finger protein 610	7,00	6,69	1,24	4,10E-02
2439861	IGSF9	immunoglobulin superfamily, member 9	7,87	8,18	1,24	4,10E-02
3367338	KIF18A	kinesin family member 18A	6,54	6,96	1,34	4,12E-02
2358044; 23	PLEKHO1	pleckstrin homology domain containing 1	7,37	7,76	1,30	4,18E-02
3026599	TRIM24	tripartite motif-containing 24	8,08	8,44	1,28	4,19E-02
3816699	ZNF57	zinc finger protein 57	7,80	7,52	1,21	4,19E-02
2435383	S100A10	S100 calcium binding protein A10	12,00	12,31	1,24	4,21E-02
3947123; 39	SREBF2	sterol regulatory element binding transcription	8,03	8,43	1,32	4,30E-02
2899772	HIST1H2AH	histone cluster 1, H2ah	7,31	7,83	1,44	4,32E-02
3075136	CREB3L2	cAMP responsive element binding protein 3L2	9,50	10,03	1,45	4,33E-02
3150715	DSCC1	defective in sister chromatid cohesion	6,75	7,20	1,37	4,37E-02
2761829	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1	7,26	8,22	1,94	4,39E-02
3105465; 31	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	6,91	7,20	1,22	4,46E-02
2610241	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	7,24	7,51	1,21	4,48E-02
3418303; 34	PIP4K2C	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase	8,37	8,05	1,25	4,49E-02
2899176	HIST1H2BD	histone cluster 1, H2bd	9,65	10,01	1,29	4,51E-02
2792069	NAF1	nuclear assembly factor 1 homolog (S. pombe)	6,59	6,90	1,24	4,51E-02
3414846	DAZAP2	DAZ associated protein 2	10,37	10,09	1,21	4,61E-02
3431220	MVK	mevalonate kinase	7,11	7,47	1,29	4,64E-02

Probeset	Gene symbol	Description	log Intensity Nodule	log Intensity CTRL	Fold-Change	P value
2947073	HIST1H1B	histone cluster 1, H1b	8,48	8,96	1,40	4,68E-02
3119945	GRINA	glutamate receptor, ionotropic, N-met	10,87	10,56	1,25	4,70E-02
2545549	SLC5A6	solute carrier family 5 (sodium-deper	8,34	8,07	1,21	4,71E-02
3304746	USMG5	up-regulated during skeletal muscle g	9,02	8,65	1,29	4,71E-02
2899223	HIST1H2AE	histone cluster 1, H2ae	10,62	11,02	1,32	4,71E-02
2750594	SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	8,00	8,49	1,41	4,72E-02
2738191	TET2	tet oncogene family member 2	7,50	7,90	1,32	4,77E-02
3333226; 33	FADS2	fatty acid desaturase 2	9,54	10,14	1,51	4,81E-02
2522212; 25	SGOL2	shugoshin-like 2 (S. pombe)	6,82	7,25	1,35	4,85E-02
3105430	LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil do	7,11	7,52	1,33	4,93E-02
3381607; 33	RAB6A	RAB6A, member RAS oncogene family	9,05	9,34	1,22	4,93E-02
3416256	HOXC13	homeobox C13	8,37	8,77	1,32	4,97E-02
3357723	BET1L	blocked early in transport 1 homolog	8,33	8,06	1,21	4,99E-02

Table S2: singular and gathered pathway analysis of comparative expression of residual cells vs control tumors for 3 triple negative breast cancer PDXs by using panther database (www.pantherdb.org).

HBCx-6					HBCx-17				
Pathways	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value	Pathways	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Notch signaling pathway	51	4	0,62	3,63E-03	Inflammation mediated by chemokine and	315	7	2,35	1,00E-02
Axon guidance mediated by Slit/Robo	35	3	0,42	9,12E-03	p53 pathway feedback loops 2	66	3	0,49	1,37E-02
Angiogenesis	229	7	2,76	2,24E-02	p53 pathway	136	4	1,02	1,97E-02
Ras Pathway	91	4	1,10	2,54E-02	Angiogenesis	229	5	1,71	2,96E-02
Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin	53	3	0,64	2,71E-02	Axon guidance mediated by semaphorins	46	2	0,34	4,70E-02
Blood coagulation	55	3	0,66	2,97E-02					
p53 pathway feedback loops 2	66	3	0,80	4,67E-02					

HBCx-8					HBCx-6/HBCx-8/HBCx-17				
Pathways	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value	Pathways	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Blood coagulation	55	2	0,20	1,79E-02	JAK/STAT signaling pathway	23	2	0,06	1,44E-03
Interleukin signaling	194	3	0,72	3,56E-02	Ras Pathway	91	2	0,22	2,04E-02

HBCx-6					HBCx-17				
Biological Process	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value	Biological Process	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Immunity and defense	1318	38	15,91	7,80E-07	Interferon-mediated immunity	63	8	0,47	3,45E-08
Developmental processes	2152	50	25,98	6,46E-06	Immunity and defense	1318	29	9,85	2,03E-07
Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	211	10	2,55	2,95E-04	Cell adhesion	622	16	4,65	2,12E-05
Ectoderm development	692	20	8,35	3,47E-04	Signal transduction	3406	46	25,45	4,12E-05
Signal transduction	3406	62	41,12	6,04E-04	MHCI-mediated immunity	22	3	0,16	6,46E-04
Transport	1306	30	15,77	6,39E-04	Developmental processes	2152	30	16,08	6,91E-04
Neurogenesis	587	17	7,09	9,31E-04	Extracellular matrix protein-mediated signaling	62	4	0,46	1,30E-03
Lipid and fatty acid transport	131	7	1,58	1,20E-03	Growth factor homeostasis	7	2	0,05	1,31E-03
Oncogenesis	472	14	5,70	2,07E-03	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	3343	40	24,98	1,66E-03
Cell adhesion-mediated signaling	379	12	4,58	2,52E-03	Neurogenesis	587	12	4,39	1,69E-03
Cell communication	1213	26	14,64	3,69E-03	Ectoderm development	692	13	5,17	2,29E-03
Cell proliferation and differentiation	1028	23	12,41	3,74E-03	Proteolysis	960	16	7,17	2,47E-03
Neuronal activities	569	15	6,87	4,36E-03	Skeletal development	123	5	0,92	2,47E-03
Pain sensation	32	3	0,39	7,16E-03	Mesoderm development	551	11	4,12	3,12E-03
Amino acid metabolism	230	8	2,78	7,46E-03	Other neuronal activity	136	5	1,02	3,78E-03
Synaptic transmission	279	9	3,37	7,47E-03	Macrophage-mediated immunity	140	5	1,05	4,27E-03
Interferon-mediated immunity	63	4	0,76	7,55E-03	Angiogenesis	54	3	0,40	8,02E-03
Ion transport	616	15	7,44	8,72E-03	JNK cascade	61	3	0,46	1,11E-02
DNA degradation	12	2	0,14	9,51E-03	Calcium mediated signaling	116	4	0,87	1,17E-02
Proteolysis	960	20	11,59	1,37E-02	MAPKKK cascade	181	5	1,35	1,21E-02
Other sensory perception	15	2	0,18	1,45E-02	Other nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	29	2	0,22	2,03E-02
Other receptor mediated signaling pathway	210	7	2,54	1,48E-02	Cell communication	1213	16	9,06	2,04E-02
Cell surface receptor mediated signal transduction	1638	30	19,77	1,58E-02	Cell surface receptor mediated signal transduction	1638	20	12,24	2,14E-02
Skeletal development	123	5	1,48	1,76E-02	Cell proliferation and differentiation	1028	14	7,68	2,31E-02
Amino acid transport	47	3	0,57	1,99E-02	Oncogenesis	472	8	3,53	2,65E-02
Blood circulation and gas exchange	89	4	1,07	2,37E-02	Intracellular signaling cascade	871	12	6,51	3,16E-02
MAPKKK cascade	181	6	2,19	2,37E-02	Antioxidation and free radical removal	38	2	0,28	3,33E-02
Blood clotting	92	4	1,11	2,63E-02					
Apoptosis	531	12	6,41	2,95E-02					
Cation transport	482	11	5,82	3,41E-02					
Mesoderm development	551	12	6,65	3,74E-02					
Cell adhesion	622	13	7,51	4,10E-02					
Lipid and fatty acid binding	27	2	0,33	4,28E-02					
Lipid, fatty acid and steroid metabolism	770	15	9,30	4,91E-02					

HBCx-8					HBCx-6/HBCx-8/HBCx-17				
Biological Process	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value	Biological Process	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Immunity and defense	1318	21	4,87	1,21E-08	Interferon-mediated immunity	63	8	0,15	3,72E-12
Interferon-mediated immunity	63	6	0,23	1,56E-07	Immunity and defense	1318	18	3,16	1,10E-09
Cholesterol metabolism	68	3	0,25	2,14E-03	Proteolysis	960	7	2,30	8,00E-03
Proteolysis	960	10	3,55	2,95E-03	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	3343	15	8,02	1,11E-02
MHCI-mediated immunity	22	2	0,08	3,10E-03	Macrophage-mediated immunity	140	2	0,34	4,48E-02
Oxidative phosphorylation	78	3	0,29	3,14E-03					
T-cell mediated immunity	194	4	0,72	5,99E-03					
Cytokine/chemokine mediated immunity	125	3	0,46	1,14E-02					
Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	252	4	0,93	1,45E-02					
Electron transport	252	4	0,93	1,45E-02					
Other metabolism	559	6	2,07	1,78E-02					
Complement-mediated immunity	56	2	0,21	1,85E-02					
Ligand-mediated signaling	421	5	1,56	2,03E-02					
Steroid metabolism	183	3	0,68	3,08E-02					
Cell proliferation and differentiation	1028	8	3,80	3,68E-02					
Intracellular signaling cascade	871	7	3,22	4,28E-02					

HBCx-6					HBCx-17				
Molecular Function	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value	Molecular Function	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Protease inhibitor	129	9	1,56	3,41E-05	Defense/immunity protein	369	14	2,76	9,47E-07
Serine protease inhibitor	76	7	0,92	4,64E-05	Cell adhesion molecule	395	12	2,95	5,00E-05
Membrane-bound signaling molecule	130	8	1,57	2,16E-04	Extracellular matrix	384	11	2,87	1,71E-04
Nucleotidyltransferase	70	6	0,85	2,38E-04	Extracellular matrix glycoprotein	111	6	0,83	2,10E-04
Metalloprotease inhibitor	4	2	0,05	1,13E-03	Nucleotidyltransferase	70	4	0,52	2,01E-03
Synthetase	96	6	1,16	1,22E-03	CAM family adhesion molecule	72	4	0,54	2,23E-03
Receptor	1512	32	18,25	1,60E-03	Signaling molecule	795	14	5,94	2,81E-03
Other receptor	231	9	2,79	2,24E-03	Ubiquitin-protein ligase	253	7	1,89	3,16E-03
Tyrosine protein kinase receptor	77	5	0,93	2,63E-03	Select calcium binding protein	274	7	2,05	4,85E-03
Endodeoxyribonuclease	29	3	0,35	5,47E-03	Nuclear hormone receptor	47	3	0,35	5,49E-03
Transporter	648	16	7,82	6,06E-03	Synthetase	96	4	0,72	6,13E-03
Tight junction	32	3	0,39	7,16E-03	Calmodulin related protein	157	5	1,17	6,85E-03
Oxygenase	101	5	1,22	8,11E-03	Hydrolase	736	12	5,50	9,85E-03
Signaling molecule	795	18	9,60	8,74E-03	Other cell adhesion molecule	116	4	0,87	1,17E-02
Protein kinase receptor	104	5	1,26	9,12E-03	Protease inhibitor	129	4	0,96	1,66E-02
Cell adhesion molecule	395	11	4,77	9,39E-03	Other defense and immunity protein	73	3	0,55	1,79E-02
Other cell adhesion molecule	116	5	1,40	1,40E-02	Ligase	468	8	3,50	2,54E-02
Other signaling molecule	259	8	3,13	1,44E-02	Other cell junction protein	36	2	0,27	3,02E-02
Synthase and synthetase	213	7	2,57	1,58E-02	Antibacterial response protein	38	2	0,28	3,33E-02
Oxidoreductase	603	14	7,28	1,61E-02	Nucleic acid binding	2850	30	21,29	3,41E-02
Other transporter	334	9	4,03	2,15E-02	Cell junction protein	99	3	0,74	3,88E-02
Actin binding motor protein	52	3	0,63	2,58E-02	Other miscellaneous function protein	427	7	3,19	4,26E-02
Hydrolase	736	15	8,88	3,56E-02	Other signaling molecule	259	5	1,94	4,61E-02
Miscellaneous function	866	17	10,45	3,57E-02	Major histocompatibility complex antigen	46	2	0,34	4,70E-02
Transaminase	25	2	0,30	3,73E-02					

HBCx-8					HBCx-6/HBCx-8/HBCx-17				
Molecular Function	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value	Molecular Function	Nb genes in the Reference list	Nb regulated genes	Expected nb genes	P-value
Protease inhibitor	129	6	0,48	9,47E-06	Serine protease inhibitor	76	4	0,18	3,63E-05
Serine protease inhibitor	76	5	0,28	1,05E-05	Defense/immunity protein	369	6	0,89	2,62E-04
Select regulatory molecule	1190	13	4,40	4,42E-04	Protease inhibitor	129	4	0,31	2,74E-04
Defense/immunity protein	369	7	1,36	4,61E-04	Nucleotidyltransferase	70	3	0,17	6,66E-04
Signaling molecule	795	10	2,94	7,36E-04	Other cytokine	22	2	0,05	1,32E-03
Miscellaneous function	866	10	3,20	1,40E-03	Synthetase	96	3	0,23	1,64E-03
Oxidoreductase	603	8	2,23	1,82E-03	Nucleic acid binding	2850	15	6,84	2,53E-03
Other cytokine	22	2	0,08	3,10E-03	Helicase	173	3	0,41	8,45E-03
Cytokine	97	3	0,36	5,74E-03	Synthase and synthetase	213	3	0,51	1,47E-02
Other select calcium binding proteins	41	2	0,15	1,03E-02	Tyrosine protein kinase receptor	77	2	0,18	1,49E-02
Other transfer/carrier protein	130	3	0,48	1,27E-02	Miscellaneous function	866	6	2,08	1,75E-02
Major histocompatibility complex antigen	46	2	0,17	1,28E-02	Cytokine	97	2	0,23	2,29E-02
Other transferase	132	3	0,49	1,32E-02	Protein kinase receptor	104	2	0,25	2,61E-02
Complement component	51	2	0,19	1,56E-02	Other transfer/carrier protein	130	2	0,31	3,92E-02
Chemokine	54	2	0,20	1,73E-02					
Other miscellaneous function protein	427	5	1,58	2,14E-02					
Nucleotidyltransferase	70	2	0,26	2,80E-02					
Reductase	184	3	0,68	3,12E-02					
Transfer/carrier protein	327	4	1,21	3,35E-02					
Synthetase	96	2	0,35	4,96E-02					

Table S3: Statistical analysis of IFN-related gene expression at day 3 (D3) and day 7 (D7) PDX models sensitive vs resistant to adriacyclin/cyclophosphamide treatment described in Figure 3A.

Gene Symbol	D3		D7	
	S vs R (fold-change)	p value	S vs R (fold-change)	p value
BST2	2,33704733	0,0483	4,722259263	0,0297
CLDN1	2,319927705	0,0088	5,464147409	0,0007
DDX60	1,733473953	0,063	5,426340602	0,0008
IFI44	2,404945181	0,0465	6,11914556	0,0102
IFI44L	2,602384428	0,1017	8,233577907	0,0185
IFI6	2,543954113	0,0618	5,921075255	0,021
IFIT1	1,976942193	0,0844	5,44188715	0,0086
IFIT3	1,574332857	0,1722	2,088019235	0,0538
IFITM1	1,230532963	0,3165	1,747900428	0,194
IRF9	1,345303405	0,2569	2,044072794	0,0319
LAMP3	2,596001495	0,0117	5,487480012	0,0033
MX1	2,373407169	0,0254	6,616168389	0,0003
OAS1	2,573459678	0,0291	6,568820316	0,0074
OAS2	3,434668619	0,0228	13,33623677	0,001
PARP12	1,916881572	0,0147	2,771811087	0,0283
PARP9	1,49514126	0,0782	2,238725032	0,0406
SAMD9	1,605323264	0,0527	1,79477115	0,0155
STAT1	1,516325808	0,0462	1,80241433	0,0477
STAT2	1,350037691	0,0552	1,413729158	0,1382
UBE2L6	1,623012484	0,0639	2,542272868	0,0645
ZNFX1	1,516448615	0,071	1,765141005	0,0379
Legend:				
S=Sensitive to AC				
R=Resistant to AC				
Statistical test: unpaired t-test				

Intracellular STING inactivation sensitizes breast cancer cells to genotoxic agents

Julie Gaston, Laura Cheradame, Vanessa Yvonnet, Olivier Deas, Marie-France Poupon, Jean-Gabriel Judde, Stefano Cairo, Vincent Goffin.

Soumis pour publication à Oncotarget.

Préambule

Dans ce manuscrit, nous avons étudié les mécanismes d'activation de la voie IFN/STAT1 dans des cellules tumorales sous chimiothérapie et nous avons analysé le rôle des gènes surexprimés de cette voie dans la résistance au traitement. Les résultats sont schématisés dans la figure 26, ci-après.

Tout d'abord, nous avons confirmé *in vitro* que les cellules tumorales sont capables d'induire la voie IFN/STAT1 sous chimiothérapie. Le mafosfamide, un équivalent du cyclophosphamide induisant des dommages à l'ADN, est utilisé *in vitro*. Nos résultats montrent que, sous mafosfamide, certaines lignées (dont les cellules MFC7 et HBCx-19) sont capables d'exprimer des IFN de type I conduisant à l'activation autocrine/paracrine de la voie IFN/STAT1. Dans ces cellules, l'inhibition de l'expression d'IFNAR1 ou de STAT1 bloque l'induction de la voie par le mafosfamide. Confirmant la relation fonctionnelle entre les IFN sécrétés et l'activation de la voie IFN/STAT1, les cellules incapables d'induire l'expression des IFN (T47-D et MDA-MB-231) n'induisent pas la signalisation IFN/STAT1.

Les IFN ayant un rôle important dans l'expression de cette signature, nous avons mis en évidence l'implication de la protéine STING dont le rôle est bien connu dans les cellules immunitaires. Sous mafosfamide, des foyers de STING se forment et colocalisent avec γ H2AX, un détecteur des dommages de l'ADN mais aussi partiellement avec la protéine IRF3 phosphorylée qui permet l'induction des IFN de type I.

De manière à étudier le rôle des gènes surexprimés par le mafosfamide, nous avons montré que l'inhibition individuelle de l'expression de différents acteurs de la voie IFN/STAT1 potentialise l'effet de la chimiothérapie, impliquant cette cascade dans la résistance au traitement. Nous avons notamment mis en évidence le rôle de PARP12 dans la résistance, protéine dont le rôle a jusqu'ici été très peu étudié. Les mécanismes possibles pouvant expliquer l'implication de PARP12 dans la résistance et la récurrence sont abordés dans la discussion du manuscrit.

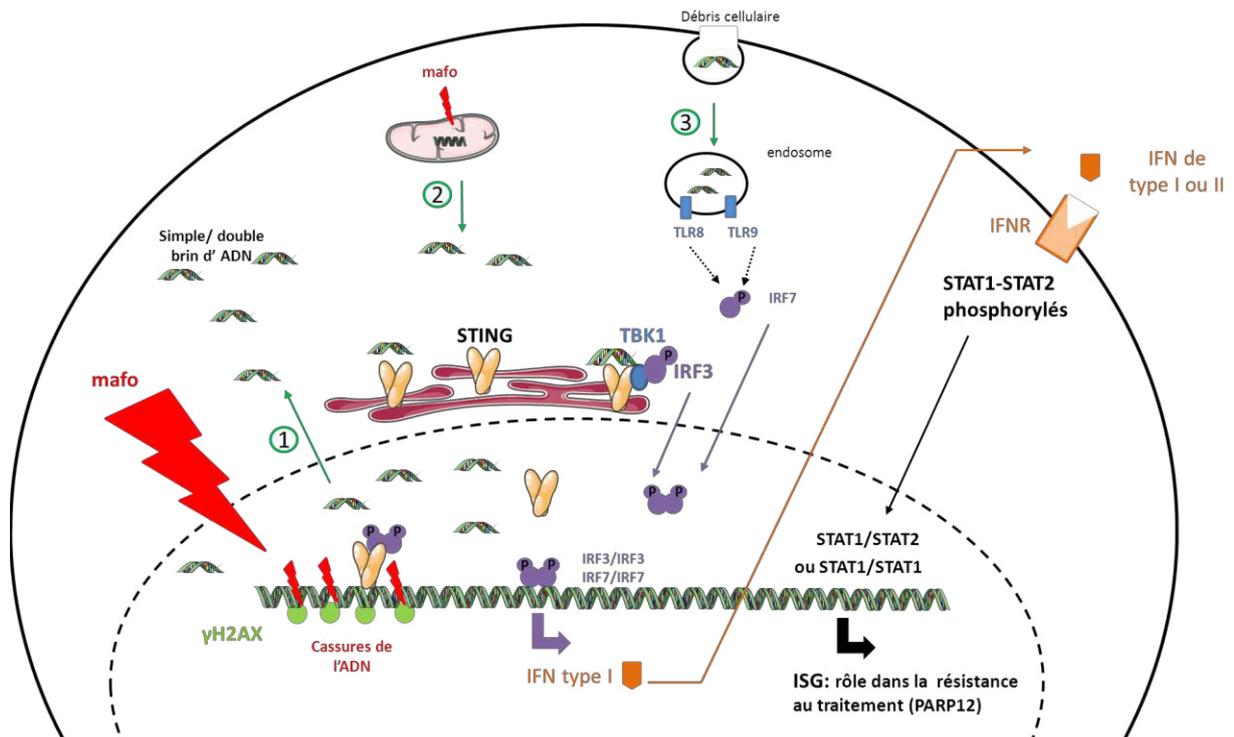


Figure 26 : Mécanisme d'activation de la voie STING/IFN/STAT1 dans des cellules tumorales mammaires sous chimiothérapie. Après ajout du mafosfamide (mafo), des acides nucléiques sont observés dans le cytoplasme des cellules, qui peuvent avoir plusieurs origines : ils peuvent provenir ① de cassures de l'ADN nucléaire, ② de cassures de l'ADN mitochondrial ou ③ de l'endocytose de débris cellulaires via des endosomes. Ces cassures d'ADN activent STING, ce qui permet la phosphorylation de IRF3. Celui-ci est ensuite transloqué dans le noyau où il induit l'expression des IFN de type I. Une colocalisation entre STING/γH2AX et STING/IRF3 dans le noyau laisse supposer que STING pourrait interagir dans le noyau avec l'ADN endommagé. Comme cela sera plus amplement abordé dans la discussion générale qui va suivre, l'activation de l'expression des IFN par l'action des TLR8 et 9 dans les endosomes via le facteur de transcription IRF7 pourrait également contribuer à la production des IFN de type I. Une fois produits, ceux-ci vont avoir une action autocrine/paracrine en se fixant aux récepteurs des IFN exprimés par les cellules tumorales. Cela va induire la phosphorylation des facteurs de transcriptions STAT1 et STAT2 qui sont ensuite transférés dans le noyau où ils se fixent à l'ADN et induisent l'expression des ISG (dont PARP12) démontrés ici comme étant impliqués dans des mécanismes de résistance à la chimiothérapie.

Intracellular STING inactivation sensitizes breast cancer cells to genotoxic agents

Julie Gaston^{1,2}, Laura Cheradame^{1,2}, Vanessa Yvonnet², Olivier Deas², Marie-France Poupon², Jean-Gabriel Judde², Stefano Cairo^{2*}, Vincent Goffin^{1,*¶}

¹Inserm, U1151, Institut Necker Enfants Malades (INEM), University Paris Descartes, Faculty of Medicine, Paris, France

²XenTech, 4 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France;

*Equal contribution

[¶]Corresponding Author: Inserm U1151 / Institut Necker Enfants Malades (INEM), Team 4, FACULTE DE MEDECINE PARIS DESCARTES, BATIMENT LERICHE, 14 Rue Maria Helena Vieira Da Silva, CS61431, 75993 Paris cedex 14
Tel: +33 1 72 60 63 68. Email: vincent.goffin@inserm.fr

Key words: Interferon, STAT1, PARP12, breast cancer, recurrence

Abstract :

Activation of the IFN/STAT1 pathway is closely associated with drug response and recurrence of breast cancer treated by chemotherapy. The aim of the current study was to elucidate the molecular mechanisms involved upstream and downstream of this pathway in order to identify distinct entities that might be manipulated to improve treatment efficacy. Four breast cancer cell lines (T-47D, MCF7, MDA-MB-231 and HBCx-19 established from the eponymous PDX) were treated *in vitro* with mafosfamide, a DNA damage inducer. In two of these cell lines, genotoxic treatment upregulated type I IFN expression leading to paracrine activation of IFN/STAT1 signaling pathway after 6-8 days. In the MCF7 cell line used as a model, drug-induced DNA damage triggered precocious activation of STING, a well-characterized inducer of the IFN pathway in immune cells. STING silencing potentiated genotoxic treatment efficacy as it promoted cell death extent and delayed cell colony recurrence. Similar results were obtained when silencing PARP12, one selected gene of the IFN/STAT1 pathway fingerprint. This study provides the first demonstration of STING activation in cancer cells. We suggest that genotoxic-induced, STING-mediated type I IFN signaling is a cell intrinsic mechanism of breast cancer cell survival and regrowth.

Table 1**IFN/STAT1 fingerprint induced in breast cancer PDXs after chemotherapy treatment**

IFN/STAT1 fingerprint (selected 21 gene list)^a		
Gene name	Full name	IRDS^b
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	X
IFI44	interferon-induced protein 44	X
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	X
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	X
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	X
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	X
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	X
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	X
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	
PARP12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	
PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	
SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2	
UBE2L3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	
IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	
IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	
IRF9	ring finger protein 31	
LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	
ZNFX1	zinc finger, NFX1-type containing 1	
CLDN1	Claudin 1	

^aGenes selected to represent the diversity of the IFN/STAT1 fingerprint induced in residual tumor cells after chemotherapy in responder PDXs [2]. ^bGenes of the IFN/STAT1 fingerprint identified as IRDS [15].

INTRODUCTION

Chemotherapy is active in numerous cancers, reducing tumor growth and lengthening patient survival. However these benefits are not constant and frequently transient, reflecting a variable ability of cancer cells to survive to drug toxicity. Resistance to chemotherapy can be observed *de novo*, as identified by the lack of tumor response. However, escape to treatment can occur after an initial response, defining a process of drug-resistance differing from the *de novo* resistance. Such an adaptive survival is frequent and responsible for tumor recurrences after response to chemotherapy. Thus, improving the efficacy of treatment by prevention of cancer cell survival and recurrence is currently an active area of research [1] and of rational hope.

Using several breast cancer patient-derived xenografts (PDXs), we were recently able to distinguish xenografts which resisted *de novo* to chemotherapy, and others which initially regressed under treatment, but progressed with constant recurrences [2]. Furthermore, the responses to chemotherapy were tightly related to the activation of IFN/STAT1 signaling in post-treatment residual cancer cells [2]. Indeed, the upregulation of an IFN fingerprint covering 140 IFN stimulated genes (ISGs) was observed in responding tumors only [2]. This IFN-related response was correlated with STAT1 phosphorylation and massive DNA damage, as reflected by very high prevalence of γ H2AX. However, neither the actual mechanisms by which chemotherapy triggered the IFN/STAT1 pathway in these breast cancer PDXs nor the actual contribution of the ISG fingerprint to the tumor response were elucidated. Using human-specific molecular tools, both type I (α , β) and II (γ) IFNs were detected in tumor cells in response to treatment. Since breast

cancer cells have been shown to express IFN receptors [3], these observations suggested that activation of the IFN/STAT1 pathway might be induced by an autocrine/paracrine mechanism.

Both types I and II IFNs are typical cytokines classically secreted by immune cells to induce immune cell activation and differentiation in response to pathogen aggression [4, 5]. Several studies have shown that the presence of tumor infiltrating immune cells was a factor of good prognosis in various human solid tumors [6-9]. The presence of IFNs in the tumor microenvironment has been widely documented [for a review, 10] and they are usually viewed as active contributors to the antitumor processes mediated by the immune system. Furthermore, a recent study suggested that cancer cell-intrinsic type I IFN signaling may contribute to chemosensitization [11]. Otherwise, the transcriptomic profiling of biopsies from women with locally advanced/high risk early stage breast cancers receiving neoadjuvant chemotherapy revealed that increased ISG expression at the time of surgery (compared to pre-treatment levels) was associated with early cancer recurrence [12]. This finding nicely correlated the observation that STAT1, the main downstream signaling target of IFN receptors, was constitutively activated in cancer cells surviving chronic treatments inducing DNA damage [13, 14]. In agreement, an IFN-related DNA damage resistance signature (IRDS) gathering STAT1 and 48 other genes was identified as a prediction marker of recurrence after radiotherapy [15, 16]. Of note, the IRDS signature showed only partial overlap with the IFN/STAT1 fingerprint that we identified in PDXs [Ref. 2 and Table 1]. Taken together, these data underline the functional complexity of IFNs secreted into the

Table 2

Characteristics of the four breast cancer cell lines used in this study [see Ref. 58]

Cell lines	Origin	ER status	p53 status	Her2 levels
MCF7	ATCC	+	WT	very low
T-47D	ATCC	+	mutated	moderate
MDA-MB-231	ATCC	-	mutated	low
HBCx-19	PDX	+	WT	N.D.

N.D.: not determined

Table 3

In vitro profile of several breast cancer cell lines to mafosfamide sensitivity

	Day 3		Day 6	
	GI ₅₀ ± SD (µM)	TGI ± SD (µM)	GI ₅₀ ± SD (µM)	TGI ± SD (µM)
MCF7	2,7±0,7	18,0±6,2	0,6±0,2	11,2±0,9
T-47D	12,1±1,5	17,5±1,5	1,5±0,3	12,1±2,2
MDA-MB-231	11,4±5,2	17,2±3,1	0,5±0,3	11,0±0,5
HBCx-19	10,1±2,8	18,13±1,9	0,6±0,6	4,1±2,2

GI₅₀ and TGI index concentrations were calculated 3 or 6 days after mafosfamide treatment (results are mean of at least three independent experiments). GI₅₀ was calculated as the drug concentration that reduced the number of cells to 50% of the number of cells before drug addition. TGI is the drug concentration that achieved total growth inhibition of cells.

tumor microenvironment, which may exert opposite actions on tumor response to treatment depending on the nature of the target cell (immune vs neoplastic) and on signal kinetics (acute vs chronic).

In immune cells, it has been shown that type I IFN production and downstream signaling was stimulated by the STING pathway [17]. STING (stimulator of IFN genes), also referred to as TMEM173, is a transmembrane protein located in the endoplasmic reticulum. One mechanism of STING activation has been recently elucidated. In the presence of cytosolic double stranded (ds) or single stranded (ss) DNA originating from pathogens, the cytosolic DNA sensor cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) catalyzes the production of 2'3' cyclic GMP-AMP (cGAMP) which binds to and activates STING [18-20]. Activated STING then translocates to perinuclear regions and ultimately contributes to the activation of type I IFN expression [21, 22]. As such, the STING/IFN plays a critical role in anti-microbial innate immunity [20, 23, 24]. Based on this evidence, the paradigm has emerged that increasing type I IFN expression within the tumor microenvironment may potentiate the antitumor immune response with expected therapeutic benefit [5]. One of the strategies currently under investigation involves the use of STING agonists which have been shown to induce IFN production by tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and in turn to promote rejection of established tumors in immune-competent host mice [25].

In this context, and following up our recent findings using breast cancer PDXs [2], the present study was designed with the double aim to elucidate i) the molecular mechanisms by which cell-intrinsic IFN signaling was triggered in cancer cells in response to chemotherapy, and ii) the ultimate contribution of the ISG fingerprint to the tumor response to treatment. In order to

avoid any interference with biological responses induced by the immune cells present in the tumor microenvironment *in vivo*, we privileged an *in vitro* approach. We first identified breast cancer cell lines mimicking *in vitro* the drug-induced activation of the IFN/STAT1 signature observed *in vivo*, then we used these models to decipher both the upstream mechanisms and downstream consequences of this IFN/STAT1 fingerprint. This study provides the first evidence that chemotherapy used at sub-lethal doses can trigger the STING/IFN pathway in some cancer cells, which in turn contributes to survival to treatment via specific IFN/STAT1 target genes. We identified PARP12 as one such active contributor of this pathway involved in post-chemotherapy survival and re-growth of breast cancer cells.

RESULTS

Induction and characterization of an IFN/STAT1 fingerprint in cancer cells under genomic stress

Preliminary screening of various breast cancer cell models identified MCF7, T-47D and MDA-MB-231 cell lines and HBCx-19, a primary cell line derived from the eponymous PDX, as those exhibiting the most robust molecular responses to genotoxic stress (see below). These four cell lines reflect the breast cancer diversity according to their estrogen receptor (ER) status, HER2/Neu expression and p53 mutations (Table 2) [26]. A proliferation test was performed *in vitro* to quantify the effects of mafosfamide, the active metabolite of cyclophosphamide used *in vivo*. We determined that the total growth inhibition (TGI) concentration index, i.e. the dose of drug at which the number of living cells seeded remains unchanged after 3 or 6 days of treatment blocked cells in G2/M (Figure S1A,B), induced progressive cell death (Fig S1C) and concomitantly reduced proliferation

reflected by the decrease of Ki-67 staining (Fig S1D,E). According to these data, the sub-lethal drug concentration of 10 μ M was chosen throughout this study to investigate the consequence of genotoxic stress while maintaining a sufficient number of living cells for performing molecular analyses.

The status of IFN/STAT1 signaling in response to genotoxic stress was analyzed by western blot. In the four cell lines, we monitored STAT1 phosphorylation on both tyrosine (Y701) and serine (S727) residues and the level of STAT1 expression, since the latter is *per se* a transcriptional target of the IFN/STAT1 pathway [27]. In HBCx-19 cells (Figure 1C,D) and MCF7 (Figure 1F,G) cells, serine/tyrosine STAT1 phosphorylation and STAT1 protein up-regulation were detected 144h after addition of mafosfamide, and these effects persisted (MCF7) or even increased (HBCx-19) until 192h. Using qPCR analysis, we detected an increased expression of the majority of the IFN/STAT1 signature (21 genes) that we previously identified as representative of the drug-induced ISGs in breast cancer PDXs (Figure 1E,H) [2]. Based on these observations, HBCx-19 and MCF7 were identified as 'IFN-responsive' cell lines, i.e. cells exhibiting STAT1 pathway activation and ISG

upregulation in response to genotoxic treatment. In contrast, T-47D (Figure 1,I-K) and MDA-MB-231 (Figure 1,L-N) were identified as 'IFN-non responsive' cell lines, as neither STAT1 pathway activation nor ISG upregulation were observed in response to genotoxic stress. The absence of response in IFN-non responsive cells was not due to the lack of drug-induced DNA damage since phosphorylated H2AX (referred to as γ H2AX) was similarly detected by western blot in the four cell lines (Figure 1C,F,I,L) [28].

Induction of ISGs has been reported to occur during cell senescence [29], therefore we addressed whether the senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) could discriminate IFN-responsive *versus* IFN-non responsive cell lines. Using MCF7 (IFN-responsive) and T47D (IFN-non responsive) as representative cell lines this was clearly not the case (Figure S2), suggesting that expression of the IFN/STAT1 signature was not linked to cell senescence.

Together these data indicate that *in vitro* and in the absence of immune cells, genotoxic treatment can trigger IFN signaling in some but not all breast cancer cell lines, exactly as observed *in vivo* using PDXs [2].

Figure 1. STAT1 phosphorylation and up-regulation of IFN-inducible genes is observed in some but not all breast cancer cells in response to mafosfamide treatment.

(A,B) Dose-response effect of mafosfamide on the *in vitro* proliferation of HBCx-19, MCF7, MDA-MB-231 and T-47D cells 3 (A) or 6 (B) days after treatment. Results (n=3 independent experiments) are expressed as percentage of growth with respect to the increased cell density between day 0 and days 3 or 6 in the absence of treatment. **(C)** Western blotting analysis of P-STAT1^{Y701}, P-STAT1^{S727} and total STAT1 in HBCx-19 cells showing the time course induction of the STAT1 pathway following mafosfamide treatment (added at T0). γ H2AX reflects drug-induced DNA damage. **(D)** Quantification of P-STAT1^{Y701}, P-STAT1^{S727} and total STAT1 protein levels (normalized to actin levels, mean \pm SD) in mafosfamide-treated (192h) HBCx-19 cells relative to untreated conditions (two-way ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test). **(E)** qRT-PCR analysis of the 21 gene signature representative of the IFN/STAT1 fingerprint (Table 1) after 192h mafosfamide treatment (mean \pm SD, n=3 per group compared to cells treated with vehicle). The same analyses as described in C-E were performed for MCF7 cells **(F-H)**, MDA-MB-231 **(I-K)** and T-47D **(L-N)** cells. Dotted lines on immunoblots separate noncontiguous parts of the same membrane.

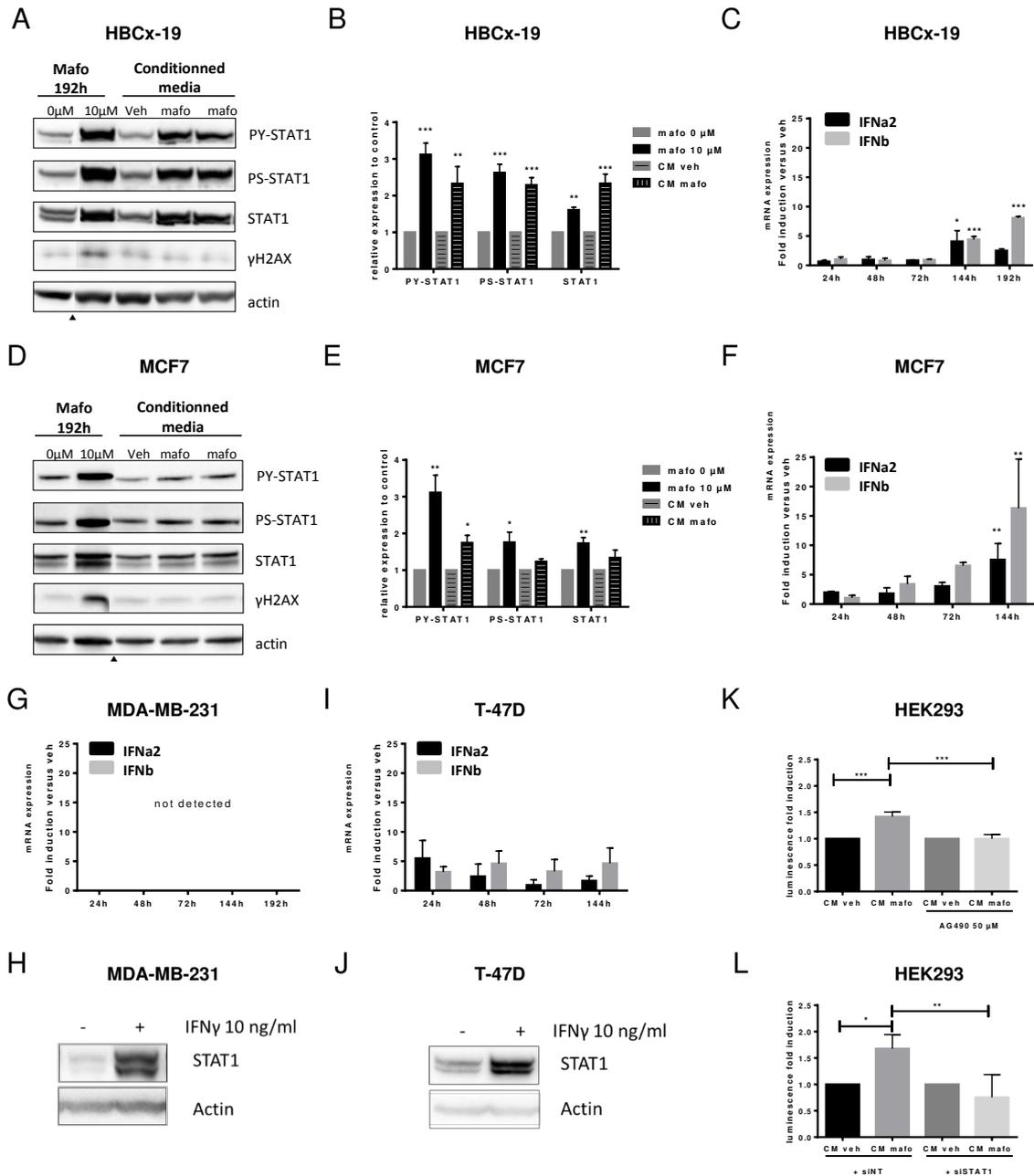


Figure 2. Paracrine IFN signaling is induced by mafosfamide treatment

(A,B,D,E) HBCx-19 (A,B) and MCF7 (D,E) cells were stimulated for 192h with mafosfamide versus vehicle, or for 24h with conditioned medium from cells that were stimulated with mafosfamide (CM^{mafo}, shown in duplicate) versus vehicle (CM^{veh}), then P-STAT1^{Y701}, P-STAT1^{S727} and total STAT1 were analyzed by western blotting and quantified as described in the legend to Figure 1. Dotted lines on immunoblots separate noncontiguous parts of the same membrane. (C,F,G,H) The time-course expression of IFNα2 and IFNβ in HBCx-19 (C), MCF7 (F), MDA-MB-231 (G) and T-47D (H) cells treated with mafosfamide versus vehicle was performed by qRT-PCR (n=3, mean ± SD, two-way ANOVA and post-hoc Tukey's multiple comparison test). (I,J) Western blot of total STAT1 and actin expression in MDA-MB-231 (I) and T47D (J) cells after 72h stimulation with 10 ng/ml IFNγ. (K,L) Activation of ISRE-luciferase reporter plasmid by CM^{mafo} with/without 50 μM AG490 (K) or 20 nM non targeted siRNA (siNT) versus siSTAT1 (L). For each condition the results are expressed relative to CM^{veh} after normalization to Renilla luciferase values (n=3, mean ± SD, two-way ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test).

Cell-autonomous secretion of type I IFNs is observed in response to genotoxic stress

Based on these results, we reasoned that the activation of STAT1 pathway in tumor cells treated with mafosfamide could result from cell-autonomous secretion of cytokines, known to trigger this pathway. We used a conditioned medium approach to address this issue (Figure S3A). MCF7 and HBCx-19 cells were incubated with mafosfamide (or vehicle) for 6h, then cells were washed and shifted to fresh, mafosfamide-free, medium. Cell conditioned media (CM^{mafo} or CM^{veh}) were collected 144h (MCF7) or 192h (HBCx-19) later (i.e. the time to get maximal STAT1 activation, see Figure 1) then added respectively to naive MCF7 or HBCx-19 cells for 24h. In HBCx-19, CM^{mafo} markedly induced STAT1 tyrosine/serine phosphorylation and total STAT1 up-regulation as efficiently as mafosfamide treatment (Figure 2 A,B). Similar effects were observed in MCF7 cells albeit with lower efficiency since only upregulation of STAT1 tyrosine phosphorylation achieved significance (Figure 2 D,E). Together, these results indicate that short time exposure to genotoxic drug is sufficient to induce secretion of ligands able to trigger the STAT1 pathway via a paracrine signaling.

Based on previous reports suggesting that type I and type II IFNs are upregulated in PDXs treated with genotoxics [2, 11], we focused on IFN ligands for further investigations. First, we performed a time-course follow-up of type I and type II IFN mRNA expression in response to mafosfamide treatment. In both IFN-responsive cell lines (HBCx-19 and MCF7), a significant increase in type I IFN expression was observed 144h/192h after treatment (Figure 2C,F), which matched the detection of

the IFN/STAT1 signature at these time points (Figures 1E,H). Type II IFN mRNAs were below the detection threshold in both cell lines (not shown). By contrast, IFN-non responsive cell lines (MDA-MB-231 and T-47D) failed to show any significant upregulation overtime of type I or type II IFN expression in response to mafosfamide treatment (Figure 2 G,I). Since activation of STAT1 pathway could be observed when these cells were stimulated with purified IFNs (Figure 2 H,J), this strongly suggests that the absence of IFN/STAT1 signaling in response to mafosfamide treatment in IFN-non responsive models (Figure 1I-N) is linked to the lack of IFN escalation in these experimental conditions.

Next, we aimed to assess whether functional IFNs were actually secreted into the culture medium by cells treated with mafosfamide. To do so, CM^{mafo} or CM^{veh} obtained from MCF7 cells as described above were used to stimulate HEK293 cells transiently transfected with luciferase reporter gene constructs driven by the IFN-stimulated response element (ISRE) promoter (see Material and Methods). As shown in Figure 2K, the ISRE reporter construct could be activated by CM^{mafo} compared to CM^{veh}. This effect was specific as it was significantly reduced by addition of the JAK inhibitor AG490 (Figure 2K) as well as by expression of a siRNA directed against STAT1 (Figure 2L).

Together, these data strongly suggest that breast cancer cells treated with mafosfamide secrete functional cytokines able to trigger paracrine STAT1 signaling, among which type I IFNs appear to be relevant candidates.

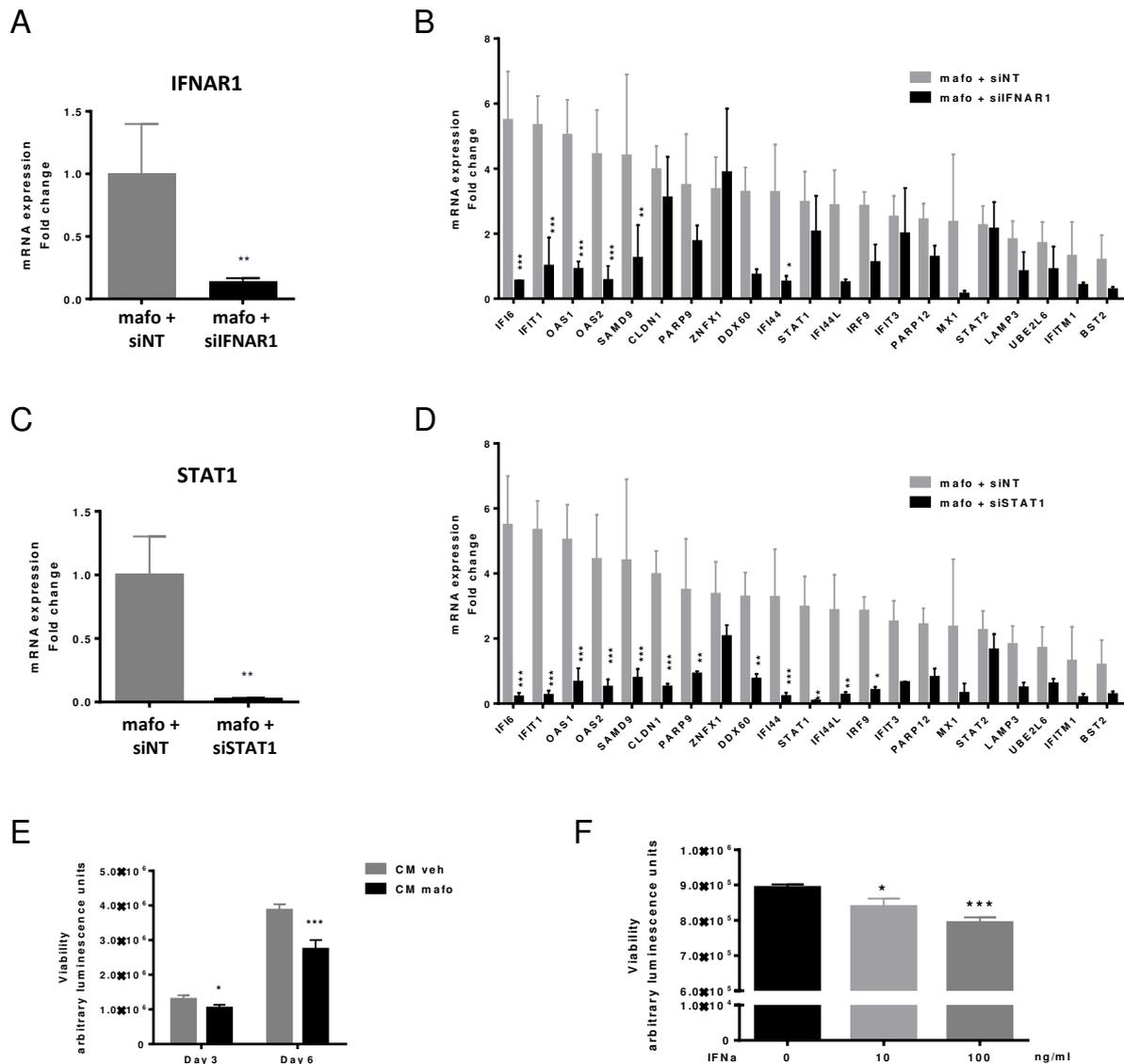


Figure 3. Silencing IFNAR1 or STAT1 gene expression in MCF7 cells impacts on expression of the IFN fingerprint and on cell proliferation.

(A,B) qRT-PCR showing the efficacy of IFNAR1 silencing using siIFNAR1 relative to siNT in MCF7 cells treated for 6 days (144h) with mafosfamide (n=3, mean ± SD, t test) (A) and its resulting effect on the expression of the IFN/STAT1 signature (B) (n=3, mean ± SD, two-way ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test). (C,D) The same experiment as in panels A and B is shown for STAT1 silencing. (E,F) MCF7 viability (Cell Titer-Glo luminescent assay) was measured after incubation in CM^{veh} versus CM^{mafo} for 3 or 6 days (E) or in culture medium containing various doses of purified IFN α . In all panels results are expressed as mean ± SD, n=3 independent experiments in triplicate per condition (two-way (E) or one-way (F) ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test).

IFNAR1 and STAT1 silencing effects the genotoxic stress-induced molecular signature

Type I IFNs act on a common receptor, IFNAR, which is composed of two subunits, IFNAR1 and IFNAR2. Both are expressed in MCF7 cells [30]. Former studies showed that IFNAR1 silencing was sufficient to abolish type I IFN signaling [30], therefore we used this strategy to further assess the involvement of paracrine type I IFN signaling. As shown in Figure 3A, a siRNA directed against IFNAR1 markedly decreased its expression compared to a non-targeted siRNA (siNT). Using the latter as a control, IFNAR1 silencing strongly counteracted the ability of MCF7 to express the IFN/STAT1 signature in response to mafosfamide treatment (Figure 3B). Specifically, the induction of 6 out of the 21 genes analyzed (IFI6, IFIT1, OAS1, OAS2, SAMD9, IFI44) was significantly altered, sometimes beyond their level in mafosfamide-free condition. Ten other genes were also decreased (DDX60, IFI44L, IFIT3, MX1, IRF9, PARP12, LAMP3, UBE2L6, IFITM1, BST2) but this did not reach statistical significance probably due to heterogeneous levels in the mafosfamide/siNT condition. Finally, the expression level of five genes (ZNF1, CLDN1, ITIF3, STAT1, STAT2) was not affected. These results confer a key role to IFNAR1, and by extension to type I IFNs, in the induction of the IFN/STAT1 signature observed in MCF7 in response to genotoxic treatment.

In agreement, STAT1 silencing produced very similar effect and was even more efficient since CLDN1, PARP9, STAT1, IRF9 and IFIT3 were now significantly down-regulated as compared to change in expression in the mafosfamide/siNT condition (Figure 3D). This higher efficiency could reflect the stronger inhibition of STAT1 ($97.4 \pm 1\%$) vs IFNAR1 ($85.7 \pm 2.3\%$) expression. Alternatively, since

many cytokines other than IFNs are also able to activate the STAT1 pathway [31], one could not discard the possibility that such other ligands could participate in the response observed (e.g. type II IFNs, Interleukin (IL)-6, IL-8, etc.). To address this hypothesis, we performed a cytokine array involving several of these cytokines (Figure S4A and B). None of them could be detected after 72h, 96h (not shown) or 144h (Fig S3C) mafosfamide treatment, further supporting IFNs as the major trigger of STAT1 fingerprint downstream of genotoxic stress. Taken together, these data indicate that the type I IFNs/IFNAR1/STAT1 pathway plays a critical role in mediating ISG upregulation in breast cancer cells in response to genotoxic treatment.

Finally, we aimed to address whether the activation of this pathway in response to mafosfamide treatment could affect cell viability. Conditioned media generated as described above were added to naive MCF7 cells and cell viability was measured 3 and 6 days later (Figure 3D). CM^{mafo} (containing secreted cytokines) significantly reduced cell viability compared to CM^{veh}, which was reminiscent of the widely described anti-proliferative properties of IFNs [32]. Accordingly, the effect of CM^{mafo} could be mimicked by the addition of purified type I IFNs (Figure 3E). These data suggest that the expression of STAT1 pathway after genotoxic treatment via the production of type I IFNs might have an important role in controlling the response to genotoxic treatment.

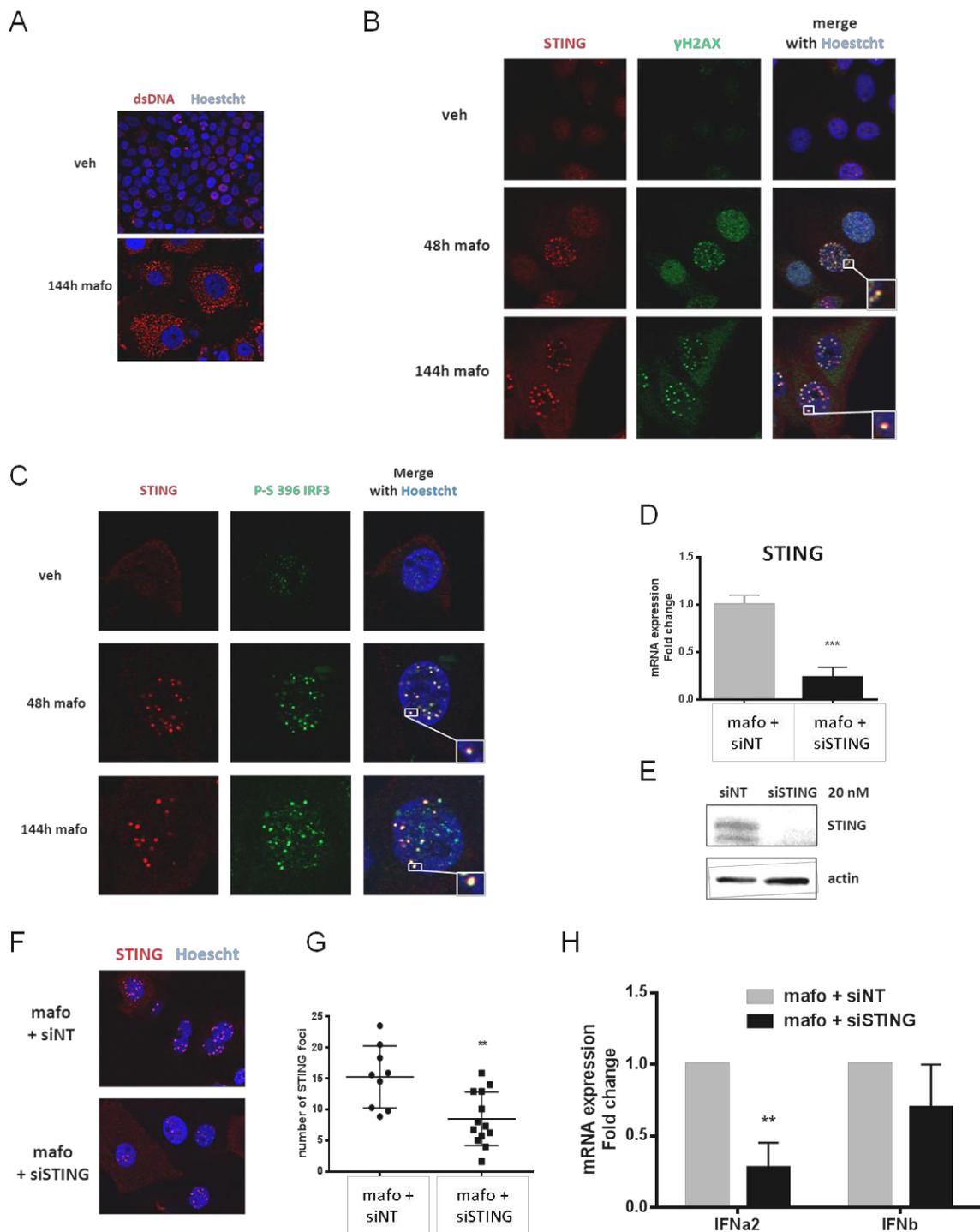


Figure 4. STING pathway is activated in MCF7 cells upon DNA damage induced by genotoxic stress

(A) Immunofluorescence staining of dsDNA breaks in the cytoplasm (red) after 6 days (144h) treatment of cells with vehicle or mafosfamide. (B,C) Co-immunostaining of STING (red) with γ H2AX (green) (B) or P-IRF3⁵³⁹⁶ (green) (C) in cells treated with vehicle or mafosfamide for 48h or 144h as indicated. In A-C, nuclei are shown in blue; images shown are representative of 3 independent experiments. (D-G) The efficacy of STING silencing using siSTING relative to siNT in MCF7 cells treated for 6 days with mafosfamide was assessed by qRT-PCR (D) ($n=3$, mean \pm SD, t test), western blotting (E) and immunofluorescence (F). Panel G shows the quantification of STING foci per cells obtained in immunofluorescence experiments ($n=3$, mean \pm SD, t test). (H) Expression of IFN α 2 and IFN β (qRT-PCR) in cells treated for 6 days with mafosfamide in the presence of siNT versus siSTING (mean \pm SD, $n=3$ independent experiments in triplicate, two-way ANOVA and post-hoc Bonferroni's multiple comparison test).

The STING pathway is triggered by chemotherapy and regulates type I IFN production

We next aimed to address by which mechanism the genotoxic stress could trigger type I IFN expression in breast cancer cells. As stated in the Introduction, recent studies have shown that ss/dsDNA present in the cytosol of immune cells infected by pathogens could trigger the STING pathway that in turn activated IFN production. We reasoned that dsDNA release resulting from genotoxic-induced DNA damage in breast cancer cells might have the same effect. To address this hypothesis we first analyzed dsDNA breaks and observed that upon mafosfamide treatment, dsDNA breaks accumulate in the cytoplasm (Figure 4A). Moreover, as previously shown, the time-course analysis of MCF7 cells treated with mafosfamide revealed that γ H2AX was detected by western blotting as early as 24/48h after treatment (Figure 1C), i.e. much before the induction of STAT1 pathway could be detected. Using immunofluorescence (IF) assay, green dots representing the accumulation of γ H2AX foci at sites of DNA damage were detected in the nucleus 48h after treatment and appeared to increase in number and staining density until 144h (Figure 4B). Strikingly, STING (labelled in red) displayed a very similar pattern, suggesting it may re-localize in the nucleus upon DNA damage. Accordingly, merging IF images revealed that γ H2AX and STING overlapped (yellow dots).

The canonical activation of STING pathway involves recruitment and activation of TANK binding kinase-1 (TBK1) which in turn phosphorylates serine 396 of IFN regulatory factor (IRF)-3, a key transcription factor involved in IFN type I transcription [23]. To

confirm the activation of this pathway in response to genotoxic stress, we aimed to assess the serine phosphorylation of IRF-3 and its co-localization with STING. Using IF, phosphorylated IRF-3 was detected in the nucleus at 48h and 144h time points after mafosfamide treatment (Figure 4C). As noticed for γ H2AX, a partial co-localization of STING with phosphorylated IRF-3 was observed.

Finally, we used a gene silencing approach to evaluate the role of STING pathway in IFN upregulation in response to genotoxic stress. The efficacy of the siRNA directed against STING was validated by monitoring STING expression at the mRNA and protein levels using qPCR (Figure 4D), western blot (Figure 4E) and IF (figure 4F,G). As shown in Figure 4H, STING knock-down reduced type I IFN upregulation observed in response to treatment, an effect that appeared to be more marked on IFN α than IFN β . Although this partial effect may be the incomplete extinction of STING expression (Figure 4, D-G), it may also account for the participation of alternative DNA sensors cooperating with STING such as IFI16 [33], and/or pathways leading to IFN expression in response to genotoxic stress e.g. IRF1 [34] or MYD88 [35]. As shown in Figure S5, these three genes were upregulated in MCF7 and HBCx-19 in response to mafosfamide treatment (see Discussion).

Together these results demonstrate that STING pathway is rapidly (48h) triggered in breast cancer cells as a result of chemotherapy-induced DNA damage, and plays an important role in the transcriptional upregulation of type I IFNs. This cell-autonomous circuitry then amplifies for several days.

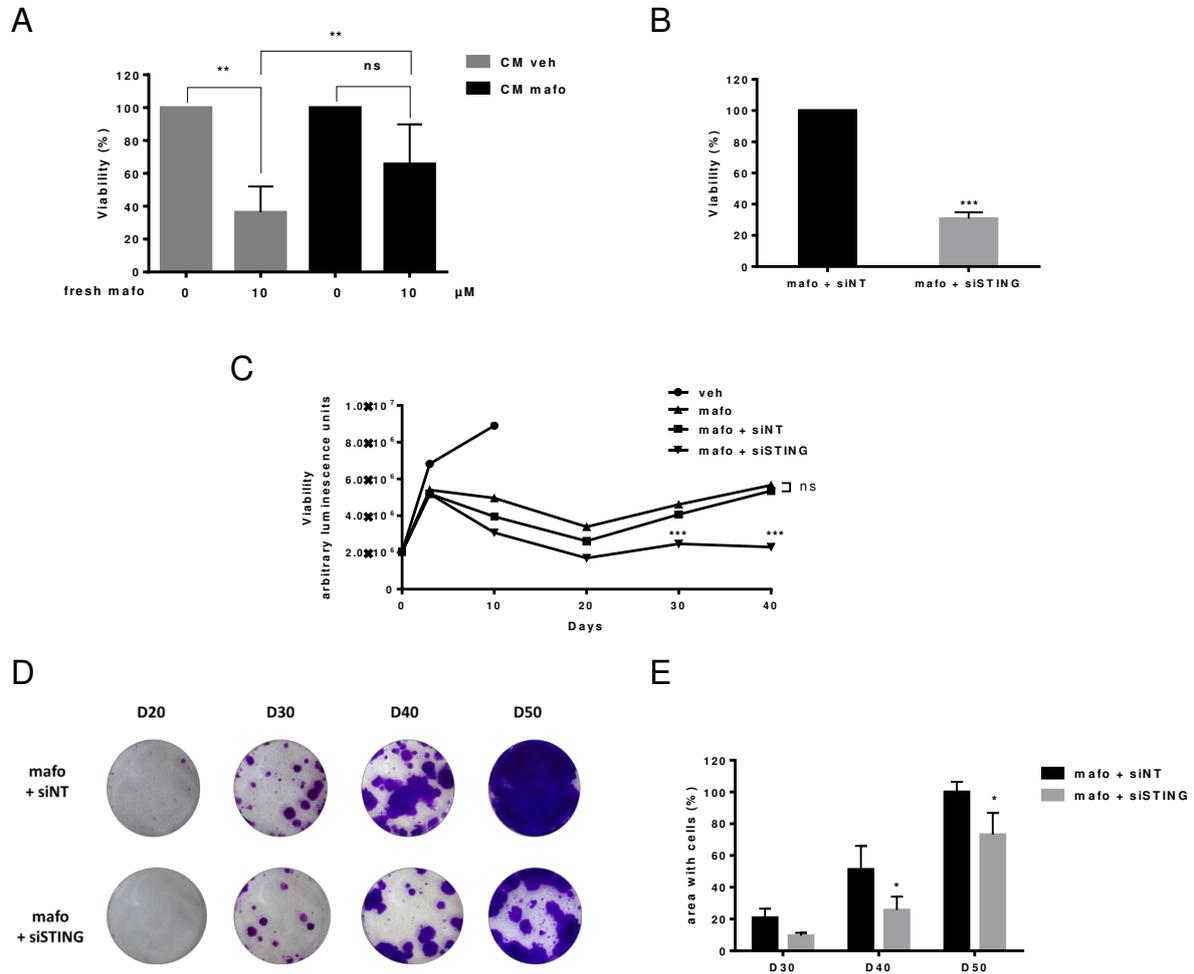


Figure 5. STING silencing potentiates the efficacy of genotoxic treatment of MCF7 cells

(A) MCF7 cells cultured in CM^{veh} or CM^{mafo} (see Figure S3) were treated with mafosfamide then cell viability was assessed after 6 days using CellTiter-Glo luminescent assay. Results are expressed relative to the condition without mafosfamide (mean ± SD, n=3 independent experiments per condition, two-way ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test). (B) The effect of mafosfamide combined with siSTING or siNT was assessed by CellTiter-Glo luminescent assay 6 days after mafosfamide treatment. Results were relative to mafosfamide with siNT (mean ± SD, n=3 independent experiment per condition, t test). (C) The effect of mafosfamide on cell viability over 40 days in the presence or the absence of siNT or siSTING was assessed by CellTiter-Glo luminescent assay (two-way ANOVA and post-hoc Tukey's multiple comparison test). (D,E) Twenty to fifty days after mafosfamide treatment combined with siSTING or siNT the colonies appearing from resistant cells were stained with crystal violet (D) and quantified (E) using ImageJ (mean ± SD, n=3 at per condition, two-way ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test).

Cell intrinsic IFN signaling reduces the genotoxic effects, its inhibition amplify them

Although reduced proliferation of cancer cells is intuitively a good prognosis feature (Figure 3E), MCF7 cells cultured for 6 days in CM^{mafo} (containing IFNs and cytokines) appeared to be more resistant to mafosfamide treatment as compared to cells cultured in CM^{veh} (Figure 5A). This suggested that priming breast cancer cells with IFNs/cytokines may contribute to confer an increased survival potential to further genotoxic stress. In order to address this hypothesis, we silenced the expression of STING as the most upstream inducer of the IFN production in response to mafosfamide (Figure 4H). As expected, STING silencing significantly potentiated mafosfamide treatment efficacy as reflected by the marked decrease in cell viability 6 days after treatment (Figure 5B).

After a single mafosfamide treatment (10 μ M), some cells survive but enter into a prolonged steady-state/senescence phase followed by re-activation of growth and emergence of cell colonies detectable between days 20 and 30 (Figure 5C-E). To address whether STING pathway impacted the tumor recurrence phase, we silenced its expression in MCF7 cells 3 days after treatment and followed them up for the next 50 days. Compared to the control condition (siNT), STING silencing potentiated the efficacy of mafosfamide treatment as reflected by delayed appearance of re-growing colonies of surviving cells.

Together these results suggest that cell-autonomous activation of the STING/IFN pathway confers resistance to treatment which ultimately favors tumor survival.

PARP12 as a novel target to reduce breast cancer resistance to genotoxic stress

A recent study suggested that STING agonists may be of clinical benefit to boost the immune system by upregulating IFN β and thereby contribute to initial tumor regression [25]. Based on this rationale, we reasoned that STING might be a tricky target contributing to opposite effects in tumor cells (Figure 5) versus their microenvironment. We therefore searched for potential targets downstream of the STAT1 pathway. To that end, we developed a lab-scale screening approach using a custom library of siRNA targeting the genes of the IFN fingerprint. In addition to the 21 gene listed in Table 1, a dozen of candidates selected from the transcriptomic analysis of residual PDXs [2] or from the literature (e.g. IFI27, IFIT5, RNaseL, OASL, IFI16, IFIT2, BCL2L2) were added to the analysis based on their potential relevance in the context of interest. Candidate siRNAs were tested individually or by pairs using 96 well plates and cell viability 10 days after mafosfamide treatment was used as the functional readout of gene silencing.

For the majority of the genes silencing resulted in increased mafosfamide-induced cell death compared to siNT, further supporting a role for the IFN fingerprint in conferring cell resistance to treatment (Figure 6A). To validate the results of this preliminary screening, single gene silencing experiments were performed for the most promising genes tested by pairs (BCL2L1-BCL2L2; USP18-ZNFX1; IFIT2-IFIT3)(not shown). In all, PARP12 appeared to be the gene whose transcriptional inhibition most potently inhibited MCF7 cell viability under genotoxic stress (Figure 6A). To validate this result, we confirmed that the PARP12 siRNA used in the screening experiment efficiently reduced

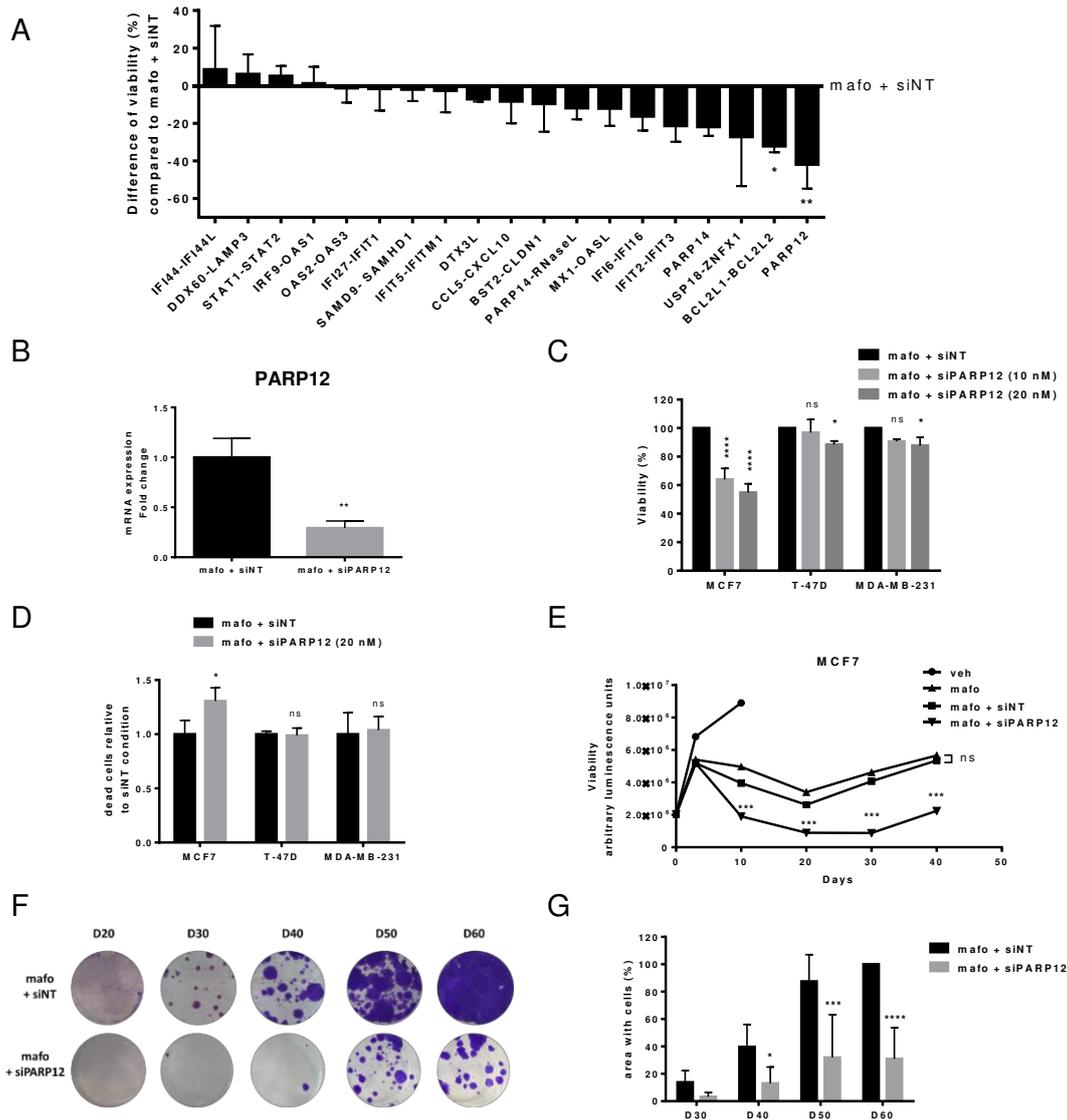


Figure 6. PARP12 silencing potentiates the efficacy of genotoxic treatment of MCF7 cells

(A) The effect of mafosfamide combined with various siRNAs (tested individually or by pairs) targeting the genes of the IFN/STAT1 fingerprint was assessed by CellTiter-Glo luminescent assay 6 days after mafosfamide treatment of MCF7 cells. Results are relative to mafosfamide with siNT (mean \pm SD, $n=3$ independent experiments per condition, one-way ANOVA post-hoc Dunnett's multiple comparison test). **(B)** The efficacy of PARP12 silencing using siPARP12 relative to siNT in MCF7 cells treated for 10 days with mafosfamide was assessed by qRT-PCR (mean \pm SD, on MCF7 cell line $n=3$ per group, t test). **(C)** The effect of mafosfamide combined with siPARP12 or siNT on MCF7, T-47D and MDA-MB-231 cell viability was assessed by CellTiter-Glo luminescent assay 10 days after mafosfamide treatment. Results are relative to mafosfamide with siNT (mean \pm SD, $n=3$ independent experiments per condition, two-way ANOVA and post-hoc Tukey's multiple comparison test). **(D)** The effect of mafosfamide combined with siPARP12 (20 nM) on MCF7, T-47D and MDA-MB-231 cell mortality was evaluated by FACS analysis 10 days after mafosfamide treatment. The results represent the percentage of dead cells compared to mafosfamide with siNT (mean \pm SD, $n=3$ independent experiments per condition, two-way ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test). **(E)** The effect of mafosfamide on cell viability over 50 days in the presence or the absence of siNT or siPARP12 was assessed by CellTiter-Glo luminescent assay (two-way ANOVA and post-hoc Tukey's multiple comparison test). **(F,G)** Twenty to sixty days after mafosfamide treatment combined with siPARP12 or siNT the colonies appearing from resistant cells were stained with crystal violet (D) and quantified (E) using ImageJ (mean \pm SD, $n=3$ at per condition, two-way ANOVA and post-hoc Sidak's multiple comparison test).

PARP12 expression (Figure 6B) and actually affected MCF7 cell viability when combined to mafosfamide (figure 6C). A FACS analysis discriminating live from dead cells showed that inhibition of PARP12 combined to mafosfamide induced more cell death than the drug alone, confirming the results of the cell viability assay (figure 6D). Strikingly, PARP12 silencing had limited impact on T-47D and MDA-MB-231 cell viability and on the percentage of dead cells (FACS analysis) compared to mafosfamide combined to siNT (Figure 6 C and D), strengthening former observations showing that these two models do not trigger the IFN/STAT1 pathway in response to genotoxic stress. We then performed a colony assay using the MCF7 model in order to evaluate whether PARP12 silencing interfered with tumor survival and growth. A very significant delay (~10 days) in cell re-growth (colony formation) was observed when mafosfamide was combined to siNT *versus* PARP12 siRNA (Figure 6 E-G). Combining STING and PARP12 siRNA did not exhibit additional or synergistic effect (Figure S6A,B), confirming that these two targets belong to the same functional pathway.

Taken together, these data indicated that breast cell intrinsic IFN signaling induced by genotoxic stress favors resistance to treatment in a PARP12-dependent manner.

DISCUSSION

This study enlightens several intriguing aspects of response to chemotherapy of cancer cells and their survival after genotoxic treatment. The genotoxic stress triggers IFN production in breast cancer cells which respond the chemotherapy and

not in *de novo* resistant tumors, irrespectively of their hormone receptor status and p53 mutated type. Trigger of IFN effect is mediated by the recruitment of STING pathway, providing a mechanism to the recently reported chemotherapy-induced IFN production by cancer cells [2, 11]. Moreover, the cell-intrinsic STING/IFN/STAT1 pathway triggers a typical ISG fingerprint that ultimately contributes to resistance to treatment and favors tumor cell re-growth. Finally this biological process probably involves the cooperation of various ISGs among which we identified PARP12 as an interesting contributor.

The 'viral mimicry' concept of cancers has recently emerged based on the assumption that the mechanisms mediating the innate response to pathogen aggression may also apply to tumor/host relationships [10, 36, 37]. Accordingly, a growing body of evidence argues that tumor cells are under the control of the immune system as highlighted by experimental studies showing that immune activation potentiates the response to genotoxic therapy in various syngeneic or xenograft models [Ref. 10 and references therein, Ref. 38]. Here we pushed this concept one step further by showing that the STING pathway, which is a molecular mechanism typically activated in immune cells in response to pathogen infection (see Introduction), can also be mobilized in cancer cells undergoing genotoxic stress. Activation of the STING pathway in MCF7 cells was assessed by IRF-3 serine phosphorylation downstream of TBK1, nuclear translocation of STING and decrease of genotoxic-induced type I IFN production upon STING gene silencing. This is to the best of our knowledge the first

report showing activation of this pathway in neoplastic cells.

The actual mechanisms that activate STING in breast cancer cells are unknown. In the immune context, STING can be activated by cGAMP that is catalyzed by cGAS from dsDNA or ssDNA provided by pathogens [18-20]. However alternative mechanisms may also exist [39]. For example, STING activation can involve DNA sensors acting as intermediate between STING and dsDNA, e.g. IFI16 [33]. Of interest, the latter was shown to be upregulated in both IFN-responsive MCF7 and HBCx-19 cell lines after mafosfamide treatment, which may contribute to amplify STING pathway activation through enhancement of cytosolic dsDNA detection. Moreover, cells can have in their endosomes dsDNA coming from dying cells in their environment. In this case, DNA sensing could involve TLR (present in the cytoplasmic or endosomal membranes) via MYD88, an adapter protein shown to promote IFN α production [35]. Of interest, MYD88 expression was also increased in both IFN-responsive cell lines upon genotoxic stress (Figure S5). Various intracellular damage-associated molecular pattern (DAMPs) could also be involved in STING activation. DAMPs include signals (e.g. ssDNA, dsDNA, ssRNA, or dsRNA) that dying cells use to alert the immune system [10]. In MCF7 cells, STING pathway activation paralleled marked enrichment of cytosolic DNA following genotoxic stress. The exact nature and origin of this cytosolic DNA are currently unknown but presumably involve dsDNA or ssDNA leaking from nuclei undergoing DNA damage, in agreement with a recent study showing that STING can be activated by the accumulation of DNA damage due to ATM

mutations [24]. Also, it has been shown that cytosolic mitochondrial DNA engaged cGAS and promoted the STING-IRF3 pathway resulting in ISG upregulation [40]. The release of mitochondrial DNA under genotoxic stress may potentially trigger a similar mechanism. Further studies are needed to elucidate the DNA sensing circuitry that is mobilized upstream of STING pathway in neoplastic cells undergoing genotoxic stress.

We showed that once activated, STING (also known as Nuclear Envelope Transmembrane protein 23), translocated into the nucleus and partially co-localized with the phosphorylated histone γ H2AX. This is to our knowledge another original finding of this study. STING has been described by others to play a role in chromatin compaction in concert with other histones to potentiate immune signaling [41]. IFI16, another DNA sensor commonly found in the cytosol, has been reported to re-localize into the nucleus after DNA or virus stimulation [42] and to associate with BRCA1 during DNA damage repair [43]. Furthermore, Mre11, a well-known protein involved in the MRN complex for double strand breaks DNA repairs in the nucleus, has also been reported to sense DNA in the cytosol [44]. Thus, against the early dogma that the nucleus is protected from DNA detection by DNA sensors [for a review, 39], our observation add another example suggesting that some DNA sensors may be able to sense DNA both in the cytosol and in the nucleus. Elucidating the functional consequences of STING subcellular relocalization with the DNA damage marker γ H2AX in breast cancer cells undergoing genotoxic stress deserves further investigations.

Gene silencing experiments unambiguously showed that STING contributed to chemotherapy-triggered type I IFN production in breast cancer cells and that the downstream IFNAR1/STAT1 pathway was a major regulator of the IFN fingerprint (Figure

3). We noticed that the effect of STING knockdown was more marked on IFN α than IFN β (Fig 2H). This may reflect the concomitant upregulation of IRF1 upon genotoxic stress (Figure S5) as this transcriptional regulator was shown to induce IFN β expression [34]. According to the higher efficiency of STAT1 *versus* IFNAR1 silencing to abolish the IFN/STAT1 signature we cannot exclude that other cytokines present in the chemotherapy-induced MCF7 secretome may also participate in STAT1 activation, though at a lower level than type I IFNs. There are in fact many STAT1 activators [31] of which only a limited set was covered by the cytokine array that we used. Of note, we failed to detect IL-6 and IL-8 which were shown to be upregulated in radioresistant cancer cells expressing the IRDS signature [45], suggesting that distinct mechanisms may be engaged. Other candidate ligands may involve PDGF, EGF, VEGF, GH, or other interleukins such as IL-3, IL-15 or IL-22 [31, 46].

Traditional chemotherapies require active cycling cells to trigger cell death [47]. Cells that are quiescent or slowly cycling are therefore less likely to be responsive to these drugs [48]. After short-term chemotherapy exposure, it has been shown that cancer cells enrich in slow cycling, dormant, chemo-resistant cell sub-populations that can resume growth after drug withdraw [49]. Even cell lines established and grown *in vitro* for decades

were shown to contain such slow cycling cells [50]. In our experiments, genotoxic treatment markedly disturbed the progression through the cell cycle as confirmed by dramatic reduction of Ki-67 positive cells (Figure S1). However, 20 days after treatment, some cells which survived treatment were able to reenter the cell cycle and form growing colonies. We show here that the chemotherapy-induced MCF7 secretome acts as a survival stimulus reducing cell death (Figure 5A). Remarkably, this effect was blunted by STING down-regulation (Figure 5B-E) strongly suggesting that the STING/IFN/STAT1 pathway acts as a cell-intrinsic mechanism of malignant cell survival and re-growth. This finding is in good agreement with former reports suggesting that STAT1 over-signaling in cancer cells confers resistance to DNA-damaging agents [12-16].

In their elegant work, Sistigu *et al* used tumor allografts in type I IFN signaling-deficient (IFNAR1^{-/-}) syngeneic host mice to demonstrate that malignant cell-autonomous IFN signaling promoted anthracycline efficacy by inducing immune responses [11]. The results we here provide integrate well these findings and warn on the protective role that some cytokines secreted by tumor cells subjected to genotoxic injury may exert on the tumor itself by stimulating the immune system. Accordingly, exogenous supply of type I IFN [11] or induction of endogenous IFN production using STING agonists [25] have been proposed as promising strategies to potentiate antitumor responses. Although STING agonists were shown to promote regression of established tumors and distant metastases in experimental models [25], we are not

aware that such compounds have been tested in combination with chemotherapy. From our observations involving *in vitro* and immune cell-free cancer models, we anticipate that IFN enrichment in the tumor microenvironment might lead to paradoxical effects combining antitumor (immune cells) and resistance (neoplastic cells) properties. Furthermore, the benefit of attracting more immune cells to fight tumor cells should be carefully balanced with the perverse effects of constitutive inflammation also shown to promote resistance to treatment [51]. In this versatile context, the identification of individual ISGs contributing to tumor cell resistance downstream of the STING/IFN/STAT1 pathway deserved to be investigated further. Furthermore, as the IFN fingerprint induced by genotoxic stress gathers proteins with very different and potentially opposite functions, this strengthened the likelihood that targeted inhibition of individual genes specifically in tumor cells may be an efficient strategy to potentiate chemotherapy.

Screening the IFN fingerprint identified PARP12 as the most potent contributor to resistance to treatment. Of interest, PARP12 was not identified among IRDS target genes (Table 1). Together with PARP9 and PARP14 also found in the IFN fingerprint [Table 1 and 2], PARP12 is a member of the large family of ADP-ribosyl transferases and is considered as a mono-ADP-ribose transferase like PARP-3,-6,-7,-8,-10,-11,-14,-15, and -16. While the DNA repair properties of canonical PARP members (PARPs 1 and 2) make them attractive targets for cancer therapy, the actual role of other family members is less

well (or not) documented in breast cancer [52, 53]. PARP9 was shown to be a member of the DNA damage response pathway and to be part of a DNA repair complex [54]. Moreover, it has been described to repress the anti-proliferative and pro-apoptotic IFN/STAT1 axis in B-cell lymphoma [55]. PARP14 is involved in genomic stability [56]. Of note, genetic inhibition of PARP9 and PARP14 was shown to increase chemotherapy efficacy in prostate cancer cells [57]. PARP12 is much less documented and was shown to be involved in the control of protein translation and inflammation [52]. To the best of our knowledge our study is the first to suggest its implication in cancer. We may speculate that when combined with mafosfamide, PARP12 inhibition reduces dormant cell survival leading to delayed cancer cell colony regrowth. In agreement, using the Kaplan Meier database (<http://kmplot.com/analysis/>), we found that ER-positive breast tumors that overexpressed PARP12 had a worse outcome compared to those expressing low levels of PARP12 (Figure S6C). Obviously further studies are required to elucidate its mechanism of action in resistance to treatment.

Finally, this study identified two breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and T-47D) that were unable to induce the typical IFN fingerprint in response to genotoxic stress. Both cell lines failed to display the rise in IFN production observed 6-8 days after treatment in the two IFN-responsive cell lines, consistent with the absence of STAT1 activation (Figure 1). Of interest, we noticed that in contrast to IFN-responsive cell lines, both MDA-MB-231 and T-47D harbored mutated p53 (Table 2). A link

between enrichment of JAK/STAT-regulated genes after genotoxic stress and p53 status has been reported [29]. A combination of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and distamycin A (DMA) was capable to induce IFN/STAT1 pathway in cells with WT p53 while in cells with mutated p53, the induction was virtually absent. However, in both cases, cells were shown to undergo senescence. Our findings that the four cell lines entered into senescence after mafosfamide treatment irrespective of IFN/STAT1 signature and type I IFN expression, suggests that the lack of IFN/STAT1 signature in T-47D and MDA-MB-231 might be due to alterations of cell cycling regulation as produced by p53 mutations [58, 59]. This point needs to be explored.

Interferons are well known to exert multiple, complex and often opposite roles in cellular and non-cellular tumor microenvironment [10]. This study adds a level of complexity by providing the rationale for considering genotoxic-induced activation of the STING/IFN/STAT1 pathway in breast cancer cells as a cell-intrinsic mechanism of escape to treatment. This finding is in agreement with our recent *in vivo* studies showing that the IFN fingerprint is still present in residual PDX tumor cells giving rise to tumor recurrence in the context of immunodeficiency [2]. Therefore, we propose that therapeutic promotion of IFN signaling in the tumor microenvironment should take into account this tumor cell-specific effect, and consider the potential benefit of targeting downstream gene products. PARP12 has already been identified as a candidate, deeper investigation of the other genes of the IFN fingerprint is currently in progress.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, genotoxic treatment and cell harvesting. MCF7 (ATCC, HTB-22), T-47D (ATCC, HTB-133), MDA MB 231 (ATCC, HTB-26), HEK293 (ATCC, CRL-1573) cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium with nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) (Thermo Fisher Scientific) supplemented with fetal bovine serum (FBS) to a final concentration of 10%. HBCx-19 was dissociated with Tumor dissociation kit (human, 130-095-929, Milteny) followed by MACS MicroBead Technology (Milteny) to remove mouse fibroblasts. The primary culture was grown at 37°C and 5% CO₂ in Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with FBS to a final concentration of 10%. Mafosfamide (D-17272, Niomech) was added once in cell culture media at T₀ of each time course experiment. At the end of each experiment, cells were washed in PBS, incubated in trypsin for 5 min/37°C, then collected with complete medium. After centrifugation (500g, 5 min), cells were washed in PBS and kept at -80°C as dry pellet or lysed with in a solution containing 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 50mM HEPES, 1mM NaF anti-phosphatase, 2mM NA₃VO₄ and proteases inhibitors. For senescence assay, cells were stained according to the manufacturer's instructions (ab65351, Abcam).

qRT-PCR. Total RNA extraction was performed with NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. Total RNA (1 µg from each sample) was then reverse transcribed into cDNA with High Capacity

cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems.). Expression of IFN-related genes was analyzed with SYBR Select Master Mix (Life Technologies). qRT-PCR data were invariably normalized to the averaged expression levels of three housekeeping genes: GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), RPL13 (ribosomal protein L13) and HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1).

Western blot. Cell lysates were assayed using Micro BCA Protein Assay kit (iNtRON Biotechnology). Thirty μ g of total proteins were loaded on 4-12% polyacrylamide NuPAGE Novex Bis-Tris gels (Life Technologies) and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in PBS with 0,1% of Tween 20 and 3% BSA (1h, RT), then incubated 2h at RT or overnight at 4°C with the primary antibodies: STAT1 p84/p91 (sc-346, Santa Cruz, 1/1,000), phospho-STAT1 (tyr701) (sc-135648, Santa Cruz, 1/1,000), phospho-STAT1 (ser727) (07-714, Cell signaling, 1/1,000), γ H2AX (DR1017, Millipore, 1/1,000) and actin (A2066-.2ML, Sigma, 1/1,000), STING/TMEM173/D2P2F (13647, Cell Signaling, 1/1,000). The membranes were then washed three times in PBS-Tween and incubated with secondary antibodies (anti-rabbit HRP, 7074 Cell signaling and anti-mouse HRP, NA931 Ge Healthcare). Membranes were revealed with suitable horseradish peroxidase conjugates (Clarity ECL Western Blotting Substrate, Biorad) and quantified by ImageJ software.

Immunofluorescence. Cells were grown on sterile Lab-Tek Chamber Slide system

(Nalge Nune International). Following mafosfamide treatment, cells were washed twice in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde, then washed in PBS. To unmask epitopes, cells were incubated for 10 min in 50 mM NH_4Cl , washed with PBS, then permeabilized in 0.1 % triton X-100 for 10 min at RT and washed 3 times in PBS. The cells were then blocked in PBS with 0.1% Tween 20 and 3% BSA 1h at RT and incubated 2h at RT or overnight at 4°C with the primary antibodies: STING/TMEM173 (MAB7169, R&D Systems 1/200), IRF-3 (HPA004895, Sigma, 1/50), phospho-IRF-3 (ser396) (4947, Cell signaling, 1/50), dsDNA (ab27156, Abcam, 1/100). The cells were then washed three times in PBS-Tween and incubated with fluorescent secondary antibodies (anti-rabbit Alexa Fluor 488, A-11070 Thermo Fisher Scientific and anti-mouse Alexa Fluor 594, Thermo Fisher Scientific) and kept in the dark. Finally, cells were washed in PBS-Tween, nucleus stained by Hoechst 33342 (10 min, RT) and washed again in PBS-Tween, then rapidly washed in distilled water and covered with slides with fluorescent mounting medium.

Transfection of siRNAs. Cells were treated 24h post-seeding or later (as indicated) with 10 μ M mafosfamide or vehicle (water). Using interferin reagent (Polyplus transfection), cells were transfected with the following siRNA (GE Dharmacon): siNonTargeted (ON-TARGETplus SMARTpool D-001810-10-05), siIFNAR1 (ON-TARGETplus SMARTpool L-024333-02-0005), siSTAT1 (ON-TARGETplus SMARTpool L-020209-00-0005), siSTAT1 (ON-TARGETplus SMARTpool L-003543-00-0005). Using cherry-pick RNAi libraries of

Dharmacon, we screened 35 siRNAs (sequences available upon request) in combination with mafosfamide. In brief, cells were seeded in 96-well-plates and treated with 10 μ M mafosfamide 24h later. Three days after treatment, siRNAs were added, then fresh medium was added to the cell three days after siRNAs addition and the plate were analyzed 10 days after mafosfamide treatment using cell viability test (see below).

Conditioned medium production. MCF7 or HBCx-19 cell lines were seeded in 6-well plates. Twenty four hours later they were treated for 6h with 10 μ M mafosfamide or vehicle, than media were removed, cells were washed twice with PBS and fresh culture medium (without drug) was added. After 144 or 192 h (as indicated), these conditioned media (CM^{veh} and CM^{mafo} coming from cells treated with vehicle or mafosfamide, respectively) were collected then added (without dilution) on naïve MCF7, HBCx-19 or HEK293 cells.

Cytokine array. Cytokines expressed by MCF7 cells after mafosfamide (or vehicle) treatment were identified using human cytokine array (panel A from R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Three hundred μ g of total protein lysates were extracted and incubated with the membrane according to the manufacturer's instructions. Horseradish peroxidase substrate (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) was used to detect protein expression. Arrays were scanned using Geldoc apparatus (Biorad) and optical density measurement was obtained with the Image J software.

Luciferase assay. Luciferase assay was performed in 96-well plate using the Dual-Luciferase Reporter Assay System

(Promega) following the manufacturer's instructions. In brief, adherent HEK293 cells were transiently transfected (lipofectamine, Invivogen) with the ISRE (interferon sensitive responder element) luciferase responder plasmid [60] and the Renilla plasmid used for normalization. For experiments involving STAT1 silencing, siSTAT1 or siNT were transiently transfected interferin reagent (Polyplus transfection) 24h before reporter plasmid transfection. Twenty four hours later, cells were stimulated for 24h with CM^{veh} or CM^{mafo}, containing or not AG490 (50 μ M) or DMSO (vehicle). The luminescence activity in cell lysates was measured using a Mithras LB940 (Berthold) and data were analyzed using the MicroWin2000 software.

Cell viability assay. Cell viability assays were performed in 96-well plate using CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay reagent (Promega) following the manufacturer's instructions. To determine the total growth inhibition (TGI) concentration of mafosfamide, optical density was determined at day 0 versus days 3 or 6 (as indicated). The luminescence was measured with a Mithras LB940 (Berthold) and MicroWin2000 software.

Colony assay. After 20, 30, 40 or 50 days of mafosfamide and siRNAs treatment, the cells were washed, fixed with 4% PFA 30 min at RT then washed again with PBS. Next, cells were stained with crystal violet (0.1% crystal violet, 2% ethanol) for 20 min and washed with water. The plate was dried upside-down. Quantification of the area was performed using ImageJ software.

Statistics. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. We used multiple t-test, one-way or two-way ANOVA as indicated in the legends to figures. One, two and three symbols correspond to p value <0.05, <0.01 and <0.001, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Myriam Lassalle, Delphine Nicole, Sophie Banis, Enora LeVen, Marie-Emmanuelle Legrier, Arnaud Beurdeley and Lucila Sackmann Sala, for technical assistance and helpful discussions. The authors also wish to thank Allan Zwart for kindly giving the ISRE luciferase reporter plasmid.

CONFLICT OF INTEREST

A patent application covering the results disclosed in this manuscript is in preparation.

GRANT SUPPORT

This study was funded by Xentech, Inserm and the University Paris Descartes. JG and LC are recipient of a CIFRE fellowship from the Association Nationale de la Recherche et de la technologie (ANRT).

REFERENCES

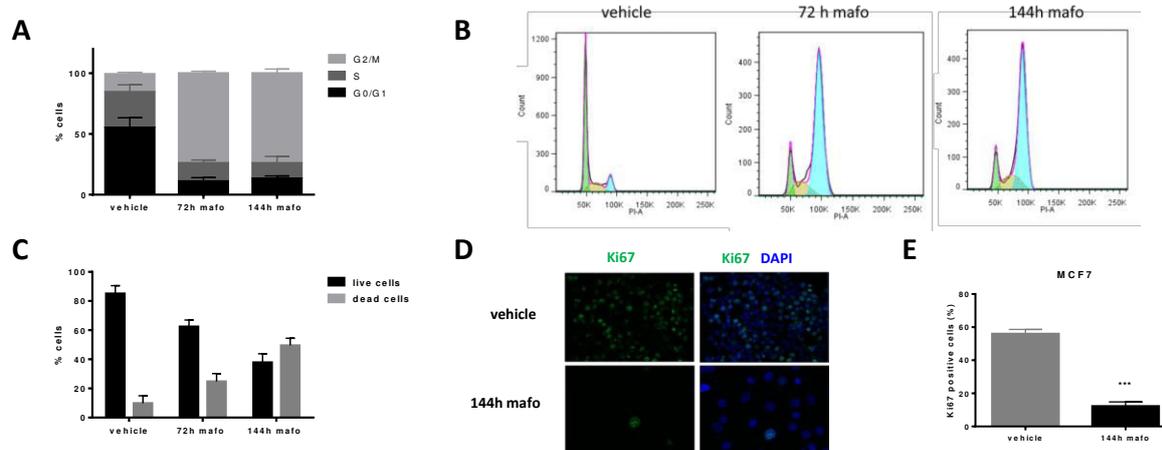
1. Yardley DA. Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes. *Int J Breast Cancer*. 2013; 2013:137414.
2. Legrier ME, Bieche I, Gaston J, Beurdeley A, Yvonnet V, Deas O, Thuleau A, Chateau-Joubert S, Servely JL, Vacher S, Lassalle M, Depil S, G CT, Fontaine JJ, Poupon MF, Roman-Roman S, et al. Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2016; 114(2):177-187.
3. Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz AA, Fraile B, Paniagua R and Royuela M. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2007; 7:158.
4. Le Page C, Genin P, Baines MG and Hiscott J. Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet*. 2000; 2(3):374-386.
5. Woo SR, Corrales L and Gajewski TF. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. *Trends Immunol*. 2015; 36(4):250-256.
6. McCoy JL, Rucker R and Petros JA. Cell-mediated immunity to tumor-associated antigens is a better predictor of survival in early stage breast cancer than stage, grade or lymph node status. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 60(3):227-234.
7. Lee AH, Gillett CE, Ryder K, Fentiman IS, Miles DW and Millis RR. Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology*. 2006; 48(6):692-701.
8. Andre F, Dieci MV, Dubsy P, Sotiriou C, Curigliano G, Denkert C and Loi S. Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(1):28-33.
9. Bindea G, Mlecnik B, Angell HK and Galon J. The immune landscape of human tumors: Implications for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014; 3(1):e27456.
10. Minn AJ. Interferons and the Immunogenic Effects of Cancer Therapy. *Trends Immunol*. 2015; 36(11):725-737.
11. Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remedios C, Fend L, Hannani D, Aymeric L, Ma Y, Niso-Santano M, Kepp O, et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med*. 2014; 20(11):1301-1309.
12. Magbanua MJ, Wolf DM, Yau C, Davis SE, Crothers J, Au A, Haqq CM, Livasy C, Rugo HS, Esserman L, Park JW and 't Veer LJ. Serial expression analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy reveals changes in cell cycle and immune pathways associated with recurrence and response. *Breast Cancer Res*. 2015; 17:73.
13. Khodarev NN, Roizman B and Weichselbaum RR. Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(11):3015-3021.
14. Franci C, Zhou J, Jiang Z, Modrusan Z, Good Z, Jackson E and Kouros-Mehr H. Biomarkers of residual disease, disseminated tumor cells, and metastases in the MMTV-PyMT breast cancer model. *PLoS ONE*. 2013; 8(3):e58183.
15. Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B and Weichselbaum RR. STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(6):1714-1719.
16. Weichselbaum RR, Ishwaran H, Yoon T, Nuyten DS, Baker SW, Khodarev N, Su AW, Shaikh AY, Roach P, Kreike B, Roizman B, Bergh J, Pawitan Y, van de Vijver MJ and Minn AJ. An interferon-

- related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(47):18490-18495.
17. Barker JR, Koestler BJ, Carpenter VK, Burdette DL, Waters CM, Vance RE and Valdivia RH. STING-dependent recognition of cyclic di-AMP mediates type I interferon responses during *Chlamydia trachomatis* infection. *MBio*. 2013; 4(3):e00018-00013.
 18. Sun L, Wu J, Du F, Chen X and Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013; 339(6121):786-791.
 19. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C and Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*. 2013; 339(6121):826-830.
 20. Gentili M, Kowal J, Tkach M, Satoh T, Lahaye X, Conrad C, Boyron M, Lombard B, Durand S, Kroemer G, Loew D, Dalod M, Thery C and Manel N. Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science*. 2015; 349(6253):1232-1236.
 21. Ishikawa H, Ma Z and Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*. 2009; 461(7265):788-792.
 22. Abe T, Harashima A, Xia T, Konno H, Konno K, Morales A, Ahn J, Gutman D and Barber GN. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell*. 2013; 50(1):5-15.
 23. Burdette DL and Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol*. 2013; 14(1):19-26.
 24. Hartlova A, Erttmann SF, Raffi FA, Schmalz AM, Resch U, Anugula S, Lienenklaus S, Nilsson LM, Kroger A, Nilsson JA, Ek T, Weiss S and Gekara NO. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity*. 2015; 42(2):332-343.
 25. Corrales L, Glickman LH, McWhirter SM, Kanne DB, Sivick KE, Katibah GE, Woo SR, Lemmens E, Banda T, Leong JJ, Metchette K, Dubensky TW, Jr. and Gajewski TF. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep*. 2015; 11(7):1018-1030.
 26. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM and Lowe SW. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*. 2002; 109(3):335-346.
 27. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H and Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*. 2000; 19(21):2619-2627.
 28. Kuo LJ and Yang LX. Gamma-H2AX - A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008; 22(3):305-309.
 29. Novakova Z, Hubackova S, Kosar M, Janderova-Rossmeislova L, Dobrovolna J, Vasicova P, Vancurova M, Horejsi Z, Hozak P, Bartek J and Hodny Z. Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence. *Oncogene*. 2010; 29(2):273-284.
 30. Levin D, Harari D and Schreiber G. Stochastic receptor expression determines cell fate upon interferon treatment. *Mol Cell Biol*. 2011; 31(16):3252-3266.
 31. Subramaniam PS, Torres BA and Johnson HM. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine*. 2001; 15(4):175-187.
 32. Bekisz J, Baron S, Balinsky C, Morrow A and Zoon KC. Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010; 3(4):994-1015.

33. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR and Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol.* 2010; 11(11):997-1004.
34. Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T and Taniguchi T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell.* 1988; 54(6):903-913.
35. Sharma S and Fitzgerald KA. Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog.* 2011; 7(4):e1001310.
36. Burkholder B, Huang RY, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv ZQ, Gao CY, Wang BL, Zhang YM and Huang RP. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1845(2):182-201.
37. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD and Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:235-271.
38. Agrawal N, Bettgowda C, Cheong I, Geschwind JF, Drake CG, Hipkiss EL, Tatsumi M, Dang LH, Diaz LA, Jr., Pomper M, Abusedera M, Wahl RL, Kinzler KW, Zhou S, Huso DL and Vogelstein B. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(42):15172-15177.
39. Paludan SR and Bowie AG. Immune sensing of DNA. *Immunity.* 2013; 38(5):870-880.
40. West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, Tal MC, Pineda CM, Lang SM, Bestwick M, Duguay BA, Raimundo N, MacDuff DA, Kaech SM, Smiley JR, Means RE, Iwasaki A and Shadel GS. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature.* 2015; 520(7548):553-557.
41. Malik P, Zuleger N, las Heras JI, Saiz-Ros N, Makarov AA, Lazou V, Meinke P, Waterfall M, Kelly DA and Schirmer EC. NET23/STING promotes chromatin compaction from the nuclear envelope. *PLoS ONE.* 2014; 9(11):e111851.
42. Li T, Diner BA, Chen J and Cristea IM. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(26):10558-10563.
43. Aglipay JA, Lee SW, Okada S, Fujiuchi N, Ohtsuka T, Kwak JC, Wang Y, Johnstone RW, Deng C, Qin J and Ouchi T. A member of the Pysin family, IFI16, is a novel BRCA1-associated protein involved in the p53-mediated apoptosis pathway. *Oncogene.* 2003; 22(55):8931-8938.
44. Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S and Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(8):2969-2974.
45. Efimova EV, Liang H, Pitroda SP, Labay E, Darga TE, Levina V, Lokshin A, Roizman B, Weichselbaum RR and Khodarev NN. Radioresistance of Stat1 over-expressing tumour cells is associated with suppressed apoptotic response to cytotoxic agents and increased IL6-IL8 signalling. *Int J Radiat Biol.* 2009; 85(5):421-431.
46. Vignais ML and Gilman M. Distinct mechanisms of activation of Stat1 and Stat3 by platelet-derived growth factor receptor in a cell-free system. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(5):3727-3735.
47. Jung Y and Lippard SJ. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev.* 2007; 107(5):1387-1407.
48. Moore N, Houghton J and Lyle S. Slow-cycling therapy-resistant cancer cells. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(10):1822-1830.

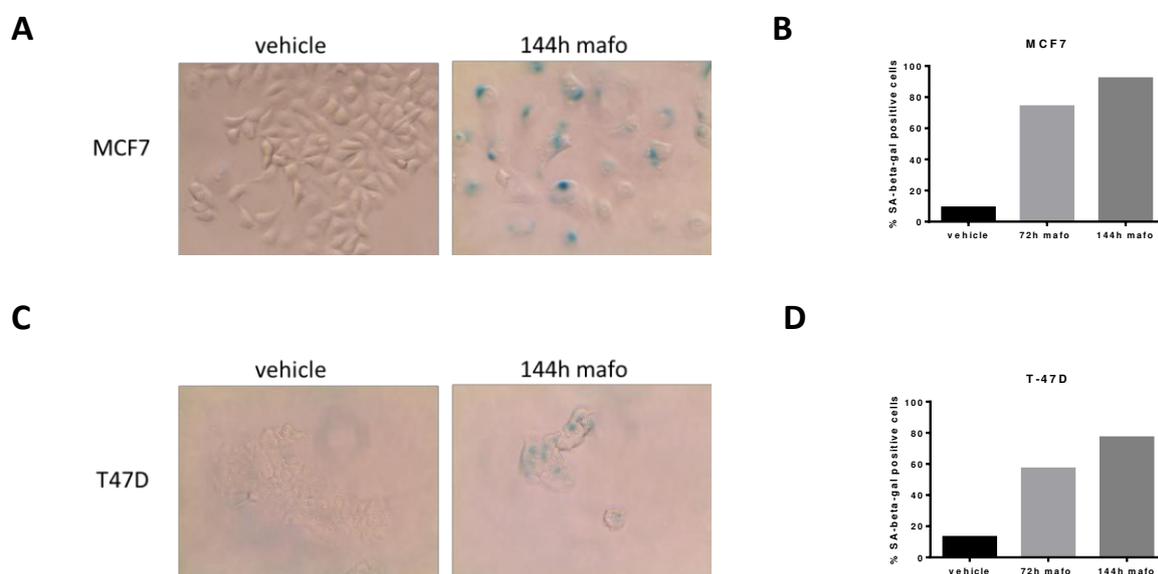
49. Li S, Kennedy M, Payne S, Kennedy K, Seewaldt VL, Pizzo SV and Bachelder RE. Model of tumor dormancy/recurrence after short-term chemotherapy. *PLoS One*. 2014; 9(5):e98021.
50. Fillmore CM and Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(2):R25.
51. Cheon H, Borden EC and Stark GR. Interferons and their stimulated genes in the tumor microenvironment. *Semin Oncol*. 2014; 41(2):156-173.
52. Javle M and Curtin NJ. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer*. 2011; 105(8):1114-1122.
53. Vyas S and Chang P. New PARP targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(7):502-509.
54. Yan Q, Xu R, Zhu L, Cheng X, Wang Z, Manis J and Shipp MA. BAL1 and its partner E3 ligase, BBAP, link Poly(ADP-ribose) activation, ubiquitylation, and double-strand DNA repair independent of ATM, MDC1, and RNF8. *Mol Cell Biol*. 2013; 33(4):845-857.
55. Camicia R, Bachmann SB, Winkler HC, Beer M, Tinguely M, Haralambieva E and Hassa PO. BAL1/ARTD9 represses the anti-proliferative and pro-apoptotic IFN γ -STAT1-IRF1-p53 axis in diffuse large B-cell lymphoma. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 9):1969-1980.
56. Nicolae CM, Aho ER, Choe KN, Constantin D, Hu HJ, Lee D, Myung K and Moldovan GL. A novel role for the mono-ADP-ribosyltransferase PARP14/ARTD8 in promoting homologous recombination and protecting against replication stress. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(6):3143-3153.
57. Bachmann SB, Frommel SC, Camicia R, Winkler HC, Santoro R and Hassa PO. DTX3L and ARTD9 inhibit IRF1 expression and mediate in cooperation with ARTD8 survival and proliferation of metastatic prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 2014; 13:125.
58. Alami N, Paterson J, Belanger S, Juste S, Grieshaber CK and Leyland-Jones B. Comparative analysis of xanafide cytotoxicity in breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2007; 97(1):58-64.
59. Munoz-Fontela C, Macip S, Martinez-Sobrido L, Brown L, Ashour J, Garcia-Sastre A, Lee SW and Aaronson SA. Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. *J Exp Med*. 2008; 205(8):1929-1938.
60. Ning Y, Riggins RB, Mulla JE, Chung H, Zwart A and Clarke R. IFN γ restores breast cancer sensitivity to fulvestrant by regulating STAT1, IFN regulatory factor 1, NF-kappaB, BCL2 family members, and signaling to caspase-dependent apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2010; 9(5):1274-1285.

Supplemental figures



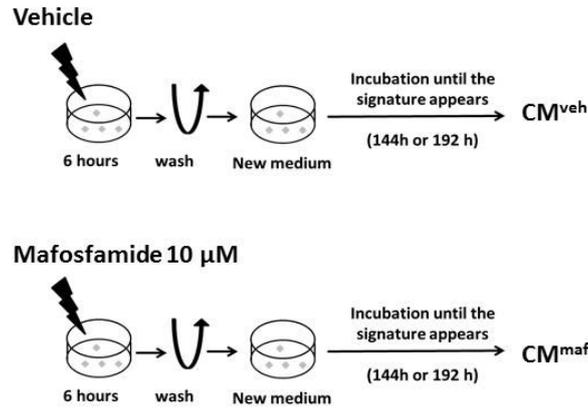
Supplemental Figure 1. Mafosfamidine treatment of MCF7 cells alters cell cycle

As assessed by cell cycle analysis, 10 μ M mafosfamidine treatment blocked cells in G2/M (A,B). The ratio of live versus dead cells was determined by FACS analysis (C). Cell proliferation was determined by Ki-67 staining (D) and quantified as shown in E (n=3, t test).



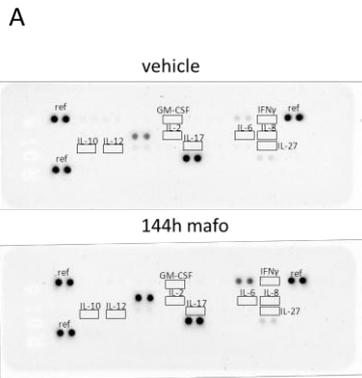
Supplemental Figure 2. Mafosfamidine treatment of breast cancer cells induces senescence

(A,C) The effect of mafosfamidine (versus vehicle) on cell senescence was assessed 6 days after treatment by senescence-associated β -galactosidase staining in MCF7 (IFN-responsive) and T47D (IFN-non responsive) cells. (B,D) The percentage of SA-beta-galactosidase positive cells was quantified from three representative fields of 100 cells each.



Supplemental Figure 3. Generation of conditioned media

Schematic illustration of the experimental setting to generate conditioned media. 1) Mafosfamide or vehicle were added to the cells during 6 hours. 2) The media were aspirated, cells were washed twice and new medium was added. 3) The medium stayed in contact with cells until the ISGs were overexpressed in the treated cells (144h for MCF7/192h for HBCx-19). 4) The conditioned media coming from cells treated with vehicle (CM^{veh}) or mafosfamide (CM^{mafo}) were harvested and used for performing cytokine arrays (Fig S4) or added onto naïve cells for functional studies (see main text).

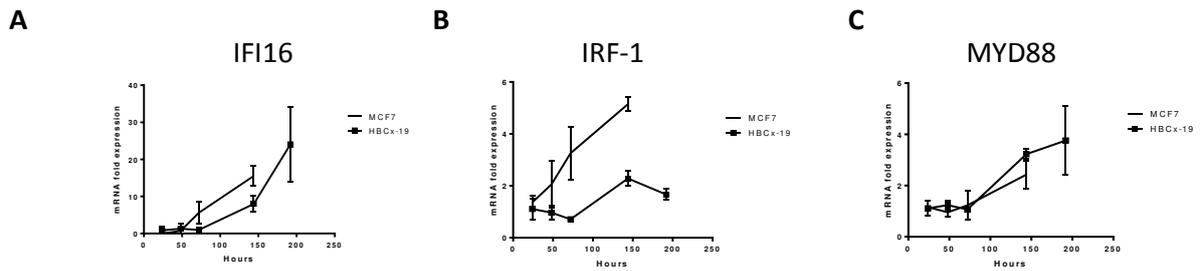


B

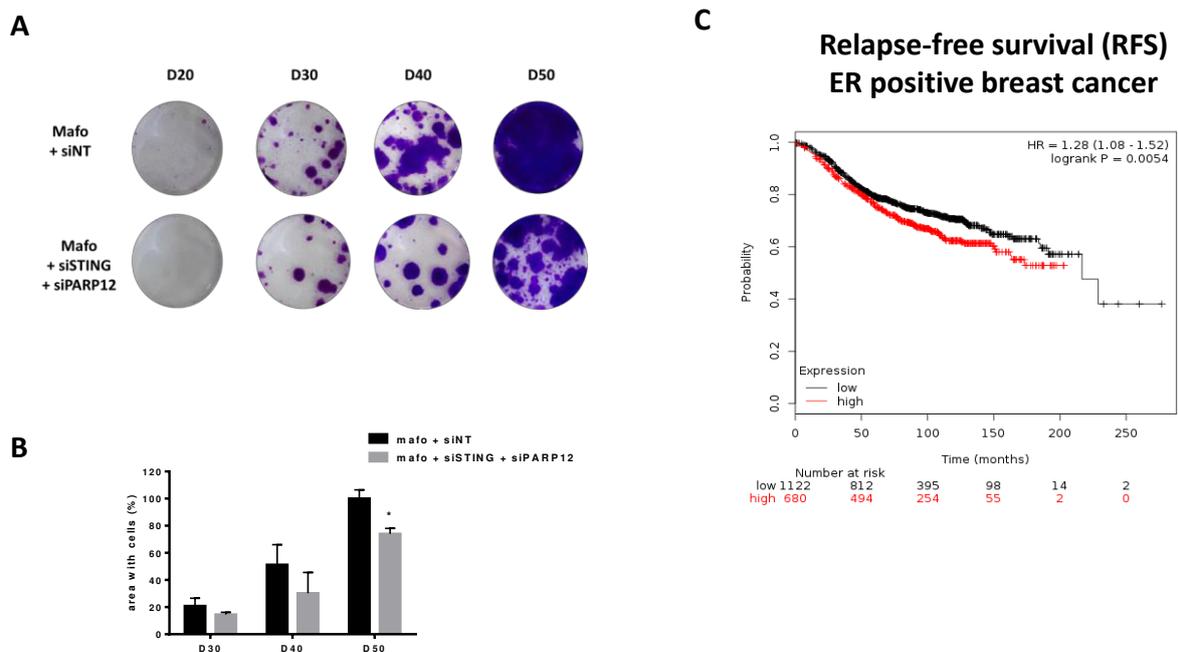
STAT1 activators		others	
name	detection	name	detection
GM-CSF	no	C5a	no
IFN-gamma	no	CD40 Ligand/TNFSF5	no
IL-2	no	G-CSF	no
IL-6	no	CXCL1/GRO alpha	no
IL-8	no	CCL1/I-309	no
IL-10	no	ICAM-1= CD54	upregulation
IL-12 p70	no	IL-1 alpha/IL-1F1	no
IL-17	no	IL-1 beta/IL-1F2	no
IL-27	no	IL-1ra/IL-1F3	upregulation
		IL-4	no
		IL-5	no
		IL-13	no
		IL-16	no
		IL-17E	no
		IL-23	no
		IL-32 alpha	no
		CXCL10/IP-10	no
		CXCL11/I-TAC	no
		CCL2/MCP-1	no
		MIF	upregulation
		CCL3/MIP-1 alpha	no
		CCL4/MIP-1 beta	no
		CCL5/RANTES	no
		CXCL12/SDF-1	no
		Serpin E1/PAI-1	upregulation
		TNF-alpha	no
		TREM-1	no

Supplemental Figure 4. Cytokine array analysis of the genotoxic-induced secretome

(A) The identification of cytokines secreted by MCF7 treated with mafosfamide versus vehicle was performed 144h after treatment using cytokine arrays. (B) The list of cytokine antibodies spotted onto the cytokine array are discriminated as STAT1 activators (left column) versus other cytokines. None of the STAT1 activators were detected in the genotoxic-induced secretome (see rectangles on the array).



Supplemental Figure 5. Mafosfamide treatment induces overexpression of various DNA sensors qRT-PCR showing the upregulation of IFI16 (A), IRF1 (B) and MYD88 (C) over time in MCF7 cells treated with mafosfamide versus vehicle. Results are from three independent experiments.



Supplemental Figure 6. PARP12 and STING silencing

(A,B) The combination of siPARP12 and siSTING (here shown *versus* siINT) was not more potent than each single siRNA to potentiate the effect of mafosfamide as assessed by the quantification of colonies appearing from resistant cells stained using crystal violet (see Figures 5 and 6 for additional details). (B) Kaplan-Meier plot showing that high expression of PARP12 correlates lower relapse-free survival in ER+ breast cancers

DISCUSSION

La résistance à la chimiothérapie, qu'elle soit *de novo* ou acquise, est fréquente dans les tumeurs mammaires. Cependant, il est encore très difficile aujourd'hui de pouvoir prédire la réponse aux traitements. Le risque de résistance *de novo* justifie la recherche de marqueurs de sensibilité, pour mieux adapter les traitements. Actuellement, les essais thérapeutiques cliniques permettent une évaluation statistique des chances de réussite des nouveaux traitements anti-cancéreux en termes de réponse et de prolongation de survie, mais à l'échelle du patient, cette évaluation est aujourd'hui impossible. Seule la découverte et la mise en œuvre de marqueurs personnalisés aux tumeurs individuelles peut permettre d'atteindre cet objectif. Le risque de récurrence justifie de comprendre les mécanismes de résistance impliqués.

Dans la publication de Legrier et al. (2016), nous avons mis en évidence sur des modèles de PDX de cancer du sein, une association entre la sensibilité au traitement et la surexpression de la voie IFN/STAT1. Ces résultats soulèvent la possibilité que cette signature de sensibilité, réduite à 21 gènes représentatifs, puisse être utilisée à l'avenir comme biomarqueur prédictif de la réponse initiale au traitement. Cette hypothèse sera discutée dans la première partie de la discussion à la lumière des différents tests prédictifs et pronostiques décrits dans la littérature et, pour certains, déjà utilisés dans le contexte clinique.

Dans le manuscrit soumis pour publication, nous avons décrypté *in vitro* les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de la signature IFN/STAT1 par le mafosfamide, et avons abordé le rôle fonctionnel des gènes qui la constitue. A la lumière de notre criblage, nous avons suggéré que cette signature IFN/STAT1 favorise la récurrence tumorale. Dans une deuxième partie de la discussion, la méthodologie utilisée et les résultats qui en découlent seront discutés de manière plus approfondie et remis dans le contexte global de la littérature afin de discuter du potentiel en tant que cible thérapeutique des principales cibles identifiées.

Comme cela a été décrit dans la publication de Legrier et al. (2016), l'analyse transcriptomique des PDX traitées par génotoxique a montré que ce traitement induisait en réalité un nombre de gènes dépassant largement les 21 gènes représentatifs évoqués ci-dessus. Cette « signature globale » renferme divers gènes capables d'activer le système immunitaire, comme par exemple des détecteurs d'ADN et d'ARN dont le rôle dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est bien documenté. Dans la troisième et dernière partie de la discussion, nous aborderons donc de manière plus globale le rôle de l'inflammation dans la réponse tumorale à la chimiothérapie, et notamment l'influence des cytokines sur les effets pro- ou anti-tumoraux du système immunitaire.

1. La signature IFN/STAT1 comme biomarqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie dans le cancer du sein

1.1 Les tests actuels : état des lieux

De nombreux traitements anticancéreux existent aujourd'hui. Avec les différentes chimiothérapies, les hormonothérapies et les autres thérapies ciblées, les médecins disposent d'un large panel pour traiter leurs patients. Différents paramètres sont pris en compte pour choisir le type de traitement : la taille de la tumeur, l'atteinte ganglionnaire et métastatique, l'agressivité de la tumeur et les analyses histologiques et immunohistochimiques qui définissent le sous-type selon l'expression des récepteurs aux hormones et de HER2 comme vu en introduction. Cependant, les possibilités étant de plus en plus nombreuses, le choix dans les traitements se complexifie car les paramètres caractérisant la tumeur ne sont pas assez informatifs.

Le problème se pose notamment pour le choix de la thérapie néoadjuvante. Celle-ci est couramment utilisée pour réduire la taille de la tumeur avant la chirurgie afin de conserver au maximum le sein. Plusieurs combinaisons de chimiothérapie néoadjuvante sont reconnues comme traitement de référence en fonction des centres de traitement et du profil des patientes (voir Tableau 1). Concernant le sous-type TNBC, les combinaisons les plus courantes comprennent un mélange d'anthracycline, de fluorouracile et de cyclophosphamide (AC, FEC, FAC) souvent complété par des taxanes administrés séquentiellement. Un bon pronostic de survie est associé à une réponse pathologique complète (pCR) qui se caractérise par une absence de cellules cancéreuses détectables dans le tissu mammaire retiré lors de la chirurgie ou dans les ganglions. Le pourcentage de patientes atteignant la pCR est très variable selon les études et le régime de chimiothérapie utilisé, mais il est généralement compris entre 20 et 40%. De nombreux outils se développent de nos jours pour essayer d'aiguiller les médecins vers la chimiothérapie néoadjuvante la plus efficace et adaptée à un patient donné.

Tableau 1 : Taux de réponse pathologique complète (pCR) selon les différentes combinaisons de chimiothérapie pour les cancers du sein triple négatifs (von Minckwitz and Martin, 2012).

Chemotherapy	TNBC (N)	pCR (%)	pCR definition	Reference
Anthracycline/taxane				
FEC/FAC/AC	14	20% ($P=0.0001$)	pCR in breast and axilla	Liedtke et al. [13]
TFEC/TFAC	35	28% ($P=0.0071$)		
Anthracyclines/taxanes ^a	542	34% TNBC ($P<0.001$) 24% non-TNBC ($P<0.001$)	pCR in breast and axilla	von Minckwitz et al. [6]
Platinum alone				
Cisplatin ^b	28	21%	pCR in breast	Silver et al. [25]
Platinum/taxane				
Paclitaxel/carboplatin ^c	12	67% versus 12% (ER+/HR-) ($P=0.002$)	pCR in breast and axilla	Sikov et al. [9]
Paclitaxel/carboplatin ^d	24	33%	pCR in breast plus axilla	Chen et al. [45]
Docetaxel/carboplatin ^e	13	77%	pCR in breast	Kern et al. [46]
Docetaxel/carboplatin ^f	9	44%	pCR in breast and axilla	Roy et al. [47]
Docetaxel/carboplatin ^g	11	55%	pCR in breast	Chang et al. [48]

TNBC, triple-negative breast cancer; pCR, pathological complete response; FEC, fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide; FAC, fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide; AC, doxorubicin, cyclophosphamide; TFEC, weekly/once every 3 weeks paclitaxel/docetaxel followed by fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide; TFAC, weekly/once every 3 weeks paclitaxel/docetaxel followed by fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide; ER, oestrogen receptor; HR, hormone receptor; AUC, area under curve.

^aMultivariable analysis of treatment characteristics.

^bFour treatments of cisplatin at 75 mg/m² every 21 days were administered, 95% CI 9% to 43%.

^cCarboplatin AUC 6 q4w and paclitaxel 80 mg/m² weekly for 16 weeks.

^dSingle-arm study: weekly paclitaxel 80 mg/m² plus carboplatin AUC 2 weekly.

^eDocetaxel 75 mg/m² plus carboplatin AUC 6 q3w × 6 cycles, ongoing single-arm study.

^fDocetaxel 75 mg/m² plus carboplatin AUC 3 q2w + G-CSF × 4 cycles, single-arm study.

^gDocetaxel 75 mg/m² plus carboplatin AUC 6 q3w × 4 cycles, single-arm study.

Une autre problématique concerne les traitements adjuvants. Une hormonothérapie combinée et/ou une chimiothérapie sont indiquées selon les résultats obtenus lors de l'examen de la pièce chirurgicale. Le risque présent est de traiter à l'excès avec des chimiothérapies adjuvantes des patientes à bon pronostic, ou qu'à l'inverse, des patientes à mauvais pronostic ne reçoivent pas de traitement adjuvant (Albain et al., 2009). Toutes les femmes ne possédant pas les mêmes risques de rechute, de nombreux tests sont développés afin d'aider les médecins dans leur prise de décision sur la prise en charge adaptée à ces patientes.

De nombreux tests pronostiques et/ou prédictifs sont déjà aujourd'hui sur le marché, et ont pour but de faciliter la prise de décision thérapeutique en fonction du profil de la tumeur de chaque patient (médecine personnalisée). Pour rappel ces deux types de tests ne donnent pas la même information :

- **Les marqueurs pronostiques** : ils permettent de prévoir l'évolution clinique c'est-à-dire le devenir du patient indépendamment du traitement en évaluant le risque de rechute. Si le risque est faible, généralement une chimiothérapie n'est pas indiquée.
- **Les marqueurs prédictifs** : ils prédisent la réponse à un traitement donné et permettent d'aider les médecins à choisir un traitement adapté aux caractéristiques du patient. Ces tests reposent sur l'identification de marqueurs connus pour influencer la réponse à un traitement donné.

Nous présentons ci-dessous une liste non exhaustive des tests parmi les plus connus disponibles actuellement sur le marché (voir récapitulatif dans le tableau 2) :

- Le test **PAM50** est un des plus connus. Basé sur une analyse par « microarray » et par qRT-PCR de 50 gènes, il classe les tumeurs en quatre sous-types moléculaires : les lumineales A et

B, les HER2+ et les « basal-like ». Il établit un score permettant de prédire le risque de récurrence chez les patientes sans atteinte ganglionnaire et n'ayant pas eu de traitement systémique en adjuvant avant l'analyse. Ce test peut être réalisé à partir de tissu fixé.

- **uPA/PAI-1** : PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) est l'inhibiteur de uPA (urokinase). Ce sont des enzymes protéolytiques qui possèdent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dans la régulation de l'expression des protéines d'adhésions qui servent à fixer la tumeur à la matrice extracellulaire ou lors de la migration des cellules. Ces protéines sont mesurées à partir de prélèvements de fragments de tissus frais de 50 mg rapidement congelés, lysés, puis les protéines sont dosées par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Ce test évalue à la fois la réponse à la chimiothérapie adjuvante et l'évolution clinique du patient.
- **Oncotype DX™** : ce test calcule un score de récurrence (RS) à partir de l'analyse par qRT-PCR du niveau d'expression de 21 gènes dont 16 gènes cibles qui participent principalement à la prolifération cellulaire et à l'expression de HER2, ER, un détecteur d'ARN ou de protéines ribosomales. Ce test permet d'évaluer le risque d'apparition de métastases sur une durée de 10 ans chez des patientes sans atteinte ganglionnaire, exprimant les récepteurs aux œstrogènes, traités au tamoxifène (Paik et al., 2004). Ce test permet aussi de prédire la réponse au docetaxel en néoadjuvant (Chang et al., 2008) ainsi que pour les patientes sous tamoxifène, la réponse à la chimiothérapie adjuvante cyclophosphamide, fluoro-uracile et méthotrexate (CMF) (Sparano and Paik, 2008).
- **MammaPrint®** : ce test évalue l'expression de 70 gènes sur une puce ADN à partir de tissus congelés. Il permet de calculer le risque de développer des métastases sur une durée de 5 ans. Peu de données sont disponibles pour conclure sur la valeur prédictive de ce test.
- Le test **IHC4** se base sur une analyse semi-quantitative de ER, PR, HER2 et Ki-67 calculée à partir de tissus fixés en formaline et intégrés dans de la paraffine (FFPE). Ce test repose sur un algorithme qui tient compte de la quantification globale et non individuelle de chaque paramètre de manière à calculer un score de récurrence. Il permet de prévoir l'avenir du patient avant ou après une chimiothérapie néoadjuvante (Chatterjee et al., 2015). Cependant, ce résultat est peu fiable car il manque une normalisation par rapport à une protéine de référence.
- Le test « **Genomic grade index** » est basé sur un "microarray". La mesure de l'expression de 97 gènes permet d'évaluer le grade moléculaire de la tumeur. Il permet donc de reclasser des profils ER intermédiaires dans des profils de forts ou de faibles grades moléculaires et de les associer à des pronostics différents (Naoi et al., 2011; Sotiriou et al., 2006). De plus, ce test permet de prédire la sensibilité à la combinaison paclitaxel/FAC (Liedtke et al., 2009).
- Le test « **Breast cancer index** » est basé sur une RT-PCR faite à partir de tissu FFPE. Elle permet de prédire les risques de récurrence à distance dans les cancers du sein ER+ sans nodule dans les ganglions lymphatiques dans les 5 ans ou plus. Il peut notamment aider le médecin à continuer le traitement adjuvant plus longtemps que d'ordinaire. Ce test est basé sur 2

signatures : le ratio HOXB13/IL17BR et la quantification de 5 gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ce test est supposé meilleur que l'IHC4 et Oncotype DX (Sgroi et al., 2013).

- Le test **Endopredict** permet de classer les patients ayant une tumeur ER+ entre fort et faible risque de récurrence si la tumeur est traitée seulement avec une thérapie endocrinienne adjuvante. Il est basé sur l'analyse par RT-PCR de 11 gènes dont 3 gènes de ménage.
- Enfin, et bien qu'il existe encore de nombreux autres tests, le kit **Prosigna** utilise la technologie Nanostring pour quantifier l'expression des ARNm de 50 gènes dont des gènes de référence, des contrôles positifs et négatifs et des gènes utilisés dans la classification moléculaire PAM50 qui aide à classer les différents sous-types de cancer du sein. Ce test permet d'évaluer le risque de récurrence mais ne permet pas de définir le sous-type de cancer. De plus, il a récemment été démontré que ce test a aussi la capacité de prédire la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante pour les tumeurs HR+/HER2- (Prat et al., 2016).

Tableau 2 : Récapitulatif de tests prédictifs ou pronostiques les plus connus.

Tests	Echantillons	Prélèvements	Type d'analyse	Nombre de gènes	Indications	Prédictif	Pronostique
PAM50	FFPE	avant traitement ou chirurgie	microarray et qRT-PCR	50	tout type de cancer du sein	nd.	oui
UPA/PAI-1	tissus frais congelés	chirurgie	ELISA	2	tout type de cancer du sein	réponse à CMF en adj	risque rechute à 10 ans
Oncotype DX	FFPE	avant traitement ou chirurgie	qRT-PCR	21	ER+	réponse à chimio adj/ docetaxel néoadj	risque métastases sur 10 ans
Mamma print	tissus frais congelés	avant traitement ou chirurgie	puce ADN	70	tout type de cancer du sein	nd.	risque métastases 5 ans
IHC4	FFPE	avant traitement ou chirurgie	IHC	4	tout type de cancer du sein	nd.	oui
Genomic grade index	cytoponction	avant traitement	microarray	97	ER+	nd.	oui
Breast cancer index	FFPE	avant traitement ou chirurgie	RT-PCR	7	ER+	réponse au tamoxifène	risque récurrence à distance
Endopredict	cytoponction	avant traitement ou chirurgie	RT-PCR	11	ER+	nd.	oui
Prosigna	cytoponction	avant traitement ou chirurgie	Nanostring (ARNm)	50	tout type de cancer du sein	réponse à NAC pour tumeur HR+/HER2-	oui

Chimio : chimiothérapie ; adj : adjuvante ; néoadj : néoadjuvant ; nd : non défini ; TN : tumeur triple négative. HR+ : expression des récepteurs aux hormones ; FFPE : de tissus fixés en formaline et intégrés dans de la paraffine ; NAC : chimiothérapie néoadjuvante ; CMF : cyclophosphamide, fluoro-uracile et méthotrexate ; chirurgie : au moment de la chirurgie ; IHC : Immunohistochimie.

Ces tests sont encore peu utilisés car leur utilité clinique réelle reste controversée à cause du manque d'études montrant leur spécificité. Pour permettre de mieux les évaluer, les membres d'un comité américain appelé « American Society of Clinical Oncology Tumor Markers Guidelines Committee », ont mis en place dès 1996 des niveaux de preuve appelé LOE (« Levels of Evidence ») qui sont utilisés en clinique pour évaluer l'utilité réelle d'un biomarqueur. Les niveaux vont de 1 à 5 : le niveau 1 étant un niveau de preuve fort où les données accumulées sur le test sont robustes ; le niveau de preuve 5 est le niveau le plus bas (les données obtenues ne sont pas significatives ou trop peu nombreuses) (Hayes et al., 1996). En 2009, une mise à jour de la classification a été proposée pour améliorer l'évaluation de la fiabilité des tests (Simon et al., 2009). Ces niveaux de preuve permettent de classer les marqueurs testés dans des études cliniques prospectives mais aussi rétrospectives en étudiant différents critères : le type d'étude clinique ; les données du patient ; la collecte, l'analyse et l'archivage des échantillons ; les statistiques possibles associées ; et enfin la nécessité que l'étude soit validée par une autre étude clinique. Selon ces critères, les études cliniques sont alors distinguées en quatre catégories :

- **A : prospectives** : étude clinique créée pour l'évaluation de biomarqueurs spécifiques dont elle possède toutes les informations concernant les patients, les échantillons traités en temps réel; la conception de l'étude est adaptée aux analyses statistiques nécessaires et la validation par d'autres études cliniques n'est pas nécessaire car cette étude-ci est faite de façon à être significative ;
- **B : rétrospectives-prospectives** : l'étude n'est pas désignée pour l'étude de biomarqueurs mais peut être facilement adaptée sauf au point de vue statistique ;
- **C : observations prospectives** : les échantillons sont collectés mais analysés seulement à la fin de l'étude, le résultat est donc plutôt dû au hasard car de nombreux biais sont présents : manque d'information sur la collecte des échantillons, manque de contrôle adapté;
- **D : observations rétrospectives** : la plupart des échantillons sont collectés pour des raisons non connues, les résultats qui en résultent sont souvent plutôt dus au hasard.

Par exemple, le niveau LOE 1 et une étude prospective (A) est la condition d'évaluation idéale car l'étude est créée pour évaluer un test donné. Cependant, il n'est pas toujours évident de réaliser des études prospectives de ce type car le coût est trop élevé, les échantillons peuvent être difficilement récupérables ou des problèmes éthiques peuvent bloquer la réalisation du test.

Se servant de cette classification, l'INCa (Institut national du Cancer) a évalué trois tests :

- **uPA/PAI-1** : ce test est le seul qui ait un niveau de preuve élevé (LOE 1A) pour évaluer les risques de rechute à 10 ans pour les patients de type sans atteinte ganglionnaire (valeur pronostique) ainsi que de prédire la réponse à une chimiothérapie à base de CMF (Janicke et al., 2001).
- **Oncotype DX™** : ce test calcule le risque d'apparition de métastases sur une durée de 10 ans avec un niveau de preuve intermédiaire (LOE 2B) (Paik et al., 2004). Ce test permet aussi de

prédire avec un niveau de preuve intermédiaire (LOE 2B) la réponse à la chimiothérapie adjuvante CMF. Cependant, en plus d'un niveau de preuve intermédiaire, les informations apportées par ce test sont redondantes avec celles amenées par les outils plus usuels. En effet, le RS semble concorder avec l'index mitotique, les récepteurs aux hormones et le Ki-67. De plus, même si les échantillons sont tous analysés sur une plateforme unique aux Etats-Unis, la répétabilité lors de la collecte des échantillons, la qualité de la fixation, la conservation et le transport sont autant de critères qui influencent sur la qualité de l'ARN.

- **MammaPrint®** : la valeur pronostique de ce test possède un niveau de preuve très bas (LOE 3C) sur le risque de développer des métastases sur une durée de 5 ans. De plus, de même que pour Oncotype DX, ce test est redondant avec les informations collectées par les outils classiques. En effet, sa valeur est corrélée à l'âge, au grade histologique et au diamètre de la tumeur (van 't Veer et al., 2002). Même si des méthodes ont été mises en place pour valider la qualité de l'échantillon, le taux minimal de cellules tumorales et le délai de congélation sont des facteurs limitant induisant des variabilités dans les échantillons (Mook et al., 2009).

Parmi ces trois tests, seul uPA/PAI-1 atteint un niveau de preuve élevé (LOE 1A). Utilisant des marqueurs témoignant de capacité d'invasion par les cellules, c'est le seul test capable d'apporter des informations complémentaires à celles déjà données par les outils classiques de caractérisation de la tumeur par l'anatomo-pathologiste. Cependant, l'INCa ne préconise pas son utilisation à cause du manque d'études permettant de le valider en tant qu'outil fiable.

1.2 Intérêt potentiel d'un test basé sur la signature IFN

Malgré les difficultés évidentes que les développeurs de ces tests rencontrent pour prouver leur fiabilité, il apparaît important de continuer les recherches pour trouver de nouveaux biomarqueurs capables de mieux définir les chances de survie ainsi que de prédire les réponses aux traitements.

De nombreuses équipes travaillent notamment sur des marqueurs qui pourraient prédire la sensibilité à la chimiothérapie néoadjuvante (récapitulé dans le tableau 3). Par exemple, l'équipe de Pietenpol a effectué une étude sur 19 patients. La biopsie était prélevée avant le traitement pour évaluer l'expression de deux gènes : DEFA (« α -defensin », peptides cytotoxiques impliqué dans les mécanismes de phagocytose) et MAP2 (« microtubule-associated protein 2 ») par immunohistochimie et par spectrométrie de masse. Leurs données suggèrent que la surexpression de ces deux gènes est associée avec la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante à base de taxane (Bauer et al., 2010). L'équipe de Pusztai, a mis en place une liste de 30 gènes pour prédire une pCR à la combinaison paclitaxel, fluorouracile, adrimaycine, cyclophosphamide (T/FAC) (Hess et al., 2006). L'équipe de de Thé, s'est penchée sur les mutations de p53 et a associé ce profil et un traitement avec de forte dose d'épirubicin et de cyclophosphamide a une pCR. Le résultat serait encore plus efficace dans le sous-type basal des cancers du sein (Bertheau et al., 2007).

Tableau 3 : Récapitulatif des travaux de recherche visant à trouver des marqueurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante.

Référence	prédit pCR aux	nb de gènes	précision	Détails de l'étude		
				nb de patients	biopsie	analyse
Pietenpol (Bauer et al., 2010)	taxanes	2	surexpression de DEFA et MAP2	19	avant traitement	IHC et protéomique
Noguchi (Tanei et al., 2009)	paclitaxel/ adriamycine	ALDH	ALDH surexpression associé à mauvais pCR	108	avant et après traitement	IHC
de Thé 2007 (Bertheau et al., 2007)	Forte dose epirubicine/ cyclophosphamide	1	TP53 muté	80	avant traitement	ARN
Pusztai (Hess et al., 2006)	T/FAC	30	cytoponction	133	avant traitement	puce ADN
Chang (Cleator et al., 2006)	adriamycine/ cyclophosphamide	253 voies de signalisation exprimées différemment		40	avant traitement	ARN

Les biopsies étant réalisées avant traitement, chaque équipe de chercheurs essaye de définir un marqueur ou un ensemble de marqueurs associé à la réponse à une chimiothérapie donnée. Comme nous venons de l'observer, à chaque combinaison de traitements correspond un biomarqueur ou plusieurs biomarqueurs. Effectuer pour chaque patient chacun de ces tests afin de définir la chimiothérapie néoadjuvante la plus efficace représenterait une investigation considérable et un coût non négligeable. De plus, certains de ces tests ne font pas la différence entre les différents sous-types de cancer du sein. Or certains sous-types semblent plus sensibles que d'autres à la chimiothérapie. Par exemple, les tumeurs « basal-like » et HER2+ sont plus sensibles à la combinaison paclitaxel/adriamycine que les tumeurs luminales (Rouzier et al., 2005).

Comme nous l'avons vu dans la première partie des résultats (Legrier et al., 2016), les PDX de cancers du sein triple-négatifs traités par l'adriamycine/cyclophosphamide voient l'expression de gènes régulés par la voie IFN/STAT1 augmenter quelques jours seulement après l'administration de la chimiothérapie uniquement dans les tumeurs qui vont bien répondre au traitement. De plus, la surexpression de cette voie a aussi été validée dans d'autres PDX de sous-type HER2+ sensible à l'irinotecan (Legrier et al., 2016, figure Supplémentaire 3). L'expression de cette signature dans les cellules tumorales exposées à la chimiothérapie est probablement le reflet d'un stress génomique dû aux lésions induites par les agents génotoxiques et semble associé à une réponse tumorale à la chimiothérapie quelque-soit le type de traitement (taxanes, anthracycline, agent alkylant). Contrairement aux signatures prédictives obtenues à partir d'échantillons tumoraux prélevés avant traitement, cette signature IFN/STAT1 induite rapidement par le traitement pourrait mieux refléter la chimio-sensibilité réelle de la tumeur et s'avérer supérieure pour prédire l'efficacité d'un traitement. En effet, l'intérêt majeur des tests prédictifs est de permettre une décision rapide quant au choix du

traitement le plus adapté à un patient donné, alors qu'il est généralement nécessaire d'attendre plusieurs mois avant de pouvoir vérifier l'efficacité d'un traitement en fonction de l'évolution macroscopique de la tumeur (régression de son volume). Comparer aux autres tests prédictifs, notre test aurait donc l'avantage d'être utilisé quelque-soit le type de traitement administré (taxanes, anthracyclines, agent alkylants) et quelque-soit le type de tumeur du sein quelque jours seulement après traitement, permettant ainsi aux médecins de pouvoir changer de traitement rapidement si besoin.

Pour développer un test prédictif basé sur la signature IFN, de nombreuses étapes seront nécessaires. Dans cette optique, nous devons d'abord démontrer que les observations faites sur les PDX ont une pertinence sur les tumeurs des patients. Une des difficultés repose sur la disponibilité des échantillons. Il est en effet nécessaire d'obtenir pour chaque patient un échantillon clinique avant traitement et un deuxième après quelques jours de traitements (3 à 6 jours) pour les comparer. L'équipe de Vant' Veer a eu l'opportunité de récupérer ce type d'échantillons. Leurs analyses ont permis de mettre en évidence la surexpression de 35 voies de signalisation dont des voies impliquées dans la stimulation du système immunitaire, dont très probablement la voie IFN (Magbanua et al., 2015). Approfondir ces résultats en étudiant plus précisément nos 21 gènes serait un moyen d'évaluer la validité de nos résultats trouvés sur PDX.

Cependant, de tels échantillons sont difficiles à obtenir. En effet, la plupart des échantillons disponibles ont été prélevés soit avant traitement au moment du diagnostic, soit après traitement néoadjuvant au moment de la chirurgie. La voie IFN/STAT1 pourrait aussi être surexprimée à long terme après chimiothérapie comme nous l'avons constaté dans les nodules de nos PDX. Il conviendrait alors de corréliser l'évolution de la taille de la tumeur entre le début du traitement et la chirurgie à l'expression de la voie IFN/STAT1 : si la tumeur a diminué ou s'est stabilisée, la signature des 21 gènes devrait être surexprimée par rapport à l'échantillon prélevé avant traitement ; si la tumeur continue de pousser, la signature ne devrait pas être exprimée.

Quoi qu'il en soit, afin de valider notre signature sur des échantillons cliniques, diverses collaborations ont été établies avec des équipes de cliniciens (oncologues, anatomo-pathologistes) afin d'avoir accès à des échantillons tumoraux rétrospectifs. Nous nous focaliserons d'abord sur les tumeurs triple négatives, puisque la majorité des observations faites sur les PDX l'ont été sur ce sous-type tumoral.

Dans un premier temps, nous allons étudier l'ensemble de la signature de 21 gènes identifiée dans le travail précédent (Legrier et al., 2016). Sur la base de cette analyse préliminaire, l'objectif sera de sélectionner les plus représentatifs de l'ensemble des échantillons testés et/ou les plus pertinents dans la situation réelle, à savoir identifier ceux dont l'expression est augmentée sous chimiothérapie de la façon la plus large (amplitude) et représentative (proportion d'échantillons). L'objectif ultime est de réduire le nombre de cibles à celles qui auront la meilleure valeur prédictive.

Après cette sélection des gènes, il conviendra de choisir une méthode robuste et adaptée afin que notre test soit le plus fiable possible dans un contexte de routine. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées et toutes possèdent des avantages et des inconvénients. L'IHC détermine de façon semi-quantitative le niveau d'expression des protéines cibles. Son grand intérêt est de pouvoir identifier le

compartiment cellulaire porteur de la signature IFN. Comme nous l'avons vu, une telle signature IFN peut être portée tant par le compartiment tumoral qu'immunitaire, et nous ne mesurons pas encore l'interférence qui pourrait exister entre ces deux compartiments au plan de la détection de la signature globale dans la tumeur, tout compartiment confondu (par qRT-PCR d'ARNm extrait d'une pièce tumorale). Pour valider une approche IHC, il est nécessaire de valider les anticorps utilisés, d'optimiser les protocoles, de discriminer les cellules tumorales des lymphocytes infiltrants, et de définir un score permettant de discriminer les tumeurs sensibles des tumeurs résistantes au traitement. Pour augmenter la rapidité des expériences, les tissus seront ensuite déposés sur des TMA (tissu macro-array). Pour compléter l'étude protéomique, une analyse quantitative des ARN sera réalisée par la technologie Nanostring. Cette technique possède plusieurs avantages comparés à la RT-PCR et à la qRT-PCR. Tout d'abord, elle ne demande que peu de matériel et peut-être réalisée à partir de tissus FFPE (ou de cellules vivantes dont l'ADN ou l'ARN est extrait). De plus, cette technologie est fidèle à la réalité biologique puisqu'aucune amplification n'est nécessaire à l'analyse contrairement à la PCR (amplification exponentielle) et aux puces ADN (amplification linéaire). Néanmoins, comme discuté plus haut, une quantification par Nanostring donnera une image globale de l'expression dans le tissu, et non par compartiment cellulaire. Une étape de microdissection laser, comme décrit dans notre travail sur les PDX (Legrier et al., 2016), et/ou une analyse comparative d'échantillons analysés par cette technique et en parallèle par IHC, permettra de mesurer le biais possible introduit par une éventuelle signature IFN dans le compartiment immunitaire.

Enfin, si le test est validé selon ces approches, il sera nécessaire d'établir des collaborations pour mener une étude clinique prospective dédiée et prouver l'utilité clinique du test.

Un autre biomarqueur pourrait être l'utilisation de la phosphorylation de l'histone H2AX qui est un détecteur des dommages de l'ADN. La mesure des foci après traitement (irradiation ou chimiothérapie) permet de vérifier si la chimiothérapie a bien agi sur la tumeur. Comme démontré dans la publication de Legrier (2016), la surexpression de γ H2AX est associée à celle de la voie IFN/STAT1. Il faut cependant être vigilant sur le fait que, selon le type cellulaire, le bruit de fond, c'est-à-dire les foci formés lors du cycle cellulaire classique d'une cellule, peut être différent. En effet, des cellules tumorales ont un bruit de fond plus élevé que des cellules saines du même tissu (Banath et al., 2004). De plus, dans le travail de Legrier (2026), γ H2AX est aussi détectable dans les tumeurs résistantes au traitement. Cette cible semble donc moins attrayante que la signature IFN.

La corrélation entre la surexpression de la voie IFN/STAT1 et la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie a été trouvée dans les tumeurs triple négatives mais aussi dans les tumeurs HER2+. Cette corrélation reste à être retrouvée dans les tumeurs ER+. Il y a peu de PDX ER+ dans le panel de modèles disponibles et ceux-ci sont donc peu représentatifs de ce sous-type de cancer. La capacité à surexprimer la signature a été étudiée sur différents modèles *in vitro* (Gaston et al, soumis). Sous mafosfamide, la voie IFN/STAT1 peut aussi être surexprimée dans des tumeurs ER+ *in vitro*. La validation de cette observation *in vivo* reste à faire, et des expériences sont en cours à XenTech dans cette perspective.

2. Vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter la récurrence du cancer du sein

Au-delà de l'aspect « biomarqueur » traité ci-avant, notre travail de recherche a aussi permis d'avancer vers une meilleure compréhension du rôle de la voie IFN/STAT1, et plus particulièrement de ses gènes cibles, dans la réponse des tumeurs mammaires aux traitements génotoxiques. Dans cette seconde partie de la discussion, après un bref rappel sur les principaux mécanismes de résistance, nous aborderons les résultats du criblage fonctionnel des ISG présenté dans le manuscrit soumis (Gaston et al), données que nous compléterons par quelques résultats complémentaires ne figurant pas dans le manuscrit soumis.

2.1 Les mécanismes de résistance

Il existe deux types de résistance à la chimiothérapie. La résistance primaire (innée) est caractérisée par l'absence de réponse au traitement *de novo*. Ce phénomène touche 10% des patients ayant une tumeur primaire mammaire, 50% des patients métastatiques (Gonzalez-Angulo et al., 2007). La résistance peut aussi s'acquérir au cours du traitement : après une première phase de régression, la tumeur devient ensuite résistante au traitement. Les tumeurs étant hétérogènes, un traitement peut n'être efficace que sur une partie des clones composant la tumeur ; c'est une sélection clonale. Les clones résistants peuvent être déjà présents et mélangés à d'autres cellules sensibles au traitement qui seront éliminées au profit des cellules résistantes. Mais la résistance peut aussi s'acquérir pour survivre au traitement : c'est une résistance adaptative ou secondaire. Différents mécanismes responsables de la résistance ont été étudiés. Dans les paragraphes suivants, nous évoquons brièvement les mieux décrits d'entre eux, en comparant chaque fois que c'est possible les signatures moléculaires reliées à ces mécanismes avec celle observée dans nos modèles de PDX.

Un des mécanismes les plus connus repose sur l'altération des voies d'entrée ou de sortie de la cellule des molécules thérapeutiques. Pour entrer dans la cellule, la molécule utilise des protéines membranaires, soit de type récepteur, soit de type transporteur. Un des mécanismes de résistance mis en place par certaines cellules consiste à diminuer l'expression de ces récepteurs ou transporteurs impliqués, ou à engendrer des mutations altérant leurs activités. Par exemple, le méthotrexate est un analogue structural des acides foliques, en se fixant sur l'enzyme déhydrofolate reductase, il inhibe le métabolisme des folates dans la cellule. Pour arriver dans la cellule, le méthotrexate utilise un transporteur de folate. Cependant, il a été démontré que l'un des mécanismes de résistance au méthotrexate était dû à une perte ou une diminution de l'activité de ce transporteur (Trippett et al., 1992). L'augmentation de l'expression de transporteurs contribuant à accélérer la sortie de la molécule est un autre mécanisme de résistance: le transporteur P-glycoprotéine (MDR1 gene product) permet l'évacuation des molécules hydrophobes comme l'adriamycine ou le taxol ; MRP1 (multidrug resistance associated protein 1) permet le transport des molécules chargées négativement ou modifiées par ajout de glutathion ; et MXR (mitoxantrone resistance protein) amène les inhibiteurs de topoisomérase I et les anthracyclines en dehors de la cellule. Dans le même ordre d'idée, l'altération du métabolisme de l'agent thérapeutique est également décrite comme un mécanisme de résistance. Ce processus implique notamment la

mutation ou la sous-expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme de la molécule. Celle-ci peut aussi être inactivée par l'ajout de glutathion, ce qui est un des mécanismes plausibles mis en place pour résister au cyclophosphamide (Gamcsik et al., 1999). Cet aspect n'a pas été étudié dans ce travail mais mériterait d'être plus approfondie.

Un autre mécanisme de résistance très connu est la réparation de l'ADN. En effet, la plupart des thérapies anti-cancéreuses ainsi que la radiothérapie induisent la mort des cellules en générant des cassures double brin de l'ADN. L'inhibition des mécanismes de réparation utilisée en combinaison avec ces traitements permettrait d'améliorer la réponse d'après les premiers essais cliniques (revue dans (Kelley et al., 2014)). Cette stratégie peut aussi être efficace en monothérapie sur les cancers possédant un défaut de réparations des dommages de l'ADN. C'est par exemple le cas des inhibiteurs de PARP, impliqués dans la réparation par excision de bases qui améliorent la réponse au traitement dans les cellules déficientes en BRCA1/2 comme vu en introduction paragraphe 3.6.3. Dans la signature IFN/STAT1 identifiées dans les nodules, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont surexprimées comme PARP14, dont l'inhibition semble améliorer la réponse au mafosfamide comme nous le verrons plus bas. De plus, d'après la figure 4 de Legrier et al. en 2016, dans les modèles répondeurs *in vivo* 80 à 90% des cellules expriment γ H2AX qui marque l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN (voir introduction 3.6.1). Malgré le fait que l'apoptose soit enclenchée (caspase 3 clivée), de nombreux mécanismes de réparations de l'ADN semblent être mis en place dans les cellules.

Les cellules tumorales peuvent aussi contourner les effets des traitements en amplifiant des voies oncogéniques alternatives ou des voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules, comme par exemple l'inhibition des gènes pro-apoptotiques et l'amplification de l'expression des gènes anti-apoptotiques. La voie de signalisation STAT1, qui nous intéresse plus particulièrement, est surexprimée dans de nombreux cancers résistants à la radiothérapie. Ainsi, l'équipe de Khodarev a été la première à montrer que la protéine STAT1 était surexprimée dans des clones de cellules tumorales « tête et cou » résistant au traitement (Efimova et al., 2009). Ensuite, ces observations se sont étendues à d'autres types de cancers comme le myélome (Fryknas et al., 2007), le cancer de la prostate, du sein et du colon (Khodarev et al., 2007). Associé à la résistance, l'équipe de Khodarev a défini une liste de gènes appelés IRDS (voir introduction paragraphe 4.2.2), dont certains sont communs avec notre signature IFN/STAT1 de 21 gènes : BST2, IFI44, IFITM1, STAT1, MX1, IFIT1, DDX60 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 60) et OAS1 (voir table 1 de de Gaston et al, soumis). Cependant, en analysant la signature de Khodarev avec notre signature au sens large (Legrier et al., 2016 table supplémentaire 1), d'autres protéines communes s'ajoutent comme OAS3, CXCL10, MX1, LAMP3 et IFIH1 (voir tableau 4 ci-après). Notre signature possède donc de nombreux éléments en commun avec la signature de résistance définie par Khodarev (Khodarev et al., 2004).

De plus, il a été trouvé une corrélation positive entre l'augmentation de la voie IFN chez l'Homme dans les cellules résiduelles récupérées lors de la chirurgie après une chimiothérapie néoadjuvante et le risque de récurrence et le développement de métastases. Notamment, la surexpression des gènes IFIT1, IFIT2, IFITM1 et IFIH1, présents dans la signature au sens large obtenue grâce au transcriptome (Legrier et al., 2016 table supplémentaire 1), sont associés à un fort de risque de récurrence (Magbanua et al., 2015).

La résistance aux traitements médiée par la voie STAT1 pourrait être liée aux états de phosphorylation de la sérine 727 ou de la tyrosine 701. Cependant, *in vivo*, l'action du ruxolitinib, inhibiteur de JAK1 et JAK2, ne permet pas de diminuer le risque de récurrence (figure 5E, Legrier et al. 2016). De plus, il semblerait que la forme non phosphorylée de STAT1 soit responsable de l'expression de gènes dont certains font partis des IRDS (Cheon and Stark, 2009) comme récapitulé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Comparaison de la signature obtenue par (Legrier et al., 2016) avec celle de (Khodarev et al., 2004) et de (Cheon and Stark, 2009).

	Gènes de la signature Legrier	Gènes IRDS, Khodarev	Gènes U-STAT1, Cheon
21 gènes de la signature	BST2	X	X
	IFI44	X	X
	IFITM1	X	X
	STAT1	X	X
	MX1	X	X
	IFIT1	X	X
	DDX60	X	
	OAS1	X	X
	OAS2		X
	PARP12		
	PARP9		
	SAMD9L		
	STAT2		
	UBE2L3		
	IFI44L		X
	IFI6		
	IFIT3		X
	IRF9		
	LAMP3		
	ZNFX1		
	CLDN1		
autres gènes de la signature globale	OAS3	X	X
	CXCL10	X	
	MX1	X	X
	LAMP3	X	
	IFIH1	X	X
	IFIT2		X

Ainsi, STAT1 non phosphorylé paraît jouer un rôle important dans la survie des cellules tumorales soumises à un traitement génotoxique. Afin d'évaluer son rôle dans la résistance *de novo*, nous avons transformé des MDA-MB-231, résistantes à l'adriamycine/cyclophosphamide (A/C) *in vivo*, avec un shRNA (short-hairpin RNA) inducible sous doxycycline dirigé contre STAT1. Après avoir injecté les cellules transformées dans la souris, nous avons vérifié que sous doxycycline, le shRNA diminuait bien l'expression de STAT1. Puis nous avons combiné l'A/C avec la doxycycline et évalué la réponse comparée à l'A/C seul, illustré dans la figure 27. Il semble que dans le modèle MDA-MB-231 non répondeur à l'A/C, STAT1 ne joue pas de rôle important dans la résistance car son inhibition ne permet pas de rendre cette tumeur sensible au traitement.

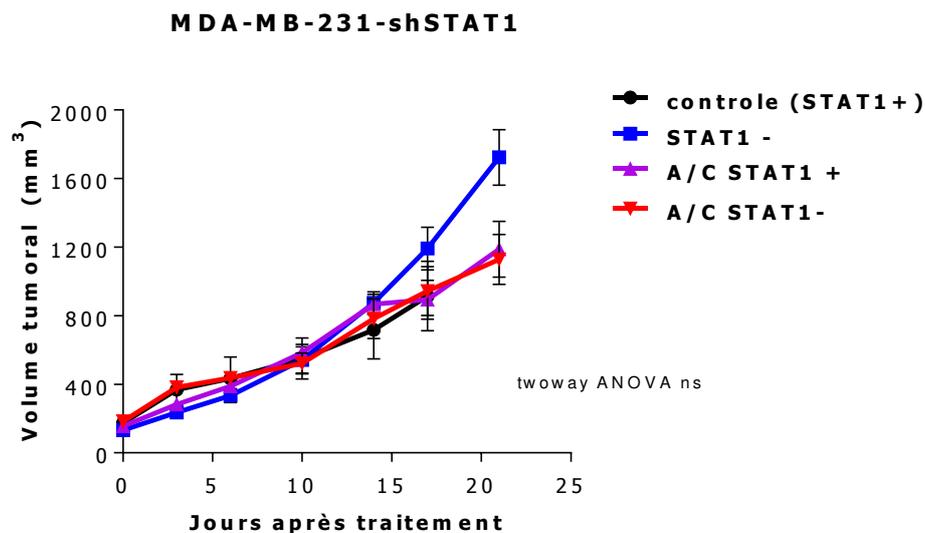


Figure 27 : Réponse à l'adriamycine/cyclophosphamide (A/C, 2/100 mg/kg) *in vivo* (résultat non publié). Moyenne \pm écart-type, n=10 par groupe. Contrôle : groupe non traité ; STAT1- : groupe traité avec de la doxycycline (2 mg/ml dans l'eau de boisson) pour inhiber l'expression de STAT1; A/C STAT1+ : groupe traité à l'A/C seul ; A/C STAT1- : groupe traité à l'A/C et à la doxycycline (2 mg/ml dans l'eau de boisson) pour inhiber l'expression de STAT1.

Nous nous sommes alors penchés sur le rôle de STAT1 dans un modèle qui induit l'expression de la voie IFN/STAT1 sous traitement (comme les cellules MCF7). Cependant, lors de notre criblage *in vitro* de la signature IFN/STAT1 (figure 6A de Gaston et al, soumis), l'inhibition de l'expression de STAT1 en binôme avec STAT2, combinée au mafosfamide n'a pas permis de mettre en évidence une diminution de la viabilité cellulaire comparée à celle du mafosfamide combiné à un siRNA non ciblé. De plus, d'autres expériences préliminaires ne nous ont pas permis de conclure quant à l'importance de STAT1 dans la résistance acquise dans nos conditions expérimentales. Ce résultat est surprenant car, comme vu dans la figure 6 de Gaston et al. soumis, l'inhibition d'un bon nombre de gènes dont l'expression est induite par STAT1 semble indiquer leur rôle dans la résistance. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par le fait que STAT1 induit à la fois des gènes impliqués dans la résistance et d'autres dans la sensibilité, donnant au final un effet moyen peu significatif.

L'origine de ces cellules résistantes peut s'expliquer par plusieurs phénomènes, l'existence des cellules souches cancéreuses possédant des propriétés « initiatrices de tumeur » en est une. L'existence des cellules souches dans le cancer du sein a été mise en évidence dans les cancers *in situ* et invasifs. De plus, leur activité est corrélée à un facteur de mauvais pronostic (Al Hajj et al.,

2003). Comme vu en introduction (paragraphe 3.5.4), l'activité de l'ALDH est plus importante dans les cellules souches. Or l'ALDH métabolise l'aldophosphoramide, un intermédiaire du métabolisme du cyclophosphamide (voir figure 5 en introduction au paragraphe 3.3.1) en carboxyphosphamide, molécule inactive. Ce mécanisme est décrit comme un mécanisme majeur dans la résistance au cyclophosphamide. De plus, il semble que les MCF7 possèdent quelques (<1%) cellules positives à l'ALDH (Charafe-Jauffret et al., 2009). Lors des expériences de clonogénicité (figure 5D dans Gaston et al, soumis), 200 000 cellules sontensemencées et traitées avec 10 μ M de mafosfamide. Au bout de 20 à 30 jours, environ 20 à 30 clones apparaissent par puits ce qui correspond à un pourcentage d'environ 0,01% qui pourrait coïncider avec les données publiées. Cependant, la même expérience a été menée avec les T47D qui ne possèdent pas d'activité ALDH décrite et nous avons obtenu dans les mêmes conditions expérimentales environ 50 clones. Ces expériences suggèrent donc que l'activité de l'ALDH n'est peut-être pas le mécanisme de résistance majoritairement impliqué dans ces conditions. Afin de clarifier ce point, il serait intéressant d'évaluer de plus près l'importance de l'ALDH dans les MCF7 dans nos conditions expérimentales.

Dans le cadre d'un travail mené à XenTech portant sur l'étude des biomarqueurs des cellules résiduelles présentes dans les nodules après chimiothérapie, un enrichissement en SSEA4 a été mis en évidence dans de nombreuses PDX de cancer du sein (voir introduction paragraphe 3.5.4). D'autres marqueurs de cellules souches, comme CD44 ou CD133, ont aussi été analysés mais leur enrichissement n'était pas systématique et variait selon le modèle de PDX étudié (Aloia et al., 2015). Lors d'une étude préliminaire réalisée au cours de mon travail de thèse, un enrichissement en SSEA4 a été observé par cytométrie en flux dans les cellules MCF7 six jours après traitement *in vitro* au mafosfamide. De manière intéressante, la protéine STAT1 est décrite comme faisant partie des mécanismes de résistance mis en place par les cellules souches mammaires. En effet, la surexpression de STAT1 dans des cellules cancéreuses mammaires cultivées en mammosphères a permis aux cellules souches cancéreuses de résister aux radiations (Zhan et al., 2011). Les cellules souches cancéreuses sont décrites comme étant résistantes au traitement pour différentes raisons : une forte capacité à réparer l'ADN, une augmentation de l'expression des gènes anti-apoptotiques, une augmentation des transporteurs larguant les molécules thérapeutique, ou un état quiescent qui est difficile à cibler par les chimiothérapies qui touchent préférentiellement les cellules en division. Il n'est donc pas impossible que la résistance observée dans nos expériences (figures 5 et 6 de Gaston et al, soumis) soit liée à l'acquisition de certaines propriétés souches ; ce point n'a pas été exploré au cours de notre travail et méritera sans doute de l'être par la suite.

La sénescence apparaît être aussi un mécanisme de résistance à la chimiothérapie. Ce phénomène est pourtant important pour induire la mort des cellules. En effet, il a été démontré que, suite à une chimiothérapie néoadjuvante, 42% des tumeurs mammaires réséquées lors de la chirurgie expriment la β -galactosidase, marqueur de sénescence (voir introduction paragraphe 3.6.3), contre seulement 10% des tumeurs non traitées (te Poele et al., 2002). Certaines stratégies thérapeutiques visent même à augmenter l'entrée en sénescence des cellules pour améliorer les réponses aux traitements en jouant sur une stabilisation de p53, une augmentation de p21 ou sur les mécanismes du cycle cellulaire (Lin et al., 2010). Cependant, des données émergent sur un mécanisme réversible de la sénescence : les cellules en sénescence contourneraient le blocage du cycle cellulaire par la perte d'expression de p53, de p21 ou par l'augmentation du complexe Cdc2/Cdk1 (Roberson et al., 2005). De plus, la sénescence s'accompagne d'une induction de nombreux facteurs sécrétés appelés

« Senescent Associated Secretary Phenotype » (SASP), et ce phénotype a été impliqué dans la résistance à la chimiothérapie dans le cancer du sein (Farmer et al., 2009).

Comparé à l'ensemble des gènes exprimés dans le SASP tels que définis par l'équipe de Campisi (Coppe et al., 2010), seule l'IL-8 apparaît être commune au transcriptome des cellules résiduelles des PDX (table S1 de Legrier et al., 2016). Ceci laisse donc penser qu'il n'y aurait pas de sénescence massive (détectable par le biais de marqueurs moléculaires) dans les nodules, et que ce phénomène ne serait donc pas impliqué de manière prépondérante dans notre modèle de résistance. Cependant, *in vitro*, après 6 jours de traitement des différentes lignées tumorales mammaires au mafosfamide, nous avons observé que la plupart des cellules étaient en sénescence d'après le pourcentage de cellules positives au test β -galactosidase (figure S2 de Gaston et al., soumis). Il serait intéressant de regarder *in vivo*, en amont de la phase nodule, si des cellules sénescents sont présentes. Si tel était le cas, cela pourrait suggérer que le système immunitaire résiduel des souris nude suffit à phagocyter les cellules sénescents et qu'elles ne sont donc pas responsables de la résistance.

Le microenvironnement *in vivo* mais aussi le microenvironnement moléculaire *in vitro*, définit par l'ensemble des ligands sécrétés dans le milieu, peut aussi pousser les cellules cancéreuses à entrer en phase de quiescence, de cycle cellulaire très lent ou de dormance. Pour définir cet état de dormance, une signature de gènes a récemment été établie (Chery et al., 2014). En comparant cette signature avec le transcriptome des cellules résiduelles (Legrier et al, table S1), quelques gènes concordent comme N4BP1, qui inhibe les régulateurs de mort et ainsi participerait à la progression tumorale (Oberst et al., 2007) ; un régulateur des stérols de la famille des SREBP (sterol regulator element-binding protein) qui sont impliqués dans la métabolisation du glucose par les cellules tumorales (Li et al., 2012) ; et un récepteur à domaine discoïdin (DDR), récepteurs de différents types de collagènes qui favorisent l'adhésion aux cellules voisines (Yeh et al., 2011). L'adhésion des cellules dormantes pour résister au traitement est un mécanisme connu : en s'ancrant à la matrice extracellulaire, les cellules dégradent les protéines pro-apoptotiques ou les redistribuent dans la cellule de manière à ce qu'elles ne s'activent pas (Hazlehurst et al., 2003).

Le microenvironnement peut également engendrer des pressions induisant des mutations génétiques permettant à la cellule de résister au traitement et de proliférer de nouveau. Dans ce cas, les clones résistants ont un IC50 (concentration de la molécule causant 50% d'inhibition de la viabilité) plus élevé que la lignée parentale. Cependant, si la pression est rapidement relâchée (c'est-à-dire le traitement stoppé), les cellules ne font alors que passer en phase de quiescence ou de cycle cellulaire très lent sans pour autant engendrer de mutations génétiques importantes (Moore et al., 2012). Dans le cas de l'étude *in vivo*, l'effet de l'A/C n'est que transitoire : le niveau d'expression des gènes diminue lors de la phase de repousse pour redescendre à niveau de base avant traitement (Legrier et al., 2016 figure 1). Ces résultats suggèrent que la surexpression de la voie IFN/STAT1 n'est que transitoire et n'est pas devenue comme le suggère Khodarev (Khodarev et al., 2004), une signature dont l'expression constitutive est indispensable à la croissance des cellules survivantes. *In vitro*, des résultats similaires ont été observés. En effet, une étude préliminaire a permis d'évaluer l'IC50 de clones, apparus environ 30 jours après l'addition de mafosfamide (10 μ M), et de les comparer à celui des MCF7 parentales: aucune différence n'a été constatée. Ceci suggère que la pression de sélection n'a pas été suffisamment importante pour engendrer des mutations modifiant la sensibilité de la cellule à la chimiothérapie : la résistance au traitement n'est que transitoire.

Dans ce travail, la détection des dommages de l'ADN a été évaluée par la mesure de γ H2AX. D'après la figure 4 de Legrier et al. en 2016, *in vivo*, 80 à 90% des cellules sont marquées au γ H2AX dans les PDX sensibles à la chimiothérapie alors que seulement 40% des cellules sont marquées dans les PDX résistants *de novo*. La chimiothérapie induit donc moins de cassures de l'ADN dans les modèles résistants. Ceci pourrait par exemple s'expliquer par les mécanismes de résistances vu précédemment (gestion des flux d'entrée et de sortie de la cellule, métabolisme, cellules souches) mais aucune donnée aujourd'hui ne nous permet de conclure.

De même, dans notre contexte expérimental de résistance acquise, les mécanismes de résistance qui rentrent en jeu sont encore loin d'être élucidés. Cependant, les résultats suggèrent que la senescence et la quiescence des cellules ne semblent pas être les mécanismes mis en place car leurs signatures de gènes semblent avoir peu de similitudes avec la signature IFN/STAT1. Un mécanisme constant, qui pourrait aussi jouer un rôle dans la résistance, est la surexpression de la voie IFN/STAT1. L'étude de son rôle dans la résistance acquise pourrait permettre la découverte de nouveaux mécanismes potentiellement applicables à la résistance *de novo*.

2.2 Criblage fonctionnel de la signature IFN/STAT1

In vitro, le mafosfamide induit la sécrétion de ligands dont les IFN qui induisent la voie STAT1 comme vu dans Gaston et al., soumis. Le criblage de siRNA que nous avons mis en œuvre (figure 6 de Gaston et al, soumis) a permis de mettre en évidence plusieurs cibles potentiellement intéressantes pour différer la récurrence, au premier rang desquelles figure PARP12. De manière à valider les conclusions de ce test, nous avons volontairement inclus dans notre banque certains siRNA dirigés contre des cibles déjà connues pour leur rôle dans la résistance à la chimiothérapie. C'est par exemple le cas de Chk1 et de Chk2, dont les inhibiteurs sont aujourd'hui en essai clinique et peuvent être utilisés en monothérapie ou en combinaison avec une chimiothérapie (Bryant et al., 2014; Smith et al., 2010). Le résultat de l'inhibition de Chk1 et de Chk2, dont le résultat n'est pas inclus dans notre manuscrit soumis, est exposé ci-dessous.

Comme nous l'avons vu en introduction, Chk1 et Chk2 sont des points de contrôle importants pour l'initiation des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN et pour le contrôle du cycle cellulaire. Ces protéines agissant très en amont dans la signalisation des cassures de l'ADN, leur inhibition permet d'empêcher l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN et ainsi d'accumuler des cassures de l'ADN et de déclencher la mort des cellules. En appliquant la même approche expérimentale que celle mise en place pour le criblage des gènes de la signature IFN/STAT1 (Gaston et al, soumis), l'inhibition de Chk1 et/ou de Chk2 combinée au mafosfamide a pour effet de diminuer la viabilité cellulaire comparativement à la condition contrôle (mafosfamide associé à un siRNA non ciblé, siNT). Ce résultat a donc permis de valider notre modèle expérimental puisqu'il confirme les données de la littérature. Cette donnée est encourageante dans la perspective que certaines des nouvelles cibles identifiées dans ce travail expérimental puissent un jour être confirmées comme apportant un réel bénéfice thérapeutique.

Chk1 étant plutôt impliqué dans les mécanismes de réparation des cassures simple brin d'ADN et Chk2 dans ceux des cassures double brin, leurs effets combinés sur la viabilité sont plus importants que pris séparément (figure 28). Sachant que dans la voie IFN, il est souvent nécessaire d'inhiber deux ISG pour voir un effet sur l'inhibition virale, nous avons décidé de réaliser le screening sur des combinaisons de deux siRNA dans le but de potentialiser les effets (Zhang et al., 2007).

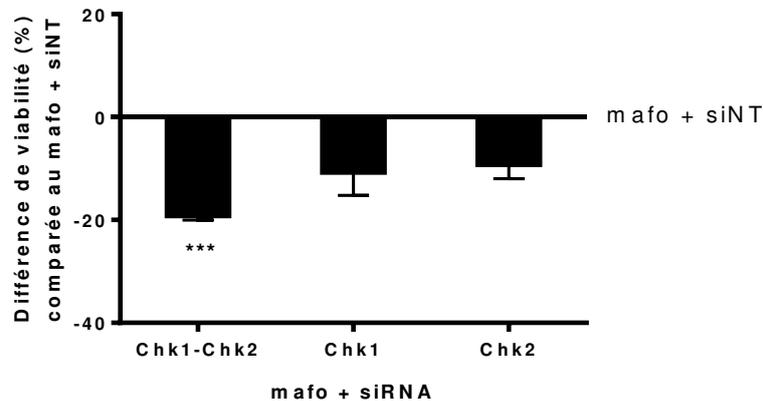


Figure 28 : L'inhibition combinée de Chk1 et/ou Chk2 potentialise l'effet du mafosfamide. Effet du mafosfamide combiné à siChk1+ siChk2, ou à siChk1 ou siChk2 seul et comparé au mafosfamide combiné à du siNT (siRNA non ciblé) sur des MCF7. La viabilité est mesurée par luminescence « cellTiter-Glo » 10 jours après l'ajout du mafosfamide (voir Gaston et al, soumis, pour détails de protocole). Moyenne \pm écart type.

2.2.1 Etude de PARP12

Les ADP-ribosylations sont des modifications post-traductionnelles importantes car elles induisent un changement de fonction des protéines. PARP1 et PARP2 sont les membres les plus connus de cette famille et leurs inhibiteurs sont, comme décrit en introduction, utilisés pour traiter les cancers du sein BRCA mutés. PARP1, PARP2, PARP4, PARP5a et PARP5b sont caractérisés par leur capacité à ajouter plusieurs riboses à une protéine cible. La capacité des PARP à ajouter plusieurs riboses à une protéine cible est liée à la présence du résidu glutamate en position 988 (Rolli et al., 1997). Leur nom, « poly-(ADP-ribose) transférase », correspond donc bien à leur fonction. Cependant, certains PARP (PARP3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16) sont limités au transfert d'un seul groupe ribose sur une protéine cible. Le nom de PARP ne convenant plus, une nouvelle nomenclature a vu le jour. Ils sont aujourd'hui appelés par le terme ARTD pour « ADP-ribosyl transférase diphteria-toxin-like » (Tableau 5). Par ailleurs, PARP9 et PARP13 ne possèdent aucune activité de ribosylation connue. Parmi les PARP certains sont induits par les IFN comme PARP7, 9, 10, 12, 13, 14 et 15.

Tableau 5 : Nomenclature des PARP, activités enzymatiques et rôles connus dans le cancer (Vyas and Chang, 2014)

PARP	Alternative names	Demonstrated activity*	Predicted activity	ADP-ribose-binding domains	Cancer-related functions	Cancers to target
PARP1	PARP and ARTD1	PAR ¹⁰	PAR	ND	DNA repair ¹⁴ , ERK and NF- κ B signalling ¹¹⁸ and heat shock response ¹¹⁹	Those that are homologous recombination-deficient and those with increased ERK and NF- κ B signalling
PARP2	ARTD2	PAR ¹²⁰	PAR	ND	DNA repair ¹²⁰	Those that are homologous recombination-deficient
PARP3	ARTD3	MAR ¹²¹	PAR	ND	DNA repair ¹²²	ND
PARP4	VPARP and ARTD4	MAR ⁶¹	PAR	ND	ND	ND
PARP5A	TNKS1 and ARTD5	PAR ¹²³	PAR	ND	Telomere maintenance ¹²⁴ , WNT signalling ¹²⁵ , proteasome regulation ¹²⁶ , stress granule assembly ¹⁷ and cell division ¹²⁷	Solid tumours with increased WNT signalling that are telomerase-dependent and stress granule-positive
PARP5B	TNKS2 and ARTD6	PAR ¹²⁸	PAR	ND	Telomere maintenance ¹²⁸ and WNT signalling ¹²⁵	Those with increased WNT signalling and that are telomerase-dependent
PARP6	ARTD17	ND	MAR ¹	ND	Negative regulator of proliferation ⁶² and potential tumour-suppressive functions	Unknown
PARP7	TIPARP and ARTD14	MAR ⁶⁴	MAR	WWE domain	ND	ND
PARP8	ARTD16	ND	MAR ¹	ND	ND	ND
PARP9	BAL1 and ARTD9	No automodification activity ¹¹³	Inactive ³	Two macro domains	Cell migration ⁶⁹	Metastatic cancers
PARP10	ARTD10	MAR ¹	MAR	ND	Inhibits MYC ⁶⁸ and NF- κ B ¹⁷ signalling and is pro-apoptotic ⁶¹	Might have potential tumour-suppressive functions; therefore, increasing its expression in tumours might be useful
PARP11	ARTD11	ND	MAR ¹	WWE domain	ND	ND
PARP12	ARTD12	MAR ¹⁷	MAR	WWE domain	Stress granule assembly ¹⁷	Solid tumours that are stress granule-positive
PARP13	ZAP, ZC3HAV1 and ARTD13	No automodification activity ³	Inactive ³	WWE domain	Stress granule assembly ¹⁷ and miRNA-RISC regulation ^{17,56}	Solid tumours that are stress granule-positive
PARP14	BAL2 and ARTD8	MAR ¹	MAR	Three macro domains and a WWE domain	B cell survival ¹⁰¹ , cell migration ¹² and stress granule assembly ¹⁷	Haematopoietic malignancies and metastatic cancers
PARP15	BAL3 and ARTD7	MAR ¹⁷	MAR	Macro domain	Stress granule assembly ¹⁷	Solid tumours that are stress granule-positive
PARP16	ARTD15	MAR ^{51,70}	MAR	ND	UPR ⁵¹	UPR-dependent tumours

PAR : Poly(ADP-ribose) transferase ; MAR : mono(ADP-ribose) transferase ; RISC : RNA-induced silencing complex ; TNKS : tankyrases, UPR : unfolded protein, WWE : Trp-Trp-Glu ; ZAP : Zinc finger antiviral protein ; ZC3HAV1 : Zinc finger CCCH type antiviral protein 1 ; ND : non déterminé ;

Peu de publications décrivent PARP12. Cette protéine est composée d'une structure en doigt de zinc, d'un domaine appelé WWE permettant l'interaction avec d'autres protéines, et d'un domaine catalytique PARP qui lui permet d'ajouter un groupe ribose à la protéine cible (figure 29). PARP12 a été décrit par une unique publication comme ayant deux isoformes possibles. PARP12s (acide aminé 1 à 484, soit environ 54 kDa), forme tronquée ne possédant pas de domaine catalytique, serait impliquée dans l'inhibition de la réplication virale lors d'une infection. PARP12L (acide aminé 1 à 711, soit environ 79 kDa), en plus de sa capacité de mono-riboseylation, possède un rôle dans l'inhibition de la traduction en se liant aux complexes ribosomiaux et contribue donc aussi à un effet antiviral (Atasheva et al., 2014).

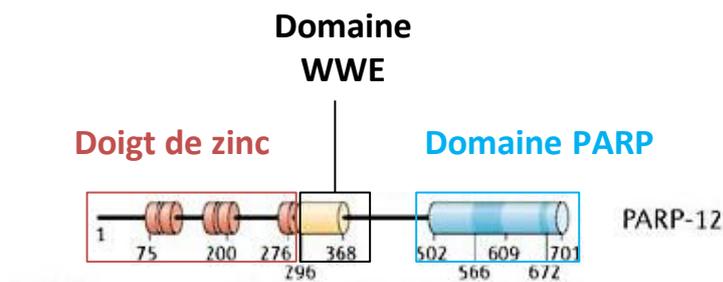


Figure 29 : Structure de la protéine PARP12. PARP12 est composé d'un domaine en doigt de zinc, d'un domaine WWE et d'un domaine PARP permettant le transfert d'un groupe ribose à une protéine cible. Adapté de (Schreiber et al., 2006).

Lors de l'induction d'un stress, des granules de stress se forment : ce sont des corps cytoplasmiques où se concentrent des ARNm. Ces granules de stress dégradent les ARNm impliqués dans la signalisation de mort cellulaire, et conservent les ARNm impliqués dans la survie cellulaire. Une fois le stress éliminé, les ARNm protégés sont traduits et permettent à la cellule de survivre au traitement (Fournier et al., 2010). Sous stress oxydatif, il a été démontré que la protéine PARP12 colocalise avec des marqueurs de granules de stress laissant supposer que son rôle de régulateur de la traduction se fait au niveau de ces granules de stress (Atasheva et al., 2014). Ce mécanisme est donc potentiellement un des mécanismes de survie mis en place par les cellules tumorales pour résister au mafosfamide dans notre contexte.

Cette même équipe a étudié la localisation de PARP12 suite à l'ajout d'IFN β ou de lipopolysaccharides. Dans ce cas, et surtout si PARP12 est tronquée de sa partie en doigt de zinc (ce qui ne correspond pas à une mutation observée jusqu'ici dans les cellules), PARP12 est localisée dans des structures appelées « aggresome-like induced structures », lieu de concentration de protéines mal repliées qui seront ensuite éliminées par la cellule (Atasheva et al., 2014). Dans ces structures, PARP12 interagit avec des protéines capables d'activer la voie NF κ B et d'induire la sécrétion d'IL-8, aussi appelée CXCL8 (Welsby et al., 2014).

Par chimiotactisme, IL-8 attire les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles, les macrophages, les cellules dendritiques, les NK et les lymphocytes B et T. Elle se fixe sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 exprimés par plusieurs types de cellules dont les leucocytes, les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses. L'analyse transcriptomique de tissus sain et de tissus possédant des cellules cancéreuses a montré la surexpression d'IL-8 (Green et al., 1997). Cette cytokine semble donc être impliquée dans le développement du cancer. De plus, la surexpression d'IL-8 a été observée dans différents types de cancer comme les carcinomes « tête et cou », et a également été associée à la résistance (Efimova et al., 2009). Enfin, la forte expression d'IL-8 dans le sérum des patients a été corrélée avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein (Yokoe et al., 1997).

Une forte expression d'IL-8 est aussi accompagnée d'une augmentation de l'expression de son récepteur CXCR1, couplé à une protéine G, qui, une fois activée induit la prolifération cellulaire. CXCR1 étant surexprimé dans les cellules souches cancéreuses, la prolifération de ces dernières est d'autant plus induite par IL-8 (Charafe-Jauffret et al., 2009) La forte expression d'IL-8 a par ailleurs été corrélée avec une forte activité des cellules souches cancéreuses dans le cancer du sein (Singh et

al., 2013a). Après validation en phase préclinique sur des xénogreffes (Ginestier et al., 2010), des inhibiteurs de CXCR1/2 sont aujourd'hui en phase clinique pour améliorer les effets de la chimiothérapie, montrant l'influence d'IL-8 dans la réponse au traitement (Singh et al., 2013b).

L'IL-8 ayant un rôle important dans le développement du cancer et dans la résistance au traitement et étant surexprimée dans le transcriptome des cellules résiduelles (table S1 de Legrier et al., 2016), il serait intéressant de confirmer le lien entre PARP12 et IL-8. Dans notre contexte, l'inhibition de PARP12 combiné au mafosfamide pourrait inhiber l'expression d'IL-8 et ainsi conférer une meilleure sensibilité au traitement. Il est à noter que des expériences préliminaires de l'inhibition de PARP12 combiné au mafosfamide n'ont pas montré de changement d'expression de la signature IFN/STAT1. Par ailleurs, des expériences d'immunofluorescence ne m'ont pas permis d'évaluer à ce jour la localisation de PARP12 sous mafosfamide dans les granules de stress ni dans les structures « aggresome-like ». Une amplification de l'expression de PARP12 permettrait peut-être de mieux voir les effets du stress causés par le mafosfamide sur la localisation de PARP12.

Enfin, il est décrit que PARP12 colocalise avec p62, protéine connue pour s'associer avec LC3 et induire l'autophagie (Welsby et al., 2014). Comme décrit dans l'introduction, l'autophagie est un mécanisme de mort cellulaire. Cependant, celui-ci apparaît aussi être un mécanisme possible de résistance lorsque l'autophagie permet à la cellule tumorale de survivre en restaurant son homéostasie (Sui et al., 2013). Une hypothèse possible est donc que sous mafosfamide, l'inhibition de PARP12 diminue l'activation des mécanismes d'autophagie. L'analyse de LC3 par western blot pourrait nous donner des indications sur ce potentiel mécanisme de résistance.

2.2.2 Etude d'autres cibles de la voie IFN/STAT1

D'après notre criblage (figure 6A de Gaston et al., soumis), la protéine PARP12 s'est avérée la cible la plus pertinente, mais d'autres gènes semblent aussi contribuer à la résistance comme PARP14, ou les couples USP18/ZNF1, et BCL2L1/BCL2L2.

PARP14 est, comme PARP12, capable de transférer un unique ADP ribose. Cependant, son rôle est mieux défini. En effet, PARP14 est impliqué dans la recombinaison homologue et dans la réplication de l'ADN. Son inhibition entraîne une diminution des réparations des cassures double brin par recombinaison homologue ce qui conduit à une accumulation des cassures de l'ADN. Comme dans les MCF7 (figure 6A de Gaston et al, soumis), l'inhibition de PARP14 combinée à des traitements chimiothérapeutiques sur des cellules HeLa entraîne une augmentation de la mortalité cellulaire (Nicolae et al., 2015). De plus, PARP14 a été récemment décrit comme étant surexprimé dans différents types de cancer. Sa surexpression favorise l'effet Warburg, permettant aux cellules cancéreuses de vivre plus longtemps en inhibant les protéines pro-apoptotiques. L'inhibition de PARP14 combinée à des chimiothérapies apparaît comme une nouvelle piste thérapeutique prometteuse (Iansante et al., 2015).

Au-delà des protéines de la famille des PARP, l'enzyme USP18 combinée à ZNF1 (Zinc finger Nuclear transcription Factor X box binding protein 1) a aussi montré son implication dans la résistance des cellules MCF7 à la chimiothérapie. Durant le criblage, la variabilité entre les expériences a été très

élevée pour cette condition expérimentale. L'analyse individuelle de chaque siRNA a été réalisée afin d'évaluer plus clairement leur rôle (figure 30). Il semble que l'inhibition de ZNFX1 n'induit pas de diminution de la viabilité cellulaire contrairement à l'inhibition d'USP18. ZNFX1 est un long-non-coding RNA dont le rôle n'est pas connu. Comme nous l'avons vu en introduction, USP18 est capable d'inhiber l'activation de la voie IFN α /STAT. Cette enzyme est d'ailleurs surexprimée dans les cellules résiduelles d'après la signature identifiée dans les modèles PDX (Legrier et al., 2016), illustrant ainsi la mise en place d'un rétrocontrôle négatif pour inhiber l'inflammation. De plus, il a été démontré que l'inhibition d'USP18 *in vitro* combinée à l'ajout d'IFN α induisait l'augmentation des facteurs de transcription IRF-1, -7 et -9, mais aussi de la protéine TRAIL ; ceci permettant l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque. Il est important de noter que l'inhibition de USP18 seule n'entraîne pas la mort des cellules (Potu et al., 2010). Dans nos conditions expérimentales, l'expression des IFN est induite par le mafosfamide. En ajoutant le siRNA dirigé contre USP18, la viabilité diminue. Il serait intéressant de voir si cela résulte d'un processus apoptotique et, dans l'affirmative, si celui-ci passe aussi par TRAIL dans nos conditions.

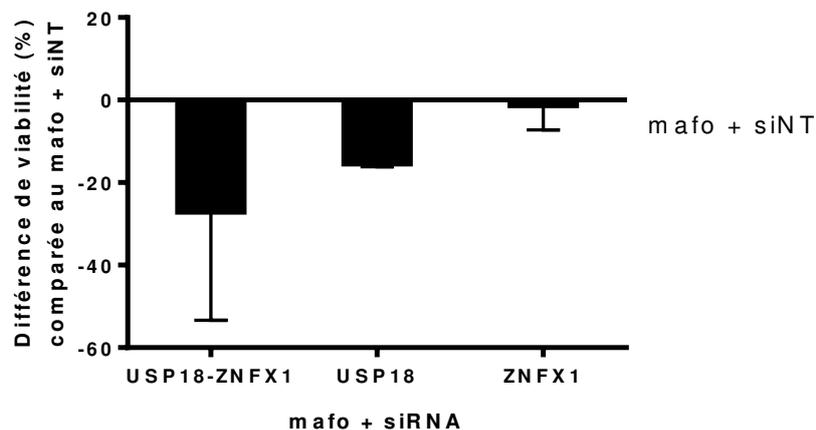


Figure 30 : L'inhibition d'USP18 et/ou ZNFX1 et leurs effets combinés au mafosfamide. Voir figure 28 pour les détails.

USP18 est aussi impliquée dans la régulation des IFN de type III. L'inhibition d'USP18 entraîne une hypersensibilité aux IFN λ qui s'accompagne d'une augmentation de CXCL10, chimiokine qui attire les lymphocytes T (Burkart et al., 2013). Il serait intéressant d'étudier si des IFN de type III sont produits et sécrétés dans nos conditions expérimentales.

USP18 est aussi une enzyme de la famille des protéases qui permet d'enlever la protéine ISG15 (aussi appelée G1P2 ou IFI15) de son substrat par un processus appelé deISGylation. La présence d'ISG15 empêche l'amplification de la voie IFN de type I (Zhang et al., 2015). De plus, la présence d'ISG15 non liée à un substrat permettrait d'activer le système immunitaire et d'induire une réponse anti-tumorale (Burks et al., 2015). ISG15 est surexprimée dans le cancer du sein (Bektas et al., 2008) et nous la retrouvons d'ailleurs surexprimée dans les nodules dans la figure 1D de Legrier et al. (2016). Cependant, étant donné son rôle, son inhibition ne semblerait pas bénéfique pour traiter la résistance.

Un autre couple dont le rôle dans la réponse au mafosfamide paraît intéressant est BCL2L1/BCL2L2. La balance entre les signaux pro- et anti-apoptotiques est souvent altérée dans les cellules cancéreuses. BCL-2 est surexprimée dans 73% des cancers du sein (Dawson et al., 2010). Ce pourcentage varie selon le type de tumeur : 83% pour le sous-type luminal, 50% pour le sous-type HER2+, 18,5 % pour le sous-type triple négatif. La régulation de l'apoptose étant très importante pour l'équilibre de la cellule, jouer sur cet équilibre est une des stratégies classiques pour tuer plus de cellules tumorales. BCL-2 est une protéine anti-apoptotique comme BCL-XL (isoforme longue de BCL2L1) ou BCL-W (BCL2L2). Ces protéines appartiennent à la grande famille BCL-2 qui contient aussi des protéines pro-apoptotiques comme BAX, BAK, BID, BIM et BCL-XS (isoforme courte de BCL2L1). Dans notre criblage (figure 6 de Gaston et al., soumis) l'inhibition de BCL2L1 et BCL2L2 combinée au mafosfamide induit une diminution de la viabilité comparativement à la condition contrôle (mafosfamide + siRNA non ciblé). Dans la littérature, différents agents modifiant cette voie ont déjà été testés de manière à évaluer leur effet sur la réponse tumorale des PDX. ABT-737, un inhibiteur de BCL-2, BCL-XL et BCL-W, a montré une amélioration de la réponse au docetaxel sur des tumeurs triple négatives sur-exprimant BCL-2, faisant de cette dernière un marqueur prédictif de réponse (Oakes et al., 2012). De la même manière, une étude sur des PDX de sous-type ER+ a montré que la combinaison tamoxifène et ABT-737 améliorait la réponse au traitement jusqu'à empêcher l'apparition de récurrence dans un modèle (Vaillant et al., 2013). Le venetoclax (ABT-199), inhibiteur de BCL-2 est déjà sur le marché et est utilisé pour les leucémies lymphocytaires chroniques. D'autres études cliniques sont en cours pour tester son effet sur différents types de cancer solides. Cibler les protéines de la famille BCL-2 dans le cancer du sein paraît donc être une stratégie déjà bien étudiée.

Les différentes cibles identifiées (PARP12, PARP14, USP18) possèdent un potentiel thérapeutique intéressant. Des études *in vitro* sont actuellement en cours, pour confirmer ces résultats sur d'autres types cellulaires avant de passer à des expériences *in vivo*.

Jusqu'ici nous nous sommes principalement intéressés à la signature IFN/STAT1 réduite à 21 gènes. Dans la suite de cette discussion, nous nous pencherons sur la signature globale du transcriptome qui compare l'expression des gènes dans les tumeurs non traitées aux cellules résiduelles dans les nodules (décrite dans la table S1 de Legrier et al., 2016) et qui ne contient pas seulement des éléments de la voie IFN/STAT1.

3. L'inflammation : le rôle des cytokines

Le système immunitaire assure l'immunosurveillance dans le but de détecter et de détruire les éléments pathogènes ou les cellules dysfonctionnelles. Cependant, certaines cellules tumorales échappent à cette surveillance et créent un microenvironnement favorable à leur prolifération en maintenant l'inflammation et l'angiogenèse.

Il existe différents types d'inflammation favorisant le développement des cellules tumorales. Ils se distinguent par leurs causes, leur intensité, leurs mécanismes ou leur devenir. L'inflammation peut

être chronique et d'intensité légère, par exemple lorsqu'elle est engendrée par une infection persistante, par une maladie auto-immune résultant en de sévères dérèglements du système immunitaire. L'inflammation peut être favorisée par les facteurs environnementaux comme le tabac, l'obésité ou l'accumulation de cellules mortes dans un tissu. Elle peut aussi apparaître au cours du développement de la tumeur ou être induite par une chimiothérapie. Dans la suite de ce chapitre, nous utiliserons le terme inflammation pour désigner soit la présence/activation des cellules du système immunitaire inné et/ou adaptatif dans un contexte *in vivo*, soit la présence de cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules cultivées *in vitro*.

L'inflammation joue deux rôles opposés : l'activation du système immunitaire inné puis adaptatif est associée à une réponse à la chimiothérapie caractérisée par une régression tumorale mais si cette inflammation n'est pas régulée et perdure dans le temps, elle peut aussi être associée avec l'augmentation des risques de récurrence. L'équilibre entre l'inflammation associée à la réponse et l'inflammation associée à la récurrence paraît complexe à définir sachant que les cytokines exprimées par le microenvironnement tumoral et les voies de signalisation activées proviennent et agissent simultanément sur différents types cellulaires. C'est la combinaison des différents signaux qui fait pencher la balance vers une inflammation pro ou anti-tumorale. Grâce aux « cytokines array » ou au « multiplex immunoassay », il est possible d'analyser les cytokines mises en jeu. Jusqu'à récemment, l'activation du système immunitaire par les cellules tumorales s'établissait via la reconnaissance d'un anticorps étranger. Cependant, les cytokines sécrétées par les cellules cancéreuses ont récemment été identifiées comme étant capable d'influencer l'action du système immunitaire, rendant plus complexe encore l'inflammation. Mieux comprendre leurs effets sur la stimulation du système immunitaire ou sur la résistance est important pour mieux comprendre les mécanismes et ainsi identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La signature globale retrouvée dans les cellules résiduelles des PDX après chimiothérapie est riche et complexe (Legrier et al., 2016). Elle est le résultat de l'ensemble des signaux reçus (cytokines, facteurs de croissance) qui peuvent provenir de cellules tumorales auxquelles peuvent également s'ajouter des ligands produits par les cellules du système immunitaire résiduel, ou du stroma de la souris nude. L'équilibre entre l'inflammation responsable de la régression tumorale et l'inflammation causant la récurrence dépend notamment de la résultante fonctionnelle de ces cytokines, l'ensemble formant un microenvironnement qui peut être, selon les cas, pro- ou anti-tumoral. Une dissection de la signature trouvée dans les cellules résiduelles *in vivo* devrait donner des indications pour comprendre l'importance de ces cytokines dans le contexte tumoral, avant ou après effets de la chimiothérapie. Par ailleurs, l'immunité médiée par la voie IFN est un des processus biologiques mis en avant dans la table S2 de notre étude sur des PDX (Legrier et al., 2016). La première partie de ce chapitre consiste à identifier les différents acteurs de la sécrétion d'IFN et d'autres cytokines pro-inflammatoires, qui permettent le maintien de l'inflammation. Dans un second temps, les rôles de certaines cytokines détectées dans ce transcriptome seront abordés.

3.1 Les détecteurs d'ADN cytosoliques

Les détecteurs d'ADN retrouvés dans la signature IFN sont DDX60 et SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1). La protéine DDX60 fait partie de la famille des protéines possédant un

domaine DEAD (aspartate, glutamine, alanine, aspartate) (Miyashita et al., 2011). Grâce à ce domaine, DDX60 est supposée détecter l'ADN cytosolique comme le fait DDX41. Ce dernier possède aussi un domaine DEAD qui lui permet de détecter l'ADN et de stimuler la production d'IFN de type I via STING. En effet, des expériences d'immunoprécipitation ont montré l'interaction directe de STING avec DDX41 en présence d'ADN cytosolique. D'autres protéines possédant ce domaine DEAD seraient aussi impliquées dans la détection d'ADN cytosolique et la sécrétion de cytokines inflammatoires, comme DHX9 et DHX36, mais via la protéine MYD88 et non STING.

La protéine SAMHD1 est connue pour hydrolyser les dNTP (déoxyribonucléosides triphosphates), utilisés pour réparer l'ADN, en dN (déoxyribonucléoside) et un groupe triphosphate incapable de se lier à l'ADN. Les cellules enrichies en dNTP sont associées à un taux plus important de mutations ; la forte présence de dNTP est associée à la tumorigénèse. Des traitements comme le méthotrexate ou le 5-Fluorouracile bloquent la production de dNTP ce qui empêche les cellules de réparer l'ADN. La surexpression de SAMHD1 dans les cellules résiduelles suggère que des signaux pro-apoptotiques sont mis en place pour tuer les cellules résiduelles (Kohnken et al., 2015).

STING n'apparaît pas dans le transcriptome des nodules résiduels post-chimiothérapie. Sa surexpression pourrait se produire précocement lors de la formation des premières cassures d'ADN. Pour vérifier cela, il faudrait effectuer une qPCR dans les PDX à trois ou sept jours de traitement. On ne peut cependant pas exclure que son implication dans l'activation de la voie IFN/STAT1 sous chimiothérapie résulte seulement d'une augmentation d'activité. D'autres détecteurs d'ADN cytosoliques pourraient être activés à des temps courts post-chimiothérapie tel que l'ADN polymérase III. Cette polymérase reconnaît les séquences ADN riches en résidus adénines et thymines et les transcrits. Les ARN alors formés activent les détecteurs d'ARN dont RIG-I (Ablasser et al., 2009). AIM-2 peut aussi détecter des ADN double brin, former un inflammasome activant la caspase 1 qui clive le précurseur d'IL-1 β pour former l'IL-1 β mature (Hornung et al., 2009). Il serait aussi possible de découvrir de nouveaux intermédiaires dans l'activation de STING autres qu'IFI16. Un intermédiaire entre l'ADN cytosolique et l'activation de STING doit présenter plusieurs critères.

- Premièrement, il doit comporter un domaine de liaison à l'ADN. Aujourd'hui 2600 protéines connues possèdent un tel domaine, cependant elles n'ont pas toutes les mêmes fonctions et donc ne sont pas toutes des détecteurs d'ADN cytoplasmique (Babu et al., 2004).
- Deuxièmement, il est nécessaire que cette intermédiaire détecte de l'ADN en amont de STING.
- Enfin, il doit se lier à STING afin de l'activer et d'enclencher l'expression d'IFN de type I. Cette liaison peut se démontrer par immunofluorescence et co-immunoprécipitation, mais aussi par des expériences de *knockdown* ou *knockout* afin d'évaluer la réponse IFN en absence de la protéine intermédiaire d'intérêt et/ou de STING.

Par exemple, la protéine DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors), aussi appelée ZBP1 (Z-DNA binding protein 1) possède un domaine de liaison à l'ADN. De plus, elle interagit avec TBK1 et IRF3. Un *knockdown* de la protéine DAI entraîne une faible diminution de l'expression des IFN de type I. Cette protéine joue donc un rôle mineur dans la régulation de la voie IFN, elle contrôle plutôt l'induction de la voie NF κ B via STING (Rebsamen et al., 2009; Takaoka et al., 2007).

Comme décrit en introduction, la protéine STING est exprimée par les cellules immunitaires et permet ainsi d'activer le système immunitaire lors des infections virales ou bactériennes. STING détecte les PAMP et permet la phosphorylation de IRF3 qui induit ensuite l'expression des IFN de type I. Plus récemment, STING a été décrit comme jouant un rôle important dans le contexte tumoral par la détection des DAMP. Utilisant des souris génétiquement modifiées, des agonistes de STING, DMXAA (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid, agonistes de STING spécifique de la souris) ou des CDN (comme vu en introduction paragraphe 4.3.2), ont été injectés dans des tumeurs de mélanomes endogènes. La stimulation de STING dans les cellules immunitaires a induit une régression tumorale et la surexpression des IFN γ , reflétant l'activation du système immunitaire (Corrales et al., 2015).

Pour connaître le rôle de la voie STING dans les cellules tumorales sans influence du système immunitaire, nous avons pris le parti de travailler *in vitro* sur des cellules tumorales humaines. De façon inattendue, nous avons observé que l'inhibition de STING augmentait la mortalité des cellules tumorales. Ainsi, s'il apparaît important que les cellules du système immunitaire expriment STING pour détecter les DAMP des cellules tumorales et activer les lymphocytes T et lymphocytes B, l'activation de la voie STING dans les cellules tumorales aurait au contraire des conséquences néfastes car elle induirait une activation plus prononcée de la voie IFN/STAT1 qui joue un rôle important dans la résistance (paragraphe 4.4.3). Si nos observations faites dans les cellules MCF7 reflètent effectivement ce qui se passe dans les cellules tumorales au sein d'une tumeur qui se développe dans un microenvironnement *in vivo*, l'effet ultime de la voie STING pourrait donc résulter d'un équilibre entre deux effets aux conséquences opposées sur la croissance tumorale. Novartis s'apprête à lancer un essai clinique avec un agoniste de STING appelé MIW8115, ce qui devrait à terme nous apporter des éléments de réponse sur cette hypothèse.

Les mécanismes d'activation et le rôle de STING ne sont pas encore bien connus. De plus, STING a été décrit comme étant localisé essentiellement dans le réticulum endoplasmique, l'appareille de Golgi ou des vésicules périnucléaires. Dans les cellules MCF7, STING paraît être nucléaire. Cette constatation a depuis été confirmée par western blot après extraction séparée des protéines cytoplasmiques et nucléaires. Il est par ailleurs intéressant de noter que STING fusionné au tag HA à l'extrémité C-terminale est majoritairement retrouvé dans le cytoplasme (Corrales et al., 2015), ce qui laisse supposer que le tag pourrait interférer avec la translocation nucléaire de STING. Sa colocalisation avec γ H2AX suggère une interaction possible entre ces deux protéines. En préalable à l'investigation des conséquences fonctionnelles de cette possible interaction, l'appartenance à un même complexe protéique méritera d'être approfondie par des approches de co-immunoprécipitation et « proximity-ligation assay ». S'il s'avérait que STING interagit directement avec γ H2AX, cela pourrait suggérer qu'il soit capable à la fois de participer aux mécanismes de réparation de l'ADN, et de détecter les ADN double brin dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau des cellules. Seules deux autres protéines ont été décrites pour posséder cette double fonctionnalité : IFI16, qui s'associe avec BRCA1 lors des réparations de l'ADN dans le noyau et est capable de détecter des ADN double brin dans le cytoplasme (Aglipay et al., 2003) ; et Mre11, qui fait à la fois partie du complexe de réparation de l'ADN MRN et qui est aussi capable de détecter des ADN double brin dans le cytoplasme et de déclencher l'expression des IFN de type I via STING (Kondo et al., 2013).

La détection de l'activation de la voie STING est peut-être plus facile dans les cellules MCF7 que dans d'autres lignées, car ces cellules sont mutées au niveau du gène de la caspase 3. L'apoptose de ces cellules est tout de même possible par l'activation en cascade des caspases 9, 7 et 6 (Liang et al., 2001). L'inhibition des caspases induisant une augmentation plus importante des IFN, il a ainsi été démontré que les caspases inhibent l'activation de STING (White et al., 2014). Les cellules MCF7 ayant une caspase mutée, cette voie de contrôle de l'activité de STING n'est sans doute pas aussi active que dans d'autres cellules. Dans la suite de ce travail, il sera donc intéressant de vérifier que le mécanisme mis en évidence dans les cellules MCF7 peut être observé dans d'autres lignées cellulaires.

Un autre type de détecteur d'ADN est TLR9. Récepteur présent dans la membrane des endosomes, il est activé par la présence d'ADN dans les endosomes et induit, via IRF7, l'expression des IFN de type I. Il est souvent exprimé dans les tumeurs du sein, plus spécifiquement dans le sous-type triple négatif. Une forte expression de TLR9 par les cellules tumorales est associée à un bon pronostic car il favorise l'inflammation et notamment l'activation des cellules Th1 (Sandholm and Selander, 2014). Afin de définir si, comme STING, TLR9 pourrait jouer un double rôle, j'ai eu l'opportunité d'ajouter TLR9 dans le criblage de siRNA et j'ai constaté que son inhibition combinée au mafosfamide diminuait la viabilité comparée à la condition contrôle. Ces résultats présentés dans la figure 31 (et non inclus dans notre manuscrit soumis) laissent donc penser que l'activation de TLR9 dans les cellules résiduelles leur permettrait de survivre au mafosfamide. TLR9 aurait alors, comme STING, une double fonctionnalité : bénéfique pour la stimulation du système immunitaire dans la réponse au traitement, mais néfaste sur le long terme car le maintien de l'inflammation aide les cellules tumorales à survivre à la chimiothérapie. Le développement d'un anti-TLR9 pourrait donc être bénéfique pour des tumeurs qui ont bien répondu au traitement et où seules quelques cellules résiduelles survivent. Dans l'expérience décrite à la figure 31, l'inhibition de TLR9 était combinée à celle de TLR8, un autre récepteur de la membrane des endosomes activé par la présence d'ARN simple brin, et qui induit aussi l'expression d'IFN de type I par l'intermédiaire de IRF7. En plus, des détecteurs d'ADN, des détecteurs d'ARN seraient donc aussi activés en réponse au mafosfamide.

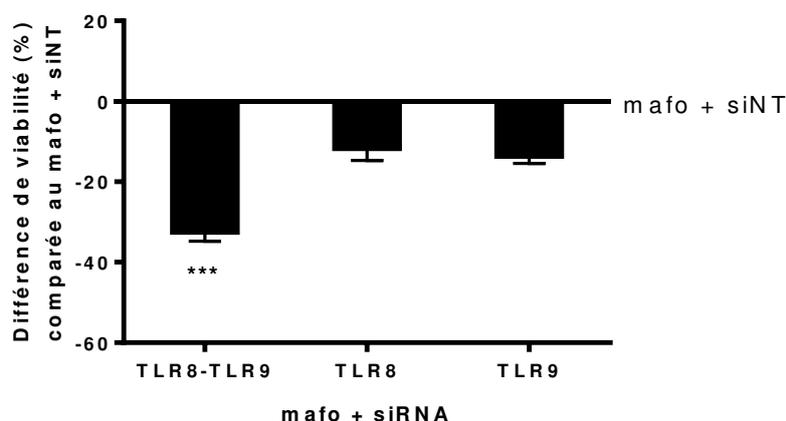


Figure 31 : L'inhibition de TLR8 et/ou TLR9 potentialise l'effet du mafosfamide. Voir figure 28 pour les détails.

3.2 Les détecteurs d'ARN cytosoliques

Dans ce contexte tumoral, l'induction de détecteurs d'ADN paraît être liée à l'accumulation d'ADN double brin dans le cytoplasme liée aux effets des chimiothérapies. Il apparaît plus surprenant de constater la surexpression de détecteurs d'ARN comme RIG-I, IFIH1, IFIT1 et les OAS1, OAS2 et OAS3 dans la signature du transcriptome décrite par Legrier et al, (2016). RIG-I, aussi connu sous le nom de DDX58, est un des trois membres la famille des RLR avec IFIH1 (MDA5) et LGP2. Les RLR reconnaissent les dsRNA et les groupes 5'triphosphate (5'pppRNA) (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). RIG-I est capable de stopper la croissance cellulaire, et d'induire l'apoptose des cellules tout en déclenchant l'inflammation (Shyu et al., 2005). Tout comme IFIH1, RIG-I est aussi capable d'induire la sécrétion d'IFN de type I et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Rice et al., 2014).

Les protéines de la famille des OAS sont aussi capables de détecter de l'ARN. Elles permettent la synthèse de 2'-5'-oligoadenylate qui active l'endoribonucléase latente (RNaseL). La protéine RNaseL clive les ARN endogènes ou exogènes ce qui conduit à la multiplication des PAMP et à une amplification de la réponse immunitaire innée (Lee et al., 2013).

IFIT1 reconnaît les ARN simple brin et les séquestre en formant des complexes avec IFIT2 et IFIT3. Leur rôle est cependant conflictuel : ils ont été décrits comme pouvant être inhibiteurs ou activateurs de la réponse immunitaire, leur activité dépendant probablement de leur capacité à contrôler la quantité d'ARN dans le cytosol. L'inhibition de la réponse immunitaire pourrait aussi être due à la capacité d'IFIT1 et IFIT2 à se fixer à STING et ainsi inhiber l'induction des IFN (Li et al., 2009). A l'inverse, l'augmentation ectopique d'IFIT3 permet une augmentation de la phosphorylation d'IRF3 par stimulation de l'activité de STING via TBK1 (Liu et al., 2011).

IFIT1 est initialement connu pour inhiber l'expression des ARN viraux, il fait aussi partie des ISG et de la signature IRDS définie par Khodarev (Khodarev et al., 2004). De plus, l'équipe de Weichselbaum et al (Weichselbaum et al., 2008) a corrélé la surexpression de sept gènes de cette voie, dont IFIT1, avec la rechute tumorale chez les patients. La surexpression de ce gène paraît donc liée à la résistance. Cependant, dans le criblage que nous avons effectué (figure 6A de Gaston et al., soumis), l'inhibition conjointe d'IFIT1 et d'IFI27 combinée au mafosfamide n'a pas eu d'effet potentialisateur sur la viabilité cellulaire. Une analyse plus approfondie de la littérature nous a permis de découvrir le rôle d'IFI27. Induite par l'IFN α , la protéine IFI27, est connue pour promouvoir l'apoptose des cellules par la voie mitochondriale. Ces deux protéines ayant des rôles opposés, il est possible que dans cet essai les effets de leurs inhibitions conjointes se soient annulés. Il sera donc intéressant d'évaluer séparément l'effet de l'inhibition de chacune de ces protéines combiné au mafosfamide.

IFIT2 a été décrite comme jouant un rôle pro-apoptotique par la stimulation de la voie mitochondriale. IFIT3 permettant un rétrocontrôle négatif, son inhibition devrait entraîner une diminution de la viabilité (Stawowczyk et al., 2011). Et c'est exactement ce que nous avons observé expérimentalement (figure 32).

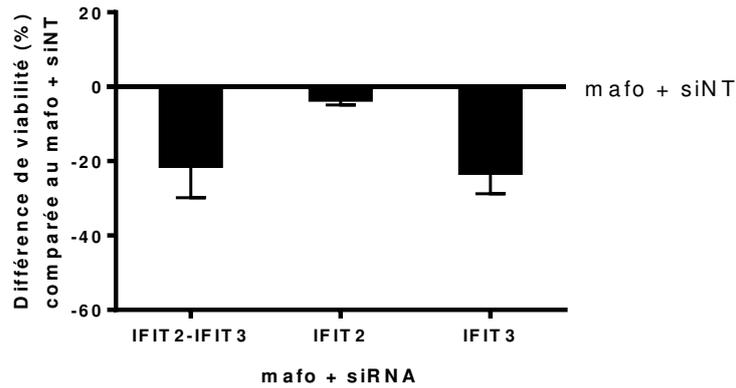


Figure 32 : L'inhibition d'IFIT2 et/ou IFIT3 potentialise l'effet du mafosfamide. Voir figure 28 pour les détails.

Il serait intéressant de corréliser la surexpression de ces détecteurs à l'augmentation d'ARN dans le cytoplasme, ou à la nature de ces ARN. L'augmentation d'ARN cytosolique pourrait être due aux effets de la chimiothérapie qui, comme sur l'ADN, induit des cassures simple ou double brin. Ces ARN peuvent aussi provenir des mitochondries qui relarguent leurs acides nucléiques lors de stress ou des effets induits par l'IFN. En effet, celui-ci a la capacité de stabiliser l'ARNm en inhibant ainsi sa dégradation. La nature des ARN induits par la chimiothérapie pourrait aussi contribuer à influencer la réponse au traitement. Les IFN peuvent induire des modifications sur les long-non-coding RNA qui agissent sur l'état de compaction de la chromatine et ainsi sur l'expression des gènes. De plus, les IFN sont aussi connus pour modifier l'expression des micro-RNA (miRNA) de façon à modifier le devenir de la cellule. Les miRNA, en se liant à une séquence complémentaire d'ARNm, peuvent induire sa dégradation : ce sont des régulateurs post-transcriptionnels. Par exemple, les miRNA peuvent inhiber les signaux d'apoptose induite par les IFN de type I ou inhiber l'arrêt du cycle cellulaire induit par les IFN de type II (Schneider et al., 2014).

Dans l'ensemble, ces détecteurs d'ARN et d'ADN activent la sécrétion de cytokines, ce qui a pour effet d'activer le système immunitaire. Leurs rôles sont alors bénéfiques car ils permettent une régression tumorale. Cependant, une inflammation prolongée dans les cellules tumorales pourrait être propice à la survie de certaines cellules tumorales. L'inhibition de ces PRR, comme STING, pourraient diminuer l'inflammation et ainsi retarder l'apparition de récidence.

3.3 Expression d'autres cytokines que les IFN et IL-8

La surexpression des IFN β a été observée par qPCR dans les nodules résiduels post-chimiothérapies et celle des IFN γ a été étudiée par cytokine array (respectivement figures S5 et 5B de Legrier et al., 2016). D'autres cytokines ont été détectées dans le transcriptome des cellules résiduelles comme l'IL-8, dont le rôle a été précédemment exposé, mais aussi CCL5, CXCL10, CXCL16 et CX3CL1. Les rôles de CCL5 et CXCL10 sont étudiées ci-dessous.

CCL5 est une chimiokine avec un motif CC (CC motif ligand 5) aussi appelée RANTES pour « regulated on activation, normal T cell expressed and secreted ». D'après la littérature, CCL5 est décrite comme

étant impliquée dans la progression du cancer et le développement des métastases (Luboshits et al., 1999; Niwa et al., 2001). CCL5 peut se lier à différents récepteurs CCR5, CCR1 et CCR3, couplés à une protéine G et entraîne une restructuration du cytosquelette et une polarisation de la cellule lui donnant les capacités de migrer et de proliférer.

Dans les cellules mammaires normales, CCL5 est peu exprimée. Par contre, son expression augmente avec celle de son récepteur CCR5 dans les cellules cancéreuses, et les fibroblastes (Luboshits et al., 1999). L'expression de CCL5 est particulièrement corrélée avec la progression du sous-type triple négatif et est donc considérée comme cible thérapeutique potentielle et marqueur de pronostic défavorable (Lv et al., 2013). Des antagonistes de CCR5 sont capables de réduire les capacités d'invasion et de prolifération des cellules de type basal (Velasco-Velazquez et al., 2012). Un effet similaire a été rapporté pour des cellules de type luminales (Svensson et al., 2015). De plus, CCL5 participe au changement du microenvironnement tumoral et attire des cellules du système immunitaire favorisant l'immunosuppression. Par son pouvoir chimio-attractif, CCL5 augmente la présence de macrophages associés aux tumeurs, de cellules myéloïdes suppressives, de lymphocytes T régulateurs et de cellules souches mésenchymateuses et diminue la présence de Th1 ou de lymphocytes T cytotoxiques. Le rôle de CCL5 est donc plutôt pro-tumoral.

CCL5 peut être dosée dans le sérum des patients. Le taux de cette chimiokine est plus élevé chez les patients atteints d'une tumeur et ce d'autant plus lorsque les ganglions sont envahis (Dehqanzada et al., 2007). Le suivi de l'expression de CCL5 est relativement facile. Il serait intéressant de voir dans nos PDX si les taux de CCL5 intra-tumoraux et/ou circulants augmentent avec le développement de la tumeur et si un anti-CCL5 ou anti-CCR5 permettrait de faire régresser la taille de la tumeur ou d'empêcher la récurrence.

Une des autres chimiokines exprimée dans les cellules résiduelles *in vivo* et pour laquelle l'intérêt est grandissant est CXCL10 (motif C-X-C chimiokine 10). CXCL10 est induite par différentes cellules (monocytes, cellules endothéliales, fibroblastes) sous stimulation IFN. CXCL10 est capable d'attirer des cellules du système immunitaire possédant le récepteur associé CXCR3 comme les cellules dendritiques, les NK, des macrophages, des Th1 et des lymphocytes T (CD4+, CD8+). Le rôle de CXCL10 est cependant controversé : certains décrivent CXCL10 comme ayant un effet anti-tumoral, d'autres, pro-tumoral. Ces rôles opposés pourraient provenir de l'existence de trois isoformes du récepteur aux fonctions différentes : CXCR3-A, exprimé par la plupart des cellules, permettrait de transmettre des signaux de prolifération, alors que CXCR3-B, présent notamment sur les cellules endothéliales et mammaires, permettrait d'inhiber leur prolifération et serait à l'origine d'un effet anti-angiogénique (la troisième isoforme n'ayant à ce jour pas de rôle dans la prolifération des cellules) (Aksoy et al., 2006). Cependant, la plupart des études ne font pas la distinction entre ces isoformes.

Le rôle anti-tumoral de CXCL10 a notamment été démontré par l'équipe de Kroemer (Sistigu et al., 2014) qui, à l'aide de souris syngéniques, démontre que la chimiothérapie induit une régression tumorale qui s'accompagne de l'expression d'un certain nombre de gènes et cytokines communs à nos modèles de PDX, dont CXCL10. L'inhibition de l'expression de l'IFNAR dans les cellules cancéreuses bloque l'induction de CXCL10 suite à une chimiothérapie et rend ces tumeurs résistantes au traitement. L'injection de la protéine CXCL10 recombinante permet aux tumeurs de répondre à

nouveau à la chimiothérapie par une régression tumorale, montrant ainsi l'importance de cette chimiokine dans la réponse au traitement. Tirant parti de son effet anti-angiogénique, la surexpression de CXCL10 a été couplée à une chimiothérapie, la gemcitabine, et potentialise l'effet de celle-ci seule dans le cancer du poumon (Mei et al., 2008). De plus, dans le cancer colorectal, une étude sur 36 échantillons de patients qui ont récidivé et 28 qui n'ont jamais connu de rechute, a montré que la surexpression de CXCL10 était un facteur de bon pronostic (Jiang et al., 2010).

Cependant, le récepteur CXCR3-A est présent sur de nombreux types cellulaires et notamment les cellules du cancer du sein. Une étude portant sur les lignées MCF7 et MDA-MB-435 a montré que suite à l'activation de la voie de signalisation Ras, CXCL10 est surexprimée et induit la diminution de l'expression de CXCR3-B et l'augmentation de la prolifération (Datta et al., 2006). De plus, CXCL10 colocalise avec le facteur de prolifération Ki-67 (Lo et al., 2010). L'effet pro-tumoral peut aussi être lié à une surexpression des récepteurs sur les cellules tumorales qui vont alors proliférer plus vite que les cellules du système immunitaire. CXCL10 possède aussi une activité paracrine : elle est capable de modifier l'environnement tumoral grâce à son chimiotactisme. Elle a ainsi été décrite comme capable d'attirer les lymphocytes T régulateurs, connues pour leur pouvoir immunosuppresseur et a ainsi été décrite comme facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein de sous-type basal (Mulligan et al., 2013). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de CXCL10 dans le contexte des cellules résiduelles dans nos PDX de manière à évaluer son rôle dans la réponse à la chimiothérapie et dans la récurrence.

Curieusement, la plupart des cytokines identifiées par l'analyse transcriptomique des modèles de PDX n'ont pas été retrouvées dans le cytokine-array effectué sur les MCF7 *in vitro* (figure S4 de Gaston et al, soumis). Une explication pourrait être que le niveau de sensibilité de ce dosage n'est pas suffisant pour détecter de (très) faibles quantités de cytokines produites par les cellules tumorales sous chimiothérapie. Etant donné leur mode d'action autocrine/paracrine supposé, celles-ci n'ont en effet pas besoin d'être présentes en grande quantité dans le microenvironnement tumoral pour avoir un impact fonctionnel. L'analyse par qPCR de CCL5, CXCL10 et IL-8 sur les échantillons obtenus *in vitro* permettrait de conclure quant à la faculté des chimiothérapies d'induire l'expression de ces cytokines par les cellules cancéreuses. Le microenvironnement tumoral présent dans les modèles *in vivo*, ou la disposition des cellules en 3D, pourrait aussi influencer l'expression de ces cytokines et expliquer les différences avec les monocouches cellulaires *in vitro*.

En conclusion, l'étude de l'expression de l'ensemble des cytokines est importante pour prendre en compte l'ensemble des événements impliqués dans les communications entre les cellules de la tumeur. L'analyse des différents types de cellules (tumorales, immunitaires, souches, stromales, vasculaires) est aussi primordiale pour déterminer si le microenvironnement est favorable ou défavorable à la régression tumorale.

Les études menées sur les cellules tumorales *in vitro* sont enrichissantes car elles permettent d'évaluer l'effet intrinsèque des cytokines sur ces cellules néoplasiques indépendamment de toute cellule immunitaire. De la même manière, l'évaluation de l'activation des cellules immunitaires hors du contexte tumoral a aussi permis de comprendre de nombreux liens entre les cellules du système immunitaire inné et adaptatif et d'identifier les cytokines responsables. Cependant, il est maintenant

important d'imbriquer toutes ces connaissances, d'étudier leur relation et les conséquences que cela peut avoir sur la tumeur. En effet, une cytokine ayant un effet pro-tumoral sur les cellules cancéreuses pourrait ne pas avoir le même effet sur la tumeur au sein de son microenvironnement. Les souris syngéniques, qui possèdent un système immunitaire compétent, permettent d'approcher certains de ces mécanismes. Cependant, les mécanismes entre la souris et l'homme sont parfois assez différents, et l'utilisation de modèles le plus humanisé possible est toujours préférable pour les essais précliniques. Les PDX permettent de travailler avec des tumeurs humaines, cependant leur utilisation impose l'utilisation de souris hôtes dont le système immunitaire n'est pas complet.

Conclusion et perspectives

Dans ce travail, nous avons abordé l'étude des mécanismes de résistance aux traitements mis en place par les cellules tumorales mammaires qui contribueraient à la récurrence. A l'aide de PDX de tumeurs du sein, nous avons mis en évidence la surexpression de la voie IFN/STAT1 uniquement dans les modèles sensibles à la chimiothérapie. Cette voie est surexprimée quelques jours seulement après traitement et semble donc être un indicateur fiable pour prédire la réponse initiale au traitement. La confirmation de ce biomarqueur sur des cohortes d'échantillons humains est désormais essentielle pour valider son utilité future afin de guider le clinicien dans le choix du traitement néoadjuvant le plus adapté à la tumeur du patient. Bien que notre étude se soit jusqu'ici focalisée sur le sous-type triple négatif, principalement parce que celui-ci est majoritairement représenté dans le panel de PDX disponibles à XenTech, des résultats préliminaires sont encourageants quant à l'extrapolation de nos résultats aux autres sous-types de cancer du sein, voire à d'autres types de cancer.

Cette voie IFN/STAT1 est aussi surexprimée dans les cellules résiduelles qui ont survécu au traitement. De plus, dans l'étude des cellules MCF7 *in vitro*, la surexpression de cette voie a permis d'identifier certains gènes impliqués dans la résistance aux génotoxiques. Ainsi, PARP12 apparaît comme une cible thérapeutique prometteuse. Néanmoins, aucun inhibiteur pharmaceutique de PARP12 n'ayant été développé à notre connaissance, il serait intéressant de mieux comprendre son implication dans les mécanismes d'autophagie ou de sécrétion d'IL-8 afin d'inhiber ces effecteurs. Plusieurs tests sont aujourd'hui en cours pour évaluer l'effet de l'inhibition de PARP12 sur la viabilité d'autres lignées cellulaires ER+ ou triple négatives. Bien entendu, ceux-ci se devront d'être complétés par des essais fonctionnels *in vivo* afin de confirmer les observations faites à ce jour uniquement *in vitro*.

L'expression de la voie IFN/STAT1 étant impliquée dans la résistance, la compréhension des mécanismes à l'origine de sa surexpression est devenue essentielle. Sous mafosfamide, les IFN de type I sont produits et sécrétés par les cellules cancéreuses elles-mêmes. A l'aide de mécanismes paracrine et autocrine, les IFN sont principalement à l'origine de l'activation de la voie IFN/STAT1. Nous avons montré que la protéine STING, jusqu'ici connue pour son action dans le système immunitaire, était aussi impliquée dans l'expression des IFN de type I par les cellules cancéreuses mammaires après traitement. De manière inattendue, notre travail a montré que l'activation de la voie STING dans les cellules tumorales pouvait contribuer à des effets de résistance, totalement opposés aux effets anti-tumoraux qui lui sont généralement attribués via l'activation du système immunitaire. C'est d'ailleurs sur cette base rationnelle qu'ont débuté des essais cliniques visant à utiliser des agonistes de STING afin de stimuler la production d'IFN de type I et ainsi de booster l'activation du système immunitaire chez des patients présentant des tumeurs. Cette possible dualité fonctionnelle de la voie STING se devra d'être confirmée par des modèles expérimentaux *ad hoc* et, à terme, par les résultats de ces essais cliniques.

Même si notre travail s'est focalisé sur les IFN, d'autres cytokines et chimiokines sont également sécrétées dans le microenvironnement tumoral, dont l'IL-8, CCL5 et CXCL10. Comme les IFN, elles pourraient aussi exercer des effets différents, voire opposés, sur les cellules immunitaires et tumorales, avec des conséquences importantes en termes de réponse globale aux traitements. A la lumière de ce travail, nous formulons l'hypothèse que l'équilibre entre réponse et résistance des

tumeurs au traitement est en partie régulé par la nature, la quantité et l'activité différentielle des cytokines sécrétées par, et agissant sur, les cellules tumorales *versus* immunitaires.

BIBLIOGRAPHIE

Abe, T., and Barber, G.N. (2014). Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1. *J Virol* *88*, 5328-5341.

Abe, T., Harashima, A., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Morales, A., Ahn, J., Gutman, D., and Barber, G.N. (2013). STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell* *50*, 5-15.

Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K.A., and Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* *10*, 1065-1072.

Aglipay, J.A., Lee, S.W., Okada, S., Fujiuchi, N., Ohtsuka, T., Kwak, J.C., Wang, Y., Johnstone, R.W., Deng, C., Qin, J., *et al.* (2003). A member of the Pyrin family, IFI16, is a novel BRCA1-associated protein involved in the p53-mediated apoptosis pathway. *Oncogene* *22*, 8931-8938.

Ahmad, S., Alsayed, Y.M., Druker, B.J., and Platanias, L.C. (1997). The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor protein. *J Biol Chem* *272*, 29991-29994.

Aksoy, M.O., Yang, Y., Ji, R., Reddy, P.J., Shahabuddin, S., Litvin, J., Rogers, T.J., and Kelsen, S.G. (2006). CXCR3 surface expression in human airway epithelial cells: cell cycle dependence and effect on cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *290*, L909-918.

Al Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3983-3988.

Albain, K.S., Barlow, W.E., Ravdin, P.M., Farrar, W.B., Burton, G.V., Ketchel, S.J., Cobau, C.D., Levine, E.G., Ingle, J.N., Pritchard, K.I., *et al.* (2009). Adjuvant chemotherapy and timing of tamoxifen in postmenopausal patients with endocrine-responsive, node-positive breast cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* *374*, 2055-2063.

Aloia, A., Petrova, E., Tomiuk, S., Bissels, U., Deas, O., Saini, M., Zickgraf, F.M., Wagner, S., Spaich, S., Sutterlin, M., *et al.* (2015). The sialyl-glycolipid stage-specific embryonic antigen 4 marks a subpopulation of chemotherapy-resistant breast cancer cells with mesenchymal features. *Breast Cancer Res* *17*, 146.

Andre, F., Dieci, M.V., Dubsky, P., Sotiriou, C., Curigliano, G., Denkert, C., and Loi, S. (2013). Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* *19*, 28-33.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., *et al.* (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* *13*, 1050-1059.

Atasheva, S., Frolova, E.I., and Frolov, I. (2014). Interferon-stimulated poly(ADP-Ribose) polymerases are potent inhibitors of cellular translation and virus replication. *J Virol* *88*, 2116-2130.

Babu, M.M., Luscombe, N.M., Aravind, L., Gerstein, M., and Teichmann, S.A. (2004). Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol* *14*, 283-291.

Badve, S., Dabbs, D.J., Schnitt, S.J., Baehner, F.L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., *et al.* (2011). 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.

Bailey, M.J., Gazet, J.C., and Peckham, M.J. (1980). Human breast-cancer xenografts in immune-suppressed mice. *Br J Cancer* 42, 524-529.

Bailey, M.J., Ormerod, M.G., Imrie, S.F., Humphreys, J., Roberts, J.D., Gazet, J.C., and Neville, A.M. (1981). Comparative functional histopathology of human breast carcinoma xenografts. *Br J Cancer* 43, 125-134.

Baker, S.J., Rane, S.G., and Reddy, E.P. (2007). Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26, 6724-6737.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

Banath, J.P., Macphail, S.H., and Olive, P.L. (2004). Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 64, 7144-7149.

Bauer, J.A., Chakravarthy, A.B., Rosenbluth, J.M., Mi, D., Seeley, E.H., De Matos Granja-Ingram, N., Olivares, M.G., Kelley, M.C., Mayer, I.A., Meszoely, I.M., *et al.* (2010). Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. *Clin Cancer Res* 16, 681-690.

Bazan, F. (1989). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and p75 IL-2 receptor β -chain. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 788-795.

Bazan, J.F. (1990). Structural design of molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 6934-6938.

Bektas, N., Noetzel, E., Veeck, J., Press, M.F., Kristiansen, G., Naami, A., Hartmann, A., Dimmler, A., Beckmann, M.W., Knuchel, R., *et al.* (2008). The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 10, R58.

Bernichtein, S., Touraine, P., and Goffin, V. (2010). New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol* 206, 1-11.

Bertheau, P., Turpin, E., Rickman, D.S., Espie, M., de Reynies, A., Feugeas, J.P., Plassa, L.F., Soliman, H., Varna, M., de Roquancourt, A., *et al.* (2007). Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen. *PLoS Med* 4, e90.

Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., and Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 123, 236-240.

Bertucci, F., Finetti, P., Guille, A., Adelaide, J., Garnier, S., Carbuccia, N., Monneur, A., Charafe-Jauffret, E., Goncalves, A., Viens, P., *et al.* (2016). Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget*.

Boelens, M.C., Wu, T.J., Nabet, B.Y., Xu, B., Qiu, Y., Yoon, T., Azzam, D.J., Twyman-Saint Victor, C., Wiemann, B.Z., Ishwaran, H., *et al.* (2014). Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell* 159, 499-513.

Boulay, J.L., O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2003). Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity* 19, 159-163.

Brewster, A.M., Hortobagyi, G.N., Broglio, K.R., Kau, S.W., Santa-Maria, C.A., Arun, B., Buzdar, A.U., Booser, D.J., Valero, V., Bondy, M., *et al.* (2008). Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 100, 1179-1183.

Briskin, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003178.

Bryant, C., Rawlinson, R., and Massey, A.J. (2014). Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 14, 570.

Burdette, D.L., and Vance, R.E. (2013). STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol* 14, 19-26.

Burkart, C., Arimoto, K., Tang, T., Cong, X., Xiao, N., Liu, Y.C., Kotenko, S.V., Ellies, L.G., and Zhang, D.E. (2013). Usp18 deficient mammary epithelial cells create an antitumour environment driven by hypersensitivity to IFN-lambda and elevated secretion of Cxcl10. *EMBO Mol Med* 5, 967-982.

Burks, J., Reed, R.E., and Desai, S.D. (2015). Free ISG15 triggers an antitumor immune response against breast cancer: a new perspective. *Oncotarget* 6, 7221-7231.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.

Burnette, B.C., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y.X., and Auh, S.L. (2011). The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res* 71, 2488-2496.

Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

Chang, B.D., Swift, M.E., Shen, M., Fang, J., Broude, E.V., and Roninson, I.B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 389-394.

Chang, J.C., Makris, A., Gutierrez, M.C., Hilsenbeck, S.G., Hackett, J.R., Jeong, J., Liu, M.L., Baker, J., Clark-Langone, K., Baehner, F.L., *et al.* (2008). Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 108, 233-240.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., *et al.* (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 69, 1302-1313.

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P., and Stark, G.R. (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J* 19, 4111-4122.

Chatterjee, S., Saha, A., Arun, I., Nayak, S.S., Sinha, S., Agrawal, S., Parihar, M., and Ahmed, R. (2015). Correlation of clinicopathological outcomes with changes in IHC4 status after NACT in locally advanced breast cancers: do pre-NACT ER/PR status act as better prognosticators? *Breast Cancer (Dove Med Press)* 7, 381-388.

Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., and Nielsen, T.O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 14, 1368-1376.

Chen, H., Pei, R., Zhu, W., Zeng, R., Wang, Y., Wang, Y., Lu, M., and Chen, X. (2014). An alternative splicing isoform of MITA antagonizes MITA-mediated induction of type I IFNs. *J Immunol* 192, 1162-1170.

Chen, H., Sun, H., You, F., Sun, W., Zhou, X., Chen, L., Yang, J., Wang, Y., Tang, H., Guan, Y., *et al.* (2011). Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell* 147, 436-446.

Cheon, H., Holvey-Bates, E.G., Schoggins, J.W., Forster, S., Hertzog, P., Imanaka, N., Rice, C.M., Jackson, M.W., Junk, D.J., and Stark, G.R. (2013). IFNbeta-dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *EMBO J* 32, 2751-2763.

Cheon, H., and Stark, G.R. (2009). Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9373-9378.

Chery, L., Lam, H.M., Coleman, I., Lakely, B., Coleman, R., Larson, S., Aguirre-Ghiso, J.A., Xia, J., Gulati, R., Nelson, P.S., *et al.* (2014). Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways. *Oncotarget* 5, 9939-9951.

Cleator, S., Tsimelzon, A., Ashworth, A., Dowsett, M., Dexter, T., Powles, T., Hilsenbeck, S., Wong, H., Osborne, C.K., O'Connell, P., *et al.* (2006). Gene expression patterns for doxorubicin (Adriamycin) and cyclophosphamide (cytoxan) (AC) response and resistance. *Breast Cancer Res Treat* 95, 229-233.

Coppe, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99-118.

Corrales, L., Glickman, L.H., McWhirter, S.M., Kanne, D.B., Sivick, K.E., Katibah, G.E., Woo, S.R., Lemmens, E., Banda, T., Leong, J.J., *et al.* (2015). Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep* 11, 1018-1030.

Cottu, P., Bieche, I., Assayag, F., El Botty, R., Chateau-Joubert, S., Thuleau, A., Bagarre, T., Albaud, B., Rapinat, A., Gentien, D., *et al.* (2014). Acquired resistance to endocrine treatments is associated with tumor-specific molecular changes in patient-derived luminal breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 20, 4314-4325.

Dangles-Marie, V., Pocard, M., Richon, S., Weiswald, L.B., Assayag, F., Saulnier, P., Judde, J.G., Janneau, J.L., Auger, N., Validire, P., *et al.* (2007). Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res* 67, 398-407.

Daniel, V.C., Marchionni, L., Hierman, J.S., Rhodes, J.T., Devereux, W.L., Rudin, C.M., Yung, R., Parmigiani, G., Dorsch, M., Peacock, C.D., *et al.* (2009). A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res* *69*, 3364-3373.

Datta, D., Flaxenburg, J.A., Laxmanan, S., Geehan, C., Grimm, M., Waaga-Gasser, A.M., Briscoe, D.M., and Pal, S. (2006). Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res* *66*, 9509-9518.

David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Larner, A.C., and Neel, B.G. (1995). Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* *15*, 7050-7058.

Dawson, S.J., Makretsov, N., Blows, F.M., Driver, K.E., Provenzano, E., Le Quesne, J., Baglietto, L., Severi, G., Giles, G.G., McLean, C.A., *et al.* (2010). BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer* *103*, 668-675.

de Beca, F.F., Caetano, P., Gerhard, R., Alvarenga, C.A., Gomes, M., Paredes, J., and Schmitt, F. (2013). Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol* *66*, 187-191.

de Ronde, J.J., Hannemann, J., Halfwerk, H., Mulder, L., Straver, M.E., Vrancken Peeters, M.J., Wesseling, J., van de Vijver, M., Wessels, L.F., and Rodenhuis, S. (2010). Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat* *119*, 119-126.

Decker, T., Lew, D.J., Mirkovitch, J., and Darnell, J.E. (1991). Cytoplasmic activation of GAF, an IFN- γ regulated DNA binding factor. *EMBO J* *10*, 927-932.

Dehqanzada, Z.A., Storrer, C.E., Hueman, M.T., Foley, R.J., Harris, K.A., Jama, Y.H., Shriver, C.D., Ponniah, S., and Peoples, G.E. (2007). Assessing serum cytokine profiles in breast cancer patients receiving a HER2/neu vaccine using Luminex technology. *Oncol Rep* *17*, 687-694.

Deng, L., Liang, H., Burnette, B., Beckett, M., Darga, T., Weichselbaum, R.R., and Fu, Y.X. (2014a). Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest* *124*, 687-695.

Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., *et al.* (2014b). STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* *41*, 843-852.

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., *et al.* (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* *28*, 105-113.

Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* *13*, 4429-4434.

DeRose, Y.S., Gligorich, K.M., Wang, G., Georgelas, A., Bowman, P., Courdy, S.J., Welm, A.L., and Welm, B.E. (2013). Patient-derived models of human breast cancer: protocols for in vitro and in vivo applications in tumor biology and translational medicine. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 14*, Unit14 23.

DeRose, Y.S., Wang, G., Lin, Y.C., Bernard, P.S., Buys, S.S., Ebbert, M.T., Factor, R., Matsen, C., Milash, B.A., Nelson, E., *et al.* (2011). Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med* 17, 1514-1520.

Di Nicolantonio, F., Arena, S., Tabernero, J., Grosso, S., Molinari, F., Macarulla, T., Russo, M., Cancelliere, C., Zecchin, D., Mazzucchelli, L., *et al.* (2010). Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *J Clin Invest* 120, 2858-2866.

Diner, E.J., and Vance, R.E. (2014). Taking the STING out of cytosolic DNA sensing. *Trends Immunol* 35, 1-2.

Dong, Q., Barsky, D., Colvin, M.E., Melius, C.F., Ludeman, S.M., Moravek, J.F., Colvin, O.M., Bigner, D.D., Modrich, P., and Friedman, H.S. (1995). A structural basis for a phosphoramidate mustard-induced DNA interstrand cross-link at 5'-d(GAC). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12170-12174.

Efimova, E.V., Liang, H., Pitroda, S.P., Labay, E., Darga, T.E., Levina, V., Lokshin, A., Roizman, B., Weichselbaum, R.R., and Khodarev, N.N. (2009). Radioresistance of Stat1 over-expressing tumour cells is associated with suppressed apoptotic response to cytotoxic agents and increased IL6-IL8 signalling. *Int J Radiat Biol* 85, 421-431.

Ellisen, L.W. (2011). PARP inhibitors in cancer therapy: promise, progress, and puzzles. *Cancer Cell* 19, 165-167.

Emadi, A., Jones, R.J., and Brodsky, R.A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 638-647.

Enblad, G., Karlsson, H., and Loskog, A.S. (2015). CAR T-Cell Therapy: The Role of Physical Barriers and Immunosuppression in Lymphoma. *Hum Gene Ther* 26, 498-505.

Ewertz, M., Duffy, S.W., Adami, H.O., Kvale, G., Lund, E., Meirik, O., Mellempgaard, A., Soini, I., and Tulinius, H. (1990). Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 46, 597-603.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., *et al.* (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 15, 68-74.

Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., *et al.* (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14, 518-527.

Flanagan, S.P. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 8, 295-309.

Foulkes, W.D., Smith, I.E., and Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363, 1938-1948.

Fournier, M.J., Gareau, C., and Mazroui, R. (2010). The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int* 10, 12.

Francois-Newton, V., Magno de Freitas Almeida, G., Payelle-Brogard, B., Monneron, D., Pichard-Garcia, L., Piehler, J., Pellegrini, S., and Uze, G. (2011). USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon alpha response. *PLoS One* 6, e22200.

Fryknas, M., Dhar, S., Oberg, F., Rickardson, L., Rydaker, M., Goransson, H., Gustafsson, M., Pettersson, U., Nygren, P., Larsson, R., *et al.* (2007). STAT1 signaling is associated with acquired crossresistance to doxorubicin and radiation in myeloma cell lines. *Int J Cancer* 120, 189-195.

Fu, J., Kanne, D.B., Leong, M., Glickman, L.H., McWhirter, S.M., Lemmens, E., Mechette, K., Leong, J.J., Lauer, P., Liu, W., *et al.* (2015). STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci Transl Med* 7, 283ra252.

Fu, X.Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8555-8559.

Gamcsik, M.P., Dolan, M.E., Andersson, B.S., and Murray, D. (1999). Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Curr Pharm Des* 5, 587-605.

Gao, S., von der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G., and Daumke, O. (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465, 502-506.

Gauzzi, M.C., Barbieri, G., Richter, M.F., Uze, G., Ling, L., Fellous, M., and Pellegrini, S. (1997). The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11839-11844.

Gillet, J.P., Calcagno, A.M., Varma, S., Marino, M., Green, L.J., Vora, M.I., Patel, C., Orina, J.N., Eliseeva, T.A., Singal, V., *et al.* (2011). Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18708-18713.

Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M.E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., Wicinski, J., Cabaud, O., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D., *et al.* (2010). CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest* 120, 485-497.

Goh, K.C., Haque, S.J., and Williams, B.R. (1999). p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *EMBO J* 18, 5601-5608.

Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F., and Hortobagyi, G.N. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 608, 1-22.

Goujon, C., Moncorge, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hue, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559-562.

Graeser, M.K., Engel, C., Rhiem, K., Gadzicki, D., Bick, U., Kast, K., Froster, U.G., Schlehe, B., Bechtold, A., Arnold, N., *et al.* (2009). Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 27, 5887-5892.

Green, A.R., Green, V.L., White, M.C., and Speirs, V. (1997). Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours. *Int J Cancer* 72, 937-941.

Greiner, J.W., Guadagni, F., Noguchi, P., Pestka, S., Colcher, D., Fisher, P.B., and Schlom, J. (1987). Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions in vivo. *Science* 235, 895-898.

Gundra, U.M., Girgis, N.M., Ruckerl, D., Jenkins, S., Ward, L.N., Kurtz, Z.D., Wiens, K.E., Tang, M.S., Basu-Roy, U., Mansukhani, A., *et al.* (2014). Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood* 123, e110-122.

Gupta, S., Yan, H., Wong, L.H., Ralph, S., Krolewski, J., and Schindler, C. (1996). The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of INF- α signals. *EMBO J* 15, 1075-1084.

Haabeth, O.A., Tveita, A.A., Fauskanger, M., Schjesvold, F., Lorvik, K.B., Hofgaard, P.O., Omholt, H., Munthe, L.A., Dembic, Z., Corthay, A., *et al.* (2014). How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? *Front Immunol* 5, 174.

Hait, W.N. (2010). Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat Rev Drug Discov* 9, 253-254.

Hartlova, A., Erttmann, S.F., Raffi, F.A., Schmalz, A.M., Resch, U., Anugula, S., Lienenklaus, S., Nilsson, L.M., Kroger, A., Nilsson, J.A., *et al.* (2015). DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity* 42, 332-343.

Hayes, D.F., Bast, R.C., Desch, C.E., Fritsche, H., Jr., Kemeny, N.E., Jessup, J.M., Locker, G.Y., Macdonald, J.S., Mennel, R.G., Norton, L., *et al.* (1996). Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 88, 1456-1466.

Hazlehurst, L.A., Enkemann, S.A., Beam, C.A., Argilagos, R.F., Painter, J., Shain, K.H., Saporta, S., Boulware, D., Moscinski, L., Alsina, M., *et al.* (2003). Genotypic and phenotypic comparisons of de novo and acquired melphalan resistance in an isogenic multiple myeloma cell line model. *Cancer Res* 63, 7900-7906.

He, G., Siddik, Z.H., Huang, Z., Wang, R., Koomen, J., Kobayashi, R., Khokhar, A.R., and Kuang, J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* 24, 2929-2943.

Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R., and Darnell, J.E., Jr (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267, 1347.

Hess, C.B., Niesel, D.W., and Klimpel, G.R. (1989). The induction of interferon production in fibroblasts by invasive bacteria: a comparison of Salmonella and Shigella species. *Microb Pathog* 7, 111-120.

Hess, K.R., Anderson, K., Symmans, W.F., Valero, V., Ibrahim, N., Mejia, J.A., Booser, D., Theriault, R.L., Buzdar, A.U., Dempsey, P.J., *et al.* (2006). Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol* 24, 4236-4244.

Heylmann, D., Bauer, M., Becker, H., van Gool, S., Bacher, N., Steinbrink, K., and Kaina, B. (2013). Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. *PLoS One* 8, e83384.

Horan, K.A., Hansen, K., Jakobsen, M.R., Holm, C.K., Soby, S., Unterholzner, L., Thompson, M., West, J.A., Iversen, M.B., Rasmussen, S.B., *et al.* (2013). Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors. *J Immunol* 190, 2311-2319.

Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514-518.

Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.

Hornung, V., Hartmann, R., Ablasser, A., and Hopfner, K.P. (2014). OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol* 14, 521-528.

Horvath, C.M., Stark, G.R., Kerr, I.M., and Darnell, J.E., Jr. (1996). Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol* 16, 6957-6964.

Huang, M., Miao, Z.H., Zhu, H., Cai, Y.J., Lu, W., and Ding, J. (2008). Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Mol Cancer Ther* 7, 1440-1449.

Hui, D.J., Bhasker, C.R., Merrick, W.C., and Sen, G.C. (2003). Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi. *J Biol Chem* 278, 39477-39482.

Huynh, M.L., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109, 41-50.

Hwang, S.Y., Hertzog, P.J., Holland, K.A., Sumarsono, S.H., Tymms, M.J., Hamilton, J.A., Whitty, G., Bertoncello, I., and Kola, I. (1995). A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11284-11288.

Iansante, V., Choy, P.M., Fung, S.W., Liu, Y., Chai, J.G., Dyson, J., Del Rio, A., D'Santos, C., Williams, R., Chokshi, S., *et al.* (2015). PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nat Commun* 6, 7882.

Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuricic, I., Inic, I., Pupic, G., and Jancic, S. (2014). Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin Med Insights Oncol* 8, 107-111.

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.

Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674-678.

Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* *461*, 788-792.

Itoh, N., Yonehara, S., Schreurs, J., Gorman, D.M., Maruyama, K., Ishii, A., Yahara, I., Arai, K., and Miyajima, A. (1990). Cloning of an interleukin-3 receptor gene: a member of a distinct receptor gene family. *Science* *247*, 324-327.

Jaks, E., Gavutis, M., Uze, G., Martal, J., and Piehler, J. (2007). Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol* *366*, 525-539.

Janicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C.G., Selbmann, H.K., Graeff, H., Schmitt, M., *et al.* (2001). Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* *93*, 913-920.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* *61*, 69-90.

Jeremiah, N., Neven, B., Gentili, M., Callebaut, I., Maschalidi, S., Stolzenberg, M.C., Goudin, N., Fremont, M.L., Nitschke, P., Molina, T.J., *et al.* (2014). Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest* *124*, 5516-5520.

Jiang, Z., Xu, Y., and Cai, S. (2010). CXCL10 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer. *Mol Biol Rep* *37*, 3029-3036.

Johnson, J.I., Decker, S., Zaharevitz, D., Rubinstein, L.V., Venditti, J.M., Schepartz, S., Kalyandrug, S., Christian, M., Arbuck, S., Hollingshead, M., *et al.* (2001). Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer* *84*, 1424-1431.

Kabos, P., Finlay-Schultz, J., Li, C., Kline, E., Finlayson, C., Wisell, J., Manuel, C.A., Edgerton, S.M., Harrell, J.C., Elias, A., *et al.* (2012). Patient-derived luminal breast cancer xenografts retain hormone receptor heterogeneity and help define unique estrogen-dependent gene signatures. *Breast Cancer Res Treat* *135*, 415-432.

Kamangar, F., Dores, G.M., and Anderson, W.F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* *24*, 2137-2150.

Kelley, M.R., Logsdon, D., and Fishel, M.L. (2014). Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol* *10*, 1215-1237.

Kenney, M.C., Chwa, M., Atilano, S.R., Falatoonzadeh, P., Ramirez, C., Malik, D., Tarek, M., Caceres-del-Carpio, J., Nesburn, A.B., Boyer, D.S., *et al.* (2014). Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet* *23*, 3537-3551.

Khodarev, N.N., Beckett, M., Labay, E., Darga, T., Roizman, B., and Weichselbaum, R.R. (2004). STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1714-1719.

Khodarev, N.N., Minn, A.J., Efimova, E.V., Darga, T.E., Labay, E., Beckett, M., Mauceri, H.J., Roizman, B., and Weichselbaum, R.R. (2007). Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumor cells. *Cancer Res* *67*, 9214-9220.

Knight, E., Jr., and Korant, B.D. (1979). Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 1824-1827.

Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K., and Komatsu, K. (2002). NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* *12*, 1846-1851.

Kohnken, R., Kodigepalli, K.M., and Wu, L. (2015). Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications. *Mol Cancer* *14*, 176.

Kondo, N., Takahashi, A., Mori, E., Ohnishi, K., McKinnon, P.J., Sakaki, T., Nakase, H., and Ohnishi, T. (2009). DNA ligase IV as a new molecular target for temozolomide. *Biochem Biophys Res Commun* *387*, 656-660.

Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., and Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids* *2010*, 543531.

Kondo, T., Kobayashi, J., Saitoh, T., Maruyama, K., Ishii, K.J., Barber, G.N., Komatsu, K., Akira, S., and Kawai, T. (2013). DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 2969-2974.

Kong, Y., Cui, H., Ramkumar, C., and Zhang, H. (2011). Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res* *2011*, 963172.

Konno, H., Konno, K., and Barber, G.N. (2013). Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. *Cell* *155*, 688-698.

Kuo, L.J., and Yang, L.X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* *22*, 305-309.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* *113 (Pt 20)*, 3613-3622.

Kutuzov, M.M., Khodyreva, S.N., Schreiber, V., and Lavrik, O.I. (2014). [The role of PARP2 in DNA repair]. *Mol Biol (Mosk)* *48*, 561-572.

Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabaratz, C., Lelievre, J.D., and Manel, N. (2013). The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. *Immunity* *39*, 1132-1142.

Lasfar, A., Cook, J.R., Cohen Solal, K.A., Reuhl, K., Kottenko, S.V., Langer, J.A., and Laskin, D.L. (2014). Critical role of the endogenous interferon ligand-receptors in type I and type II interferons response. *Immunology* *142*, 442-452.

Lavin, M.F., and Kozlov, S. (2007). DNA damage-induced signalling in ataxia-telangiectasia and related syndromes. *Radiother Oncol* *83*, 231-237.

Lee, A.H., Gillett, C.E., Ryder, K., Fentiman, I.S., Miles, D.W., and Millis, R.R. (2006). Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology* *48*, 692-701.

Lee, M.S., Kim, B., Oh, G.T., and Kim, Y.J. (2013). OASL1 inhibits translation of the type I interferon-regulating transcription factor IRF7. *Nat Immunol* *14*, 346-355.

Lee, Y., Auh, S.L., Wang, Y., Burnette, B., Wang, Y., Meng, Y., Beckett, M., Sharma, R., Chin, R., Tu, T., *et al.* (2009). Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* *114*, 589-595.

Legrier, M.E., Bieche, I., Gaston, J., Beurdeley, A., Yvonnet, V., Deas, O., Thuleau, A., Chateau-Joubert, S., Servely, J.L., Vacher, S., *et al.* (2016). Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* *114*, 177-187.

Legrier, M.E., Guyader, C., Ceraline, J., Dutrillaux, B., Oudard, S., Poupon, M.F., and Auger, N. (2009). Hormone escape is associated with genomic instability in a human prostate cancer model. *Int J Cancer* *124*, 1103-1111.

Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* *121*, 2750-2767.

Lekmine, F., Sassano, A., Uddin, S., Smith, J., Majchrzak, B., Brachmann, S.M., Hay, N., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2004). Interferon-gamma engages the p70 S6 kinase to regulate phosphorylation of the 40S S6 ribosomal protein. *Exp Cell Res* *295*, 173-182.

Leonard, W.J. (2001). Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* *1*, 200-208.

Leonard, W.J., and O'Shea, J.J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* *16*:293-322, 293-322.

Leong, H.S., Chambers, A.F., and Lewis, J.D. (2012). Assessing cancer cell migration and metastatic growth in vivo in the chick embryo using fluorescence intravital imaging. *Methods Mol Biol* *872*, 1-14.

Levin, D., Harari, D., and Schreiber, G. (2011). Stochastic receptor expression determines cell fate upon interferon treatment. *Mol Cell Biol* *31*, 3252-3266.

Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., and Darnell, J.E., Jr (1989). Cytoplasmic activation of ISGF3 the positive regulator of interferon- α stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes Dev* *3*, 1362-1371.

Li, W., Tai, Y., Zhou, J., Gu, W., Bai, Z., Zhou, T., Zhong, Z., McCue, P.A., Sang, N., Ji, J.Y., *et al.* (2012). Repression of endometrial tumor growth by targeting SREBP1 and lipogenesis. *Cell Cycle* *11*, 2348-2358.

Li, Y., Li, C., Xue, P., Zhong, B., Mao, A.P., Ran, Y., Chen, H., Wang, Y.Y., Yang, F., and Shu, H.B. (2009). ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 7945-7950.

Li, Y., Nichols, M.A., Shay, J.W., and Xiong, Y. (1994). Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* *54*, 6078-6082.

Liang, Y., Yan, C., and Schor, N.F. (2001). Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* *20*, 6570-6578.

Liedtke, C., Hatzis, C., Symmans, W.F., Desmedt, C., Haibe-Kains, B., Valero, V., Kuerer, H., Hortobagyi, G.N., Piccart-Gebhart, M., Sotiriou, C., *et al.* (2009). Genomic grade index is associated with response to chemotherapy in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* *27*, 3185-3191.

Lin, H.K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S.W., Chan, C.H., Yang, W.L., Wang, J., Egia, A., Nakayama, K.I., *et al.* (2010). Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* *464*, 374-379.

Liu, H., Patel, M.R., Prescher, J.A., Patsialou, A., Qian, D., Lin, J., Wen, S., Chang, Y.F., Bachmann, M.H., Shimono, Y., *et al.* (2010). Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18115-18120.

Liu, X.Y., Chen, W., Wei, B., Shan, Y.F., and Wang, C. (2011). IFN-induced TPR protein IFIT3 potentiates antiviral signaling by bridging MAVS and TBK1. *J Immunol* *187*, 2559-2568.

Livasy, C.A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T., and Perou, C.M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* *19*, 264-271.

Llanos, S., Clark, P.A., Rowe, J., and Peters, G. (2001). Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* *3*, 445-452.

Lo, B.K., Yu, M., Zloty, D., Cowan, B., Shapiro, J., and McElwee, K.J. (2010). CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am J Pathol* *176*, 2435-2446.

Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J.P., Hitre, E., *et al.* (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* *31*, 860-867.

Lollini, P.L., Bosco, M.C., Cavallo, F., De Giovanni, C., Giovarelli, M., Landuzzi, L., Musiani, P., Modesti, A., Nicoletti, G., Palmieri, G., *et al.* (1993). Inhibition of tumor growth and enhancement of metastasis after transfection of the gamma-interferon gene. *Int J Cancer* *55*, 320-329.

Luboshits, G., Shina, S., Kaplan, O., Engelberg, S., Nass, D., Lifshitz-Mercer, B., Chaitchik, S., Keydar, I., and Ben-Baruch, A. (1999). Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res* *59*, 4681-4687.

Lutfalla, G., Holland, S.J., Cinato, E., Monneron, D., Reboul, J., Rogers, N.C., Smith, J.M., Stark, G.R., Gardiner, K., Mogensen, K.E., *et al.* (1995). Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *EMBO J* *14*, 5100-5108.

Lv, D., Zhang, Y., Kim, H.J., Zhang, L., and Ma, X. (2013). CCL5 as a potential immunotherapeutic target in triple-negative breast cancer. *Cell Mol Immunol* *10*, 303-310.

Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Mattarollo, S.R., Delahaye, N.F., Pereira, P., Boucontet, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Casares, N., *et al.* (2011). Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med* *208*, 491-503.

Maclaine, N.J., and Hupp, T.R. (2009). The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging (Albany NY)* *1*, 490-502.

Magbanua, M.J., Wolf, D.M., Yau, C., Davis, S.E., Crothers, J., Au, A., Haqq, C.M., Livasy, C., Rugo, H.S., Esserman, L., *et al.* (2015). Serial expression analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy reveals changes in cell cycle and immune pathways associated with recurrence and response. *Breast Cancer Res* *17*, 73.

Makowska, Z., Duong, F.H., Trincucci, G., Tough, D.F., and Heim, M.H. (2011). Interferon-beta and interferon-lambda signaling is not affected by interferon-induced refractoriness to interferon-alpha in vivo. *Hepatology* 53, 1154-1163.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.

Marangoni, E., and Poupon, M.F. (2014). Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Curr Opin Oncol* 26, 556-561.

Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Auger, N., Degeorges, A., Assayag, F., de Cremoux, P., de Plater, L., Guyader, C., de Pinieux, G., Judde, J.G., *et al.* (2007). A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 13, 3989-3998.

Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., and Vinkemeier, U. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* 165, 823-833.

Matsuoka, M., Tani, K., and Asano, S. (1998). Interferon-alpha-induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages. *Oncogene* 16, 2075-2086.

McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C., and Reich, N.C. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J* 21, 1754-1763.

McBride, K.M., McDonald, C., and Reich, N.C. (2000). Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 19, 6196-6206.

Mccoy, J.L., Rucker, R., and Petros, J.A. (2000). Cell-mediated immunity to tumor-associated antigens is a better predictor of survival in early stage breast cancer than stage, grade or lymph node status. *Breast Cancer Res Treat* 60, 227-234.

McWhirter, S.M., Barbalat, R., Monroe, K.M., Fontana, M.F., Hyodo, M., Joncker, N.T., Ishii, K.J., Akira, S., Colonna, M., Chen, Z.J., *et al.* (2009). A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J Exp Med* 206, 1899-1911.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Meek, D.W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* 9, 714-723.

Mei, K., Wang, L., Tian, L., Yu, J., Zhang, Z., and Wei, Y. (2008). Antitumor efficacy of combination of interferon-gamma-inducible protein 10 gene with gemcitabine, a study in murine model. *J Exp Clin Cancer Res* 27, 63.

Melen, K., Kinnunen, L., and Julkunen, I. (2001). Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* 276, 16447-16455.

Mimeault, M., and Batra, S.K. (2013). Emergence of zebrafish models in oncology for validating novel anticancer drug targets and nanomaterials. *Drug Discov Today* 18, 128-140.

Mittendorf, E.A., Philips, A.V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Akcakanat, A., *et al.* (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2, 361-370.

Miyashita, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., and Seya, T. (2011). DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 31, 3802-3819.

Moestue, S.A., Borgan, E., Huuse, E.M., Lindholm, E.M., Sitter, B., Borresen-Dale, A.L., Engebraaten, O., Maelandsmo, G.M., and Gribbestad, I.S. (2010). Distinct choline metabolic profiles are associated with differences in gene expression for basal-like and luminal-like breast cancer xenograft models. *BMC Cancer* 10, 433.

Mook, S., Bonnefoi, H., Pruneri, G., Larsimont, D., Jaskiewicz, J., Sabadell, M.D., Macgrogan, G., Van't Veer, L.J., Cardoso, F., and Rutgers, E.J. (2009). Daily clinical practice of fresh tumour tissue freezing and gene expression profiling; logistics pilot study preceding the MINDACT trial. *Eur J Cancer* 45, 1201-1208.

Moore, N., Houghton, J., and Lyle, S. (2012). Slow-cycling therapy-resistant cancer cells. *Stem Cells Dev* 21, 1822-1830.

Morales, J.C., Xia, Z., Lu, T., Aldrich, M.B., Wang, B., Rosales, C., Kellems, R.E., Hittelman, W.N., Elledge, S.J., and Carpenter, P.B. (2003). Role for the BRCA1 C-terminal repeats (BRCT) protein 53BP1 in maintaining genomic stability. *J Biol Chem* 278, 14971-14977.

Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., *et al.* (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117.

Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.

Mulligan, A.M., Raitman, I., Feeley, L., Pinnaduwege, D., Nguyen, L.T., O'Malley, F.P., Ohashi, P.S., and Andrusis, I.L. (2013). Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry. *Clin Cancer Res* 19, 336-346.

Murphy, T.L., Geissal, E.D., Farrar, J.D., and Murphy, K.M. (2000). Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 20, 7121-7131.

Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T., Tsunashima, R., Tominaga, N., Baba, Y., Kim, S.J., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2011). High genomic grade index associated with poor prognosis for lymph node-negative and estrogen receptor-positive breast cancers and with good response to chemotherapy. *Cancer* 117, 472-479.

Nicolae, C.M., Aho, E.R., Choe, K.N., Constantin, D., Hu, H.J., Lee, D., Myung, K., and Moldovan, G.L. (2015). A novel role for the mono-ADP-ribosyltransferase PARP14/ARTD8 in promoting homologous recombination and protecting against replication stress. *Nucleic Acids Res* 43, 3143-3153.

Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., *et al.* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 5367-5374.

Niwa, Y., Akamatsu, H., Niwa, H., Sumi, H., Ozaki, Y., and Abe, A. (2001). Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clin Cancer Res* 7, 285-289.

Oakes, S.R., Vaillant, F., Lim, E., Lee, L., Breslin, K., Feleppa, F., Deb, S., Ritchie, M.E., Takano, E., Ward, T., *et al.* (2012). Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 2766-2771.

Oberst, A., Malatesta, M., Aqeilan, R.I., Rossi, M., Salomoni, P., Murillas, R., Sharma, P., Kuehn, M.R., Oren, M., Croce, C.M., *et al.* (2007). The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11280-11285.

Ortaldo, J.R., Mason, A., Rehberg, E., Moschera, J., Kelder, B., Pestka, S., and Herberman, R.B. (1983). Effects of recombinant and hybrid recombinant human leukocyte interferons on cytotoxic activity of natural killer cells. *J Biol Chem* *258*, 15011-15015.

Ouyang, S., Song, X., Wang, Y., Ru, H., Shaw, N., Jiang, Y., Niu, F., Zhu, Y., Qiu, W., Parvatiyar, K., *et al.* (2012). Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding. *Immunity* *36*, 1073-1086.

Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F.L., Walker, M.G., Watson, D., Park, T., *et al.* (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* *351*, 2817-2826.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* *12*, 252-264.

Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., *et al.* (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* *27*, 1160-1167.

Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M.W., Gregory, D.A., Johnson, M.C., and Bieniasz, P.D. (2009). Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* *139*, 499-511.

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de, R.M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747-752.

Pestka, S. (2007). The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* *282*, 20047-20051.

Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.A., Gorna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Burckstummer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L., *et al.* (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat Immunol* *12*, 624-630.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* *314*, 997-1001.

Piehler, J., Thomas, C., Garcia, K.C., and Schreiber, G. (2012). Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunol Rev* *250*, 317-334.

Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* *5*, 375-386.

Podhorecka, M., Skladanowski, A., and Bozko, P. (2010). H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids* *2010*.

Podo, F., Buydens, L.M., Degani, H., Hilhorst, R., Klipp, E., Gribbestad, I.S., Van Huffel, S., van Laarhoven, H.W., Luts, J., Monleon, D., *et al.* (2010). Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol* 4, 209-229.

Postow, M.A., Callahan, M.K., Barker, C.A., Yamada, Y., Yuan, J., Kitano, S., Mu, Z., Rasalan, T., Adamow, M., Ritter, E., *et al.* (2012). Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med* 366, 925-931.

Potu, H., Sgorbissa, A., and Brancolini, C. (2010). Identification of USP18 as an important regulator of the susceptibility to IFN-alpha and drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 70, 655-665.

Pourquier, P. (2006). Dna repair, a potential target for anticancer drug development. . *Bulletin du Cancer* 93, 124-144.

Prat, A., Adamo, B., Cheang, M.C., Anders, C.K., Carey, L.A., and Perou, C.M. (2013). Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 18, 123-133.

Prat, A., Galvan, P., Jimenez, B., Buckingham, W., Jeiranian, H.A., Schaper, C., Vidal, M., Alvarez, M., Diaz, S., Ellis, C., *et al.* (2016). Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy Using Core Needle Biopsy Samples with the Prosigna Assay. *Clin Cancer Res* 22, 560-566.

Quiros, S., Roos, W.P., and Kaina, B. (2010). Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* 9, 168-178.

Rebsamen, M., Heinz, L.X., Meylan, E., Michallet, M.C., Schroder, K., Hofmann, K., Vazquez, J., Benedict, C.A., and Tschopp, J. (2009). DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep* 10, 916-922.

Renauld, J.C. (2003). Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 3, 667-676.

Rice, G.I., del Toro Duany, Y., Jenkinson, E.M., Forte, G.M., Anderson, B.H., Ariaudo, G., Bader-Meunier, B., Baidam, E.M., Battini, R., Beresford, M.W., *et al.* (2014). Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet* 46, 503-509.

Richter, M.F., Dumenil, G., Uze, G., Fellous, M., and Pellegrini, S. (1998). Specific contribution of Tyk2 JH regions to the binding and the expression of the interferon alpha/beta receptor component IFNAR1. *J Biol Chem* 273, 24723-24729.

Roberson, R.S., Kussick, S.J., Vallieres, E., Chen, S.Y., and Wu, D.Y. (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* 65, 2795-2803.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.

Rolli, V., O'Farrell, M., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1997). Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching. *Biochemistry* 36, 12147-12154.

Roos, G., Leanderson, T., and Lundgren, E. (1984). Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells. *Cancer Res* 44, 2358-2362.

Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Naumann, S.C., Kiedron, O., Zdzienicka, M.Z., and Kaina, B. (2009). Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)* 8, 72-86.

Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., *et al.* (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11, 5678-5685.

Russo, J., Mailo, D., Hu, Y.F., Balogh, G., Sheriff, F., and Russo, I.H. (2005). Breast differentiation and its implication in cancer prevention. *Clin Cancer Res* 11, 931s-936s.

Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., *et al.* (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20842-20846.

Sandholm, J., and Selander, K.S. (2014). Toll-like receptor 9 in breast cancer. *Front Immunol* 5, 330.

Sandig, H., and Bulfone-Paus, S. (2012). TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front Immunol* 3, 185.

Sauer, J.D., Sotelo-Troha, K., von Moltke, J., Monroe, K.M., Rae, C.S., Brubaker, S.W., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Woodward, J.J., Portnoy, D.A., *et al.* (2011). The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect Immun* 79, 688-694.

Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32, 513-545.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 517-528.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69-74.

Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., and Bonner, W.M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158, 486-492.

Senechal, C., Rey, F., Callet, N., This, P., Nogues, C., Stoppa-Lyonnet, D., and Fourme, E. (2016). [Hormonotherapy for breast cancer prevention: What about women with genetic predisposition to breast cancer?]. *Bull Cancer* 103, 273-281.

Sexl, V., Kovacic, B., Piekorz, R., Moriggl, R., Stoiber, D., Hoffmeyer, A., Liebming, R., Kudlacek, O., Weisz, E., Rothhammer, K., *et al.* (2003). Jak1 deficiency leads to enhanced Abelson-induced B-cell tumor formation. *Blood* 101, 4937-4943.

Sgroi, D.C., Sestak, I., Cuzick, J., Zhang, Y., Schnabel, C.A., Schroeder, B., Erlander, M.G., Dunbier, A., Sidhu, K., Lopez-Knowles, E., *et al.* (2013). Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol* 14, 1067-1076.

Shang, G., Zhu, D., Li, N., Zhang, J., Zhu, C., Lu, D., Liu, C., Yu, Q., Zhao, Y., Xu, S., *et al.* (2012). Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 725-727.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.

Sharma, S., DeOliveira, R.B., Kalantari, P., Parroche, P., Goutagny, N., Jiang, Z., Chan, J., Bartholomeu, D.C., Lauw, F., Hall, J.P., *et al.* (2011). Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* *35*, 194-207.

Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* *14*, 289-300.

Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* *6*, 1221-1228.

Shu, C., Yi, G., Watts, T., Kao, C.C., and Li, P. (2012). Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 722-724.

Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V.R., and Darnell, J.E. (1992). Activation of transcription by IFN γ : tyrosine phosphorylation of a 91 kDa DNA binding protein. *Science* *258*, 1808-1812.

Shyu, R.Y., Chang, S.C., Yu, J.C., Hsu, S.J., Chou, J.M., Lee, M.S., and Jiang, S.Y. (2005). Expression and regulation of retinoid-inducible gene 1 (RIG1) in breast cancer. *Anticancer Res* *25*, 2453-2460.

Simon, R.M., Paik, S., and Hayes, D.F. (2009). Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* *101*, 1446-1452.

Singh, J.K., Farnie, G., Bundred, N.J., Simoes, B.M., Shergill, A., Landberg, G., Howell, S.J., and Clarke, R.B. (2013a). Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. *Clin Cancer Res* *19*, 643-656.

Singh, J.K., Simoes, B.M., Clarke, R.B., and Bundred, N.J. (2013b). Targeting IL-8 signalling to inhibit breast cancer stem cell activity. *Expert Opin Ther Targets* *17*, 1235-1241.

Siolas, D., and Hannon, G.J. (2013). Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* *73*, 5315-5319.

Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D.P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E.E., Remedios, C., *et al.* (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* *20*, 1301-1309.

Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* *108*, 73-112.

Smits, V.A., Klompmaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T.P., and Medema, R.H. (2000). p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* *275*, 30638-30643.

Song, M.M., and Shuai, K. (1998). The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 273, 35056-35062.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de, R.M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.

Sotiriou, C., Wirapati, P., Loi, S., Harris, A., Fox, S., Smeds, J., Nordgren, H., Farmer, P., Praz, V., Haibe-Kains, B., *et al.* (2006). Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98, 262-272.

Sparano, J.A., and Paik, S. (2008). Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 26, 721-728.

Spranger, S., Spaapen, R.M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T.T., and Gajewski, T.F. (2013). Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med* 5, 200ra116.

Stawowczyk, M., Van Scoy, S., Kumar, K.P., and Reich, N.C. (2011). The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J Biol Chem* 286, 7257-7266.

Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., and Medzhitov, R. (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587-598.

Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.

Strehlow, I., and Schindler, C. (1998a). Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem* 273, 28049-28056.

Strehlow, I., and Schindler, C. (1998b). Amino-terminal Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Domains Regulate Nuclear Translocation and STAT Deactivation. *J Biol Chem* 273, 28049-28056.

Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., *et al.* (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 4, e838.

Sun, W., Li, Y., Chen, L., Chen, H., You, F., Zhou, X., Zhou, Y., Zhai, Z., Chen, D., and Jiang, Z. (2009). ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8653-8658.

Svensson, S., Abrahamsson, A., Rodriguez, G.V., Olsson, A.K., Jensen, L., Cao, Y., and Dabrosin, C. (2015). CCL2 and CCL5 Are Novel Therapeutic Targets for Estrogen-Dependent Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 21, 3794-3805.

Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., *et al.* (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.

Tanaka, Y., and Chen, Z.J. (2012). STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal* 5, ra20.

Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* 15, 4234-4241.

Taylor, J. (1964). Inhibition of interferon action by actinomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 14, 447-451.

te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62, 1876-1883.

Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C., Welch, M., Schreiber, R.D., de la Torre, J.C., and Oldstone, M.B. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340, 207-211.

ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M., and Shuai, K. (2002). Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22, 5662-5668.

Thyrell, L., Erickson, S., Zhivotovsky, B., Pokrovskaja, K., Sangfelt, O., Castro, J., Einhorn, S., and Grander, D. (2002). Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21, 1251-1262.

Tischkowitz, M., Brunet, J.S., Begin, L.R., Huntsman, D.G., Cheang, M.C., Akslen, L.A., Nielsen, T.O., and Foulkes, W.D. (2007). Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 7, 134.

Toolan, H.W. (1951). Successful subcutaneous growth and transplantation of human tumors in X-irradiated laboratory animals. *Proc Soc Exp Biol Med* 77, 572-578.

Topp, M.D., Hartley, L., Cook, M., Heong, V., Boehm, E., McShane, L., Pyman, J., McNally, O., Ananda, S., Harrell, M., *et al.* (2014). Molecular correlates of platinum response in human high-grade serous ovarian cancer patient-derived xenografts. *Mol Oncol* 8, 656-668.

Trippett, T., Schlemmer, S., Elisseyeff, Y., Goker, E., Wachter, M., Steinherz, P., Tan, C., Berman, E., Wright, J.E., Rosowsky, A., *et al.* (1992). Defective transport as a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphocytic leukemia. *Blood* 80, 1158-1162.

Tsuchida, T., Zou, J., Saitoh, T., Kumar, H., Abe, T., Matsuura, Y., Kawai, T., and Akira, S. (2010). The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* 33, 765-776.

Uddin, S., Majchrzak, B., Woodson, J., Arunkumar, P., Alsayed, Y., Pine, R., Young, P.R., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem* 274, 30127-30131.

Uddin, S., Sassano, A., Deb, D.K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A.B., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2002). Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J Biol Chem* 277, 14408-14416.

Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomaki, S., Janne, O.A., Palvimo, J.J., and Silvennoinen, O. (2003). PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* 102, 3311-3313.

Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., *et al.* (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 11, 997-1004.

Vaillant, F., Merino, D., Lee, L., Breslin, K., Pal, B., Ritchie, M.E., Smyth, G.K., Christie, M., Phillipson, L.J., Burns, C.J., *et al.* (2013). Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell* 24, 120-129.

van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., *et al.* (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.

van der Kuip, H., Murdter, T.E., Sonnenberg, M., McClellan, M., Gutzeit, S., Gerteis, A., Simon, W., Fritz, P., and Aulitzky, W.E. (2006). Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* 6, 86.

van Miltenburg, M.H., and Jonkers, J. (2012). Using genetically engineered mouse models to validate candidate cancer genes and test new therapeutic approaches. *Curr Opin Genet Dev* 22, 21-27.

Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., Muller, M., and Decker, T. (2003). Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* 19, 793-802.

Velasco-Velazquez, M., Jiao, X., De La Fuente, M., Pestell, T.G., Ertel, A., Lisanti, M.P., and Pestell, R.G. (2012). CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer Res* 72, 3839-3850.

Vinkemeier, U., Cohen, S.L., Moarefi, I., Chait, B.T., Kuriyan, J., and Darnell, J.E., Jr. (1996). DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 15, 5616-5626.

von Minckwitz, G., and Martin, M. (2012). Neoadjuvant treatments for triple-negative breast cancer (TNBC). *Ann Oncol* 23 *Suppl* 6, vi35-vi39.

Vyas, S., and Chang, P. (2014). New PARP targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 14, 502-509.

Wang, S.W., and Sun, Y.M. (2014). The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). *Int J Oncol* 44, 1032-1040.

Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276, 47759-47762.

Ward, I.M., Minn, K., and Chen, J. (2004). UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. *J Biol Chem* 279, 9677-9680.

Weichselbaum, R.R., Ishwaran, H., Yoon, T., Nuyten, D.S., Baker, S.W., Khodarev, N., Su, A.W., Shaikh, A.Y., Roach, P., Kreike, B., *et al.* (2008). An interferon-related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18490-18495.

Welsby, I., Hutin, D., Gueydan, C., Kruys, V., Rongvaux, A., and Leo, O. (2014). PARP12, an interferon-stimulated gene involved in the control of protein translation and inflammation. *J Biol Chem* 289, 26642-26657.

West, A.P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M.C., Pineda, C.M., Lang, S.M., Bestwick, M., Duguay, B.A., Raimundo, N., MacDuff, D.A., *et al.* (2015). Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 520, 553-557.

White, M.J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R.M., Cambier, J.C., Herold, M.J., van Delft, M.F., Bedoui, S., Lessene, G., Ritchie, M.E., *et al.* (2014). Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell* 159, 1549-1562.

Wilson, E.B., Yamada, D.H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B.J., Karp, C.L., and Brooks, D.G. (2013). Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340, 202-207.

Wolf, D.M., Lenburg, M.E., Yau, C., Boudreau, A., and van 't Veer, L.J. (2014). Gene co-expression modules as clinically relevant hallmarks of breast cancer diversity. *PLoS One* 9, e88309.

Yan, Z., Zak, R., Luxton, G.W., Ritchie, T.C., Bantel-Schaal, U., and Engelhardt, J.F. (2002). Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol* 76, 2043-2053.

Yeh, Y.C., Wu, C.C., Wang, Y.K., and Tang, M.J. (2011). DDR1 triggers epithelial cell differentiation by promoting cell adhesion through stabilization of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 22, 940-953.

Yi, G., Brendel, V.P., Shu, C., Li, P., Palanathan, S., and Cheng Kao, C. (2013). Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. *PLoS One* 8, e77846.

Yin, Q., Tian, Y., Kabaleeswaran, V., Jiang, X., Tu, D., Eck, M.J., Chen, Z.J., and Wu, H. (2012). Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. *Mol Cell* 46, 735-745.

Yokoe, T., Iino, Y., Takei, H., Horiguchi, J., Koibuchi, Y., Maemura, M., Ohwada, S., and Morishita, Y. (1997). Changes of cytokines and thyroid function in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res* 17, 695-699.

You, M., Yu, D.H., and Feng, G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 19, 2416-2424.

Zhan, J.F., Chen, L.H., Yuan, Y.W., Xie, G.Z., Sun, A.M., Liu, Y., and Chen, Z.X. (2011). STAT1 promotes radioresistance of CD44(+)/CD24(-/low) cells in breast cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 418-422.

Zhang, J., Hu, M.M., Wang, Y.Y., and Shu, H.B. (2012). TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. *J Biol Chem* 287, 28646-28655.

Zhang, X., Bogunovic, D., Payelle-Brogard, B., Francois-Newton, V., Speer, S.D., Yuan, C., Volpi, S., Li, Z., Sanal, O., Mansouri, D., *et al.* (2015). Human intracellular ISG15 prevents interferon-alpha/beta over-amplification and auto-inflammation. *Nature* 517, 89-93.

Zhang, X., Claerhout, S., Prat, A., Dobrolecki, L.E., Petrovic, I., Lai, Q., Landis, M.D., Wiechmann, L., Schiff, R., Giuliano, M., *et al.* (2013). A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res* 73, 4885-4897.

Zhang, Y., Burke, C.W., Ryman, K.D., and Klimstra, W.B. (2007). Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *J Virol* *81*, 11246-11255.

Zhao, X., Liu, Z., Yu, L., Zhang, Y., Baxter, P., Voicu, H., Gurusiddappa, S., Luan, J., Su, J.M., Leung, H.C., *et al.* (2012). Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma. *Neuro Oncol* *14*, 574-583.

Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., *et al.* (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* *29*, 538-550.

Zhu, X., Wen, Z., Xu, L.Z., and Darnell, J.E., Jr (1997). Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol Cell Biol* *17*, 6618-6623.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542-1548.